

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 加藤 寛之 名古屋市立大学大学院医学研究科 実験病態病理学 助教

研究要旨

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、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」についての発がん性評価を行う。本年度は肝発がん性のある Decabromodiphenyl oxide、dl-Ethionine、Doxylamine succinate、非発がん物質である Hexachlorophen の 4 物質について、28 日間混餌投与を行い、以前に確立した発がん性予測遺伝子セットで評価を行った。その結果、Decabromodiphenyl oxide、dl-Ethionine では軽度の組織学的変化、あるいは Ki-67 陽性率の増加傾向はみられた。しかし、いずれの物質においても発がん性予測遺伝子セットによる発がん性の検出はできなかった。今回使用した発がん性予測遺伝子セットは特異度の高い評価系であり、本試験においても Hexachlorophen では発がん性陰性の結果を示したが、発がん性予測における感度が低く、被検物質の投与方法・濃度などの問題点を抽出すると同時に遺伝子セットの再検討が必要と考える。

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。

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し、「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為、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）においては遺伝性肝発がん物質について 10 種類の遺伝子発現を RT-PCR を行い定量することにより 60 物質（肝発がん物質 23 物質）において感度 82.6%、特異度 97.3%の検出をすることが可能であった。本研究においては非遺伝毒性肝発がん物質の検出を目的とし、Open TG-GATEs における 15 の非遺伝毒性肝発がん物質を投与した肝臓のマイクロアレイの結果から構築した 106 遺伝子での評価系を用いて、その有用性について検討する。

令和 2 年度においては、4 研究施設で 16 物質を担当し、本大学では非遺伝毒性肝発がん物質である”Decabromo- diphenyl oxide (Decabromodiphenyl ether: decaBDE)”、”dl-Ethionine (DL - ET)”、”Doxylamine succinate (DOX)”、非発がん物質である”Hexachlorophene (HCP)”のラット 28 日間混餌投与試験を行い、その肝臓から RNA を抽出し、発がん性の評価を検討した。また、本評価系は Open TG-GATEs 内での 28 日間の強制胃内投与、もしくは尾静脈投与の反復投与によるマイクロアレイの結果を用い、

評価物質として非遺伝毒性肝発がん物質 15 物質、非肝発がん物質 42 物質の評価を行い、特異度 100%、感度 77%の結果を得ている。

B. 研究方法

6週齢SD雄ラットにdecaBDE (5%)、DL-ET (0.1%)、DOX (0.2%)、HCP (0.015%)を投与する群と基礎食のみのControl群(Cont)の5群を設定し、各群4匹とした。それぞれの群に対し28日間被検物質の混餌投与を行った。その後解剖を行い、肝臓のHEによる組織学的解析、Ki-67、GST-Pの免疫組織学的解析を行った。Ki-67陽性率は外側左葉、内側右葉、右葉尾部全体の陽性率をAperio CS2(Leica)で測定した。GST-P陽性細胞は全体における陽性細胞数を計測した。また肝臓の外側左葉の一部を摘出後、RNA later で凍結保存した。その検体からmRNAを抽出し、各群4個体からmRNA 1µgを合わせた検体に対し、Clariom D Assayのマイクロアレイ解析を行い、以前に構築した106遺伝子セットにより発がん性評価を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋市立大学動物実験委員会及び名古屋市立大学理事長の承認を得て行った(承認番号:医動20-026)。実施は動物実験指針や3Rの原則を遵守して、動物愛護や苦痛の緩和に十分留意して実験を行った。

C. 研究結果

いずれの群においても実験途中で死亡した個体はみられなかった。薬剤摂取量は実験期間全体の平均でdecaBDE群:3,678mg/kg/day, DL-ET群:78mg/kg/day, DOX群:145mg/kg/day, HCP群11mg/kg/dayであった。DL-

ET群では投与初期に摂餌量低下 (Cont群: 22.1g/day/rats, DL-ET群: 19.9g/day/rats)があったために体重増加抑制が見られたが、屠殺時の体重では有意差はみられなかった。屠殺時の臓器重量は、肝重量がdecaBDE投与群で有意に増加していた (表1)。

肝の組織学的検討により、decaBDE群にはcentrilobular hepatocellular hypertrophyが見られた。また、DL-ET群では肝細胞の核分裂像が散見された。一方でDOX群、HCP群では明らかな組織学的変化はみられなかった (図1)。肝臓各葉におけるKi-67陽性率は、DL-ET群で高い傾向がみられたが、いずれの群間においても有意な差は見られなかった (図2)。GST-P陽性細胞数 (個/mm²) はCont群: 0.06 ± 0.08, decaBDE群: 0.13 ± 0.20, DL-ET群: 0.14 ± 0.23, DOX群: 0.11 ± 0.08, HCP群: 0.25 ± 0.24を示し、群間で有意差はみられなかった。

肝臓から抽出したmRNAのマイクロアレイデータ内の103遺伝子で発がん性を予測した結果、被検4物質のいずれも肝発がん性は陰性の結果を示した。

Treatment	n	Body weights (g)	Liver		Kidneys	
			Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	4	415 ± 27	15.8 ± 1.4	3.8 ± 0.3	3.1 ± 0.2	0.75 ± 0.06
Decarmodiphenyl oxide	4	423 ± 16	19.2 ± 0.8**	4.5 ± 0.2**	2.9 ± 0.1	0.69 ± 0.03
dl-Ethionine	4	380 ± 22	14.6 ± 0.8	3.8 ± 0.3	2.9 ± 0.3	0.77 ± 0.04
Dpxylamine succinate	4	418 ± 18	16.6 ± 1.1	4.0 ± 0.1	3.1 ± 0.3	0.74 ± 0.05
Hexachlorophene	4	421 ± 11	17.1 ± 1.1	4.1 ± 0.3	3.2 ± 0.2	0.75 ± 0.05

** : P < 0.01 v.s. control (Dunnett's test)

表1: 屠殺時ラット体重、臓器重量

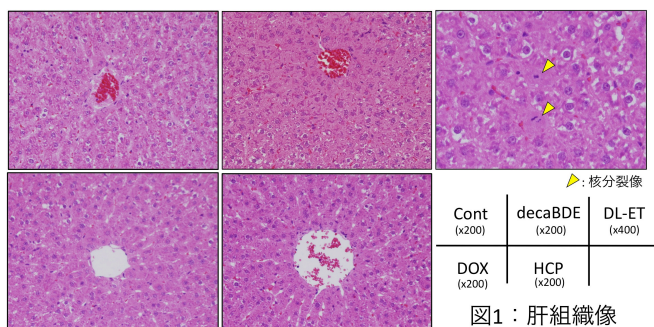


図1: 肝組織像

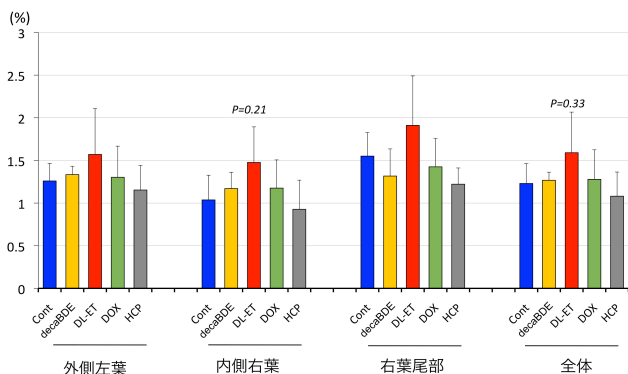


図2: 肝臓の各葉におけるKi-67陽性率

D. 考察

本試験で用いた被検物質投与量は、長期発がん性試験の結果をもとに決定している。decaBDEはマウスにおける2年間の発がん性試験において3,200mg/kg/dayで肝細胞癌の発生の有意な上昇 (control:4/50匹, decaBDE:14/50匹) を認めている。ラットの2年間発がん

試験では最大用量が2,240mg/kg/dayであり、最大用量においては線維化や結節性病変 (過形成や腺腫) の増加はみられているが明らかな肝細胞癌の発生は見られていない。本試験では3,678mg/kg/dayの投与量となっており、2年間の発がん性試験における発がん用量には達している。

DL-ETに関しては、本試験と同様の0.1%の用量でWistarラットに34週間投与することで、肝細胞癌の発生を認めている (control: 0/9匹, DL-ET:3/12匹)。一方で、0.25%の用量でWistar, Fischer, SDラットに5ヶ月以上の投与を行うと、半数以上に肝細胞癌の発生が観察されている。28日間のSDラットにおける強制胃内投与試験においては、本試験とほぼ同量の80mg/kg/dayで軽度の体重抑制や数匹に肝臓の組織学的変化がみられているが、本試験においてもほぼ同様の結果が得られている。投与量としてはある程度肝毒性を示す量に達していると考えられる。

DOXにおいては、ラットの2年間発がん性試験から95mg/kg/dayに対して肝細胞癌の発生 (2/57匹)、肝細胞腺腫+肝細胞癌の発生の有意な上昇 (control:0/57匹, DOX:5/57匹) を認めている。本試験では145mg/kg/dayの投与量を得られているが、遺伝子セットの評価系の構築時にはThe Carcinogenic Potency Database (CPDB) におけるTD50 (腫瘍発生率が50%となる用量) 以上の投与量での変化を基準にしている。decaBDE, DL-ET, DOXのTD50はそれぞれ3,340, 9.76, 1,610 mg/kg/dayであり、本試験におけるDOXの投与量はTD50に達しておらず、組織学的変化も乏しいことから、遺伝子セットによる解析で良好な結果が得られなかった可能性がある。

今回のマイクロアレイを用いた評価はRat Clarion D Assay (Affymetrix) のプラットフォームを用いて行っている一方、評価系の構築の際に使用したOpen TG-GATEsはRat Genome 230 2.0 array (Affymetrix) を使用しており、今回は106遺伝子ではなく103遺伝子で評価を行っている。そのため、プラットフォームの違いによる影響を完全には否定できない。

以上の事から、本年度の結果は被検物質の投与方法、濃度および遺伝子セットの違いに起因する可能性がある。次年度には上記を考慮した投与方法、投与量とともに、評価系で使用する遺伝子の再検討を行う必要がある。

E. 結論

本年度実施した非遺伝毒性肝発がん物質において、化審法で実施される28日間混餌投与試験での肝発がん性の検出は既存の遺伝子セットでは困難であった。投与濃度、経路、投与物質、遺伝子セットについて再度修正し、実験を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Kato H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Inaguma S, Komura M, Nakao K, Naiki T, Kachi K, Kato A, Matsuo Y, Takahashi S. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer. Carcinogenesis. \(In press; DOI:](#)

- 10.1093/carcin/bgab017).
- 2) Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. *Virchows Arch.* (In press; DOI: 10.1007/s00428-021-03062-0).
 - 3) Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ohi Y, Kinowaki K, Kumaki N, Kondo Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajita S, Kato H, Kurosumi M, Sakatani T, Shimizu S, Taniguchi K, Tamiya S, Nakamura H, Kanbayashi C, Shien T, Iwata H. Nuclear grade and comedo necrosis of ductal carcinoma in situ as histopathological eligible criteria for the Japan Clinical Oncology Group 1505 trial: an interobserver agreement study. *Jpn J Clin Oncol.* 2021; 51: 434-43.
 - 4) 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.
 - 5) Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T. Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2021.
 - 6) Matsuyama N, Naiki T, Naiki-Ito A, Chaya R, Kawai T, Etani T, Nagai T, Kato H, Kubota Y, Yasui T. Novel case of androgen receptor-positive cancer of unknown primary without serum prostate-specific antigen elevation that became progression free in the long term after primary combined androgen blockade. *IJU Case Rep.* 2021; 4: 59-63.
 - 7) Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, Takahashi S. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. *Nutrients.* 2020; 12.
 - 8) Uemoto Y, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Asano T, Hisada T, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Kato H, Takahashi S, Toyama T. Sentinel lymph node biopsy may be unnecessary for ductal carcinoma in situ of the breast that is small and diagnosed by preoperative biopsy. *Jpn J Clin Oncol.* 2020.
 - 9) 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.
 - 10) Nozaki S, Naiki T, Naiki-Ito A, Iwatsuki S, Takeda T, Etani T, Nagai T, Iida K, Kato H, Suzuki T, Takahashi S, Umemoto Y, Yasui T. Selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, NCL1, could cause testicular toxicity via the regulation of apoptosis. *Andrology.* 2020.
 - 11) Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y. Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum. *PLoS One.* 2020; 15: e0229262.
 - 12) Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yeewa R, Aoyama Y, Nagayasu Y, Suzuki S, Inaguma S, Takahashi S. A novel model of non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis and carcinogenesis in connexin 32 dominant-negative transgenic rats. *Arch Toxicol.* 2020; 94: 4085-97.
 - 13) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Sakorn N, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Dehydrozingerone, a Curcumin Analog, as a Potential Anti-Prostate Cancer Inhibitor In Vitro and In Vivo. *Molecules.* 2020; 25.
 - 14) Kato T, Matsuo Y, Ueda G, Aoyama Y, Omi K, Hayashi Y, Imafuji H, Saito K, Tsuboi K, Morimoto M, Ogawa R, Takahashi H, Kato H, Yoshida M, Naitoh I, Hayashi K, Takahashi S, Takiguchi S. Epithelial cyst arising in an intrapancreatic accessory spleen: a case report of robotic surgery and review of minimally invasive treatment. *BMC Surg.* 2020; 20: 263.
 - 15) Kato H, Naiki-Ito A, Yamada T, Suzuki S, Yamashita Y, Inaguma S, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Toyama T, Takahashi S. The standard form of CD44 as a marker for invasion of encapsulated papillary carcinoma of the breast. *Pathol Int.* 2020.
 - 16) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. *Cancer Sci.* 2020; 111: 1165-79.

2. 学会発表

- 1) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、高橋智. エラグ酸の膵発癌抑制効果と膵癌におけるレジスチンの効果の検討. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、浜松 (2021 年 1 月)
- 2) Kato H, Naiki-Ito A, Komura M, Inaguma S, Takahashi S. Ellagic acid prevents pancreatic carcinogenesis in hamster model. The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Hiroshima (2020.10)
- 3) 加藤寛之、内木綾、鈴木周五、山下依子、稲熊真悟、高橋 智. Luteolin は STAT3 経路と DPD 発現を低

下させ膵発癌を抑制する. 第 109 回日本病理学会総会、福岡 (2020 年 4 月)

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