

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*ラットを用いた中期発がん評価系による1,3-dichloro-2-propanolの  
遺伝毒性および発がんプロモーション作用の検索

研究分担者： 松下 幸平（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

研究要旨

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外国産しょうゆ等の調味料やチーズ、穀物加工品など種々の食品に含まれる汚染物質である。1,3-DCP はラット発がん性試験において肝臓および腎臓等に明確な発がん性を示すものの、遺伝毒性を含む発がん機序に関する情報は限定的である。我々はこれまで、レポーター遺伝子導入動物である *gpt delta* ラットを用いて、中期遺伝毒性・発がん性試験法を開発した。この中期試験法では、被験物質投与後に部分肝切除あるいは片側腎摘出を行い、切除した肝あるいは腎組織を用いて *gpt assay* を行う。術後に diethylnitrosamine (DEN) によるイニシエーション処置を行い、残存肝あるいは腎組織において前腫瘍性病変の形成を病理組織学的に解析する。これにより、被験物質の肝臓あるいは腎臓における変異原性および発がんプロモーション作用を同時に検出することが可能となる。本研究では、これらの中期遺伝毒性・発がん性試験法を用いて 1,3-DCP の肝臓および腎臓における発がん機序を明らかにすることを目的とした。

昨年度に肝臓における中期試験法を実施し、1,3-DCP 投与により切除肝組織において *gpt* 変異体頻度が上昇することを示した。本年度は残存肝組織を用いて glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性細胞巢の定量的解析を行った。その結果、1,3-DCP 投与群における GST-P 陽性細胞巢の数および面積に対照群との差はみられなかった。

本年度ではさらに、腎臓における中期試験法を実施した。1,3-DCP 投与により切除腎臓組織における *gpt* 変異体頻度が上昇し、さらに残存腎臓組織における尿細管異型過形成の形成が促進されていた。また 1,3-DCP 投与群の残存腎臓組織では、糸球体障害を示唆する所見や尿細管上皮における Ki67 陽性細胞の増加が認められた。

以上より、1,3-DCP による肝および腎発がん機序には遺伝毒性が関与していることが示唆された。また、1,3-DCP の肝臓における発がんプロモーション作用は限定的であることに対し、腎臓では糸球体障害に続発する尿細管の細胞増殖活性の亢進により発がんプロモーション作用を示すことが示唆された。

A. 研究目的

1,3-dichloro-2-propanol (1,3-DCP)はクロロプロパノール類に属する食品汚染物質であり、酸加水分解植物性たん白を原材料とした国外産しょうゆ等の調味料の原材料、チーズ、穀物加工品など種々の食品に含まれることが知られている。1,3-DCP

はラット発がん性試験において肝臓および腎臓など複数の臓器において明らかな腫瘍の発生増加を示すものの、その発がん機序に関する情報は限定的である。遺伝毒性については、Ames 試験および染色体異常試験などの *in vitro* 遺伝毒性試験において明確な陽性を示すものの、ラット肝 UDS 試験およびラット骨髄小核試験においては陰性を示し、*in vitro* 試験と *in vivo* 試験に

において矛盾した結果が得られている。この様な背景から、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)および食品安全委員会では、1,3-DCP の発がん機序における遺伝毒性の関与は否定できないとし、一日摂取許容量を設定せず暴露マージンに基づいた評価手法を採用している。よって、1,3-DCP の発がん機序、特に遺伝毒性の関与の有無を詳細に検討することにより、1,3-DCP の安全性評価の基礎となる科学的根拠をより強固にすることができると考えられる。

*gpt delta* ラットはレポーター遺伝子が全身の体細胞および生殖細胞に導入された遺伝子改変動物であり、変異原性物質の暴露によってレポーター遺伝子上に生じた遺伝子突然変異を直接的に検出することができる。本動物では任意の臓器において、化学物質の生体内における動態あるいは代謝といった要素を考慮に入れた変異原性の検出が可能となる。さらに、本動物を用いた変異原性試験は一般毒性試験と同様の動物実験条件下で実施されるため、変異原性の検出に加えて、DNA 損傷や細胞増殖活性といった発がんに関連する種々のパラメータも同時に解析することが可能となる。よって、本動物は既知発がん物質の発がん機序を解明するためのツールとしても、非常に有用な動物モデルとなる。

我々はこれまで、*gpt delta* ラットを用いて肝臓あるいは腎臓において変異原性に加えて発がんプロモーション作用の検出が可能となる中期遺伝毒性・発がん性試験法を開発した。本研究では、この *gpt delta* ラットを用いた中期試験法により 1,3-DCP の発がん機序、特に発がん標的臓器における遺伝毒性作用の有無を検索することを目的とした。

昨年度までに *gpt delta* ラットを用いた肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法の動物実験を行い、*in vivo* 変異原性試験を実施した。本年度では引き続き、肝臓における発がんプロモーション作用を検索す

るとともに、腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法の動物実験を実施して、腎臓における変異原性および発がんプロモーション作用を検索した。

## B. 研究方法

昨年度に実施した肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法の動物実験の概要を以下に示す。6週齢雄性 F344 系 *gpt delta* ラットを対照群、1,3-DCP 投与群および陽性対照群の 3 群 (n=15) に配した。1,3-DCP 投与群には初年度の用量設定実験の結果に基づき、1,3-DCP を最大耐量である 50 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回強制経口投与した。対照群には媒体である蒸留水、陽性対照群には遺伝毒性肝発がん物質であるエストラゴール (ES) を 150 mg/kg 体重の用量で同様に投与した。それぞれの物質を 4 週間投与した後に 2 週間の休薬期間を設け、休薬後に部分肝切除を行った。摘出した肝臓組織を採材して液体窒素にて瞬間凍結し、-80℃にて保存した。さらに部分肝切除の 16 時間後にイニシエーション処置として diethylnitrosamine (DEN) を 10 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、その 1 週間後から被験物質の投与を再開した。休薬期間は被験物質と DEN の相互作用を回避するために設定した。試験開始 13 週間後に剖検を行い、残存肝組織を採材して一部を 10% 中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定し、残りの組織を液体窒素により瞬間凍結して -80℃に保存した。凍結保存した切除肝組織よりゲノム DNA を抽出して *gpt assay* を実施し、*gpt* 変異体を用いたシークエンス解析により、変異スペクトラムを解析した。また、ホルマリン固定した残存肝組織を用いて定法に従いパラフィン包埋・薄切し、HE 標本を作製した。さらに肝前がん病変マーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P) の免疫染色を実施し、画像解析ソフト (HALO) を用いて単位面積当たりの GST-P 陽性細胞

巢の数および面積を算出した。さらに Ki67 免疫染色を実施し、1000 個以上の肝細胞の核をカウントして Ki67 陽性細胞率を算出した。また凍結保存した残存肝組織を用いて定量 PCR (qPCR) 解析を実施し、細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を検索した。

本年度ではさらに、腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法を以下の概要で実施した。6 週齢雄性 F344 系 *gpt delta* ラットを対照群、1,3-DCP 投与群および陽性対照群の 3 群 (n=15) に配した。1,3-DCP 投与群には 1,3-DCP を 50 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回投与し、対照群には蒸留水、陽性対照群には遺伝毒性腎発がん物質である aristolochic acid (AA) を 0.3 mg/kg 体重の用量で同様に投与した。それぞれの物質を 4 週間投与し、2 週間の休薬後に片側腎摘出を施して摘出した腎組織を液体窒素にて瞬間凍結し、-80°C にて保存した。さらに片側腎摘出の 48 時間後に DEN を 40 mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、DEN 投与の 1 週間後から被験物質の投与を再開した。実験開始 19 週後に剖検を行い、残存腎組織を採材して一部を 10% 中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定し、残りの組織を液体窒素により瞬間凍結して -80°C に保存した。凍結保存した摘出腎組織を用いて同様に *gpt assay* およびシーケンス解析を実施した。またホルマリン固定した残存腎組織から同様に HE 標本を作製し、前腫瘍性病変である尿細管異型過形成の数をカウントし、画像解析ソフト (HALO) で求めた腎臓の皮質および髄質外帯外層の面積で除して単位面積当たりの前腫瘍性病変の数を算出した。さらに PAS 染色および Ki67 免疫染色を実施して糸球体障害および尿細管の細胞増殖活性を検索した。Ki67 免疫染色では尿細管上皮の核を 1000 個以上カウントし、陽性細胞率を算出した。また凍結保存した残存腎組織を用いて同様に qPCR 解析を実施し、細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現を検索した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

## C. 研究結果

昨年度までに、切除肝組織を用いた *gpt assay* およびシーケンス解析を行い、1,3-DCP 投与群において *gpt* 変異体頻度が有意に上昇していること、さらに GC:AT および AT:GC transition が顕著に増加していることを示した (Table 1 および 2)。本年度ではさらに、残存肝組織における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施した。その結果、1,3-DCP 投与群では小葉中心帯の肝細胞が GST-P に陽性を示したものの、GST-P 陽性細胞巢の数および面積はともに対照群と同程度であった (Figure 1A および B)。陽性対照群である ES 投与群では、GST-P 陽性細胞の数および面積ともに対照群と比して有意に増加していた (Figure 1B)。Ki67 免疫染色では、1,3-DCP 投与群において Ki67 陽性肝細胞数の有意な増加が認められ、特に小葉中心帯の肝細胞において高率に陽性反応を認めた (Figure 1C および D)。qPCR 解析では、Cyclin A2 および Cyclin B1 の mRNA 発現が 1,3-DCP 投与群において対照群と比して有意に増加していた (Figure 1E)。

腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では、摘出腎組織を用いた *gpt assay* において、1,3-DCP 投与により *gpt* 変異体頻度が対照群と比して有意に増加した (Table 3)。陽性対照群である AA 投与群においても、*gpt* 変異体頻度の有意な増加を認めた (Table 3)。シーケンス解析では、1,3-DCP 投与群では GC:AT および AT:GC transition, AA 投与群では AT:TA transversion および single bp deletion が対照群と比して有意に増加していた (Table 4)。残存腎組織では、尿細管異型過形成の数が 1,3-DCP

投与群および AA 投与群において対照群と比して有意に増加していた (Fig 2A および B). PAS 染色の結果, 1,3-DCP 投与群の糸球体および尿細管上皮に PAS 陽性顆粒が認められ, 尿細管腔内には硝子円柱が認められた (Figure 2C および D). Ki67 免疫染色では, 1,3-DCP 投与群の尿細管における Ki67 陽性細胞率が対照群と比して有意に増加していた (Figure 2E および F). qPCR 解析では, 1,3-DCP 投与群において Cyclin E1 および Cyclin A2 の mRNA 発現が有意に増加しており, Cyclin B1 の mRNA 発現が増加傾向を示した (Figure 2G).

#### D. 考察

肝臓における中期遺伝毒性・発がん性試験法では, 残存肝組織において 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なかった. 一方, 1,3-DCP 投与群では GST-P 陽性反応が小葉中心帯の肝細胞に認められ, 同細胞では Ki67 の陽性反応が高率にみられた. 過去の報告では, 非肝発がん物質である hydroxyanisole (BHA) をラットに投与した結果, 小葉辺縁帯の肝細胞において GST-P が誘導され, さらに同細胞の細胞増殖が亢進することが示されている (Makino et al., Toxicol. Pathol. 36(3), 420-427). GST-P は第二相酵素 glutathione S-transferase のサブタイプの一つであること, さらに BHA は第二相酵素を誘導して種々の肝発がん物質に対する抗腫瘍効果を示すことから, この報告における GST-P 発現および細胞増殖活性の亢進は発がんに関連するものではなく, 酵素誘導に関連するものと結論されている. よって, 本研究でみられた小葉中心帯の肝細胞における GST-P 発現も酵素誘導に関連するものであると推察された. また, 第二相酵素誘導に伴う細胞増殖活性の亢進は, 肝発がんプロモーション作用には寄与しないことが示唆された.

腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試

験法では, 1,3-DCP 投与群の摘出腎組織において *gpt* 変異体頻度の上昇が認められた. よって, 1,3-DCP の腎発がんには遺伝毒性機序が関与していることが示唆された. シーケンス解析では, 肝臓と同じく GC:AT および AT:GC transition といった特徴的な変異スペクトラムを示した. 陽性対照群である AA 投与群においても *gpt* 変異体の上昇が認められ, シーケンス解析では, AA に特徴的にみられる AT:TA transversion が顕著に増加していた. 残存腎組織においては, 1,3-DCP 投与群において前腫瘍性病変である尿細管異型過形成の形成が促進されていたことから, 1,3-DCP は腎臓において発がんプロモーション作用を有していることが示唆された. また PAS 染色標本より得られた所見から, 1,3-DCP 投与により糸球体が障害され, 高分子タンパクが原尿中に過剰に排出・蓄積されていることが示唆され, その結果として二次的に尿細管障害が生じていることが考えられた. 1,3-DCP 投与群の尿細管では Ki67 陽性細胞が増加していたことから, 糸球体障害に続発する尿細管障害に起因する代償性の細胞増殖活性の亢進が発がんプロモーション作用に寄与しているものと考えられた.

#### E. 結論

*gpt delta* ラットを用いた肝臓および腎臓における中期遺伝毒性・発がん性試験を実施した. その結果, 1,3-DCP は肝臓および腎臓において変異原性を示したことから, 1,3-DCP による肝および腎発がんには遺伝毒性機序が関与していることが示唆された. また, 肝臓における 1,3-DCP の発がんプロモーション作用は限定的であるものの, 腎臓においては糸球体を障害して二次的に尿細管の障害および細胞増殖活性の亢進を誘発し, 発がんプロモーション作用を発揮す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.** 肝臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における切除肝組織を用いた *gpt* assay

Group	Animal No.	CmR colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TGR and CmR colonies	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SDs
Control	101	4.3	0 <sup>a</sup>	-	0.36 ± 0.26
	102	5.0	2	0.40	
	103	5.0	1	0.20	
	104	4.5	3	0.67	
	105	5.9	1	0.17	
1, 3-DCP	201	3.4	26	7.65	6.44 ± 1.17**
	202	6.2	35	5.65	
	203	3.5	26	7.43	
	204	3.8	25	6.58	
	205	5.3	26	4.91	
Estragole	301	4.9	5	1.02	2.13 ± 0.81**
	302	5.3	12	2.26	
	303	7.4	12	1.62	
	304	5.3	15	2.83	
	305	5.5	16	2.91	

a: No mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of mutant frequency.

\*\**p* < 0.01 versus control.

**Table 2.** 肝臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における変異スペクトラム解析

	Control		1, 3-DCP		Estragole	
	No. (%)	Mutation frequency (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	Mutation frequency (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	Mutation frequency (x10 <sup>-5</sup> )
Transversion						
GC-TA	1 <sup>a</sup> (14.3)	0.06 ± 0.11 <sup>b</sup>	4 (2.9)	0.18 ± 0.16	10 (16.7)	0.37 ± 0.19*
GC-CG	0 (0)	0	1 (0.7)	0.06 ± 0.13	7 (11.7)	0.24 ± 0.08*
AT-TA	0 (0)	0	10 (7.2)	0.43 ± 0.33*	8 (13.3)	0.27 ± 0.21
AT-CG	0 (0)	0	3 (2.2)	0.12 ± 0.16	3 (5.0)	0.11 ± 0.17
Transition						
GC-AT	4 (57.1)	0.20 ± 0.02	84 (60.9)	3.92 ± 1.04**	11 (18.3)	0.40 ± 0.25
AT-GC	0 (0)	0	33 (23.9)	1.58 ± 0.84**	18 (30.0)	0.64 ± 0.20
Deletion						
Single bp	1 (14.3)	0.06 ± 0.11	0 (0)	0 ± 0	0 (0)	0 ± 0
Over 2 bp	0 (0)	0	1 (0.7)	0.06 ± 0.13	0 (0)	0 ± 0
Insertion	0 (0)	0	0 (0)	0 ± 0	1 (1.7)	0.04 ± 0.08
Complex	1 (14.3)	0.05 ± 0.10	2 (1.4)	0.10 ± 0.14	2 (3.3)	0.06 ± 0.09

a: Number of colonies with independent mutations. b: Mean ± SDs.

\*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  versus control.

**Table 3.** 腎臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における摘出腎組織を用いた *gpt* assay

Group	Animal No.	CmR colonies (x 10 <sup>5</sup> )	6-TGR and CmR colonies	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SDs
Control	11	3.7	0 <sup>a</sup>	-	0.53 ± 0.25
	12	1.7	1	0.59	
	13	4.7	2	0.43	
	14	3.8	2	0.53	
	15	3.4	2	0.59	
1,3-DCP	21	2.7	8	2.99	2.90 ± 1.18**
	22	2.3	11	4.83	
	23	3.0	6	2.02	
	24	4.0	11	2.78	
	25	3.7	7	1.89	
Aristolochic acid	31	2.8	16	5.77	3.37 ± 1.99**
	32	3.2	7	2.21	
	33	1.9	10	5.18	
	34	4.1	5	1.22	
	35	3.7	9	2.46	

a: No mutant colonies were detected on the plate, with this data being excluded from the calculation of mutant frequency.

\*\**p* < 0.01 versus control.

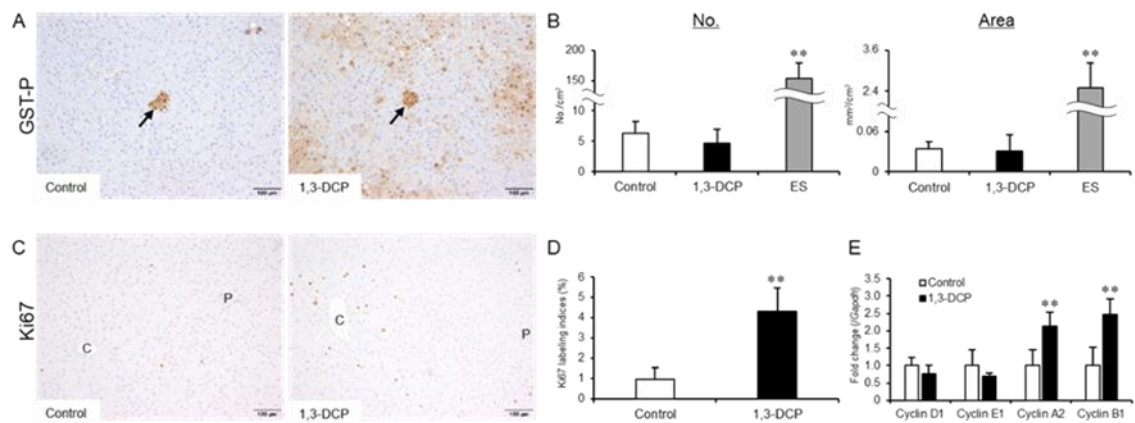


**Table 4.** 腎臓の中期遺伝毒性・発がん性試験法における変異スペクトラム解析

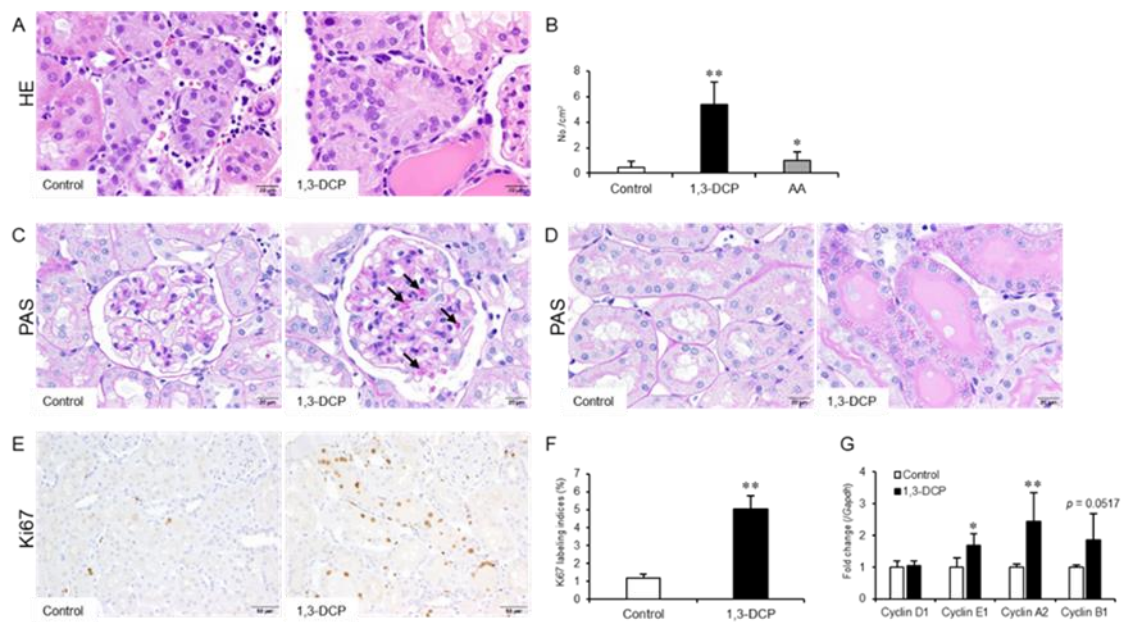
	Control		1, 3-DCP		Estragole	
	No. (%)	Mutation frequency (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	Mutation frequency (x10 <sup>-5</sup> )	No. (%)	Mutation frequency (x10 <sup>-5</sup> )
Transversion						
GC-TA	2 <sup>a</sup> (28.6)	0.14 ± 0.16 <sup>b</sup>	6 (14.0)	0.35 ± 0.34	5 (10.6)	0.40 ± 0.38
GC-CG	0 (0)	0	0 (0)	0	4 (8.5)	0.35 ± 0.49
AT-TA	0 (0)	0	3 (7.0)	0.20 ± 0.33	22 (46.8)	1.49 ± 0.66**
AT-CG	0 (0)	0	1 (2.3)	0.09 ± 0.20	2 (4.3)	0.14 ± 0.32
Transition						
GC-AT	2 (28.6)	0.12 ± 0.14	25 (58.1)	1.76 ± 1.05**	5 (10.6)	0.34 ± 0.35
AT-GC	0 (0)	0	6 (14.0)	0.36 ± 0.25*	4 (8.5)	0.31 ± 0.32
Deletion						
Single bp	1 (14.3)	0.05 ± 0.11	0 (0)	0	5 (10.6)	0.34 ± 0.21*
Over 2 bp	1 (14.3)	0.07 ± 0.15	2 (4.7)	0.14 ± 0.20	0 (0)	0
Insertion	0 (0)	0	0 (0)	0	0 (0)	0
Complex	1 (14.3)	0.15 ± 0.30	0 (0)	0	0 (0)	0

a: Number of colonies with independent mutations. b: Mean ± SDs.

\*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  versus control.



**Figure 1.** (A) GST-P 陽性細胞巢の典型像 (矢印). (B) 単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巢の数および面積. (C) Ki67 免疫染色. (D) Ki67 陽性細胞率. (E) qPCR による細胞周期関連因子の mRNA 発現解析.



**Figure 2.** (A) 尿細管異型過形成の典型像. (B) 単位面積当たりの尿細管異型過形成の数. (C) 糸球体の PAS 染色像. (D) 尿細管の PAS 染色像. (E) Ki67 免疫染色. (F) Ki67 陽性細胞率. (G) qPCR による細胞周期関連因子の mRNA 発現解析.