

化審法における監視化学物質・優先評価化学物質の長期毒性評価スキームの創出に関する研究  
(20KD0101)

分担研究項目：遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法の確立

研究分担者 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、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」の有用性を検証する。令和3年度は非遺伝毒性肝発がん物質19種類と、非発がん物質1種類の合計20種について検討した。OECDテストガイドラインのTG407：げっ歯類における28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。採取した肝組織からRNAを抽出、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法を用いて、それぞれの物質の発がん性検出を行った。今回検討した化学物質において従来モデルでは、感度42%(8/19物質)、特異度100%(1/1)と判定された。令和2年度に検討した物質の一部を投与方法や投与量を変更して検討したが、一部感度の改善を認めたものの、大幅な改善は見られなかった。感度の改善のため、低用量でも発がん物質を陽性と判定する予測モデルとして、高感受性モデルを開発し検討した結果、感度84%(16/19物質)と改善した。高感受性モデルは、以前の試験データによる解析と合わせて、感度69%、特異度85%、正答率が79%となる遺伝子セットが確立でき、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

### A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」には、スクリーニング毒性試験の結果から健康影響の懸念を評価されているものの、慢性毒性や発がん性が不明の物質が多く存在する。しかし、それらの物質を全て長期試験により検討することは、莫大な費用や時間等を必要とするため困難である。そこで、化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に評価できる試験法および試験スキームの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、国民生活の安全・安心を保证する。

本研究では化学物質の標的となる臓器の大半は肝臓であることに着目し、肝発がん性を短期で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、問題となる「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」について発がん性評価を行う。平成29年度～令和元年度「化学物質の有害性評価の迅速化・高精度化・標準化に関する研究」（鰐淵班）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超短期検出法」では、解決できない非遺伝毒性肝発がん物質に対する試験法確立を目指す。

非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせ「遺伝子セットを用いた非遺伝毒性肝発がん物質短期検出法」を確立したが、その検出力を動物実験を行い検証する。令和3年度は既知の非遺伝毒性肝発がん物質を主体に、その検出法の有用性を検証する。

### B. 研究方法

OECDテストガイドラインのTG407：げっ歯類にお

ける28日間反復経口投与毒性試験を基に動物実験を行った。6週齢SD雄ラットに被験物質を28日間投与後に屠殺剖検を行い肝臓を採取した。肝臓からRNeasy mini kit（キアゲン）を用いてtotal RNAを抽出・精製し、GeneChip® Clariom D Assay, Rat (Rat Transcriptome Array 2.0)を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、被験物質ごとの遺伝子発現変化データを取得した。

得られた遺伝子発現変化のうち、以前にGeneChip® Rat Genome 230 2.0 Arrayを使用して、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた106遺伝子セットから、共通の遺伝子として選出可能であった103遺伝子を用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出（サポートベクターマシンの数理的アルゴリズムによるモデル）及び発がん機序に基づいた分類を行い、検出法の特異性及び感受性について検証した（従来モデル）。

また、新たな遺伝子セットを検討するため、以前と同様に細胞傷害（TAA、MP）や酵素誘導（PB、HCB）、PPAR $\alpha$ アゴニスト（CFB、WY）に属する化学物質2種において、共通して対照群との発現差がWelch T値が5以上となる遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質において対照群との平均した発現差が4倍以上異なるとともに、42の非発がん物質で発現変動平均が0.5以下となる遺伝子を選出した。加えて、選出した遺伝子が、各所属化学物質の8割以上で変化するとともに、非発がん物質において2倍以上変化する物質が4つ以下となる遺伝子を選出した（14遺伝子モデル）。

さらに、発がん物質検出感度を改善するため、14遺伝子モデルで用いた14遺伝子について、従来はがん原性試験で50%に腫瘍発生を認める投与量（TD50）以上

を、判定陽性とする予測モデルを構築していたが、低用量においても判定を陽性として新たに予測モデルを再構築した（高感受性モデル）。

本年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 19 種：Thioacetamide (TAA)、Phenobarbital, sodium (PB)、Methyl carbamate (MCB)、1,4-Dioxane (1,4-D)、Methyleugenol (MEG)、2-Nitrotoluene (2NT)、Chlorendic acid(CRA)、N,N-Dimethylformamide (DMF)、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride (PHMB)、Clofibrate (CF)、Hexachlorobenzene (HCB)、Wy-14643 (WY)、Chlorobenzene (CB)、Furan、dl-Ethionine (DL-ET)、Doxylamine succinate (DOX)、Methapyrilene hydrochloride (MP)、Nitrobenzene (NB) を、非肝発がん物質 1 種：Hexachlorophene (HCP) を用いた。このうち、TAA、PB、1,4-D、CFB、CRA、DL-ET、DOX、HCP については、前年度に行った化学物質で強制胃内投与による再検討を行った。

(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

マイクロアレイ解析により対照群との遺伝子発現変化を確認し、非遺伝毒性肝発がん物質の発がん機序ごとに選出した遺伝子を組み合わせた 103 遺伝子セットを用いて、非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った。その結果、非遺伝毒性肝発がん物質 19 物質のうち 8 物質 (42%) が発がん物質として判定された。一方、非発がん物質 HCP については陰性と判定されている。以上より今年度の正答率は 45% だった (表 1)。

表 1. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (従来モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陰性	×
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陰性	×
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陰性	×
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	10 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○
	名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陰性
Doxylamine succinate		DOX	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×
Methapyrilene hydrochloride		MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
Nitrobenzene		NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene		HCP	陰性	20 mg/kg ig	陽性	○

一方、14 遺伝子モデルを用いた解析における非遺伝毒性肝発がん物質の検出を行った結果を表 2 に示す。遺伝毒性肝発がん物質 19 物質のうち 12 物質 (63%) が発がん物質として判定された。非発がん物質 HCP については陰性と判定されている。以上より今年度の正答率は 65% だった。

表 2. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (14 遺伝子モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陰性	×
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陰性	×
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陽性	○
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陰性	×
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○
	名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陽性
Doxylamine succinate		DOX	陽性	200 mg/kg ig	陰性	×
Methapyrilene hydrochloride		MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
Nitrobenzene		NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene		HCP	陰性	20 mg/kg ig	陽性	○

昨年度の非遺伝毒性発がん物質の一部について、投与方法を強制胃内投与に変更した結果、従来モデルおよび14遺伝子モデルいずれも1物質陽性判定が増え、感度は上昇したものの大きく改善はされなかった (表 3, 4)。

表 3. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果 (従来モデル)

投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年			
			投与方法・量	判定	成否	投与方法・量	判定	成否
Thioacetamide	TAA	陽性	0.5g/kg diet	陽性	○	45 mg/kg ig	陽性	○
Phenobarbital, sodium	PB	陽性	0.5g/L drink	陰性	×	100 mg/kg ig	陽性	○
Chlorendic acid	CRA	陽性	1.25g/kg diet	陰性	×	5 g/kg diet	陰性	×
Clofibrate	CF	陽性	5g/kg diet	陽性	○	300 mg/kg ig	陽性	○
dl-Ethionine	DL-ET	陽性	1g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Doxylamine succinate	DOX	陽性	2g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene	HCP	陰性	0.15g/kg diet	陰性	○	20 mg/kg ig	陰性	○
1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	5g/L drink	陰性	×	1000 mg/kg ig	陰性	×

表 4. 投与方法および投与濃度変更による発がん性判定結果 (14 遺伝子モデル)

投与物質	略名	発がん性	令和2年		令和3年			
			投与方法・量	判定	成否	投与方法・量	判定	成否
Thioacetamide	TAA	陽性	0.5g/kg diet	陽性	○	45 mg/kg ig	陽性	○
Phenobarbital, sodium	PB	陽性	0.5g/L drink	陽性	○	100 mg/kg ig	陽性	○
Chlorendic acid	CRA	陽性	1.25g/kg diet	陽性	○	5 g/kg diet	陽性	○
Clofibrate	CF	陽性	5g/kg diet	陽性	○	300 mg/kg ig	陽性	○
dl-Ethionine	DL-ET	陽性	1g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陰性	×
Doxylamine succinate	DOX	陽性	2g/kg diet	陰性	×	200 mg/kg ig	陽性	○
Hexachlorophene	HCP	陰性	0.15g/kg diet	陰性	○	20 mg/kg ig	陰性	○
1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	5g/L drink	陰性	×	1000 mg/kg ig	陰性	×

表 5. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (高感受性モデル)

施設	投与物質	略名	発がん性	投与方法・量	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	陽性	45 mg/kg ig	陽性	○
	Phenobarbital, sodium	PB	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Methyl carbamate	MCB	陽性	500 mg/kg ig	陽性	○
	1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	1000 mg/kg ig	陽性	○
	Methyleugenol	MEG	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	2-Nitrotoluene	2NT	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
香川大	Chlorendic acid	CRA	陽性	5 g/kg diet	陽性	○
	N,N-Dimethylformamide	DMF	陽性	5 g/kg diet	陰性	×
	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	陽性	50 g/kg diet	陽性	○
	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	PHMB	陽性	2 g/kg drink	陰性	×
	Clofibrate	CF	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
国立衛試	Hexachlorobenzene	HCB	陽性	300 mg/kg ig	陽性	○
	Wy-14643	WY	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
	Chlorobenzene	CB	陽性	250 mg/kg ig	陽性	○
	Furan	Furan	陽性	30 mg/kg ig	陽性	○
	名市大	dl-Ethionine	DL-ET	陽性	200 mg/kg ig	陽性
Doxylamine succinate		DOX	陽性	200 mg/kg ig	陽性	○
Methapyrilene hydrochloride		MP	陽性	100 mg/kg ig	陽性	○
Nitrobenzene		NB	陽性	125 mg/kg ig	陰性	×
Hexachlorophene		HCP	陰性	20 mg/kg ig	陽性	×

そこで、より感度を改善するため、高感受性モデルを

開発し検討した結果、非遺伝毒性肝発がん物質19物質のうち16物質(84%)が発がん物質として判定された。一方、非発がん物質HCPについては陽性と判定されている。以上より今年度の正答率は80%だった(表5)。

これまで検証した全ての79化学物質について、各モデルにおける感度、特異度および正答率と表6にまとめた。従来モデルに比べ、14遺伝子モデルは感度が高く特異度も遜色なく正答率も80%以上認める優秀なモデルではあるが、感度が60%以下と問題点が存在する。今年度作成した高感受性モデルは、感度が約70%と現行モデルから大幅な改善を認める優秀なモデルである一方で、特異度が下がっており改善が望まれる。

表6. これまでに検討した79物質の予測モデルごとの成績

予測モデル	従来モデル	14遺伝子モデル	高感受性モデル
感度	41% (13/32)	56% (18/32)	69% (22/32)
特異度	100% (47/47)	98% (46/47)	85% (40/47)
正答率	76% (60/79)	81% (64/79)	79% (62/79)

#### D. 考察

今回、検討した化学物質において、従来モデルでは感度が低い結果となり、14遺伝子モデルで改善されているものの6割程度と、より高い感度のモデル構築が望まれる結果となった。そこで、より感度の高い予測モデルとして高感受性モデルを開発し、今年度の化学物質において8割以上を、全体としても7割程度の感度を認める改善されたモデルが作成できた。一方で、特異度が85%と従来のモデルに比べ低下しており、改善する必要がある。また、投与方法や投与量の変更は感度改善に一定の評価を得たものの、大きくは改善されなかった。今後も、より高い感度とともに、正答率の高い検出法を確立するため、遺伝子選定や方法について検討予定である。

#### E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した肝臓から得られたRNAを用いた遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、感度69%、特異度85%、正答率79%であり、非遺伝毒性肝発がん物質の検出法として有用であることを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol*. 2022. In press.
- 2) Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PLoS One*. 2022; 17: e0263895.

- 3) Tagami M, Kakehashi A, Sakai A, Misawa N, Katsuyama-Yoshikawa A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression of thrombospondin-1 in conjunctival squamous cell carcinoma is correlated to the Ki67 index and associated with progression-free survival. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2021; 259: 3127-36.
- 4) Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Gi M, Kato H, Naiki T, Naiki-Ito A, Wanibuchi H, Takahashi S. Cell proliferation of rat bladder urothelium induced by nicotine is suppressed by the NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Toxicol Lett*. 2021; 336: 32-8.
- 5) Mori T, Tanaka H, Suzuki S, Deguchi S, Yamakoshi Y, Yoshii M, Miki Y, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor-resident T cells in gastric cancer. *Cancer Sci*. 2021; 112: 1746-57.
- 6) Kawata K, Baba A, Shiota M, Wanibuchi H, Baba Y. ER membrane protein complex 1 interacts with STIM1 and regulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biochem*. 2021; 170: 483-8.
- 7) Kakehashi A, Suzuki S, Shiota M, Raymo N, Gi M, Tachibana T, Stefanov V, Wanibuchi H. Canopy Homolog 2 as a Novel Molecular Target in Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 3613.
- 8) Kakehashi A, Chariyakornkul A, Suzuki S, Khuanphram N, Tatsumi K, Yamano S, Fujioka M, Gi M, Wongpoomchai R, Wanibuchi H. Cache Domain Containing 1 Is a Novel Marker of Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 1216.

##### 2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、魏民、鰐淵英機. Luteolinによるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第110回日本病理学会総会、東京(2021年4月)
- 2) 藤岡正喜、梯アンナ、魏民、鰐淵英機. アグリコン型イソフラボンによるホルモン活性がDonryuラットにおける乳がんおよび子宮内膜がんの発生を促進する. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催(2021年6月)
- 3) 梯アンナ、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. Pueraria mirificaのエストロゲン作用によるDonryuラットにおける乳がんの発生. 日本食品化学学会第27回総会・学術大会、Web開催(2021年6月)
- 4) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた芳香族アミン類による尿中代謝物と膀胱尿路上皮影響の関係. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸(2021年7月)
- 5) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第48回日本毒性

- 学会学術年会、神戸（2021年7月）
- 6) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 2021年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム(AdAMS)】」若手支援技術講習会、Web開催（2021年9月）
  - 7) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露香族アミン類による膀胱尿路上皮への影響と尿中代謝物の関係. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
  - 8) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
  - 9) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける特異的候補分子としてCNPY2の役割. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年10月）
  - 10) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、山口貴嗣、松江泰佑、梯アンナ、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発がん性の検討. 第80回日本癌学会学術総会、横浜（2021年9月）
  - 11) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミンの膀胱尿路上皮への影響及び尿中代謝物との関係. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 12) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. 1, 4-ジオキサンの *in vivo*変異原性及び発がん性の定量解析. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 13) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、梯アンナ、大石裕司、山口貴嗣、鰐淵英機. 有機ヒ素化合物DPAAのマウス経胎盤曝露による次世代に対する発がん影響及びその機序の検討. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 14) 西土井悠作、鈴木周五、魏民、梯アンナ、松江泰佑、鰐淵英機. 肺組織におけるタバコの短期曝露による初期反応バイオマーカーの探索. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 15) 松江泰佑、魏民、塩田正之、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、内田潤次、鰐淵英機. 炭酸脱水素酵素阻害剤AcetazolamideのWnt/ $\beta$ カテニンシグナル経路抑制を介した膀胱癌浸潤抑制効果. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
  - 16) 梯アンナ、鰐淵英機. NAFLD/NASH 肝発がんの促進機序への最近の洞察. 第38回日本毒性病理学会総会・第1回アジア毒性病理学連盟学術集会、神戸（2022年1月）
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし