

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 豊田 武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

## 研究要旨

本研究では、非遺伝毒性肝発がん物質による28日間反復経口投与試験を実施し、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を目指す。令和2年度は、6週齢の雄SDラットに0.125% Chlorendic acid (CRA)、5% Ponceau 3R (CI16155)、0.5% Clofibrate (CFB)、0.75% Caprolactamを28日間反復経口投与し、肝臓の病理組織学的検索および遺伝子発現解析用のRNA抽出を行った。その結果、肝発がん物質3種(CRA, CI16155, CFB)は短期間の投与においても肝細胞肥大等、肝臓にそれぞれ特徴的な病変を誘発することが明らかとなった。今後、遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の開発に向け、追加の被験物質による検討を実施する予定である。

### A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」および「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が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、それらの物質すべてを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、肝発がん性を短期間で高精度に検証できるシステムを確立するとともに、「監視化学物質」および「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～令和元年度にかけて、「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」と「DNAアダクトーム解析による遺伝毒性/発がん性評価」は、いずれも9割を超える正答率で、遺伝毒性肝発がん物質を検出または遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質を分類できる試験法である。そこで、令和2～3年度に「監視化学物質」および「優先評価化学物質」を含め検討物質数を増やし、これらの試験法をより信頼性の高い評価法へと発展させ、加えて「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」のOECDテストガイドライン化を目指す。また、上記試験法が対応できない非遺伝毒性肝発がん物質に対して、先行研究で開発した発がん機序別に分類できる「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、令和3年度以降は「監視化学物質」および「優先評価化学物質」を含め検証および改良し、OECDテストガイドライン化を

目指す。最終的に、これら3つの試験法を組み合わせた短期肝発がん性総合評価スキームの確立を目指す。

### B. 研究方法

令和2年度は、被験物質として非遺伝毒性肝発がん物質3種：Chlorendic acid (CRA)、Ponceau 3R (CI16155)、Clofibrate (CFB)および非遺伝毒性非発がん物質1種：Caprolactam (CPL)を、6週齢の雄SDラットに28日間混餌投与した(一群4匹)。各物質の投与濃度はがん原性試験における高用量群を参考に、0.125% CRA、5% CI16155、0.5% CFBおよび0.75% CPLに設定した。

投与期間終了時に解剖し、肝臓および腎臓の重量を測定した。肝臓の病理組織学的検索を実施するとともに、凍結した肝臓組織から遺伝子発現解析用のtotal RNAを抽出した。マイクロアレイ(GeneChip Clarion D Assay, Affymetrix)による網羅的遺伝子発現解析を、(株)セルイノベーターに受託して実施した。

(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

対照群および各被験物質投与群の、体重・摂餌/飲水量・被験物質摂取量を表1に示す。CFB・CPL投与群では体重増加量の抑制傾向が認められたものの、統計学的有意差はみられなかった。各投与群における被験物質の平均摂取量は、CRA:92.8、CI16155:5665、CFB:426.5、CPL:648.5 mg/kg体重/dayであった。各群の肝および腎重量を表2に示す。CRA投与群では肝相対重量の低下、CI16155・CFB投与群では肝絶対・相対重量の増加、CFB・CPL投与群では腎相対重量の増加がそれぞれ認められた。

表 1. 各投与群における体重・摂餌/飲水量・被験物質摂取量

Treatment	Body weight (g)		Food consumption (g/rat/day)	Water intake (g/rat/day)	Chemical intake (mg/kg/day)
	Initial	Week 4			
Control	179.9 ± 5.7	374.5 ± 32.9	25.8	32.3	-
CRA	180.1 ± 7.0	363.5 ± 25.0	22.1	32.4	92.8
CI16155	179.7 ± 7.3	371.0 ± 15.3	34.9	41.0	5665.2
CFB	179.6 ± 10.6	349.8 ± 36.7	24.8	35.5	426.5
CPL	179.6 ± 4.8	352.3 ± 13.3	25.1	35.9	648.5

CRA, chlorendic acid; CI16155, ponceau 3R; CFB, clofibrate; CPL, caprolactam.

表 2. 各投与群における肝および腎重量

Treatment	Liver weight		Kidney weight	
	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	13.6 ± 1.48	3.64 ± 0.20	2.70 ± 0.19	0.72 ± 0.05
CRA	11.9 ± 1.00	3.26 ± 0.07*	2.65 ± 0.20	0.73 ± 0.04
CI16155	17.2 ± 0.98**	4.65 ± 0.22**	2.82 ± 0.13	0.76 ± 0.05
CFB	19.3 ± 3.08*	5.49 ± 0.47**	3.08 ± 0.40	0.88 ± 0.04**
CPL	13.6 ± 0.65	3.87 ± 0.25	3.06 ± 0.30	0.87 ± 0.06**

\*, \*\*, P < 0.05 and 0.01 vs. Control by t-test, respectively.

CRA, chlorendic acid; CI16155, ponceau 3R; CFB, clofibrate; CPL, caprolactam.

肝臓の病理組織学的検索の結果、CI16155 投与群では軽微な小葉中心性肝細胞肥大が、CFB 投与群では軽度のび慢性肝細胞肥大がそれぞれ認められた(図 1)。また、CRA 投与群では、肝細胞の軽微な空胞化が小葉辺縁性に時折認められた。対照群およびCPL 投与群の肝臓では、明らかな病変は観察されなかった。

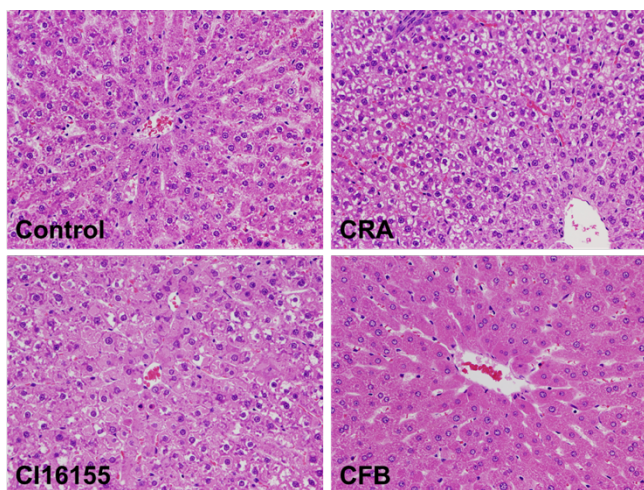


図 1. 各投与群の肝臓における病理組織学的変化

## D. 考察

非遺伝毒性肝発がん物質 3 種および非発がん物質 1 種について、がん原性試験での投与濃度を用いたラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、肝臓の病理組織学的検索を行った。その結果、CI16155 および CFB 投与群の肝臓には、それぞれすりガラス状および好酸性顆粒状の肝細胞肥大が認められた。

高脂血症治療薬である CFB は PPAR $\alpha$  活性化を介してペルオキシソームを増加させ、組織学的に好酸性顆粒状の肝細胞肥大を誘発することが知られている。染色液として使用される CI16155 の肝毒性/発がん機序は未解明であるが、本研究で認められたすりガラス状肝細胞肥大は、酵素誘導を介した滑面小胞体の増加が起きている可能性を示唆する。CRA は主に難燃剤・樹脂原料として利用され、以前に実施された 13 週間反復経口投

与試験 (NTP, 1987) において、高用量 (0.5%以上) では肝細胞肥大・異型分裂像・胆管増生の誘導が報告されている。比較的低い用量 (0.125%) を用いた本研究ではこれらの病変は認められず、ごく軽微な空胞変性を示すにとどまった。CPL はナイロン原料として汎用され、IARC による発がん性評価において唯一、Group 4 「ヒトに対する発がん性がおそらくない」に分類されていた物質である (現在は Group 3 に統合)。本研究においても、肝臓に対する影響は認められなかった。

## E. 結論

令和 2 年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 3 種および非発がん物質 1 種について、ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験を実施し、肝臓の病理組織学的検索および遺伝子発現解析用の RNA 抽出を行った。その結果、肝発がん物質 3 種は短期間の投与においても肝細胞肥大等、それぞれ特徴的な病変を誘発することが明らかとなった。今後、追加の被験物質による検討を実施し、遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の開発を目指す。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Cho YM, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. Archives of toxicology. 2021; 95: 715-26.
- 2) Yamada T, Toyoda T, Ide T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Neuromuscular and vascular hamartoma of the small intestine in an F344 rat. Journal of toxicologic pathology. 2021; 34: 113-7.
- 3) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. Journal of applied toxicology. 2021; 41: 607-17.

### 2. 学会発表

- 1) 豊田武士、松下幸平、山田貴宣、赤木純一、森川朋美、小川久美子. 腎発がん物質早期検出指標としての  $\gamma$ -H2AX の応用可能性: 用量相関性の検討. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催、(2021 年 1 月)
- 2) 豊田武士、小川久美子. ラット膀胱粘膜における  $\gamma$ -H2AX 形成を指標とした芳香族アミンの膀胱傷害性および発がん性評価. 第 79 回日本癌学会学術総会、広島県、(2020 年 10 月)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジン類似構造を持つ芳香族アミンによるラット膀胱傷害および遺伝子発現解析. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催、(2020 年

6月)

- 4) 赤木純一、曹永暉、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、小川久美子. ラット肝臓標本を用いた肝発がん物質早期検出のためのバイオマーカーの探索. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 5) 山田貴宣、原田賢吾、豊田武士、小川久美子、中山千里、田川義章、奥山学. SDラットに認められた真正半陰陽の一例. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 6) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 急性腎障害から慢性腎臓病への進展におけるCD44の役割. 第37回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web開催、(2021年1月)
- 7) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、齋島由二. RNAアプタマーを利用した組織再生を促進する新規機能性医用材料の創製に関する研究. 第58回日本人工臓器学会大会、高知県、(2020年11月)
- 8) 赤木純一、豊田武士、小川久美子. 肝発がん物質投

与ラット肝細胞における $\gamma$ -H2AX誘導と細胞増殖活性の相関. 第79回日本癌学会学術総会、広島県、(2020年10月)

- 9) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた急性腎障害から慢性腎臓病への進展メカニズムの解明. 第163回日本獣医学会学術集会、Web開催、(2020年9月)
- 10) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. mRNA-microRNA統合解析を用いた腎代償性メカニズムの包括的解析. 第47回日本毒性学会学術年会、Web開催、(2020年6月)

#### G. 知的所有権の取得状況

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