

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成 30 年度分担研究報告書

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）
分担研究項目：遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの確立

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 准教授

研究要旨

平成 30 年度は、遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVM モデル）の検出力を検証するため、7 種の遺伝毒性肝発がん物質、3 種の非肝発がん物質、及び 1 種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24 時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、「Positive」と判定されたものはすべて遺伝毒性発がん物質（4 物質）であった。また、非肝発がん物質の 4 物質はすべて「Negative」と判定された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質のうち、2 物質が偽陰性となった。これらの物質のうち 1 つは肝発がん性がないという文献も見られるが、今後も調査・検討が必要である。

A. 研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保障する。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高度化・標準化を目的に、平成23年度～28年度「化学物質の安全性と発がん性リスク評価としての短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究」（吉見班）で蓄積してきた病理組織発がんマーカーおよび試験法をより一層精度化し、確立する必要がある。6研究施設による協同体制にて多数の化学物質を同時に評価することにより、評価法の標準化を推進し、国際動向を見据えたOECDテストガイドライン化を実現する。

当施設ではこれまで開発した遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立する。本研究の特色は化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に予測できる評価法及びヒトへの外挿に必要な発がんメカニズムに関する情報が得られる試験系を確立することにある。

平成29年度は、TGP由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため、4種の遺伝毒性肝発がん物質及び7種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、遺伝子セットを用いた判定方法により、遺伝毒性発がん物質が正確に判定されており、この方法は遺伝毒性発がん物質の検出に有用性が確認された。

平成30年度は、引き続き、遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため、7種の遺伝毒性肝発がん物質、3種の非肝発がん物質、及び1種類の非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。

B. 研究方法

平成 30 年度では、遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の発がん物質について、ラット単回投与試験（剖検は投与 24 時間後）を行い、得られた肝組織から遺伝

子発現データを取得した。動物試験は 3 施設（担当：鰐淵/魏、塚本、横平）で行われたが、当施設では被験物質として、7 種の遺伝毒性肝発がん物質、3 種の非肝発がん物質、及び 1 種類の非遺伝毒性非発がん物質について検討した（表 1）。動物試験プロトコルは事前に共有・配布し、プロトコルに従い試験を実施した。遺伝子発現については、リアルタイム PCR でのデータを取得した。

日本チャールズリバー社（神奈川県厚木）より購入した 4 週齢の SD ラット（雄性）について、2 週間の馴化期間の後に実験を開始した。群構成を表 2 に示す。馴化期間に体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。実験開始時に、体重測定を行いながら体重当たりの投与量に調整した被験物質を各動物に強制胃内投与した。被験物質の投与濃度は表 3 の通りである。被験物質投与後 24 時間後に剖検を行った。剖検は、イソフルラン（abbvie #B506）吸入麻酔後、腹部大動脈から自然放血により安楽死させた。安楽死後、開腹し、臓器に肉眼的異常の有無を観察した。肝臓を摘出し、RNA 抽出用として、外側左葉（LL）を摘出後、下端辺縁部を約 2cm×0.5cm の大きさで 2 スライス切り出した。それぞれ 1mL の RNA later が入った 1.5mL チューブへ移した（合計 2 本、そのうち 1 本は、他施設でのバリデーション用）、1.5mL チューブを 4 で一晩保管後、-80℃へ長期保管した。

凍結保存サンプル用として、RNA 抽出用に採材した後の残りの外側左葉の上半分を 1.5ml チューブ 2 本分採取し、液体窒素により凍結後、ディープフリーザーにて凍結保管した（一本は DNA adduct 解析用）。ホルマリン固定用サンプルは、外側左葉の下半分、内側右葉（RM）および右葉尾部（R2）から計 3 スライス切り出し、カセットにおいて 10%ホルマリンにて固定した。

リアルタイム RT-PCR については施設共通のプロトコルを基に行った。具体的には、肝臓からの total RNA 抽出は RNeasy mini kit（キアゲン）を使用し、3mm×3mm 程度の肝組織片から total RNA を抽出した。30μL の RNase free H₂O で溶出した。cDNA の合成は Super

Script IV VIL0 Maste Mix(invitrogen) のキットを使用し、total RNA 1000 ng とした。逆転写反応は、total 20 μ L の volume で行った。サーマルサイクラーによる反応は、25 :10min、50 :10min、85 :5min、4 : とした。

QPCR 用サンプルは「RT 反応液(20 μ l)+ MilliQ 80 μ l = 100 μ l」で調整した。TaqMan Fast Universal PCR Master Mixes (サーモフィッシャー) を使用し、リアルタイム PCR 反応をおこなった。用いたプライマーは表 4 の通りである。

(倫理面への配慮)

いずれの動物実験も実験に先立ち、香川大学、動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に総合生命科学センター、同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

C. 研究結果

2 群において検討予定であった物質の Vinyl chloride であるが、予定していた高濃度の試薬を入手することが困難であり、この群は実験から削除した。

実験中、全群とも外見に異常を認めなかったが、被験物質投与後 24 時間後に 1 群 (2-Nitrosopropane 群) の 1 匹の死亡が確認された。

肝臓の病理組織所見では、1 群 (2-Nitrosopropane 群) はうっ血、門脈域を中心とする炎症細胞浸潤 (多形核白血球、リンパ球) を認めた。その他の群では、陰性対照群とくらべて、わずかな炎症細胞浸潤～変化は乏しい印象であった。

リアルタイム RT-PCR の結果を表 5 に示す。この結果を代表研究者に送り、遺伝子発現データを構築済の肝発がん性予測モデル (サポートベクターマシンのような数理的アルゴリズムによるモデル) に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。その結果、2-Nitrosopropane (1 群)、4,4'-Methylene (4 群)、Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate (6 群)、Retrorsine (7 群) が「Positive」と判定された。その他の、4,4'-Oxydianiline (3 群)、2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene) (5 群)、Butylated hydroxyanisole (BHA) (8 群)、Methimazole (MTZ) (9 群)、Sulfasalazine (SS) (10 群)、Allyl alcohol (AA) (11 群) はいずれも「Negative」と判定された。

D. 考察

今回の検討により、肝臓をターゲットとしない発がん物質や非遺伝毒性非発がん物の合計 4 物質はすべて陰性と判定された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質の 6 物質 (陽性対照を除く) のうち、2 物質は陰性と判定され、偽陰性となった。これらの 2 物質は Ames 試験陽性であるが、*in vivo* における肝発がん性についての文献報告を調査した。2,4-Dinitrotoluene については、Ames 試験は陽性であるものの、*in vivo* における肝

発がん性は乏しいという報告があった (Leonard TB. et al., 1987)。この報告は本試験系での陰性の理由を支持するものである。一方で、4,4'-Oxydianiline については、ラットにおける明らかな肝発がんが報告されている (Maronpot RR. et al., 1989)。この物質が本試験系で陰性となった要因については今後も引き続き調査・検討が必要である。

今回の実験から、本試験系において少なくとも「Positive」と判定された物質は遺伝毒性肝発癌物質であると言えることが濃厚となった。一方で、非発癌物質を高精度で「Negative」と判定できるような試験系の考慮も必要と考えられる。この研究全体 (多施設共同研究) としては、多数の物質についての検証を行うが、それぞれの非発癌物質について、10 の遺伝子マーカーの 1 つずつの発現状況を見直す必要があると考えられる。すなわち、今回の一連の実験結果を踏まえて、本試験系を「Positive」判定を目的としたものと「Negative」判定を目的としたものの 2 つに分ける必要があるかもしれないと考える (2 つの試験系は採用する遺伝子セットが異なる)。

E. 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定方法により、「Positive」と判定されたものはすべて遺伝毒性発がん物質 (4 物質) であった。また、非肝発癌物質の 4 物質はすべて「Negative」と判定された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質のうち、2 物質が偽陰性となった。これらの物質のうち 1 つは肝発がん性がないという文献も見られるが、今後も調査・検討が必要である。

本試験系のさらなる有用性を確認することができたが、今後も本試験系の限界や改良についての検証を引き続き行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Hashimoto N, Kanie S, Yoshida S, Imaida K., Characteristics of surfactant proteins in tumorigenic and inflammatory lung lesions in rodents. J. Toxicol. Pathol., 31(4):231-240. 2018.
- 2) Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K. Validating the use of napsin A as a marker for identifying tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in rodents. Exp. Toxicol. Pathol., 69(8): 637-642, 2017.
- 3) Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K. Suppressive effects of the

expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 30(2):153-159. 2017.

3 . その他
該当なし

2.学会発表

- 1) 横平政直、肺胞サーファクタントの役割と発癌リスク評価への応用 (The Role of Surfactant proteins and the Application for Assessment of the risk of Carcinogenesis) 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会、日本毒性病理学会、沖縄、2018.01
- 2) 横平政直、肺過形成性病変の発癌リスク評価における napsin A の発現と予防作用検出の試み、がん予防学術大会 2018 高松、がん予防学会、2018.06

G.知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

表 1 今回の検討で用いた被験物質についての情報

Cas.No	Name			
遺伝毒性肝発がん物質				
75-01-4	Vinyl chloride	和光純薬	228-02221	塩化ビニル標準液
101-80-4	4,4'-Oxydianiline	和光純薬	044-00781	4,4'-ジアミノジフェニルエーテル
101-14-4	4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)	東京化成	M0609	4,4'-Methylenebis
121-14-2	2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene)	東京化成	D0856	2,4-Dinitrotoluene
13674-87-8	Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate	和光純薬	203-06892	りん酸トリス
480-54-6	Retrorsine	SIGMA	R0382	レトルルシン
Ames(-)肝以外の臓器発がん性(+)				
25013-16-5	Butylated hydroxyanisole (BHA)	abcam	ab142841	Butylated hydroxyanisole
60-56-0	Methimazole (MTZ)	abcam	ab142320	Methimazole
599-79-1	Sulfasalazine (SS)	SIGMA-ADRI	190-17022	スルファサラジン
Ames(-)臓器発がん性(-)				
107-18-6	Allyl alcohol (AA)	東京化成	A0218	Allyl Alcohol

表 2 今回の実験における群構成

Group	Name		Oral LD50	
			mg/kg	投与量 (1/3 of LD50)
1	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照)	720	240
2	Vinyl chloride	遺伝毒性肝発がん物質	500	170
3	4,4'-Oxydianiline	遺伝毒性肝発がん物質	725	240
4	4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)	遺伝毒性肝発がん物質	1140	380
5	2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene)	遺伝毒性肝発がん物質	286	100
6	Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate	遺伝毒性肝発がん物質	1850	620
7	Retrorsine	遺伝毒性肝発がん物質	34	10
8	Butylated hydroxyanisole (BHA)	Ames(-) 肝以外の臓器発がん性(+)	2000	670
9	Methimazole (MTZ)		2250	750
10	Sulfasalazine (SS)		15600	2000
11	Allyl alcohol (AA)	Ames(-) 臓器発がん性(-)	64	20
12	0.5% Methyl cellulose			5ml/kg b.w.

表3 被験物質の投与量の調整

Group	Name		Oral LD50 (rat) mg/kg	投与量 (1/3 of LD50)	被験物質 量 (mg)	Volume (5% mC ml)	投与濃度 (mg/5ml/kg b.w)
1	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽性対照)	720	240	480	10	240
2	Vinyl chloride	遺伝毒性肝発がん物質	500	170	340	10	170
3	4,4'-Oxydianiline	遺伝毒性肝発がん物質	725	240	480	10	240
4	4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline)	遺伝毒性肝発がん物質	1140	380	760	10	380
5	2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene)	遺伝毒性肝発がん物質	286	100	200	10	100
6	Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate	遺伝毒性肝発がん物質	1850	620	1240	10	620
7	Retrorsine	遺伝毒性肝発がん物質	34	10	20	10	10
8	Butylated hydroxyanisole (BHA)	Ames(-) 肝以外の臓器発がん性(+)	2000	670	1340	10	670
9	Methimazole (MTZ)		2250	750	1500	10	750
10	Sulfasalazine (SS)		15600	2000	4000	10	2000
11	Allyl alcohol (AA)	Ames(-) 臓器発がん性(-)	64	20	40	10	20
12	0.5% Methyl cellulose			5ml/kg b.w.		10	

表4 リアルタイム RT-PCR で用いたプライマー

遺伝子	プローブNo.	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
1385132_at	#46	ggtagtggtgaagtcagtttcca	ttttctgaagatgccaaqca
Aen	#112	ggcctgccctcactctaaa	agcggtaagaaagctctgga
Atp6v1f	#105	tgaaatcgaagacactttcagg	gctccttggacgggatct
Rage	#66	ccagtcacaactggtcatcttc	cagactagtcggcccctgt
Cdkn1a	#21	gatccacagcgatacgcagac	acatcaccaggatcggacat
Fam49a	#56	cacactcttctcctggatcttga	aggatgctctcggatctctg
Glr3	#53	ccacagtggtacagatgaacg	aacagcttcggcttccag
Nudt5	#78	ggctacaaaggtgacattgct	gcagtttgacaagcctggat
Phlda3	#10	accacgaggcataccatttt	caaccaaccaaagtgacag
RGD1308114	#60	atggcctcgttatggagatg	tgctctgacatcttgaacttg

表5 リアルタイム RT-PCR の結果

	G1	G3	G4	G5	G6
Gene Symbol	Log 2-Nitrosopropane	Log 4,4'-Oxydianiline	Log 4,4'-Methylene	Log 2,4-Dinitrotruenene	Log Tris
Glrx3	2.29	0.19	2.85	0.78	1.35
Nudt5	1.91	0.21	2.56	0.75	1.13
Phlda3	3.54	-0.48	2.36	0.39	0.76
Cdkn1a	5.14	1.06	4.23	1.37	2.04
Atp6v1f	2.00	0.27	1.96	0.62	0.70
Rage	4.46	0.24	3.54	0.90	1.25
Aen	5.71	1.02	3.74	1.14	1.64
1385132_at	5.01	-0.25	5.93	1.73	2.07
RGD1308114	-3.04	-0.14	-3.07	-1.68	0.08
Fam49a	2.53	0.68	2.27	0.80	1.11
	G7	G8	G9	G10	G11
Gene Symbol	Log Retororsine	Log Butylated hydroxyanisole	Log Methimazole	Log Sulfasalazine	Log Allyl alcohol
Glrx3	0.47	0.30	1.52	0.46	0.04
Nudt5	0.73	0.67	2.05	0.53	0.04
Phlda3	0.70	0.18	1.10	-0.30	0.01
Cdkn1a	2.93	0.01	0.06	-0.06	0.10
Atp6v1f	0.10	0.12	1.05	0.45	0.31
Rage	1.25	0.62	1.07	0.45	0.14
Aen	1.79	0.59	2.46	0.45	0.14
1385132_at	2.80	-0.17	0.70	-1.11	0.17
RGD1308114	-1.26	0.21	0.44	0.88	-0.04
Fam49a	0.81	0.51	0.71	0.50	0.22