

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合分担研究報告書

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

環境中の化学物質の発がん性を迅速に検証できるシステムの確立は課題である。本研究では、6週齢オス Sprague-Dawley (SD) ラット単回強制胃内投与試験を行い、24時間後に肝から total RNA を抽出後、real time RT-PCR 法により 10 遺伝子 (1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) の発現データを取得し、対照群を 0 としたときの $\Delta\Delta Ct$ 値を用いて、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的モデルを用いて、化学物質を遺伝毒性肝発がん物質とその他の化学物質（非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質）に分類、評価するシステムの検証を行った。その結果、24 時間という超短期間で、10 遺伝子の発現量の変動を解析することにより、概ね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。従来との異なる評価となったものがあつたが、今後、用量依存性、代謝特異性等、更なる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

環境中の化学物質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

平成 29 年度、平成 30 年度は、種々の遺伝毒性肝発がん物質、非遺伝毒性肝発がん物質、遺伝毒性非肝発がん物質、非遺伝毒性非肝発がん物質について、検討を行った。

平成 29 年度は、4 種類の遺伝毒性肝発がん物質 (Group 1 (G1): N-Nitrosodiethylamine (NDEA), G2: N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), G3: N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), G4: 2-Nitropropane (2-NP))、2 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 (G5: Monocrotaline (MCT), G6: Phenobarbital (PB))、3 種類の遺伝毒性非肝発がん物質 (G7: Cyclophosphamide (CPA), G8: Nitrofurantoin (NFT), G9: Phenacetin (PCT))、2 種類の非遺伝毒性非肝発がん物質 (G10: Indomethacin (IM), G11: Phenylbutazone (PhB))、および対照群 (G12: 0.5% Methyl cellulose (MC)) を用いた。

平成 30 年度は、5 種類の遺伝毒性肝発がん物質として、G3: 90 mg/kg BW Nitrosoheptamethyleneimine, G4: 610 mg/kg BW Ethylene thiourea, G5: 100 mg/kg BW Benzidine、G6: 500 mg/kg BW Auramine-O、G7: 20 mg/kg BW Hydrazine を使用した。その他の化学物質として、

G8: 870 mg/kg BW Furosemide (FUR)、G9: 40 mg/kg BW Chlorpheniramine (CHL)、G10: 720 mg/kg BW Chlorpropamide (CPP)、G11: 1670 mg/kg BW Methyl dopa (MDP) を用いた。また、G12 として 0.5% Methyl cellulose (MC) 投与群を設けた。

令和元年度は、偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質 Vinyl Bromide および Hydrazinium Sulfate について再検を試み、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)。

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、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)、10 遺伝子 (1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) について、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 $\Delta\Delta Ct$ 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

溶媒である 0.5% Methyl cellulose (MC) を陰性対照とし、 $\Delta \Delta Ct$ 値=0 と設定した時の 10 遺伝子 (1385132_at, Aen, Atp6v1f, Rage, Cdkn1a, Fam49a, Glrx3, Nudt5, Phlda3, RGD1308114) の $\Delta \Delta Ct$ 値を求めた。

SVM による解析の結果、平成 29 年度は、4 種類の遺伝毒性肝発がん物質 N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), 2-Nitropropane (2-NP)、1 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 Monocrotaline (MCT) が陽性と判定された。

一方、1 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 Phenobarbital (PB)、3 種類の遺伝毒性非肝発がん物質 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)、2 種類の非遺伝毒性非肝発がん物質 Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB) は陰性と評価された。

平成 30 年度の結果では、遺伝毒性肝発がん物質のうち、2 物質 Nitrosoheptamethyleneimine、Auramine-0 は陽性判定となったが、3 物質 Ethylene thiourea、Benzidine、Hydrazine は陰性判定となった。

令和元年度は、前年度までに偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質 Vinyl Bromide および Hydrazinium Sulfate について再検を試みた結果、Vinyl Bromide は陰性となったが、Hydrazinium Sulfate の低用量、高用量の 2 群は用量依存性を持って陽性と判定された。

D. 考察

SVM による予測モデルによる解析の結果、遺伝毒性肝発がん物質 N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiethanolamine (NDELA), N-Nitrosoethylmethylamine (NEMA), 2-Nitropropane (2-NP), Nitrosoheptamethyleneimine、Auramine-0、Hydrazinium Sulfate は正しく評価された。

また、1 種類の非遺伝毒性肝発がん物質 Phenobarbital (PB)、3 種類の遺伝毒性非肝発がん物質 Cyclophosphamide (CPA), Nitrofurantoin (NFT), Phenacetin (PCT)、2 種類の非遺伝毒性非肝発がん物質 Indomethacin (IM), Phenylbutazone (PhB) は陰性と正しい判定となった。

しかし、非遺伝毒性肝発がん物質 Monocrotaline (MCT) が陽性、遺伝毒性肝発がん物質 Vinyl Bromide は陰性との予想と異なる評価となった。

以上の如く概ね予測通りの評価が得られた。

E. 結論

24 時間という超短期間で、10 遺伝子の発現量の変動を解析することにより、概ね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。従来との知見と異なる評価となったものがあつたが、今後、

用量依存性、代謝特異性等、更なる検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagawa M, Sakai Y, Kiriyama Y, Tahara T, Horiguchi N, Okabe A., Tahara S, Shibata T, Ohmiya N, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Eradication of Helicobacter pylori Induces Immediate Regressive Changes in Early Gastric Adenocarcinomas. Pathobiology. 2019; 86: 135-144.
- 2) Okabe A, Kiriyama Y, Suzuki S, Sakurai K, Teramoto A, Kato H, Naiki-Ito A, Tahara S, Takahashi S, Kuroda M, Sugioka A, Tsukamoto T. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker gamma-H2AX. J Toxicol Pathol. 2019; 32: 91-99.
- 3) Tahara S, Tahara T, Horiguchi N, Kato T, Shinkai Y, Yamashita H, Yamada H, Kawamura T, Terada T, Okubo M, Nagasaka M, Nakagawa Y, Shibata T, Yamada S, Urano M, Tsukamoto T, Kurahashi H, Kuroda M, Ohmiya N. DNA methylation accumulation in gastric mucosa adjacent to cancer after Helicobacter pylori eradication. Int J Cancer. 2019; 144: 80-88.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、高橋智、塚本徹哉、DNA 二重鎖切断マーカー γ -H2AX を用いた胃発がん物質の短期同定、第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集會、沖縄 (2018 年 1 月)
- 2) 塚本徹哉、寺本篤司、桐山諭和、山田あゆみ、フラインクチューニングした Deep Convolutional Neural Networks によるヒト肺癌細胞像の自動分類。第 107 回日本病理学会総会、札幌 (2018 年 6 月)
- 3) 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會、徳島 (2019 年 6 月)
- 4) 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. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。