

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 塚本徹哉 藤田医科大学医学部病理診断学 教授

## 研究要旨

環境中の様々な化学物質の曝露は発がん要因の1つとして重要であり、その発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性肝発がん性を判定できる24時間ラット超短期動物試験系を用い、化学物質の肝発がん性の評価法を検討した。遺伝毒性肝発がん物質（2-Nitropropane）を陽性対照、溶媒の0.5% Methyl cellulose (MC)を陰性対象群とし、昨年度までの検討で、偽陰性となった2種類の遺伝毒性肝発がん物質（Vinyl Bromide、Hydrazinium Sulfate）を低用量あるいは高容量投与した時のラット肝の10遺伝子（1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114）の転写レベルの発現データを検討し、サポートベクターマシーン（SVM）による肝発がん性予測数理工学的モデルを用いて解析した。その結果、Vinyl Bromideは陰性判定となったが、Hydrazinium Sulfateは遺伝毒性肝発がん物質と判定された。判定に変動がある物質や従来との知見と異なる評価となった物質に関しては化学物質特異的な代謝等、今後更なる検討が必要と考えられた。

## A．研究目的

環境中の様々な化学物質の曝露は発がん要因の1つとして重要であり、その発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は喫緊の課題である。本研究では、トキシコゲノミクス手法から得た遺伝毒性発がん性マーカーセットにより、遺伝毒性・発がん性を判定できるラット超短期動物試験系を用い、化学物質の遺伝毒性・発がん性評価法の確立を目指す。

## B．研究方法

30匹の6週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラットを以下の6群に分け、1週間後に実験に供した。

溶媒の0.5% Methyl cellulose (MC)を陰性対象群とした(G1)。陽性対照として240 mg/kg 体重 (body weight, BW) 2-Nitropropaneを用いた (G6)。

被験化学物質として、H29年度、H30年度の検討で、1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114の10遺伝子を用いた判定で陽性所見の得られなかった遺伝毒性肝発がん物質2物質について2用量の再検討を試み、以下の4群を設定した：Vinyl Bromide, 250 mg/kg 体重 (G2)、Vinyl Bromide, 330 mg/kg 体重 (G3)、Hydrazinium Sulfate, 300 mg/kg 体重 (G4)、Hydrazinium Sulfate, 400 mg/kg 体重 (G5)。

DIMS 医科学研究所において、以上の群について、6週齢オス Sprague-Dawley (SD)ラット単回強制胃内投与試験（各群5匹）を行い、24時間後に剖検を行い、得られた肝組織の一部を凍結保存した。藤田医科大学にて、肝組織から total RNA を抽出 (RNeasy mini kit, QIAGEN) 後、cDNA を作製 (SuperScript IV VIL0

Mater Mix, ThermoFisher) した。18S rRNA を内部標

準として (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control, ThermoFisher) 昨年と同様の10遺伝子 (1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) について、ABI PRISM-7900HTを用いて、標識した Roche Universal Primer を使い、real time RT-PCR 法により遺伝子発現データを取得した。

結果は、対照群を0としたときの Ct 値で表した。その値を、大阪市大で構築済の肝発がん性予測モデル (サポートベクターマシーン (SVM) による数理工学的アルゴリズムによるモデル) に入力し、遺伝毒性肝発がん性の評価を行った。

(倫理面の配慮)

動物実験は、動物の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議、2006年) 及び藤田医科大学動物実験取扱規定を遵守した。なお、動物実験は DIMS 医科学研究所に委託し、現地で研修ののち遂行した。

## C．研究結果

陰性対象 (G1) を0とした時の10遺伝子 (1385132\_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) の

Ct 値を算出した。Groups: 2, 3, 4, 5, 6 について、それぞれ以下の通りであった。

1385132\_at: -1.18, -0.68, 0.68, 1.89, 3.02

Aen: -0.50, -0.00, 2.35, 3.23, 4.05

Atp6v1f: -0.16, 0.07, 0.78, 1.17, 1.35

Rage: -0.30, -0.10, 0.98, 1.75, 3.79

Cdkn1a : -0.42, -0.05, 3.80, 4.11, 5.04  
Fam49a : -0.19, -0.01, 1.31, 1.54, 1.95  
Glx3 : -0.27, -0.02, 0.83, 1.59, 2.00  
Nudt5 : -0.14, 0.04, 1.08, 1.49, 1.37  
Phlda3 : -0.47, 0.17, 1.30, 1.54, 3.05  
RGD1308114 : -0.46, -0.20, -0.30, -0.81, -4.13

SVMによる解析の結果では、G2-5の被験物質のうち、Vinyl Bromideは陰性となったが、Hydrazinium Sulfateの2群は低用量、高用量において用量依存性がありいずれも陽性と判定された。

#### D . 考察

平成29年度、平成30年度のreal-time PCRを用いた定量PCRで、遺伝毒性肝発がん物質の中に、陰性判定となるものがあつたため、施設を替えて再検討を行った。その結果、Hydrazinium Sulfateの2群は低用量、高用量とも陽性と判定され、予想通りの判定結果が得られた。

#### E . 結論

10 遺伝子の発現量の変動を解析することにより、24時間という超短期間で、化学物質の遺伝毒性肝発がん性の予測が可能なモデルの構築が可能と判断された。しかし、予測と異なる判定となる物質があること、再評価で判定が異なることがあることなど、さらに詳細な検討が必要と考えられた。また、解析アルゴリズムが2-Nitropropaneによって得られたデータに基づいているため、異なる化学物質の代謝特異性等の評価も不可欠と考えられた。

#### F . 研究発表

##### 1 . 論文発表

- 1) Teramoto A, Yamada A, Kiriyama Y, Tsukamoto T, Yan K, Zhang L, Imaizumi K, Saito K, Fujita H. Automated classification of benign and malignant cells from lung cytological images using deep convolutional

neural network. Informatics in Medicine Unlocked 2019; 16: 100205.

- 2) Teramoto A, Tsukamoto T, Yamada A, Kiriyama Y, Imaizumi K, Saito K, Fujita H. Deep learning approach to classification of lung cytological images: Two-step training using actual and synthesized images by progressive growing of generative adversarial networks. PLoS One. 2020; 15: e0229951.
- 3) Cao D, Zhao D, Jia Z, Su T, Zhang Y, Wu Y, Wu M, Tsukamoto T, Oshima M, Jiang J, Cao X. Reactivation of Atp4a concomitant with intragenic DNA demethylation for cancer inhibition in a gastric cancer model. Life Sci. 2020; 242: 117214.

#### 2 . 学会発表

- 1) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、シンポジウム 毒性病理学会からのトピックス：新しい評価法への挑戦 「人工知能を使ったヒト肺癌細胞像の自動分類」.第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 2) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、深層学習によるヒト肺癌細胞像自動分類：アーキテクチャーの違いと分類精度の比較、第60回日本臨床細胞学会総会（春期大会）東京（2019年6月）

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1 . 特許取得

なし

##### 2 . 実用新案登録

なし

##### 3 . その他

なし