

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和元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 60 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。これまで 23 の遺伝毒性肝発がん物質を検討したが、今回はそのうち偽陰性となった 6 物質について投与用量を上げて検討した。その結果、6 物質のうち 2 物質が陽性となった。これまでに取得した 60 物質のデータを総合すると、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 82.6%(19/23)及び特異度 97.3%(36/37)と、高い精度で検出できる可能性が示唆された。

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日間反復投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた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。

令和元年度は、前年度までに解析した遺伝毒性肝発がん物質 23 種のうち、偽陰性となった 6 種の物質について、投与用量を上げ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

偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質 6 種（表 1）

(Benzidine (BZ), Hydrazine (HZ), 4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA), Dichloroacetic acid (DCA), Vinyl bromide (VB), Hydrazine sulfate (HS))について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。投与用量（各物質の LD50 の 1/2 および 1/3）を用いた。動物試験および遺伝子解析は 3 施設（香川大・藤田医科大・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。

表 1 令和元年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質

被検物質	TD50	投与量		判定結果	正否
	(mg/kg/day)	(mg/kg)	Dose/LD50		
Benzidine (BZ)	1.73	150	1/2	Negative	×
		210	2/3	Negative	×
Hydrazine (HZ)	0.613	30	1/2	Negative	×
		40	2/3	Negative	×
4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)	9.51	360	1/2	Negative	×
		480	2/3	Negative	×
Vinyl bromide (VB)	18.5	250	1/2	Negative	×
		330	2/3	Negative	×
Dichloroacetic acid (DCA)	161	1410	1/2	Negative	×
		1880	2/3	Positive	○
Hydrazine sulfate (HS)	40.8	300	1/2	Positive	○
		400	2/3	Positive	○

（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」、その他の物質を「陰性」と判定する。偽陰性であった 6 物質のうち、HS については、LD50 の 1/2 および 2/3 投与量で、DCA については LD50 の 2/3 投与量で、陽性となった。

結果、60 物質での結果は、感度 82.6%(19/23)、特異度 97.3%(36/37)となった。

D . 考察

遺伝毒性肝発がん物質検出モデルの検証では、偽陰性となった 6 物質のうち、HS が LD50 の 1/2 および 2/3 投与時に、DCA が LD50 の 2/3 投与時に陽性と判定された。これまでに取得した 60 物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 82.6%(19/23)および特異度 97.3% (36/37)と、高い精度で検出できる可能性が示唆された。

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遺伝毒性肝発がん物質を高い精度で検出できる可能性が示唆された。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) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H: Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. Arch Toxicol. 2020; 94: 927-37.
- 2) Yukimatsu N, Gi M, Okuno T, Fujioka M, Suzuki S, Kakehashi A, Yanagiba Y, Suda M, Koda S, Nakatani T, Wanibuchi H. Promotion effects of acetoaceto-o-toluidide on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. Arch Toxicol. 2019; 93: 3617-3631.
- 3) Yoshida K, Gi M, Fujioka M, Teramoto I, Wanibuchi H. Long-term administration of excess zinc impairs learning and memory in aged mice. J Toxicol Sci. 2019; 44: 681-691.
- 4) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Tago Y, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in the drinking water of C57BL/6J mice for 52 weeks. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 127-134.
- 5) Takakuwa T, Okuno T, Nishimoto M, Nanno S, Takeoka Y, Nakashima Y, Koh H, Nakane T, Wanibuchi H, Hino M, Nakamae H. [Refractory ascites caused by lymphatic flow disorder after stem cell transplantation for acute myeloid leukemia]. Rinsho Ketsueki. 2019; 60: 12-16.

- 6) Osawa T, Shimamura T, Saito K, Hasegawa Y, Ishii N, Nishida M, Ando R, Kondo A, Anwar M, Tsuchida R, Hino S, Sakamoto A, Igarashi K, Saitoh K, Kato K, Endo K, Yamano S, Kanki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y, Wanibuchi H, Hayashi M, Hamada A, Yoshida M, Yachida S, Nakao M, Sakai J, Aburatani H, Shibuya M, Hanada K, Miyano S, Soga T, Kodama T. Phosphoethanolamine Accumulation Protects Cancer Cells under Glutamine Starvation through Downregulation of PCYT2. Cell Rep. 2019; 29: 89-103 e107.
 - 7) Okuno T, Yashiro M, Masuda G, Togano S, Kuroda K, Miki Y, Hirakawa K, Ohsawa M, Wanibuchi H, Ohira M. Establishment of a New Scirrhous Gastric Cancer Cell Line with FGFR2 Overexpression, OCUM-14. Ann Surg Oncol. 26: 2019; 1093-1102.
 - 8) Okuno T, Gi M, Fujioka M, Yukimatsu 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; 169: 456-464.
 - 9) Ohira T, Kojima H, Kuroda Y, Aoki S, Inaoka D, Osaki M, Wanibuchi H, Okada F, Oshimura M, Kugoh H. PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription. PLoS One. 2019; 14: e0217605.
 - 10) Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. Mutagenesis. 2019; 34: 279-287.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 魏民、梯アンナ、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機 . ジフェニルアルシン酸のマウス経胎盤ばく露による肝発がん作用. 第 36 回日本毒性病理学会総会、東京 (2020 年 2 月)
 - 2) 梯アンナ、石井直美、魏民、鈴木周五、鰐淵英機 . NASH 肝臓発がんにおける新規マーカー候補分子の同定. 第 36 回日本毒性病理学会総会、東京 (2020 年 2 月)
 - 3) 行松直、魏民、梯アンナ、鈴木周五、鰐淵英機 . ラットにおける BBN 誘発膀胱発がんに対する o-Acetoacetotoluidide の促進効果. 第 36 回日本毒性病理学会総会、東京 (2020 年 2 月)
 - 4) 魏民、鰐淵英機 . 機能性食品の安全性評価 . 日本食品化学学会第 35 回食品化学シンポジウム、東京都 (2019 年 11 月)
 - 5) Hideki Wanibuchi. Japanese Society of Toxicologic Pathology: Current Status and Future Prospects. 第 3 回中国薬学会毒性病理専門学術検討会、中華人民共和国 (2019 年 11 月)

- 6) 鰐淵英機、魏民、梯アンナ、鈴木周五．ジフェニルアルシン酸の長期毒性及びその発現機序 - 動物試験から得られた知見 - .第 23 回ヒ素シンポジウム、群馬県、(2019 年 11 月)
- 7) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、山下依子、鰐淵英機、高橋智．ラット尿路上皮に対するコチニンの腫瘍促進効果．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 8) 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の肝臓癌におけるアルギニン及び糖代謝産物の蓄積．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 9) 鰐淵英機、魏民．芳香族アミンによる職業性膀胱がんに関する最新知見．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 10) 魏民、藤岡正喜、大石裕司、鈴木周五、梯アンナ、山口貴嗣、鰐淵英機．ジフェニルアルシン酸の胎仔期ばく露におけるマウス肝発がん性の検討．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 11) 行松直、奥野高裕、魏民、梯アンナ、鰐淵英機．ラットにおける BBN 誘発膀胱発がんに対するアセトアセト-o-トルイジドの促進効果．第 78 回日本癌学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
- 12) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、梯アンナ、高橋智、鰐淵英機．Nicotine の膀胱発がん促進効果とその機序．第 34 回発癌病理研究会、三重(2019 年 8 月)
- 13) 小島肇、小川久美子、西川秋佳、若林敬二、鰐淵英機、林真、福島昭治、遠山千春．実験動物を用いた安全性・リスク評価に携わる人材育成の必要性．第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019 年 6 月)
- 14) 鰐淵英機、魏民．In vivo 発がん物質短・中期検出法の開発．第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019 年 6 月)
- 15) 奥野高裕、魏民、梯アンナ、末水洋志、秦順一、鰐淵英機．アフラトキシン B1 はキメラ化したヒト化 TK-NOG マウスのヒト肝領域を特異的に障害する．第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019 年 6 月)
- 16) 梯アンナ、石井真美、奥野高裕、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のメタボローム解析．第 108 回日本病理学会総会、東京 (2019 年 5 月)
- 17) 奥野高裕、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機．Acetoaceto-o-toluidide はラット膀胱上皮の細胞増殖を促進し、発がん促進作用を示す．第 108 回日本病理学会総会、東京 (2019 年 5 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