

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 豊田武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

本研究では、非遺伝毒性肝発がん物質による28日間反復経口投与試験を実施し、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を目指す。令和4年度は、6週齢の雄SDラットに非遺伝毒性肝発がん物質であるFuranを0, 3, 10および30 mg/kg、ならびに非肝発がん物質であるEthyl acrylateを200 mg/kgの用量で28日間反復経口投与し、肝臓の病理組織学的検索および網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、Furanにより誘発される胆管線維症およびoval cell過形成等の特徴的な肝病変は、明確な用量相関性を示すことが明らかとなった。本研究の成果は、遺伝子セットを用いた肝発がん物質短期検出法の開発に向け、有効な基礎データになり得ると考えられた。

A. 研究目的

化審法の規制区分「監視化学物質」および「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、それらの物質すべてを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、肝発がん性を短期間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」および「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～令和元年度にかけて、「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」と「DNAアダクトーム解析による遺伝毒性/発がん性評価」は、いずれも9割を超える正答率で、遺伝毒性肝発がん物質を検出または遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質を分類できる試験法である。そこで、令和2～4年度に「監視化学物質」および「優先評価化学物質」を含め検討物質数を増やし、これらの試験法をより信頼性の高い評価法へと発展させ、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。また、上記試験法が対応できない非遺伝毒性肝発がん物質に対して、先行研究で開発した発がん機序別に分類できる「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」を確立する。令和2年度は既知の非遺伝毒性肝発がん物質を主体に、令和3年度以降は「監視化学物質」および「優先評価化学物質」を含め検証および改良し、OECDテストガイドライン化を目指す。最終的に、これら3つの試験法を組み合わせ

た短期肝発がん性総合評価スキームの確立を目指す。

B. 研究方法

令和4年度の被験物質として、肝臓を標的としない非遺伝毒性発がん物質のEthyl acrylate (EA)および非遺伝毒性肝発がん物質であるFuranを選定し、6週齢の雄SDラットに溶媒（コーン油）対照群とともに28日間強制経口投与した（5匹/群）。このうちEAは、化審法における優先評価化学物質に指定されている。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量（EA：200 mg/kg、Furan：30 mg/kg）を用い、Furanについては病理組織学的所見および遺伝子発現動態の用量相関性を検討するため、中・低用量群として10および3 mg/kg群を併せて設定した。

投与期間終了時に解剖し、肝臓および腎臓の重量を測定した。肝臓の病理組織学的検索を実施するとともに、凍結採材した肝臓組織から遺伝子発現解析用のtotal RNAを抽出した。マイクロアレイ（GeneChip Clariom D Assay, Affymetrix）による網羅的遺伝子発現解析を、（株）セルイノベーターに委託して実施した。

（倫理面への配慮）

動物実験の実施にあたっては、使用する動物数は最小限にとどめ、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会の承認を経て、同所が定める実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

対照群および各被験物質投与群の、体重・摂餌量・飲水量を表1に示す。Furan（高用量）投与群において、統計学的有意差はないものの体重増加抑制の傾向が認められた。同群では、摂餌量の低値および飲水量の高値傾向もみられた。

各投与群における肝および腎重量を表2に示す。

Furan 投与群では用量依存性の肝重量増加が認められ、中および高用量群における肝相対重量の有意な増加に加え、高用量群では肝絶対重量の増加も観察された。また、Furan (高用量) 投与群では腎相対重量も有意に増加した。

表 1. 各投与群における体重・摂餌量・飲水量

Treatment	Body weight (g)		Food consumption (g/rat/day)	Water intake (g/rat/day)
	Initial	Week 4		
Control	188.8 ± 9.1	413.3 ± 28.3	21.0	35.3
Ethyl acrylate	188.6 ± 9.3	392.7 ± 22.3	20.2	39.0
Furan (low)	188.8 ± 6.2	384.9 ± 42.0	19.9	38.4
Furan (mid)	188.7 ± 14.4	406.6 ± 59.8	21.8	34.3
Furan (high)	188.3 ± 10.6	358.6 ± 41.3	18.9	47.0

表 2. 各投与群における肝および腎重量

Treatment	Liver weight		Kidney weight	
	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	16.5 ± 1.93	3.99 ± 0.24	2.80 ± 0.25	0.68 ± 0.04
Ethyl acrylate	15.3 ± 1.34	3.89 ± 0.17	2.57 ± 0.05	0.66 ± 0.04
Furan (low)	15.8 ± 3.10	4.08 ± 0.38	2.62 ± 0.48	0.68 ± 0.06
Furan (mid)	19.3 ± 3.64	4.71 ± 0.27*	2.77 ± 0.28	0.69 ± 0.05
Furan (high)	24.2 ± 2.22**	6.76 ± 0.53**	2.91 ± 0.40	0.81 ± 0.04**

*, **; P < 0.05 and 0.01 vs. Control (Dunnett).

肝臓の病理組織学的検索の結果、Furan (高用量) 投与群において、重度の胆管線維症 (図 1 下段左) および oval cell の過形成が特に尾状葉で顕著に認められたほか、肝細胞のびまん性肥大および核の大型化 (図 1 下段右) が観察された。Furan 投与群におけるこれらの肝病変の程度は、明確な用量相関性を示した (図 1 中段)。一方、対照群および EA 投与群では肝臓に明らかな病変は認められなかった (図 1 上段)。

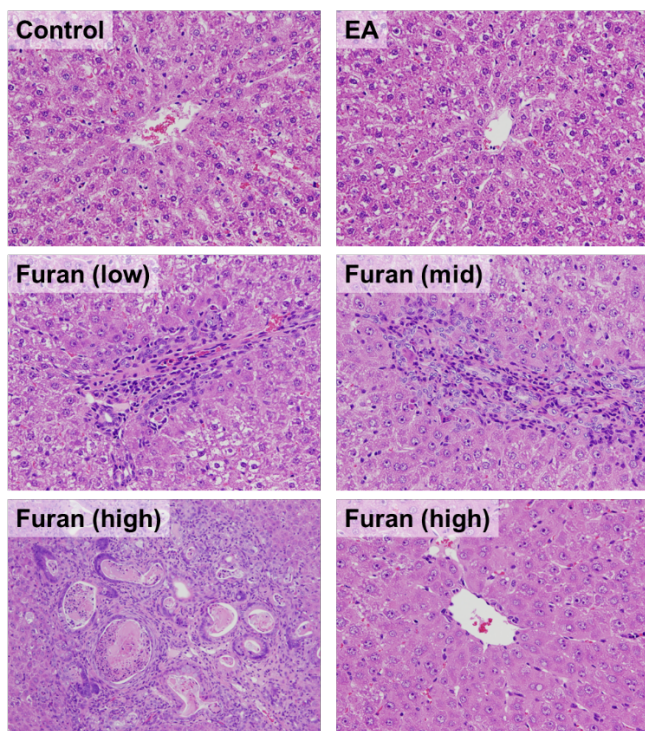


図 1. 各投与群の肝臓における病理組織学的変化

D. 考察

令和 4 年度は、肝臓を標的としない非遺伝毒性発がん物質 (EA) および非遺伝毒性肝発がん物質 (Furan)

各 1 物質について、短期試験での最大用量を用いたラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、肝臓の病理組織学的検索を行った。

EA は樹脂・プラスチック等のポリマー原料として用いられ、優先評価化学物質に指定されている。長期の経口投与によって齧歯類の前胃に発がん性を示すことが知られ、国際がん研究機関 (IARC) による評価ではグループ 2B (「ヒトに対する発がん性が疑われる」) に分類されている (IARC, 2019)。一方で、肝臓に対する毒性影響は報告されておらず、本研究においても肝臓に明らかな病変は認められなかった。令和 2 年度に検討した Caprolactam (非発がん物質) と同様に、遺伝子発現動態に基づく非遺伝毒性肝発がん物質検出法の開発における陰性対照物質として有用であることが確認された。

Furan は化学物質の合成中間体として利用される一方、コーヒーや加工食品など、様々な食品中に存在することが知られている。ラット肝臓において胆道系および肝細胞の腫瘍を高頻度に発生させ、IARC による評価ではグループ 2B に分類されている (IARC, 1995)。本研究において、Furan は肝臓に胆管線維症等の特徴的な病理組織学的所見を誘発し、その程度は明瞭な用量相関性を示すことが明らかとなった。

各群の肝臓から抽出した total RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析を実施し、得られた結果を共同研究者に提出済みである。本研究の成果は、遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の開発に向け、有効な基礎データになり得ると考えられた。

E. 結論

令和 4 年度は、肝臓を標的としない非遺伝毒性発がん物質 (EA) および非遺伝毒性肝発がん物質 (Furan) について、ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験を実施し、肝臓の病理組織学的検索および網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、EA は明らかな肝病変を誘導しない一方、Furan により誘発される肝病変の程度は明瞭な用量相関性を示すことが明らかとなった。遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の開発において、両物質はそれぞれ陰性対照および用量相関性の検証に有用であることが確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toyoda T, Sone M, Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. J Toxicol Sci. in press
- 2) Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. Food Chem Toxicol. 2023; 175: 113702.
- 3) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in N-butyl-N-(4-

hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci.* 2022; 189: 51-61.

- 4) Toyoda T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals. *J Toxicol Pathol.* 2022; 35: 283-98.
- 5) Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci.* 2022; 47: 457-66.
- 6) Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic homo- and hetero-dimers of o-toluidine, o-anisidine, and aniline formed by in vitro metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2022; 35: 1625-30.
- 7) Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage. *Nat Commun.* 2022; 13: 5854.

2. 学会発表

- 1) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023年3月)
- 2) 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京 (2023年1月)
- 3) 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子. 化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程における γ -H2AXの役割. 第81回日本癌学会学術総会, 横浜 (2022年9月)
- 4) 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX を指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発. 第49回日本毒性学会学術年会, 札幌 (2022年7月)
- 5) 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. 結晶子径6 nmの超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性. 日本薬学会第143年会, 札幌 (2023年3月)
- 6) Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite

diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023年3月)

- 7) Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors and promoters of thyroid hormone metabolism. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023年3月)
- 8) 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 渡邊正悟, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆかり, 若林敬二, 三好規之. 単環芳香族アミンの新規尿中代謝物はラット膀胱上皮におけるALDH1A1の発現を誘導する. 日本農芸化学会2023年度大会, Web開催 (2023年3月)
- 9) 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子. ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京 (2023年1月)
- 10) 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割とCD44との関連. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 東京 (2023年1月)
- 11) 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 薬剤性腎障害の慢性化病変におけるCD44陽性尿細管の病態生理学的意義. 第5回医薬品毒性機序研究会, 東京 (2022年12月)
- 12) 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価. 第44回日本バイオマテリアル学会, 東京 (2022年11月)
- 13) 増田寛喜, 豊田武士, 宮下知治, 吉田寛, 瀬戸泰之, 野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対するMEKインヒビターの治療効果の検討. 第33回日本消化器癌発生学会総会, 東京 (2022年11月)
- 14) 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ナノサイズ二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性. 第59回全国衛生化学技術協議会年会, 川崎 (2022年11月)
- 15) 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出. 第81回日本癌学会学術総会, 横浜 (2022年9月)
- 16) 赤木純一, 豊田武士, 小川久美子. γ -H2AXとの組み合わせによる肝発癌物質検出のためのバイオマーカーとしてのEpCAMおよびアミノペプチダーゼ

N の有用性. 第 81 回日本癌学会学術総会、横浜 (2022 年 9 月)

- 17) 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対する MEK インヒビターの治療効果の検討. 第 81 回日本癌学会学術総会、横浜 (2022 年 9 月)
- 18) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京 (2022 年 8 月)
- 19) 岡本悠佑、福井千恵、赤根弘敏、豊田武士、梶山健次、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京 (2022 年 8 月)
- 20) Kobayashi T, Toyoda T, Yoshioka Y, Murai N, Kishimoto S, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic metabolites of *o*-toluidine and *o*-anisidine induce ALDH1A1 in rat bladder epithelium. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022 年 8 月)
- 21) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ナノサイズ酸化チタン (IV) の毒性研究. 第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022 年 7 月)
- 22) 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. 甲状腺ホル

モン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較. 第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022 年 7 月)

- 23) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いた CD44 の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証. 第 49 回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022 年 7 月)
- 24) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆかり、若林敬二、三好規之. 細胞毒性を有する *o*-Toluidine と *o*-anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する. 第 29 回日本がん予防学会総会、京都 (2022 年 7 月)
- 25) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. AKI から CKD への移行における CD44 の役割とバイオマーカーとしての応用. 第 65 回日本腎臓学会学術総会、神戸 (2022 年 6 月)
- 26) 森川朋美、豊田武士、赤根弘敏、松下幸平、小川久美子. ラットを用いたオリゴガラクトン酸の 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 日本食品化学学会第 28 回総会・学術大会、東京 (2022 年 5 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