

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4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 大阪公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。令和4年度は非遺伝毒性肝発がん物4種類と、非発がん物質6種類の合計10種および、非遺伝毒性肝発がん物2種の濃度依存性について検討した。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。今回検討した化学物質において従来モデルおよび14遺伝子モデルでは、感度25%(1/4物質)、特異度100%(6/6)と判定された。また、高感受性モデルでは感度50%(2/4物質)、特異度67%(4/6)と判定された。そこで、3つの異なる発がん機序ごとにモデルを作成し、その成果を統合するモデル（機序別統合モデル）を作成した結果、感度50%(2/4物質)、特異度83%(5/6)と改善された。新たに作成した機序別統合モデルは、以前の試験データによる解析と合わせて、感度64%、特異度94%、正答率が82%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、その検出力について動物実験を行い検証する。令和3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ンの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（従来モデル）。

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（14遺伝子モデル）。

さらに、発がん物質検出感度を改善するため、14遺伝子モデルで用いた14遺伝子について、従来はがん原性試験で50%に腫瘍発生を認める投与量（TD50）以上

を、判定陽性とする予測モデルを構築していたが、低用量においても判定を陽性として新たに予測モデルを再構築した（高感受性モデル）。

新たな遺伝子セットを作成するため、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2種の化学物質において、高用量および中間用量を投与した群と対照群との発現差がWelch T値で5以上となる遺伝子を選んだ後に各2種の化学物質で共通する遺伝子を選出した。次にそれぞれの属する化学物質の高用量投与群において、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2倍以下となる遺伝子を選出した。その結果、選出された細胞傷害4遺伝子や酵素誘導2遺伝子、PPAR α アゴニスト18遺伝子が選出された。それぞれの遺伝子を用いて各発がん機序に対し陽性となる予測モデルを作成し、いずれかで陽性と判定された物質を陽性と判定する新たな予測モデルを構築した（機序別統合モデル）。

本年度は、非遺伝毒性肝発がん物質4種：Monuron（MON）、Mirex（MIR）、Safrole（SAF）、Nitrilotriacetic acid（NTA）と、非肝発がん物質で優先評価物質に属する6種：Ethylene glycol（EGL）、Terephthalic acid（TPA）、Ethyl acrylate（EAL）、Acrylic acid（ACA）、Triethanolamine（TEA）、Dimethyl terephthalate（DMT）を用いた。また、投与濃度による陽性判定検証のため、非遺伝毒性肝発がん物質 Furan(3, 10, 30 mg/kg/day 強制胃内投与)および Bis(2-ethylhexyl) phthalate（DEHP; 5, 15, 50 g/kg 摂餌）について各投与濃度および方法で行った。

（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得、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遺伝子で構成される従来モデルおよび、新たに開発した14遺伝子モデルにおいて、非遺伝毒性肝発がん物質4物質のうちSAFのみ(25%)発がん物質として判定された。一方、非発がん物質6物質は、従来モデルでは全て陰性と判定されていたが、14遺伝子モデルではDMTのみ陽性と判定された。高感受性モデルでは、非遺伝毒性肝発がん物質4物質のうちMIRとSAFが陽性(50%)となったが、非発がん物質のうち、TPAおよびDMTが陽性と判定された(表1)。

そこで、細胞傷害や酵素誘導、PPAR α アゴニストそれぞれの発がん機序に基づいたモデルを作成し構築した機序別統合モデルを用いた結果、細胞障害モデルでMONとSAFが、酵素誘導モデルでSAFが陽性と判定された。一方、非肝発がん物質は細胞傷害や酵素誘導モデルでは陰性と判定されたものの、PPAR α アゴニストモデルでDMTが陽性と判定された。以上から、総合評価として感度50%、特異度83%と判定された(表2)。

表1. 各モデルによる令和4年度検討した物質の判定結果

投与物質	略名	発がん性	従来モデル		14遺伝子モデル		高感受性モデル	
			判定	成否	判定	成否	判定	成否
Monuron	MON	陽性	陰性	×	陰性	×	陰性	×
Mirex	MIR	陽性	陰性	×	陰性	×	陽性	○
Safrole	SAF	陽性	陰性	○	陰性	○	陽性	○
Nitrilotriacetic acid	NTA	陽性	陰性	×	陰性	×	陰性	×
Ethylene glycol	EGL	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Terephthalic acid	TPA	陰性	陰性	○	陰性	○	陽性	×
Ethyl acrylate	EAL	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Acrylic acid	ACA	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Triethanolamine	TEA	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○
Dimethyl terephthalate	DMT	陰性	陰性	○	陽性	×	陽性	×

表2. 機序別統合モデルによる令和4年度検討した物質の判定結果

予測モデル	細胞傷害物質 検出モデル	酵素誘導物質 検出モデル	PPAR α アゴニスト 物質検出モデル	総合評価
感度	50% (2/4)	25% (1/4)	0% (0/4)	50% (2/4)
特異度	100% (6/6)	100% (6/6)	83% (5/6)	83% (5/6)
正答率	80% (8/10)	70% (7/10)	50% (5/10)	70% (7/10)

これまで検証した全ての89化学物質について、各モデルにおける感度、特異度および正答率と表3にまとめた。従来モデルに比べ、14遺伝子モデルは感度が高く特異度も遜色なく正答率も80%近く認める優秀なモデルではあるが、感度が50%近くと問題点が存在する。今年度作成した高感受性モデルは、感度が67%と現行モデルから大幅な改善を認める優秀なモデルである一方で、特異度が下がっており改善が望まれる。

表3. これまでに検討した89物質の予測モデルごとの成績

予測モデル	従来モデル	14遺伝子モデル	高感受性モデル
感度	39% (14/36)	53% (19/36)	67% (24/36)
特異度	100% (53/53)	96% (51/53)	83% (44/53)
正答率	75% (67/89)	79% (70/89)	76% (68/89)

そこで作成した機序別統合モデルでの結果を表4に示す。各予測モデルから陽性と判定された物質を統合し、感度64%と高感受性モデルに近い高感度を得られたとともに、特異度についても偽陽性判定を統合しても94%と高い値を維持しており、正答率も80%以上ある良いモデルが作成できた。

表4. 機序別統合モデルにおける89物質の成績

予測モデル	細胞傷害物質 検出モデル	酵素誘導物質 検出モデル	PPAR α アゴニスト 物質検出モデル	総合評価
感度	28% (10/36)	44% (16/36)	19% (7/36)	64% (23/36)
特異度	98% (52/53)	98% (52/53)	98% (52/53)	94% (50/53)
正答率	70% (62/89)	76% (68/89)	66% (59/89)	82% (73/89)

非遺伝毒性発がん物質の一部について、投与濃度を下げて検討を行った結果、Furanについては従来モデルや14遺伝子モデルで高用量以下は陰性と判定された。一方、高感受性モデルでは陽性と判定されたことから、高感受性モデルでは低い濃度から陽性と判定出来ることが示された。新しい機序別統合モデルでは、高用量のみ陽性と判定された。DEHPについては、いずれのモデルにおいても低用量から全て陽性と判定された(表5)。

表5. 各モデルによる投与濃度ごとの発がん性判定結果

予測モデル	Furan			DEHP		
	Low	Middle	High	Low	Middle	High
従来モデル	×	×	○	○	○	○
14遺伝子モデル	×	×	○	○	○	○
高感受性モデル	○	○	○	○	○	○
機序別統合モデル	×	×	○	○	○	○

D. 考察

これまでに検討した化学物質において、従来モデルでは感度が低い結果となり、14遺伝子モデルで改善されているものの5割近くと、より高い感度のモデル構築が望まれる結果となった。そこで、高感受性モデルを開発したが、特異度が低下しており改善する必要があった。発がん機序ごとに構築したモデルを組み合わせ作成した機序別統合モデルでは、高感受性モデルに近い感受性を認めるとともに、特異度は以前のモデルと遜色ない結果が得られた。

また、投与濃度による陽性判定検証では、従来モデルや14遺伝子モデルでは高濃度投与でしか陽性判定が出なかった一方で、高感受性モデルでは低用量でも要請となったことは、モデル作成に起因すると考えられた。新たに作成した機序別統合モデルは、高感受性モデルほど低濃度での感度が高くない可能性を示した。

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摘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64%、特異度94%、正答率82%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) Yamaguchi T, Gi M, Fujioka M, Suzuki S, Oishi Y, Wanibuchi H. A carcinogenicity study of diphenylarsinic acid in C57BL/6J mice in drinking water for 78 weeks. *J Toxicol Pathol.* 2023; 36: 123-9.
- 2) Yokota Y, Suzuki S, Gi M, Yanagiba Y, Yoneda N, Fujioka M, Kakehashi A, Koda S, Suemizu H, Wanibuchi H. *o*-Toluidine metabolism and effects in the urinary bladder of humanized-liver mice. *Toxicology.* in press.
- 3) Oikawa D, Gi M, Kosako H, Shimizu K, Takahashi H, Shiota M, Hosomi S, Komakura K, Wanibuchi H, Tsuruta D, Sawasaki T, Tokunaga F. OTUD1 deubiquitinase regulates NF- κ B- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. *Cell Death Dis.* 2022; 13: 694.
- 4) Nagai M, Iemura K, Kikkawa T, Naher S, Hattori S, Hagihara H, Nagata KI, Anzawa H, Kugisaki R, Wanibuchi H, Abe T, Inoue K, Kinoshita K, Miyakawa T, Osumi N, Tanaka K. Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype. *Brain Commun.* 2022; 4: fcac220.
- 5) Tagami M, Kakehashi A, Katsuyama-Yoshikawa A, Misawa N, Sakai A, Wanibuchi H, Azumi A, Honda S. FOXP3 and CXCR4-positive regulatory T cells in the tumor stroma as indicators of

tumor immunity in the conjunctival squamous cell carcinoma microenvironment. *PLoS One.* 2022; 17: e0263895.

- 6) Deguchi S, Tanaka H, Suzuki S, Natsuki S, Mori T, Miki Y, Yoshii M, Tamura T, Toyokawa T, Lee S, Muguruma K, Wanibuchi H, Ohira M. Clinical relevance of tertiary lymphoid structures in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2022; 22: 699.
 - 7) Kondo N, Sakurai Y, Takata T, Kano K, Kume K, Maeda M, Takai N, Suzuki S, Eto F, Kikushima K, Wanibuchi H, Miyatake SI, Kajihara T, Oda S, Setou M, Aoki J, Suzuki M. Persistent elevation of lysophosphatidylcholine promotes radiation brain necrosis with microglial recruitment by P2RX4 activation. *Sci Rep.* 2022; 12: 8718.
 - 8) Matsue T, Gi M, Shiota M, Tachibana H, Suzuki S, Fujioka M, Kakehashi A, Yamamoto T, Kato M, Uchida J, Wanibuchi H. The carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide inhibits urinary bladder cancers via suppression of beta-catenin signaling. *Cancer Sci.* 2022; 113: 2642-53.
 - 9) Suzuki S, Asai K, Gi M, Kojima K, Kakehashi A, Oishi Y, Matsue T, Yukimatsu N, Hirata K, Kawaguchi T, Wanibuchi H. Response biomarkers of inhalation exposure to cigarette smoke in the mouse lung. *J Toxicol Pathol.* 2022; 35: 247-54.
- ### 2. 学会発表
- 1) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性膀胱がん関連芳香族アミン類の尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
 - 2) 梯アンナ、鈴木周五、魏民、鰐淵英機. 肝発がんにおける新規標的分子ターゲットとしてのCanopy homolog 2の役割. 第111回日本病理学会総会、神戸 (2022年4月)
 - 3) 鰐淵英機. ヒ素による発がん機序の解明. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年6月)
 - 4) 鰐淵英機. 有機ヒ素化合物の長期毒性・発がん性機序の研究. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
 - 5) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めた*o*-toluidineの尿中代謝物と膀胱尿路上皮への影響. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
 - 6) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 1,4-ジオキサンの肝発がん機序の解明と定量的発がんリスク評価. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
 - 7) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 芳香族アミンの膀胱がんメカニズムの解析. 第29回日本がん予防学術大会、京都 (2022年7月)

- 8) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 芳香族アミンによる職業性膀胱がん. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 9) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 10) 魏民、鈴木周五、山下聡、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、鰐淵英機. 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. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 11) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱桂ユウ、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
- 12) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、邱桂鈺、芝野佳奈、鰐淵英機. マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物の発がん性およびその機序. 第35回発癌病理研究会、湯沢 (2022年11月)
- 13) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐淵英機、戸塚ゆ加里. 職業性膀胱がん候補化学物質によるDNA付加体の網羅的解析. 第51回環境変異原学会、広島 (2022年11月)
- 14) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、鈴木周五、鰐淵英機. 無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおける尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
- 15) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸による膀胱発がん機序の解明. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
- 16) 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、山本与毅、Vachiraarunwong Arpamas、梯アンナ、鰐淵英機. ヒ素誘発膀胱発がん過程におけるDNAメチル化異常の関与. 第27回ヒ素シンポジウム、今治 (2022年12月)
- 17) 道場彩乃、魏民、櫻井映子、寺本 篤司、桐山諭和、山田 勢至、鰐淵英機、塚本徹哉. γ H2AXとKi-67を用いた遺伝毒性肝発がん物質の早期検出:機械学習による自動判定の試み. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 18) 山本与毅、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、Guiyu Qiu、芝野佳奈、清水一希、梯アンナ、鰐淵英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおけるDNAメチル化異常. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 19) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Kana Shibano, Guiyu Qiu, Pharapirom Aroonrat, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of various arsenicals on immortalized normal human bladder epithelial cells. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 20) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌の新規バイオマーカー候補の解析. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 21) Guiyu Qiu、梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、鰐淵英機. ヒト浸潤性膵管癌におけるPRDX3の機能解明. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 22) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、芝野佳奈、Guiyu Qiu、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機. マウス経胎盤曝露モデルにおけるジフェニルアルシン酸(DPAA)のエピジェネティック修飾異常を介した肝発がんの亢進. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 23) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、鈴木周五、鰐淵英機. ヒト化肝臓マウスにおける無機ヒ素の体内動態及び毒性. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)
- 24) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐淵英機. 職業性ばく露を認めたo-toluidineの尿中代謝物による膀胱尿路上皮への影響. 第39回日本毒性病理学会総会、東京 (2023年1月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし