

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

研究代表者 鰐淵英機 大阪市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授

## 研究要旨

本研究は化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化を可能とする評価モデルの構築を目的とし、遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルの開発および検証を行った。遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 30 物質についてラット単回投与を行い、投与 24 時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10 遺伝子）の発現データを qPCR で取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ（感度 46%）、その他の全ての物質（15 物質）で陰性判定が得られた（特異度 100%）。平成 29 年度に比して感度が低い理由として、今回投与した用量と腫瘍発生率が 50%となる用量（TD50）に差が少なかった物質が多く含まれた可能性がある。肝発がん性予測モデルのより高い精度を目指して、投与量の設定や陰性と判定された理由について検討する必要性が生じた。一方、特異度は 100%で本検出モデルの特異性を強く示せた。

### 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・安心を保障する重要な基盤となる。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高精度化・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及び試験法をより一層発展・高精度化し、高精度発がん評価モデルとして確立する。さらに国際的に認知させる必要があるため、それらの発がん性評価法のOECDテストガイドライン化を目指すことが重要である。そこで、本申請研究においては、OECDテストガイドライン化の成立を最終目的として、6研究施設による協同体制にて下記に記す三つの研究を実施する。第一に、膀胱を標的とする発がん物質を用いた28日間反復投与試験及び大腸を標的とする発がん物質を用いた90日間反復投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた大腸及び膀胱発がんリスク評価法を確立する。第二に、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。第三に、上記の試料を用いてDNA付加体を網羅的に解析しカタログ化する方法（アダクトーム解析）による化学物質のDNA損傷を指標とした遺伝毒性評価法を開発する。

平成 30 年度は、我々が構築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を確立するために、13 種類の遺伝毒性肝発がん物質及び 15 種類のそれ以外の化合物（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質）を「陰性」と判定する。その結果、遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ（感度 46%）、その他の全ての物質（15 物質）で陰性判定が得られた（特異度 100%）。また、今回用いた遺伝毒性肝発がん物質について、その投与した用量と腫瘍発生率が 50%となる用量（TD50）を比較検討した結果、大半が「投与量/TD50」比率が 100 以下であり（表 2）、平成 29 年度（平均：531）に比べ、低いこ

発がん物質）について、ラット単回投与試験を行い、得られた遺伝子発現データを予測モデルに入力し、判定を行った。

### B．研究方法

遺伝毒性肝発がん物質を含めた種々の化学物質 28 種類について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。動物試験および遺伝子解析は 3 施設（香川大・藤田医科大学・大阪市立大）で行われた。

各施設で得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（サポートベクターマシーンによる数理的アルゴリズムによるモデル）に入力し、判定を行った。

（倫理面への配慮）

各施設の動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

### C．研究結果

各施設で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った（表 1）。本モデルでは、遺伝毒性肝発がん物質を「陽性」、その他の物質（非遺伝毒性肝発がん物質、肝以外の発がん物質、非発がん物質）を「陰性」と判定する。その結果、遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、6 物質について陽性判定が得られ（感度 46%）、その他の全ての物質（15 物質）で陰性判定が得られた（特異度 100%）。また、今回用いた遺伝毒性肝発がん物質について、その投与した用量と腫瘍発生率が 50%となる用量（TD50）を比較検討した結果、大半が「投与量/TD50」比率が 100 以下であり（表 2）、平成 29 年度（平均：531）に比べ、低いこ

とが判明した。

## D. 考察

遺伝毒性肝発がん物質 13 物質のうち、7 物質について陰性と判定された原因の一つとして、今回の投与量と TD50 の関係が挙げられる。表 2 に示すとおり発癌を示す投与量に対する今回の投与量の差が少ないため、遺伝子発現変化も結果的に小さくなり、偽陰性として判定された可能性がある。平成 29 年度では、10 化学物質中 8 つが「投与量/TD50」比率が 100 以上と高い値を示す。今後、精度を上げるには許容される最大容量を用いる必要性も考える。

表 1 遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた判定結果

被検物質	投与量 (mg/kg)	判定結果
Ames(+) 肝発がん性(+)	2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	240 Positive
	Nitrosoheptamethyleneimine (NHMI)	90 Positive
	Ethylene thiourea (ETU)	610 Negative
	Benzidine (BZ)	100 Negative
	Auramine-O (AO)	500 Positive
	Hydrazine (HZ)	20 Negative
	4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	240 Negative
	4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline) (MBOCA)	380 Positive
	Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate (TDCPP)	620 Positive
	Retrorsine (RTS)	10 Positive
	Vinyl bromide (VB)	170 Negative
	Dichloroacetic acid (DCA)	940 Negative
	Hydrazine sulfate (HS)	200 Negative
	Acid Red 26 (AR-26)	2000 Positive
Ames(-) 肝発がん性(+)	Hexachlorobenzene (HCB)	2000 Negative
	Carbon tetrachloride (CCL4)	780 Negative
	Gemfibrozil (GFZ)	470 Negative
	Ethinylestradiol (EE)	320 Negative
	Coumarin	100 Negative
Ames(+) 発がん性(-)	2,4-Dinitrotoluene (DNT)	100 Negative
	Isoniazid (INH)	420 Negative
Ames(-) 肝以外発がん性(+)	Butylated hydroxyanisole (BHA)	670 Negative
	Methimazole (MTZ)	750 Negative
	Sulfasalazine (SS)	2000 Negative
Ames(-) 発がん性(-)	Allyl alcohol (AA)	20 Negative
	Furosemide (FUR)	870 Negative
	Chlorpheniramine (CHL)	40 Negative
	Chlorpropamide (CPP)	720 Negative
	Methylidopa (MDP)	1670 Negative

表 2 遺伝毒性肝発がん物質の判定結果および TD50 との関係

被検物質	投与量 (mg/kg)	判定結果	TD50 (mg/kg/day)	Folds (投与量/TD50)
2-Nitropropane (2-NP) (陽性対照物質)	240	Positive	-	-
Nitrosoheptamethyleneimine (NHMI)	90	Positive	0.0378	2381
Ethylene thiourea (ETU)	610	Negative	8.13	75
Benzidine (BZ)	100	Negative	1.73	58
Auramine-O (AO)	500	Positive	11	45
Hydrazine (HZ)	20	Negative	0.613	33
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	240	Negative	9.51	25
4,4'-Methylene-bis(2-chloro-aniline) (MBOCA)	380	Positive	19.3	20
Tris-(1,3-dichloro-2-propyl)phos-phate (TDCPP)	620	Positive	46.4	13
Retrorsine (RTS)	10	Positive	0.862	12
Vinyl bromide (VB)	170	Negative	18.5	9
Dichloroacetic acid (DCA)	940	Negative	161	6
Hydrazine sulfate (HS)	200	Negative	40.8	5
Acid Red 26 (AR-26)	2000	Positive	415	5

## E. 結論

我々が構築した遺伝子セットを用いた肝発がん性予測モデルは、去年度に比べ感度が低くなったが、その理由として、今回用いた投与量が発がん用量に近い容量設定で行ったための可能性がある。一方で特異度は 100%と、特異度は 100%で本検出モデルの特異性を強く示せた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatu N, Kakehashi A, Takeuchi A, Endo G, Endo Y, Wanibuchi H. Acetoaceto-o-toluidide enhances cellular proliferative activity in the urinary bladder of rats. *Toxicol Sci*. 2019, in press.
- Okuno T, Kakehashi A, Ishii N, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. mTOR Activation in Liver Tumors Is Associated with Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis in Both Mouse Models and Humans. *Cancers (Basel)*. 2018; 10: 465.
- Gi M, Fujioka M, Yamano S, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Yamaguchi T, Tago Y, Kitano M, Hayashi SM, Wanibuchi H. Chronic dietary toxicity and carcinogenicity studies of dammar resin in F344 rats. *Arch Toxicol*. 2018; 92: 3565-83.
- Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Okuno T, Masumura K, Nohmi T, Matsumoto M, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. In vivo positive mutagenicity of 1,4-dioxane and quantitative analysis of its mutagenicity and carcinogenicity in rats. *Arch Toxicol*. 2018; 92: 3207-21.
- Fukushima S, Gi M, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Matsumoto M. Quantitative Approaches to Assess Key Carcinogenic Events of Genotoxic Carcinogens. *Toxicol Res*. 2018; 34: 291-6.
- Shimizu Y, Tamada S, Kato M, Takeyama Y, Fujioka M, Kakehashi A, Nakatani T, Wanibuchi H, Gi M. Steroid sulfatase promotes invasion through epithelial-mesenchymal transition and predicts the progression of bladder cancer. *Exp Ther Med*. 2018; 16: 4463-70.
- Oikawa D, Shiota M, Tokunaga F, Wanibuchi H. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for DZIP3. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018; 37: 153-7.
- Oikawa D, Shiota M, Goto E, Komakura K, Wanibuchi H, Tokunaga F. Generation of Rat Monoclonal Antibodies Against a Deubiquitinase, Ovarian Tumor Domain-Containing Protein 1. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018; 37: 180-4.
- Kitajima S, Lee KL, Fujioka M, Sun W, You J, Chia GS, Wanibuchi H, Tomita S, Araki M, Kato H, Poellinger L. Hypoxia-inducible factor-2 alpha up-regulates CD70 under hypoxia and enhances anchorage-independent growth and aggressiveness in cancer cells. *Oncotarget*. 2018; 9: 19123-35.

### 2. 学会発表

- 1) 鰐淵英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕．環境化学物質による発がん細胞傷害・修復の破綻．第 107 回日本病理学会総会、北海道（2018 年 6 月）（ワークショップ）
- 2) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、魏民、鰐淵英機．非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の肝細胞と肝がんにおけるプロテオーム解析．第 107 回日本病理学会総会、北海道（2018 年 6 月）
- 3) 奥野高裕、石井真美、梯アンナ、魏民、鰐淵英機．NASH 由来の肝細胞癌における mTOR の活性化．第 107 回日本病理学会総会、北海道（2018 年 6 月）
- 4) 魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕、鰐淵英機．職業性胆管がんにおける疫学および動物モデルでの知見．第 25 回日本がん予防学会学術総会、香川（2018 年 6 月）
- 5) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性の検討．第 33 回発癌病理研究会、静岡（2018 年 8 月）
- 6) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機．有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid のマウス経胎盤ばく露による発がん機序の検討．第 77 回日本癌学会学術総会、大阪（2018 年 9 月）
- 7) 奥野高裕、行松直、藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機．Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮細胞の増殖と DNA 傷害を誘発する．第 77 回日本癌学会学術総会、大阪（2018 年 9 月）
- 8) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、藤岡正喜、多胡善幸、魏民、鰐淵英機．メタボリックシンドロームモデル TSOD マウスにおける NASH 肝臓組織及び腫瘍のメタボローム解析．第 77 回日本癌学会学術総会、大阪（2018 年 9 月）
- 9) 魏民、藤岡正喜、奥野高裕、行松直、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機．ラットにおける 1,4-dioxane の変異原性と発がん性の定量的解析．第 77 回日本癌学会学術総会、大阪（2018 年 9 月）
- 10) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機．マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の発がん性およびその機序．日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会 2018、宮城（2018 年 11 月）
- 11) 奥野高裕、行松直、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．職業性膀胱癌に関わるヒト膀胱癌の特徴と実験病理学的解析．第 18 回分子予防環境医学研究会大会、愛知県（2019 年 1 月）
- 12) 行松直、奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．o-Acetoacetotoluidide による膀胱に対する毒性、発がんプロモーション作用の検討．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 1 月）
- 13) 山口貴嗣、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．ジフェニルアルシン酸の F344 ラットにおける慢性毒性試験及び発がん性試験．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 1 月）
- 14) 魏民、藤岡正喜、行松直、奥野高裕、山口貴嗣、梯アンナ、鰐淵英機．BBN 誘発マウス膀胱がんモデルにおける Acetazolamide の予防効果の検討．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 2 月）
- 15) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、多胡善幸、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機．NASH モデル TSOD マウスにおける肝臓腫瘍および肝臓組織のメタボローム解析．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 2 月）
- 16) 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機．有機ヒ素化合物 Dimethylarsinic acid の経胎盤ばく露によるマウス肺発がん過程におけるヒストン修飾異常．第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京都（2019 年 2 月）

## 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

### 3. その他

該当なし