

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 鈴木 周五 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 准教授

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6種を、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。結果、従来の予測モデルにおいては、2物質が発がん物質と判定される一方で、新規予測モデルでは4物質が発がん物質と判定された。以上の結果から、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、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・安心を保証する。

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、昨年度に陰性と判定された一部の物質について、投与方法および投与濃度を変更して検討するとともに、新たに新規の非遺伝毒性肝発がん物質を用いて、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、microarray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ーンによる数論学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。加えて、より高い精度を求め開発した14遺伝子からなる新規予測モデルを用いて、検出法の特異性及び感受性について検証した。

大阪市立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質6種：Thioacetamide (TAA; 45 mg/kg)、Phenobarbital, sodium (PB; 100 mg/kg)、Methyl carbamate (MCB; 500 mg/kg)、1,4-Dioxane (1,4-D; 1000 mg/kg)、Methyleugenol (MEG; 250 mg/kg)、2-Nitrotoluene (2NT; 300 mg/kg)を強制胃内投与した。

（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

実験経過中にTAA、MCBおよび2NT投与群において、対照群に比べ体重増加抑制傾向が見られ、最終屠殺時には対照群に比べ有意な体重減少を認めた（表1）。また、TAA、PB、1,4-Dおよび2NT投与群においては肝臓相対重量が対照群に比べ有意な増加を認めた（表1）。

表1. 体重および肝重量、摂餌・飲水量

Treatment	No. of rat	Body weight (g)	Liver		Food consumption	Water consumption
			Absolute (g)	Relative (%)		
Control	5	426.0 ± 50.5	16.6 ± 3.4	3.9 ± 0.4	20.9 ± 2.9	32.2 ± 3.5
TAA	5	318.5 ± 23.6 **	14.4 ± 1.3	4.5 ± 0.2*	16.3 ± 6.4	26.6 ± 10.2
PB	5	391.5 ± 36.1	20.4 ± 2.7	5.2 ± 0.3***	20.4 ± 7.8	28.3 ± 11.0
MCB	4	359.3 ± 34.6 *	13.7 ± 2.0	3.8 ± 0.2	18.5 ± 2.0	26.1 ± 3.7
Control	6	407.4 ± 21.1	17.1 ± 1.5	4.2 ± 0.2	20.6 ± 1.2	29.6 ± 2.1
1,4-D	5	368.7 ± 13.9	16.8 ± 1.5	4.6 ± 0.3*	17.5 ± 7.2	29.1 ± 13.3
2NT	5	346.4 ± 37.9 **	18.3 ± 2.4	5.2 ± 0.2***	17.5 ± 6.9	29.5 ± 11.6
MEG	4	386.7 ± 22.5	17.2 ± 0.9	4.5 ± 0.1	20.6 ± 1.9	32.8 ± 4.6

*, **, ***: P < 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively
TAA: thioacetamide; PB: phenobarbital, sodium; MCB: methyl carbamate; 1,4-D: 1,4-Dioxane; 2NT: 2-Nitrotoluene; MEG: Methyleneugenol

肝臓の組織学的検討した結果、TAA、PB、1,4-Dおよび2NT投与群においてZone 3での肝細胞腫大と好酸性化が存在した。MEGにおいても、Zone 3での軽度の肝細胞腫大と好酸性化が存在した。また、TAAでは核小体も目立った。MCB投与群では、投与群との差がはっきりしなかった(図1)。

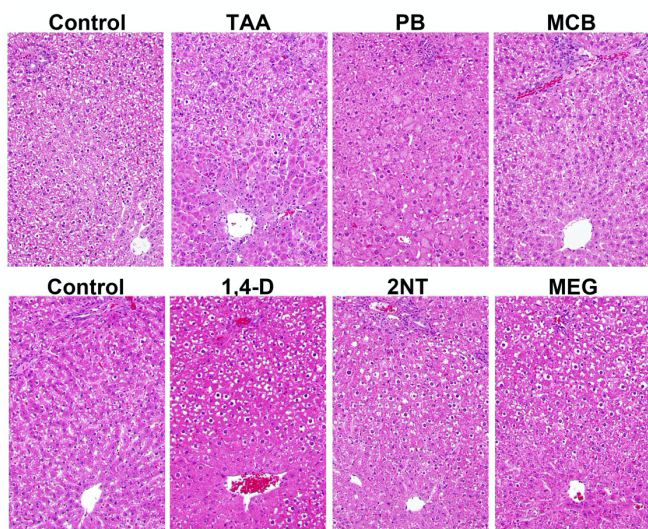


図1. 各物質を投与したラット肝組織像

各肝組織からRNAを抽出した結果、平均47.8 ± 18.3 μgのtotal RNAを回収し、質もA260/A280が平均2.13 ± 0.02と良い状態だった。マイクロアレイ解析を行った結果、対照群に対してZ scoreが2.0倍以上、発現差が1.5倍以上変動した遺伝子は、TAA投与群においては上昇535、低下687、PB投与群では上昇457、低下447、MCB投与群では上昇539、低下530、1,4-D投与群では上昇528、低下460、2NT投与群では上昇442、低下579、MEG投与群では上昇358、低下605の遺伝子を認めた。

表2. 各物質における発がん性判定結果

投与物質	略名	発がん性	従来モデル		新規モデル	
			判定	成否	判定	成否
Thioacetamide	TAA	陽性	陽性	○	陽性	○
Phenobarbital, sodium	PB	陽性	陽性	○	陽性	○
Methyl carbamate	MCB	陰性	陰性	×	陰性	×
1,4-Dioxane	1,4-D	陽性	陰性	×	陰性	×
Methyleneugenol	MEG	陽性	陰性	×	陽性	○
2-Nitrotoluene	2NT	陽性	陰性	×	陽性	○

各投与群における遺伝子発現データについて、構築済の非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、非遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った結果、従来の予測モデルにおいては、TAAおよびPBのみ陽性と判定され、他の4物質は陰性と判定された。一方、新規

予測モデルにおいては、TAA、PBに加え、2NTおよびMEGにおいても陽性と判定された(表2)。

D. 考察

今回、どちらの予測モデルにおいても発がん物質として同定できたTAAおよびPBは、強い肝組織像の変化も存在し、対照群との遺伝子発現が変化した遺伝子数も多く認められた。昨年度、摂餌投与で陰性となったPBが強制胃内投与により陽性となったことから、投与濃度および投与方法について検討する必要がある。2NTやMEGは従来の予測モデルでは陰性と判定されたものの、新規予測モデルにおいて陽性と判定されており、新規予測モデルの感度の高さを示した。一方で、1,4-Dは肝相対重量の増加や肝組織変化を認めるものの、いずれの予測モデルでも陰性と判定され、発がん機序が、この予測モデルで判定できる機序と異なる可能性が疑われた。MCBは体重増加抑制を認める濃度での投与を行ったが、肝重量や肝組織において大きな変化を認めず、いずれの予測モデルでも陰性と判定された。肝組織変化がない場合には検出が困難である可能性を示した。

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、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) 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.
- 3) Shimizu K, Gi M, Suzuki S, North BJ, Watahiki A, Fukumoto S, Asara JM, Tokunaga F, Wei W, Inuzuka H. Interplay between protein acetylation and ubiquitination controls MCL1 protein stability. *Cell Rep.* 2021; 37: 109988.
- 4) 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.
- 5) Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated

- by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2021; 42: 940-50.
- 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabata H, Koizumi R, Moriyoshi H, Yazawa I. Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism. *Neuropathology*. 2021; 41: 387-95.
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) 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)
 - 3) 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)
 - 4) 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)
 - 5) 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)
 - 6) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露芳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)
 - 7) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 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. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) 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)
 - 13) 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/ β 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)
- 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