

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和2年度分担研究報告書

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。本年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 11 種類と、非発がん物質 5 種類の合計 16 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。今回検討した新規化学物質において感度 27%(3/11 物質)、特異度 100%(5/5)と判定され、以前のデータと合わせて感度 54%、特異度 100%および正答率が 84%となった。そこで、新たな遺伝子セットを作成および検討した結果、新規化学物質において感度 45%(5/11 物質)、特異度 100%(5/5)と改善され、以前の試験データによる解析と合わせて、感度 65%、特異度 98%、正答率が 86%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2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ーンによる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（現行予測モデル）。

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 α 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（新規予測モデル）。

非遺伝毒性肝発がん物質 11 種として、Thioacetamide (TAA)、11-Aminoundecanoic acid (AUDA)、di(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP)、Phenobarbital、sodium

(PB)、1,4-Dioxane (1,4-D)、Clofibrate (CFB)、Chlorendic acid (CRA)、Ponceau 3R (P3R)、Decabromodiphenyl oxide (DBDPO)、dl-Ethionine (DL-ET)、Doxylamine succinate (DOX) と、非肝発がん物質 5 種: Quercetin dihydrate (QDH)、Phytic acid (PhA)、Cyclohexanone (CHN)、Caprolactam (CPL)、Hexachlorophene (HCP) を用いた。

(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取得し、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。結果、11 の非遺伝毒性肝発がん物質うち、TAA、DEHP および CFB については、発がん物質と判定されたものの、他の 8 物質は陰性と判定された。一方、5 つの非発がん物質はいずれも陰性と判定された (表 1)。

予測モデルの作成時の結果、感度 73% (11/15 物質)、特異度 100% (42/42) に今回の結果を加えると、感度 54% (14/26)、特異度 100% (47/47) で、正答率が 84% (61/73) となった。遺伝子セットを用いた主成分解析では、陽性判定された TAA は細胞障害に、DEHP および CFB は PPAR α アゴニストに属することが確認出来た (図 1)。

表 1. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (現行予測モデル)

施設	投与物質	略名	投与量	発がん性	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	0.5g/kg diet	陽性	陽性	○
	di (2-Ethylhexyl)phthalate	DEHP	12g/kg diet	陽性	陽性	○
	11-Aminoundecanoic acid	AUDA	15g/kg diet	陽性	陰性	×
	Quercetin dihydrate	QDH	50g/kg diet	陰性	陰性	○
香川大学	1,4-Dioxane	1,4-D	5g/L drink	陽性	陰性	×
	Phenobarbital, sodium	PB	0.5g/L drink	陽性	陰性	×
	Phytic acid	PhA	25g/L drink	陰性	陰性	×
	Cyclohexanone	CHN	6.5g/L drink	陰性	陰性	○
国立衛研	Chlorendic acid	CRA	1.25g/kg diet	陽性	陰性	×
	Ponceau 3R	P3R	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	Clofibrate	CFB	5g/kg diet	陽性	陽性	○
	Caprolactam	CPL	7.5g/kg diet	陰性	陰性	○
名市大	Decabromodiphenyl oxide	DBDPO	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	dl-Ethionine	DL-ET	1g/kg diet	陽性	陰性	×
	Doxylamine succinate	DOX	2g/kg diet	陽性	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	0.15g/kg diet	陰性	陰性	○

そこで、モデル解析に用いる遺伝子について再選定し、予測率の改善を試みた。細胞障害 (TAA, MP) から 4 遺伝子、酵素誘導 (PB, HCB) から 3 遺伝子、PPAR α アゴニスト (CFB, WY) から 8 遺伝子が選出され、酵素誘導と PPAR α アゴニストに共通の遺伝子が 1 つ存在したことから、合計 14 遺伝子からなるセットが作成された。その 14 遺伝子を用いて、新規予測モデルを再作成して検討した結果、感度 80% (12/15 物質)、特異度 98% (41/42) が得られ、今回検討した新規化学物質においても感度 45% (5/11 物質)、特異度 100% (5/5) と改善さ

れた (表 2)。これらの結果をまとめると、感度 65% (17/26 物質)、特異度 98% (46/47) で、正答率が 86% (63/73) となった。

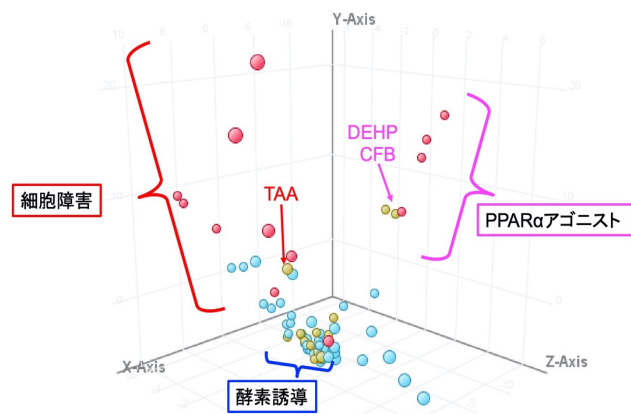


図 1. 遺伝子セットを用いた主成分解析

表 2. 非遺伝毒性肝発がん物質の判定結果 (新規予測モデル)

施設	投与物質	略名	投与量	発がん性	判定	成否
大阪市大	Thioacetamide	TAA	0.5g/kg diet	陽性	陽性	○
	di (2-Ethylhexyl)phthalate	DEHP	12g/kg diet	陽性	陽性	○
	11-Aminoundecanoic acid	AUDA	15g/kg diet	陽性	陰性	×
	Quercetin dihydrate	QDH	50g/kg diet	陰性	陰性	○
香川大学	1,4-Dioxane	1,4-D	5g/L drink	陽性	陰性	×
	Phenobarbital, sodium	PB	0.5g/L drink	陽性	陽性	○
	Phytic acid	PhA	25g/L drink	陰性	陰性	×
	Cyclohexanone	CHN	6.5g/L drink	陰性	陰性	○
国立衛研	Chlorendic acid	CRA	1.25g/kg diet	陽性	陽性	○
	Ponceau 3R	P3R	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	Clofibrate	CFB	5g/kg diet	陽性	陽性	○
	Caprolactam	CPL	7.5g/kg diet	陰性	陰性	○
名市大	Decabromodiphenyl oxide	DBDPO	50g/kg diet	陽性	陰性	×
	dl-Ethionine	DL-ET	1g/kg diet	陽性	陰性	×
	Doxylamine succinate	DOX	2g/kg diet	陽性	陰性	×
	Hexachlorophene	HCP	0.15g/kg diet	陰性	陰性	○

D. 考察

今回、新規に検討した化学物質において、特異度は高かったものの、感度は低い結果となった。以前より、特異度に対して感度がやや低い傾向があり、今回の結果はその傾向が強く反映した結果となった。その改善策として、遺伝子選定方法を変更した結果、特異度がやや低下したものの、感度が高い検出法が確立された。

今後も、より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抽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 65%、特異度 98%、正答率 86% 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, 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.
- 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki K, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2020; 96: 180-7.
 - 5) Takeyama Y, Kato M, Tamada S, Azuma Y, Shimizu Y, Iguchi T, Yamasaki T, Gi M, Wanibuchi H, Nakatani T. Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Lett.* 2020; 479: 89-99.
 - 6) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of gamma-H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2020; 33: 279-85.
 - 7) Sakai A, Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. Expression, intracellular localization, and mutation of EGFR in conjunctival squamous cell carcinoma and the association with prognosis and treatment. *PLoS One.* 2020; 15: e0238120.
 - 8) Kakehashi A, Suzuki S, Ishii N, Okuno T, Kuwae Y, Fujioka M, Gi M, Stefanov V, Wanibuchi H. Accumulation of 8-hydroxydeoxyguanosine, L-arginine and Glucose Metabolites by Liver Tumor Cells Are the Important Characteristic Features of Metabolic Syndrome and Non-Alcoholic Steatohepatitis-Associated Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 7746.
 - 9) Fujioka M, Suzuki S, Gi M, Kakehashi A, Oishi Y, Okuno T, Yukimatsu N, Wanibuchi H. Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 927-37.
2. 学会発表
 - 1) 鰐淵英機、魏民. 職業曝露によるがん発生の要因解明と予防研究への展開. 第 27 回がん予防学会総会. Web 開催 (2020 年 9 月)
 - 2) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第109回日本病理学会総会、Web開催 (2020年8月)
 - 3) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. ラット膀胱尿路上皮のニコチンによる増殖はNADPH oxidase阻害剤apocyninにより抑制される. 第79回日本癌学会学術総会、Web開催 (2020年10月)
 - 4) 魏民、鈴木周五、行松直、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミン acetoaceto-*o*-toluidide のラット膀胱発がん性とその機序解明. 第 93 回産業衛生学会、Web 開催 (2020 年 4 月)
 - 5) 魏民、行松直、鈴木周五、梯アンナ、鰐淵英機. ラットにおける acetoaceto-*o*-toluidide の膀胱発がん促進作用. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)
 - 6) Gi Min, Suzuki Shugo, Kakehashi Anna, Matsue Taisuke, Wanibuchi Hideki. Aberrant histone H3K9 methylation in lung carcinogenesis induced by transplacental organic arsenical exposure in mice. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
 - 7) 鰐淵英機. 日本毒性病理学会のグローバル戦略. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
 - 8) 鈴木周五、加藤寛之、内木綾、魏民、鰐淵英機、高橋智. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によるニコチン誘発ラット膀胱増殖性病変抑制効果. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
 - 9) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 化審法に有用な新規化学物質の肝発がん性評価スキームの創出. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
 - 10) 梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. マウス肝発がんにおける新規マーカーとして canopy homolog 2 の解明. 第 37 回日本毒性病理学会総会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- G. 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