

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

レポーター遺伝子導入動物を用いたクロロプロパノール類の発がん機序の解明

分担研究報告書

*gpt delta*ラットを用いた遺伝毒性・発がん性包括的検索モデルによる  
1,3-DCPの肝発がん機序の解明

研究代表者： 高須 伸二（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

研究要旨

食品中に含まれる可能性のあるクロロプロパノール類の一つである1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)は、主に酸加水分解植物性たん白を原材料としたしょうゆ等の調味料の原材料やチーズ、穀物加工品などに含まれることが知られており、ラットにおいて肝臓、腎臓、甲状腺、舌などで発がん性を示すことが報告されている。また、1,3-DCPは *in vitro* 遺伝毒性試験で遺伝毒性を示すことが知られているものの、*in vivo*における遺伝毒性試験の知見は限定的であり、発がん標的臓器における発がん機序、特に遺伝毒性の関与についてはあまり検討されていない。本研究では、1,3-DCPについてレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用いて、発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する。6週齢の雄性 *gpt delta* ラットに1,3-DCPを27, 80及び240 mg/Lの用量で13週間飲水投与した。投与終了後、*in vivo* 遺伝毒性評価として肝臓および腎臓の *gpt assay* を、発がん性評価として肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。*gpt assay* の結果、肝臓および腎臓の *gpt* 変異体頻度は低用量群から対照群に比して有意な高値を示し、用量依存的に増加した。変異スペクトラム解析の結果、肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が、腎臓では G:C-A:T transition 変異頻度の有意な増加が認められた。GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果、何れの投与群においても GST-P 陽性細胞巢の数および面積に統計学的に有意な変化は見られなかった。以上より、1,3-DCP のラット肝および腎臓発がん性は遺伝毒性機序によるものと考えられた。一方、本実験条件下において、肝前がん病変の形成を指標とした発がん性評価では1,3-DCP投与による変化が認められなかったことから、1,3-DCPの肝発がんプロモーション作用は乏しい可能性が示唆され、肝前がん病変の形成に影響する因子の検索が必要であると考えられた。

A. 研究目的

食品中に含まれる可能性のあるクロロプロパノール類の一つである1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)は、主に酸加水分解植物性たん白を原材料としたしょうゆ等の調味料の原材料やチーズ、穀物加工品などに含まれることが知られている。1,3-DCPはラットにおいて、肝臓、腎臓、甲状腺、舌などで発がん性を示すことが報告されており、FAO/WHO 合同食品添

加物専門家会議(JECFA)では限られたデータながら肝毒性、腫瘍発生の増加が認められ、重大な健康影響は発がん性であるとしている。一方、摂取量推計の結果、高摂取群の推定摂取量とベンチマーク法を基にした暴露マージンの検討から、ヒトの健康への懸念は低いと評価している。また、食品安全委員会でも高摂取群における摂取量を比較した結果、日本人における健康への懸念は低いとしている。

しかし、1,3-DCPは *in vitro* 遺伝毒性試

験で明確な遺伝毒性を示すことが知られており、*in vivo* 遺伝毒性試験（ラット骨髄小核試験及びラット肝 UDS 試験）では陰性であるものの知見は限定的であり、腫瘍発生部位の作用機序に関する知見が不足していることから、JECFA では遺伝毒性による発がん作用機序を排除できないとしている。

本研究では、我々がこれまで開発してきたレポーター遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性・発がん性試験モデルを用いて、1,3-DCP の発がん過程における遺伝毒性機序の関与を検討する。さらに、得られた結果に基づき分子病理学的な機序を検討し、1,3-DCP の発がん機序の解明を目指す。

## B. 研究方法

### B-1. 試薬及び動物

1,3-DCP は Sigma-aldrich から購入した。動物は 5 週齢の雄性 Wistar Han 系 *gpt delta* ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し、一週間の馴化後、実験に供した。動物の飼育はバリヤーシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時（オールフレッシュ）、12 時間蛍光灯照明/12 時間消灯で、飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 又は 3 匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。また、試験期間中は基礎食として固形 CRF1 を自由摂取させた。

### B-2. 動物試験

6 週齢の雄性 *gpt delta* ラット各群 10 匹に配し、1,3-DCP を発がん性試験における投与用量である 27, 80 及び 240 mg/L の用量で 13 週間飲水投与した。対照群には蒸留水を同様に投与した。投与期間中は一般状態を観察するとともに、体重を週 1 回測定した。投与終了後、イソフルラン麻酔下で全身諸器官・組織を摘出した。肝臓及び腎臓については、一部をレポーター遺伝子変

異頻度解析のために  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

*In vivo* 遺伝毒性評価として肝臓および腎臓の *gpt assay* を、発がん性評価として肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の免疫組織化学染色法による検索を実施した。

いずれの項目についても統計学的解析は Bartlett 検定により分散の均一性を確認し、均一である場合は One-way ANOVA により、均一でない場合は Kruskal-Wallis 検定により群間差を解析した。群間差が認められた項目については、Dunnett の多重比較検定または steel 検定により各群の有意差を解析した。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### （倫理面への配慮）

投与実験は熟練者が実施し、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。実験動物に関しては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、遺伝子組み換え実験計画書を作成し、審査を受けた。

## C. 研究結果

*gpt assay* および *gpt* 変異体スペクトラム解析の結果をそれぞれ Table 1~4 に示す。肝臓の *gpt assay* の結果、*gpt* 変異体頻度は低用量群から対照群に比して有意な高値を示し、用量依存的に増加した (Table 1)。変異スペクトラム解析の結果、G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が有意に増加した (Table 2)。腎臓の *gpt assay* の結果、*gpt* 変異体頻度は低用量群から対照群に比して有意な高値を示し

た (Table 3). 変異スペクトラム解析の結果, 中間用量群から G:C-A:T transition 変異頻度の有意な増加が認められた (Table 4).

GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果を Table 5 に示す. GST-P 陽性細胞巢の定量解析の結果, 何れの投与群においても GST-P 陽性細胞巢の数および面積に統計学的に有意な変化は見られなかった.

#### D. 考察

*gpt delta* ラットに発がん用量の 1,3-DCP を 13 週間反復投与し, 1,3-DCP の発がん標的臓器である肝臓および腎臓の *gpt* assay を実施した. その結果, 両臓器共に *gpt* 変異体頻度は用量依存的に増加したことから, 1,3-DCP は *in vivo* において変異原性を示すことが明らかになった. さらに, 変異スペクトラム解析の結果, 肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が, 腎臓では G:C-A:T transition の変異頻度が増加したことから, 1,3-DCP のラット肝および腎発がん過程には, これらの遺伝子突然変異が関与する可能性が示唆された.

一方, GST-P 陽性細胞巢の定量的解析の結果, 1,3-DCP の投与は GST-P 陽性細胞巢の形成に影響を与えなかった. 本研究課題の分担研究においても, 1,3-DCP 投与による GST-P 陽性細胞巢の形成促進作用は認められず, 1,3-DCP の肝発がんプロモーション作用は限定的である可能性が示唆された. さらに, これまでに 1,3-DCP の長期間投与は肝逸脱酵素 (AST, ALT, ALP および  $\gamma$ -GTP) の上昇や肝紫斑症の増加など肝障害を引き起こすと報告されている. 昨年度までの解析結果から, 本試験条件下では小葉中心性肝細胞肥大が認められたものの, その程度は軽度であり, 血清生化学的検査および病理組織学的検査において傷害性の変化は認められなかった. このことから, 本実験条件下では肝臓に顕著な毒性影響はみられていないことも GST-P 陽性

細胞巢の形成促進作用が見られなかった一因である可能性が考えられ, 今後, 肝前がん病変の形成に関与する因子の検索が必要であると考えた.

#### E. 結論

*gpt delta* ラットに発がん用量の 1,3-DCP を 13 週間反復投与し, 発がん標的臓器である肝臓および腎臓の *gpt* assay を実施した. その結果, 両臓器ともに *gpt* 変異体頻度は用量依存的に増加した. 変異スペクトラム解析の結果, 肝臓では G:C-A:T transition および A:T-T:A transversion の変異頻度が, 腎臓では G:C-A:T transition の変異頻度が増加した. 以上より, 1,3-DCP のラット肝および腎発がん性は遺伝毒性機序によるものと考えられた.

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

Table 1. *gpt* mutant frequencies in the liver of *gpt* delta rats treated with 1, 3-DCP.

Dose	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± S.D.
Control	1	3.1	3	0.97	0.73 ± 0.37
	2	2.6	2	0.77	
	3	0.2	0 <sup>a</sup>	-	
	4	2.8	2	0.71	
	5	4.3	2	0.47	
27 mg/L	12	3.2	7	2.19	2.21 ± 1.03*
	13	0.6	0 <sup>a</sup>	-	
	14	3.0	6	2.00	
	15	1.0	2	2.00	
	18	3.0	8	2.67	
80 mg/L	22	1.8	3	1.67	3.46 ± 1.67*
	23	2.4	14	5.83	
	24	3.2	12	3.75	
	25	2.9	6	2.07	
	27	3.0	12	4.00	
240 mg/L	31	1.0	6	6.00	6.01 ± 2.45*
	34	1.1	3	2.73	
	35	2.8	27	9.64	
	36	2.4	14	5.83	
	40	1.2	7	5.83	

a: No mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of mutant frequency. \* $p < 0.05$  vs. control.

Table 2. Mutation spectra of *gpt* mutant in the liver of *gpt* delta rat treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

	Control		27 mg/L		80 mg/L		240 mg/L		
	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	
Base substitution									
Transversion									
G:C-T:A	3 (33.3)	0.23 ± 0.16	2 (8.7)	0.33 ± 0.47	1 (2.1)	0.07 ± 0.15	0 (0.0)	0 0	
G:C-C:G	1 (11.1)	0.09 ± 0.18	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	
A:T-T:A	0 (0.0)	0	1 (4.3)	0.08 ± 0.16	3 (6.4)	0.21 ± 0.20	10 (17.5)	1.07 ± 1.15 *	
A:T-C:G	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	
Transition									
G:C-A:T	1 (11.1)	0.10 ± 0.19	17 (73.9)	1.56 ± 0.58 *	33 (70.2)	2.46 ± 0.86 *	36 (63.2)	3.91 ± 1.73 *	
A:T-G:C	1 (11.1)	0.06 ± 0.12	2 (8.7)	0.16 ± 0.19	9 (19.1)	0.66 ± 0.62	9 (15.8)	0.88 ± 1.03	
Deletion									
Single bp	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	2 (3.5)	0.15 ± 0.21	
Over 2 bp	1 (11.1)	0.10 ± 0.19	1 (4.3)	0.08 ± 0.17	0 (0.0)	0	0 (0.0)	0	
Insertion									
Complex	2 (22.2)	0.16 ± 0.32	0 (0.0)	0	1 (2.1)	0.07 ± 0.15	0 (0.0)	0	
Total	9	0.73 ± 0.37	23	2.21 ± 1.03 *	47	3.46 ± 1.67 *	57	6.01 ± 2.45 *	

Table 3. *gpt* mutant frequencies in the kidney of *gpt* delta rats treated with 1, 3-DCP.

Dose	Animal No.	Cm <sup>R</sup> colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± S.D.
Control	1	5.5	2	0.36	0.55 ± 0.18
	2	4.3	2	0.47	
	4	3.7	3	0.81	
	9	2.2	1	0.45	
	10	4.5	3	0.67	
27 mg/L	11	1.4	0 <sup>a</sup>	-	1.42 ± 0.70*
	14	4.6	7	1.52	
	15	1.9	2	1.05	
	18	3.1	4	1.29	
	19	2.2	4	1.82	
80 mg/L	21	4.0	3	0.75	1.72 ± 1.21*
	24	4.5	5	1.11	
	25	2.8	4	1.43	
	27	2.7	4	1.48	
	28	2.1	8	3.81	
240 mg/L	31	1.0	8	8.00	3.48 ± 2.66*
	33	2.1	4	1.90	
	34	3.5	6	1.71	
	35	5.3	20	3.77	
	36	2.0	4	2.00	

a: No mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of mutant frequency. \**p* < 0.05 vs. control.

Table 4. Mutation spectra of *gpt* mutant in the kidney of *gpt* delta rat treated with 1,3-DCP for 13 weeks.

	Control		27 mg/L		80 mg/L		240 mg/L	
	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	MF (x10 <sup>-5</sup> )
Base substitution								
Transversion								
G:C-T:A	6 (54.5)	0.29 ± 0.31	2 (11.8)	0.13 ± 0.47	7 (29.2)	0.54 ± 0.79	7 (16.7)	0.32 ± 0.44
G:C-C:G	1 (9.1)	0.05 ± 0.10	0 (0)	0	0 (0)	0	3 (7.1)	0.11 ± 0.25
A:T-T:A	0 (0)	0	0 (0)	0	1 (4.2)	0.07 ± 0.17	0 (0)	0
A:T-C:G	0 (0)	0	1 (5.9)	0.13 ± 0.26	0 (0)	0	0 (0)	0
Transition								
G:C-A:T	3 (27.3)	0.18 ± 0.25	8 (47.1)	0.61 ± 0.42	12 (50.0)	0.79 ± 0.24 *	23 (54.8)	2.40 ± 2.62 *
A:T-G:C	1 (9.1)	0.04 ± 0.08	1 (5.9)	0.05 ± 0.11	1 (4.2)	0.07 ± 0.16	7 (16.7)	0.57 ± 0.44
Deletion								
Single bp	0 (0)	0	3 (17.6)	0.25 ± 0.19	1 (4.2)	0.10 ± 0.21	1 (2.4)	0.04 ± 0.08
Over 2 bp	0 (0)	0	1 (5.9)	0.13 ± 0.26	1 (4.2)	0.04 ± 0.10	1 (2.4)	0.04 ± 0.08
Insertion	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
Complex	0 (0)	0	1 (5.9)	0.11 ± 0.23	1 (4.2)	0.10 ± 0.21	0 (0)	0
Total	11	0.55 ± 0.18	17	1.42 ± 0.70	24	1.72 ± 1.21 *	42	3.48 ± 2.66 *

Table 5. Number and area of GST-P positive foci in the liver of *gpt* delta rats treated with 1, 3-DCP.

		Control		27 mg/L	80 mg/L		240 mg/L
No. of foci	(No./cm <sup>2</sup> )	0.13	± 0.29	0	0.16	± 0.39	0
Area of foci	(μm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup> )	890.8	± 2190.3	0	551.3	± 1225.5	0