

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 横平 政直 香川大学医学部腫瘍病理学 准教授

研究要旨

TGP由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した非遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するための検討を行った。香川大学担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質2種：Phenobarbital, sodium (500 mg/L)、1,4-Dioxane (5 g/L) と、非肝発がん物質2種：Phytic acid (2.5%)、Cyclohexanone (6.5 g/L) を飲水投与し、肝臓における遺伝子の発現変化を網羅的に調べた。その結果、陽性コントロールである、Phenobarbitalや1,4-Dioxaneが発がん物質として検出されなかった。陰性コントロールであるPhytic_acidやCyclohexanoneについては、陰性であり、予想通りの結果となった。

A. 研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保証する。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高度化・標準化を目的に、平成23年度～28年度「化学物質の安全性と発がん性リスク評価としての短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究」（吉見班）で蓄積してきた病理組織発がんマーカーおよび試験法をより一層精度化し、確立する必要がある。多施設による協体制にて多数の化学物質を同時に評価することにより、評価法の標準化を推進し、国際動向を見据えたOECDテストガイドライン化を実現する。

当施設ではこれま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短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立することを目的とした。本研究の特色は化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に予測できる評価法及びヒトへの外挿に必要な発がんメカニズムに関する情報が得られる試験系を確立することにある。

平成29年度および平成30年度の検討の結果、遺伝毒性発がん物質の検出に本モデルの有用性が確認された一方で、擬陽性や偽陰性を示す物質が認められた。令和元年度（平成31年度）では、偽陰性物質についてさらに投与容量の設定を詳細に検証する検討を行った。その結果、本モデルでは大多数の遺伝毒性肝発がん物質の検出を行うことができると考えられるが、稀に偽陰性となる物質があり、投与濃度等に留意する必要があると考えられた。

令和2年度では、TGP由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した非遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力をさらに検証するため、種々の化学物質をラットに4週間投与し、肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。

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ンの数理工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。

本研究全体における動物試験は4施設で行われた。

香川大学担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質2種：Phenobarbital, sodium (500 mg/L)、1,4-Dioxane (5 g/L) と、非肝発がん物質2種：Phytic acid (2.5%)、Cyclohexanone (6.5 g/L) を飲水投与した。

動物試験プロトコールは事前に共有・配布し、プロトコールに従い試験を実施した。遺伝子発現については、リアルタイムPCRでのデータを取得した。

日本チャールズブリバー社（神奈川県厚木）より購入した4週齢のSDラット（雄性）について、2週間の馴化期間の後に実験を開始した。馴化期間に体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。実験中は、被験物質を水道水に混じて遮光給水瓶にいれ、自由に摂取させた。投与期間中は、体重測定を週1回、飲水量および摂餌量についても週1回の測定を行った。実験開始29日目に剖検を行ったが、剖検は、イソフルラン（abbvie #B506）吸入麻酔後、腹部大動脈から自然放血により安楽死させた。安楽死後、臓器に肉眼的異常の有無を観察した。肝臓を摘出し、RNA抽出用として、外側左葉(LL)を摘出後、下端辺縁部を約2cm×0.5cmの大きさに2スライス切り出した。それぞれ1mLのRNAlaterが入った1.5mLチューブへ移した（合計2本、そのうち1本は、他施設でのバリデーション用）。1.5mLチューブを4℃で一晩保管後、-80℃へ長期保管した。凍結保存サンプル用として、RNA抽出用に採材した後の残りの外側

左葉の上半分を1.5mlチューブ2本分採取し、液体窒素により凍結後、ディープフリーザーにて凍結保管した（一本はDNA adduct 解析用）。ホルマリン固定用サンプルは、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)および右葉尾部(R2)から計3スライス切り出し、カセットにおいて10%ホルマリンにて固定した。

肝臓からのtotal RNA抽出はRNeasy mini kit (キアゲン)を使用し、3mm×3mm程度の肝組織片からtotal RNAを抽出した。1群4匹から得たRNAをそれぞれ同一量混ぜて、一つのサンプルとした。アレイ解析は株式会社セルイノベーターに受託した。

アレイ解析の結果について、遺伝子発現データを構築済の肝発がん性予測モデル(サポートベクターマシンのような数理学的アルゴリズムによるモデル)に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。

(倫理面の配慮)

いずれの動物実験も実験に先立ち、香川大学動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に総合生命科学研究センター、同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

C. 研究結果

Phytic acid群において実験開始1週目から有意な飲水量(図2)および摂餌量(図3)の低下が見られ、2週目から有意な体重減少(図1)を認めた。また、実験27日目にPhytic acid群の2匹が死亡した。このため、1群4匹から得たRNAをそれぞれ同一量混ぜて、一つのサンプルとする予定であったが、この群のみ2匹分のRNAによりアレイ解析を行った

剖検時の体重および肝重量を表1に示す。Phenobarbital, sodium群およびPhytic acid群について有意な体重減少を認めた。また、肝重量について、Cyclohexane群では絶対重量および相対重量のいずれも有意な増加を認めた。Phytic acid群では絶対重量の有意な低下が見られた。

肉眼所見および病理組織所見(図4)では、いずれの群もControl群と比べて、肝臓に明らかな変化は認められなかった。

アレイ解析の結果を肝発がん性予測モデルに入力したところ、今回検討した4物質のいずれも「negative」の結果であった。

D. 考察

Phytic acid群では絶対重量の有意な低下が見られたが、相対重量では群間の有意差は認められず、肝重量減

少は体重減少に伴う変化と考えられた。実験当初から被験物質を混じた飲水量が少なく、それに伴って摂餌量の減少および体重減少を来したと考えられる。

アレイ解析からの肝発がん性予測モデルの結果について、positive controlである、Phenobarbitalや1,4-Dioxaneが発がん物質として検出されなかった。Phytic acid や Cyclohexanoneについては、陰性であり、予想通りの結果となった。

E. 結論

今回、遺伝子セットを用いた判定の結果、Phytic acid や Cyclohexanone については、陰性であり、予想通りとなった。一方で、positive controlである、Phenobarbitalが発癌物質として検出されなかった。今後、これらの偽陰性の原因について検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K, Matsuda Y. Single Intratracheal Quartz Instillation Induced Chronic Inflammation and Tumorigenesis in Rat Lungs. *Sci Rep.* 2020; 10: 6647.
- 2) Kishi S, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Kanie S, Hashimoto N, Saoo K, Yokohira M, Imaida K, Matsuda Y. Preexisting diabetes mellitus had no effect on the no-observed-adverse-effect-level of acetaminophen in rats. *J Toxicol Sci.* 2020; 45: 151-162.
- 3) Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Matsuda Y, Imaida K. Lung proliferative lesion-promoting effects of left pulmonary ligation in A/J female mice. *Pathol Int.* 2020; 70: 340-347.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 剖検時体重および肝重量

Groups	Treatment	No.	Body weights (g)	Liver weights	
				Absolute (g)	Relative (%)
1	1,4-Dioxane	4	384.8 ± 22.7	13.1 ± 1.0	3.4 ± 0.2
2	Phenobarbital, sodium	4	365.5 ± 31.5*	14.7 ± 2.0	4.0 ± 0.2
3	Phytic acid	2	276.5 ± 28.9*	9.2 ± 0.7*	3.3 ± 0.1
4	Cyclohexanone	4	441.7 ± 20.3	20.7 ± 2.0*	4.7 ± 0.4*
5	Control	4	429.5 ± 20.1	16.6 ± 1.6	3.9 ± 0.2

* P<0.05 vs group 5, control group.

図 1 体重の経時的変化

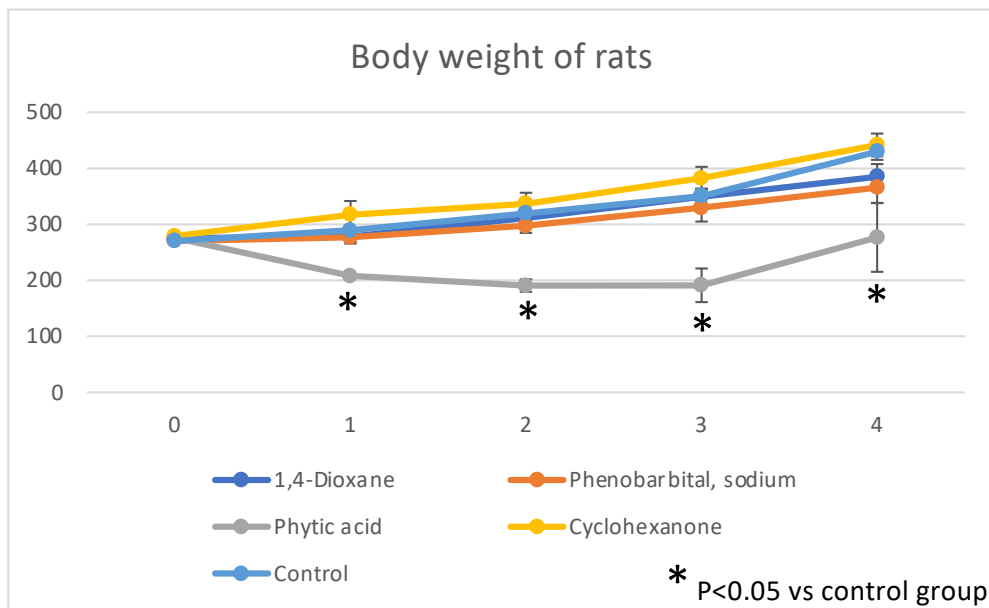


図 2 飲水量の経時的変化

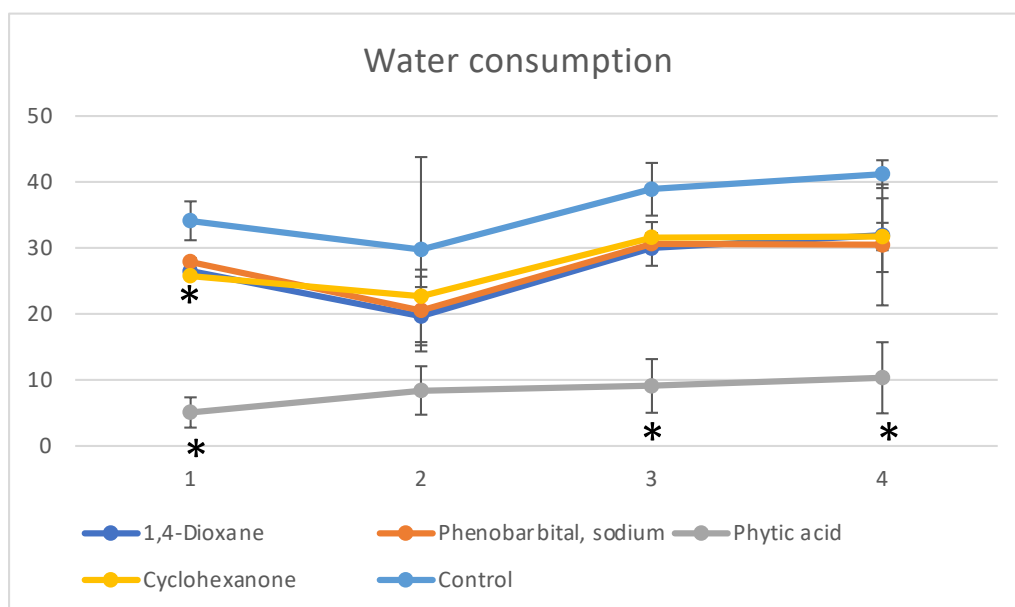


図3 摂餌量の経時的変化

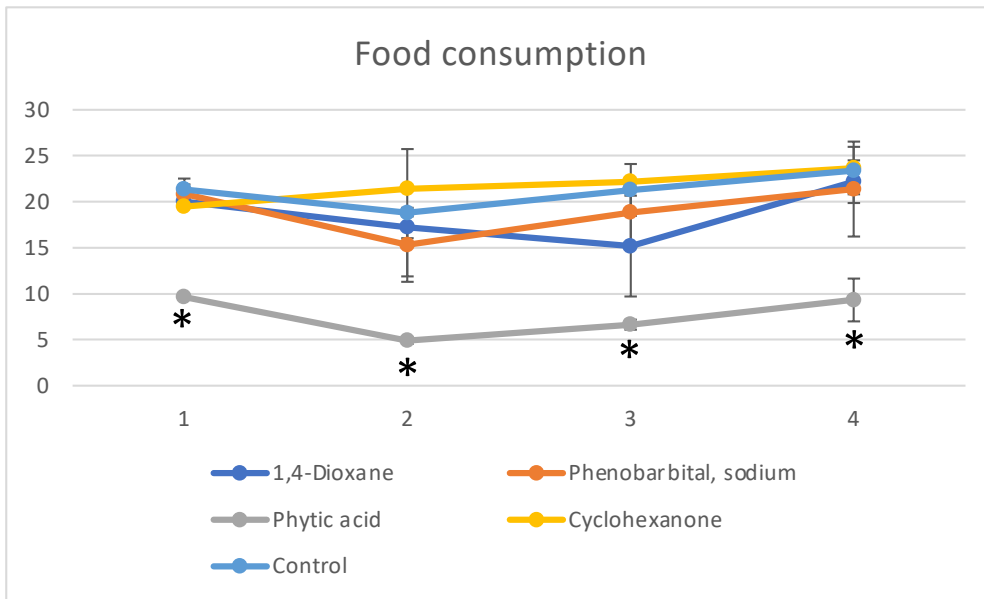


図4 各群のラット肝臓の病理組織像

