

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 鈴木 周五 大阪公立大学大学院医学研究科分子病理学 准教授

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質3種および非肝発がん物質2種を、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。結果、従来の予測モデルおよび14遺伝子モデルにおいて、1物質が発がん物質と判定される一方で、高感受性モデルでは2物質が発がん物質と判定された。一方、非肝発がん物質は予測モデルおよび14遺伝子モデルでいずれも陰性と判定されたが、高感受性モデルでは1つが陽性と判定された。以上の結果から、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、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」(鰐渕班)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4年度は、新たに新規の非遺伝毒性肝発がん物質と、優先評価物質に属する非肝発がん物質を用いて、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、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による数理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。加えて、より高い精度を求めて開発した14遺伝子からなる新規予測モデルを用いて、検出法の特異性及び感受性について検証した。

大阪公立大担当分として、非遺伝毒性肝発がん物質3種：Monuron(MON; 0.3%)、Mirex(MIR; 100mg/kg)、Safrole(SAF; 1%→0.5%)および優先評価物質に属する非肝発がん物質2種：Ethylene glycol(EGL; 4%)、Terephthalic acid(TPA; 3%)を混餌投与した。

(倫理面への配慮)

大阪公立大学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

実験開始1週間後にSAF群において体重減少を認めたため、2週目から1%から0.5%へ投与濃度を下げて実験を継続した。経過中にMONおよびSAF投与群において、対照群に比べ体重増加抑制傾向が見られ、最終屠殺時には対

照群に比べ有意な体重減少を認めた（表1）。また、MON投与群において肝重量の有意な低下、MIRおよびSAF投与群においては肝臓相対重量が対照群に比べ有意な増加を認めた（表1）。

表1. 体重および肝重量、摂餌・飲水量

Treatment	No. of rat	Body weight (g)	Liver Absolute (g)	Food consumption	Water consumption
			Relative (%)		
Control	5	407.7 ± 21.1	16.4 ± 1.6	4.0 ± 0.2	23.7 ± 1.1
MON	5	308.2 ± 20.7 ***	12.7 ± 1.8**	4.1 ± 0.3	15.7 ± 3.1
MIR	5	412.9 ± 23.0	18.8 ± 1.8	4.6 ± 0.3*	25.4 ± 2.3
SAF	5	337.8 ± 18.5 ***	18.7 ± 1.7	5.5 ± 0.2***	19.0 ± 5.9
EGL	5	419.1 ± 41.8	16.9 ± 2.1	4.0 ± 0.2	26.4 ± 3.0
TPA	5	391.8 ± 13.0	15.9 ± 0.8	4.1 ± 0.2	26.0 ± 2.8

* ** ***: P< 0.05, 0.01 and 0.001 vs Control, respectively

MON: Monuron; MIR: Mirex; SAF: Safrole; EGL: Ethylene glycol; TPA: Terephthalic acid

肝臓の組織学的検討した結果、MIR投与群でZone 3において肝細胞腫大と脂肪変性が存在した。SAF投与群においてZone 3での肝細胞腫大と好酸性化が存在した。MON群においても、Zone 3での軽度の肝細胞腫大と胞体の清明化が存在した。EGLおよびTPA投与群では、対照群との差がはっきりしなかった（図1）。

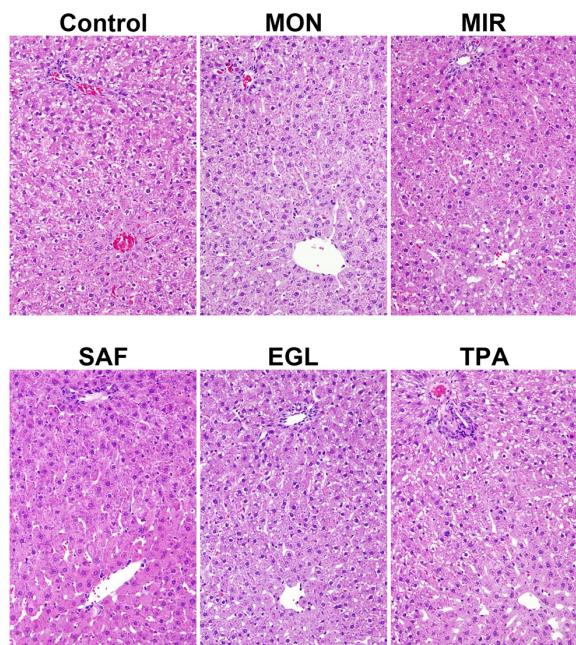


図1. 各物質を投与したラット肝組織像

各肝組織からRNAを抽出した結果、平均38.5 ± 17.0 µgのtotal RNAを回収し、質もA260/A280が平均2.11 ± 0.13と良い状態だった。マイクロアレイ解析を行った結果、対照群に対してZ scoreが2倍以上、発現差が1.5倍以上変動した遺伝子は、MON投与群においては上昇361、低下309、MIR投与群では上昇343、低下210、SAF投与群では上昇386、低下397、EGL投与群では上昇266、低下283、TPA投与群では上昇362、低下331の遺伝子を認めた。

各投与群における遺伝子発現データについて、構築済の非遺伝毒性肝発がん物質検出モデルに入力し、非遺伝毒性肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った結果、従来の予測モデルおよび14遺伝子モデルにおいては、SAFのみ陽性と判定され、他の2物質は陰性と判定された。また、非発がん物質はいずれも陰性と判定された。一方、高感受性モデルにおいては、SAFに加え、MIRにおいても陽性と判定されたが、非肝発がん物質EGLが陽性と判定された（表2）。

表2. 各物質における発がん性判定結果

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	判定	成否
Monuron	MON	陽性	×	陰性	×	陰性	×	陰性	×
Mirex	MIR	陽性	陰性	陰性	×	陽性	○	陽性	○
Safrole	SAF	陽性	陽性	○	陽性	○	陽性	○	陽性
Ethylene glycol	EGL	陰性	陰性	○	陰性	○	陰性	○	陽性
Terephthalic acid	TPA	陰性	陰性	○	陰性	○	陽性	×	陽性

D. 考察

今回、いずれの予測モデルにおいても発がん物質として同定できたSAFは、強い肝組織像の変化が存在し、対照群との遺伝子発現が変化した遺伝子数も多く認められた。一方、組織学的にも変化を認めたMIRは高感受性モデルでのみ陽性と判定された。MONは体重増加抑制を認める濃度での投与を行ったが、相対肝重量や肝組織において大きな変化を認めず、いずれの予測モデルでも陰性と判定された。肝組織変化がない場合には検出が困難である可能性を示した。従来モデルや14遺伝子モデルでは、非肝発がん物質EGLおよびTPAが陰性と判定されたものの、高感受性モデルではEGLが陽性と判定された。感度の上昇とともに特異度の低下が見られ、モデル開発の難しさを示した。

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、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

- 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.
- 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*. 2023; 488: 153483.
- 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.
- 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.
- 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.
- 6) Saleh DM, Luo S, Ahmed OHM, Alexander DB, Alexander WT, Gunasekaran S, El-Gazzar AM, Abdalgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, Hady R, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Xu J, Suzuki S, Naiki-Ito A, Takahashi S, Tsuda H. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. Part Fibre Toxicol. 2022; 19: 30.
- 7) 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、鰐渕英機. 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、鰐渕英機. 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) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 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）
 - 4) 魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 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）
 - 5) 小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐渕英機、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）
 - 6) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 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）
 - 7) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐渕英機、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）
 - 8) 魏民、鈴木周五、山下聰、藤岡正喜、梯アンナ、山本与毅、邱桂ユウ、鰐渕英機. 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）
 - 9) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、邱桂ユウ、梯アンナ、鰐渕英機. 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）
 - 10) 藤岡正喜、魏民、鈴木周五、大石裕司、梯アンナ、邱桂鉄、芝野佳奈、鰐渕英機. 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）
 - 11) 帯金明日香、小宮雅美、鈴木周五、魏民、鰐渕英機、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）
 - 12) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwon Arpamas、鈴木周五、鰐渕英機. 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）
 - 13) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 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）
 - 14) 魏民、藤岡正喜、鈴木周五、山本与毅、Vachiraarunwong Arpamas、梯アンナ、鰐渕英機. 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）
 - 15) 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、鰐渕英機. 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）
 - 16) 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 b-ladder epithelial cells. 第39回日本毒性病理学会総会、東京（2023年1月）
 - 17) 梯アンナ、西土井悠作、Guiyu Qiu、鈴木周五、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機. ヒト浸潤性膀胱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）
 - 18) Guiyu Qiu、梯アンナ、鈴木周五、藤岡正喜、鰐渕英機. ヒト浸潤性膀胱癌における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）
 - 19) 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、鰐渕英機. 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）
 - 20) 芝野佳奈、藤岡正喜、魏民、Arpamas Vachiraarunwong、Pharapirom Aroonrat、Guiyu Qiu、鈴木周五、鰐渕英機. 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）
 - 21) 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 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