

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

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検討を行った。多種の遺伝毒性肝発がん物質、非肝発がん物質、及び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、本モデルでは大多数の遺伝毒性肝発がん物質の検出を行うことができると考えられるが、稀に偽陰性となる物質があり、投与濃度等に留意する必要があると考えられた。また、今回は投与24時間後のみ評価を行ったが、評価時期の再考の必要性も感じられた。また、今回は投与24時間後のみ評価を行ったが、評価時期の再考の必要性も感じられた。

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・安心を保証する。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、確立することを目的とした。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検討を行った。多種の遺伝毒性肝発がん物質、非肝発がん物質、及び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。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年度および平成30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、多種類の遺伝毒性肝発がん物質及び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。一方で、擬陽性や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、偽陰性物質についてさらに投与容量の設定を詳細に検証する検討を行った。

B. 研究方法

平成29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10種類について（表1）、平成30年度では、遺伝毒性肝発がん物質を含めた発がん物質10種類について（表2）、令和元年度（平成31年度）では、平成29年度および平成30年度で偽陰性となった2物質（表3）について検討を行った。各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。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平成29年度および平成30年度はLD50の1/3とし、平成31年度は1/2および2/3とした。被験物質投与後24時間後に剖検を行ったが、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RNAlater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 20μLのvolumeで行った。サーマルサイクラーによる反応は、25°C:10min、50°C:10min、85°C:5min、4°C:∞とした。QPCR用サンプルは「RT反応液(20μl)+ MilliQ 80 μl=100 μl」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。

リアルタイムRT-PCRの結果について、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による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。

(倫理面の配慮)

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研究センター、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

平成29年度の実験では、被験物質投与後24時間後に2-Nitrosopropane群の1匹、3'-Methyl-4-dimethylamino azobenzeneの3匹の死亡が確認された。

肝臓の病理組織所見では、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。5匹中3匹が死亡した3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene群(9群)は、肝組織に著変は見られなかった。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。

平成30年度の実験では、検討予定であった物質のVinyl chlorideについて、予定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、2-Nitrosopropane群は平成29年度と同様の像を認めたが、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。

令和元年度(平成31年度)の実験では、被験物質投与後24時間後に2-Nitrosopropane群の2匹、Ethylene thiourea 1/2群の1匹、Dichloroacetic acid 2/3群の2匹、Dichloroacetic acid 2/3群の2匹の死亡が確認された。Dichloroacetic acid投与群の死亡例は全例に胃穿孔が確認された。

肝発がん性の陽性または陰性の判定の結果を表5に示す。非遺伝性発がん物質のethionamideが遺伝性発がん物質として判定された。それ以外の被験物質については、遺伝性発がん物質である物質は遺伝性発がん物質と判定された。また、4,4'-Oxydianiline、2,4-Dinitrotoluene (containing 1.0-1.5% 2,6-dinitrotoluene)は

遺伝性発がん物質として判定されるべきところ、陰性と判定された。

これらの偽陰性だった物質について、令和元年度(平成31年度)は検証を行った。偽陰性の原因が、投与濃度の低さによるものと仮定して、より高濃度での検証を行った。その結果、Dichloroacetic acid はLD50の2/3用量で陽性となった一方で、Ethylene thioureaは陰性であった。

D. 考察

非遺伝性毒性発がん物質であるethionamideが遺伝性毒性物質として判定された。*in vitro*遺伝毒性試験では毒性を引き起こす用量で遺伝毒性陽性があるという報告がある(Kirkland et. al., 2016)。今回の投与量はLD50の1/3量という高い投与量であった。このため、ethionamideが遺伝毒性作用を発揮したと推測される。2,4-Dinitrotolueneについては、Ames試験は陽性であるものの、*in vivo*においての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)。Ethylene thioureaについてはマウスでは肝臓をターゲットとするが、ラットではターゲットとしない報告があり(National Toxicology Program, 2002)、再検証結果の陰性を支持するものである。

今回の実験から、本試験系ではほぼ遺伝毒性肝発がん物質の検出を行うことができるが、稀に偽陰性となる物質があり、投与濃度等に留意する必要があると考えられた。また、今回は投与24時間後にのみ評価を行ったが、評価時期の再考の必要性も感じられた。

E. 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定方法により、ほとんどの遺伝性発がん物質が正確に判定されたが、偽陰性例も見られ、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と考えられた。

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. 2018; 31(4): 231-240.
- 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. 2017; 69(8): 637-642.
- 3) Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K. Suppressing effects of the expectorant drug

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

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、沖縄 (2018年1月)

- 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、第25回日本がん予防学会総会、高松 (2018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

表 1 平成 29 年度の実験における群構成

Group	被験物質		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 (陽対)	720	240
2	Nitrosodibutylamine (NB)	遺伝毒性肝発がん物質	1200	400
3	N-Nitrosopyrrolidine (遮光)(NNP)	遺伝毒性肝発がん物質	900	300
4	Promethazine (PMZ)	非遺伝毒性非肝発がん物質	580	190
5	Sulindac (SUL)	非遺伝毒性非肝発がん物質	264	90
6	Tetracycline (TC)	非遺伝毒性非肝発がん物質	807	270
7	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml/kg b.w.
8	2-Nitrosopropane (2-NP)	遺伝毒性肝発がん物質 (陽対)	720	240
9	3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene (MDA)	遺伝毒性肝発がん物質	1500	500
10	Ethionamide (ETH)	非遺伝毒性非肝発がん物質	1320	440
11	Theophylline (TEO)	非遺伝毒性非肝発がん物質	225	80
12	Caffeine (CAF)	非遺伝毒性非肝発がん物質	192	60
13	Chloramphenicol (CMP)	非遺伝毒性非肝発がん物質	2500	830
14	0.5% Methyl cellulose (MC)	対照群		5ml/kg b.w.

表 2 平成 30 年度の実験における群構成

Group	被験物質		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 令和元年度 (平成 31 年度) の実験における群構成

Groups	被験物質	LD50 mg/kg	投与量mg/kg
1	2-Nitrosopropane	720	240
2	Ethylene thiourea 2/3(LD50)	1832	1220
3	Ethylene thiourea 1/2	1832	920
4	Dichloroacetic acid 2/3	2820	1880
5	Dichloroacetic acid 1/2	2820	1410
6	0.5% Methyl cellulose		5ml/kg b.w.

表4 リアルタイム RT-PCR で用いたプライマー

Gene	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
1385132_at	ggatgtgtgaagtcagttcca	tttctgaagatgccaagca
Aen	ggcctgccctcacttaaa	agcggtaagaaagctctgga
Atp6v1f	tgaaatcgaagacactttcagg	gctcctggacgggatct
Rage	ccagtcacaactggtcattctc	cagactagtcggccctgt
Cdkn1a	gatccacagcgatatcgagac	acatcaccaggatcgacat
Fam49a	cacactcttctctgattttga	aggatgctctcggaatctg
Glrx3	ccacagtgtgtacagatgaacg	aacagcttcggcttcag
Nudt5	ggctacaaaggtgacattgct	gcagtttgacaagcctggat
Phlda3	accacgaggcataccatttt	caaccaaccaaagtggacag
RGD1308114	atggcctcggtatggagatg	tgctctgacatcttgaacttg

表5 判定結果

Chemicals	Predicted (Carcinogenicity)
平成29年度	
2-Nitrosopropane (Ex 1)	[Positive]
Nitrosodibutylamine	[Positive]
N-nitrosopyrrolidine	[Positive]
Promethazine	[Negative]
Sulindac	[Negative]
Tetracycline	[Negative]
2-Nitrosopropane (Ex 2)	[Positive]
3-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene	[Positive]
Ethionamide	[Positive]
Theophylline	[Negative]
Caffeine	[Negative]
Chloramphenicol	[Negative]
平成30年度	
2-Nitrosopropane- 2	[Positive]
4,4'-Oxydianiline	[Negative]
4,4'-Methylene	[Positive]
2,4-Dinitrotrouene	[Negative]
Tris	[Positive]
Retororsine	[Positive]
Butylated hydroxyanisole	[Negative]
Methimazole	[Negative]
Sulfasalazine	[Negative]
Allyl alcohol	[Negative]
令和元年度 (平成31年度)	
2-Nitrosopropane- 2	[Positive]
Ethylene thiourea 2 of 3	[Negative]
Ethylene thiourea 1 of 2	[Negative]
Dichloroacetic acid 2 of 3	[Positive]
Dichloroacetic acid 1 of 2	[Negative]