

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遺伝毒性肝発がん物質超短期検出法の確立

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 環境リスク評価学 准教授

### 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、「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」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。本年度は、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含む6化学物質を用いたラット単回投与を行い、投与24時間後の肝臓におけるマーカー遺伝子（10遺伝子）の発現データをqPCRで取得し、我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いて肝発がん性を予測した。その結果、「陽性」と判定されたものは、2遺伝毒性肝発がん物質であった。しかし、「優先評価化学物質」のphenylenediamineを含めた3遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134は「陰性」と判定された。今後、検出精度を確認するに、偽陰性物質について投与量を上げて再評価する必要があると考えられる。これまでに取得した69物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度83%、特異度95%、正答率90%の高い精度で検出できる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

生化学審法の規制区分「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」は正答率が9割を超える高精度試験系であるが、本研究で「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」を含め化学物質数を増やし、より信頼性の高い評価法へと発展させる。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。

本研究の特色は、化学物質の発がん性を迅速に予測できる評価法を構築することにある。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

目指すことが本研究の独創的な点である。

令和2年度は、既知遺伝毒性発がん物質、「監視化学物質」及び「優先評価化学物質」6物質について検討した。

### B. 研究方法

6週齢の雄SDラットを8群に分け、被験物質の単回強制胃内投与試験を行った。被験物質に関する情報と投与濃度は表1に示す。判定対象物質として、優先評価化学物質1種（*o*-phenylenediamine (OPD))、監視対象化学物質1種（Disperse Blue 134 (DB-134))を、既知の遺伝毒性肝発がん物質4種（Safrole; 2-Nitrofluorene (2-NF); 2-Aminoanthraquinone (2-AAQ); 1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ))の合計6物質を用いた。また、溶媒対照群(対照群)として0.5% Methyl cellulose (MC) 投与群、および陽性対照群として2-Nitropropane (2-NP) 投与群を設けた。

被験物質投与後24時間後に剖検を行った。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、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)。1.5mLチューブを4℃で一晩保管後、-80℃で長期保管した。凍結保存サンプル用として、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、-80℃で凍結保管した(1本はDNA adduct 解析用)。ホルマリン固定用サンプルとして、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)及び右葉尾部(R2)から計3スライス切り出し、カセットに入れ10%ホルマリンにて固定した。

遺伝子発現については、リアルタイム PCR (qPCR)にてデータを取得した。肝臓からの total RNA 抽出と cDNA の合成はそれぞれ RNeasy mini kit (キアゲン) と Super Script VI VIL0 Maste Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用した。得られた遺伝子発現データを我々が構築した遺伝毒性肝発がん物質検出モデル (サポートベクターマシンによる数理的アルゴリズムによるモデル) に入力し、判定を行った。

(倫理面への配慮)

大阪市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得て、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

2-NP (陽性対照群) で 1 例が死亡した。2-NP、2-NF 群および 2-AAQ 群で対照群に比較して有意な体重増加抑制が認められた。また、2-NP および OPD 群で、絶対肝重量および相対肝重量の有意な減少が認められた。DB-134 群では、相対肝重量の有意な減少が認められたが、絶対肝重量に有意な変化はみられなかった。同群では体重が増加傾向を示したことから、相対肝重量の減少は体重増加に伴ったものである可能性が示唆された。2-AAQ 群で絶対肝重量の有意な減少が認められたが、相対肝重量に有意な変化はみられなかった。これには同群での体重減少が関連する可能性があると考えられた。

表1 令和2年度に検討した遺伝毒性肝発がん物質

投与物質	分類	LD50 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	判定	正否
0.5% Methyl cellulose (MC)	溶媒 (陰性対照物質)				
2-Nitropropane (2-NP)	遺伝毒性陽性肝発がん物質 (陽性対照物質)	720	240#	陽性	○
o-phenylenediamine (OPD) 優先評価化学物質	遺伝毒性陽性肝発がん物質	510	170#	陰性	×
Disperse Blue 134 (DB-134) 監視対象化学物質	遺伝毒性陽性「発がん性不明」	「不明」	1000*	陰性	
Safrole	遺伝毒性陽性肝発がん物質	1950	650#	陰性	×
2-Nitrofluorene (2-NF)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	「不明」	1000*	陽性	○
2-Aminoanthraquinone (2-AAQ)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	>3200	1000*	陽性	○
1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)	遺伝毒性陽性肝発がん物質	「不明」	1000*	陰性	×

# LD50の1/3に相当する用量。  
\*入手可能な情報に参考にして、1日単回投与試験での致死量は1000 mg/kgより低い可能性が高いと推定した。

病理組織学的には、2-NP 群および Safrole 群で肝細胞壊死および脂肪変性が認められた。2-NF 群では小葉中心性両染色性変化が見られた。OPD 群、DB-134 群、ADBAQ 群では明らかな病理学的変化はみられなかった。

qPCR で取得した遺伝子発現データを構築済の遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った (表 1)。本モデルでは、遺伝毒性ラット肝発がん物質を「陽性」、その他の物質を「陰性」と判定する。その結果、「陽性」と判定されたものは、遺伝毒性肝発がん物質である 2 物質 (2-NF、2-AAQ) であった。しかし、それ以外の 3 遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性

陽性で発がん性不明である DB-134 は「陰性」と判定された。

### D. 考察

我々が構築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法の有用性の検証では、「優先評価化学物質」OPD を含めたそれ以外の 3 遺伝毒性肝発がん物質は「陰性」と判定された。遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134 は「陰性」と判定された。今後、検出精度を確認するに、偽陰性物質については投与量を増やして再評価する必要がある。これまでに検討した 69 物質に対して、我々が構築した遺伝子セットを用いた予測モデルは遺伝毒性肝発がん物質を、感度 83%、特異度 95%、正答率 90% の高い精度で検出できる可能性が示唆された。なお、これまでに 2-NF、DB-134 及び ADBAQ のラットにおける経口 LD50 に関する報告はなかったが、本試験では、いずれの投与群においても死亡例がみられなかったことから、これらの物質の LD50 は 1000 mg/kg 以上であることが明らかになった。GSH 分類においては経口急性毒性区分 4 以上に該当することが示唆された。

### E. 結論

我々が構築した遺伝子セットを用いた肝発がん性超短期検出法は遺伝毒性肝発がん物質を高い特異度で検出できるが、偽陰性になる物質がある。今後も本試験系の検出限界や改良についての検証を引き続き行う必要がある。

### 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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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) 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)
- 2) 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)

- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. NASH 肝発がんにおける特異的候補分子および新規マーカーとして CACHD1 の役割. 第 79 回日本癌学会学術総会、広島、Web 開催 (2020 年 10 月)
- 6) 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及び学術集会、WEB 開催 (2021 年 1 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