

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

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

### 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の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。本年度はこれまでの検討で偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の3物質について投与用量を上げて検討した。その結果、すべては「陰性」と判定された。この結果から、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特異度で検出できるが、偽陰性になる物質がある。今後も本試験系の検出限界や改良についての検証を引き続き行う必要がある。

### 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、この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。

本研究の意義は、成果となる発がん性評価法及びガイドラインが、化学物質の有害性評価において汎用的に用いられかつ厚生労働行政施策の科学的基盤となることであり、得られた発がん性に関する情報は厚生労働行政施策への活用が非常に期待できる。また、得られる成果は国内のみならず、化学物質の安全性評価に係る国際的な試験法やガイドライン等への活用も期待される。

平成29年度および平成30年度の検討の結果、遺伝毒性発がん物質の検出に本モデルの有用性が確認された一方で、偽陰性を示す物質が認められた。令和元年度（平成31年度）では、陰性と判定された遺伝毒性肝発がん物質3種類について、投与量を上げた再検討を実施した。

### B. 研究方法

これまでの検討で陰性と判定された遺伝毒性肝発がん物質であるBenzidine (BZ)、Hydrazine (HZ)および4,4'-Oxydianiline (4,4'-ODA)について、ラット単回強制胃内投与試験を行った。実験動物は6週齢の雄SDラットを用いた。投与量はこれまでに検討したLD50の1/2からLD50の1/2および2/3に上げた（表1）。

被験物質投与後24時間後に剖検を行った。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の大きさに2スライス切り出し、それぞれ1mLのRNAlaterが入った1.5mLチューブに移した（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℃で長期保管した。凍結保存サンプル用として、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、-80℃凍結保管した（1本はDNA adduct解析用）。ホルマリン固定用サンプルとして、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)及び右葉尾部(R2)から計3スライス切り出し、カセットに入れ10%ホルマリンにて固定した。

遺伝子発現については、リアルタイムPCRにてデータを取得した。リアルタイムRT-PCRは施設共通のプロトコールに従って行った。肝臓からのtotal RNA抽出とcDNAの合成はそれぞれRNeasy mini kit（キアゲン）とSuper Script VI VIL0 Maste Mix(invitrogen）のキットを使用した。

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、陽性または陰性の判定を行った。

（倫理面への配慮）

大阪市立大学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

qPCR 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。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質（非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質）を「陰性」と判定する。その結果、本年度に検討した3物質はすべて「陰性」と判定された(表1)。

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	×

### D. 考察

遺伝毒性肝発がん物質の3物質が偽陰性となった。今後、検出精度を上げるには偽陰性物質について最大耐量を用いて再評価する必要があると考えられる。

### 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特異度で検出できるが、偽陰性になる物質がある。今後も本試験系の検出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) 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.
- 6) 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) Gi M. Novel *in vivo* Bioassays for Prediction of Chemical Carcinogenicity, The 3th Chinese Pharmaceutical Association-Society of Toxicologic pathology (CPA-STP) Meeting, Shu Zhou, China（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) 梯アンナ、石井直美、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）
- 8) 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）
- 9) 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）
- 10) 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）
- 11) 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）
- 12) 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）
- 13) 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）
- 14) 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