

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
(20KD1002)

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 講師

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、「優先評価化学物質」についての発がん性評価を実施した。令和4年度は、新規優先評価化学物質としてDimethyl Terephthalate (DMT)とともに、令和3年度に研究分担者の横平が検討し、いずれの遺伝子セットにおいても発がん性予測の陽性を示したBis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (5.0%摂餌投与)について、低濃度での検出力を検討するために、5.0%に加えて1.5%、0.5%を設定し、28日間混餌投与を行った。投与後の肝臓を用いたマイクロアレイデータを用いて従来の106遺伝子セットによる肝発がん性予測を行うとともに、新規に構築した14遺伝子セット、高感受性モデルによる肝発がん性予測を行った。実験の結果、DEHPは全ての濃度、全ての検出法で陽性を示し、低濃度から検出できることが示唆され、遺伝子セットの発現量はDEHPの濃度依存性に上昇していた。DMTは長期投与試験で発がん性なしとされ、従来法では陰性を示したが、14遺伝子セットや高感受性モデルでは陽性を示した。以上の結果から、遺伝子セットによる肝発がん性予測モデルは、DEHPに関しては低濃度から検出可能である有用なモデルである。DMTに関しては、本実験は3%と高い濃度で投与行っており、高用量における発がん性については慎重に検討する必要があると考えられる。

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の確立を目指す。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)では、遺伝毒性肝発がん物質を対象として抽出した10遺伝子の発現をRT-PCRにより定量化することで、60被験物質(肝発がん物質23物質)における発がん性の検出は感度82.6%、特異度97.3%であった。本研究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種類の非遺伝毒性肝発がん物質をそれぞれ投与した肝臓マイクロアレイの結果から構築した発がん物質検出のための106遺伝子による評価系を用いて、その有用性について検討する。さらに昨年度までに、新規に構築した14遺伝子モデル、高感受性モデルの遺伝子セットでの評価を行い、感度、特異度の高い非肝発がん性予測遺伝子セットの構築と検証を行う。

B. 研究方法

OECD テストガイドライン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。被験物質として、令和3年度に研究分担者の横平

が検討し、いずれの遺伝子セットにおいても発がん性予測の陽性を示したBis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (5.0%摂餌投与)について、低濃度での検出力を検討するために、5.0%に加えて1.5%、0.5%を設定した。さらに、新たな優先評価化学物質としてDimethyl Terephthalate (DMT) (3%摂餌投与)を検討した。

いずれも6週齢SD雄ラットを各群6匹に分け、28日間混餌投与実験を行い、肝臓を採取した。その後、HE染色による組織学的検討、Ki-67、GST-P免疫染色による解析を実施した。Ki-67は外側左葉における陽性率をAperio CS2 (Leica)で測定した。また、RNA laterで凍結保存した肝外側左葉の一部からmRNAを抽出し、Clariom D Assayのマイクロアレイ解析を行った。その結果を用い、以前に構築した106遺伝子モデル、再構築した14遺伝子モデル、また昨年度新たに感度を上げて設定した高感受性モデルにおける肝発がん性予測を行った。

(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22-010)。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

実験期間中DEHP 5.0%群で著明な体重減少が見られ、実験23日目に1匹死亡を確認した。一方で、DEHP 0.5%、1.5%群は一時的に体重減少が見られたが、屠殺時にControl群と有意な差は見られなかった(図1)。屠殺時の臓器重量は、DEHP群のいずれの濃度においても相対

肝重量の有意な増加を認め(P<0.001)、DHEP 1.5%、5.0%群は相対腎重量の有意な増加も見られた(P<0.001)。DMT群では体重、臓器重量ともに有意な変化は認めなかった(表1)。

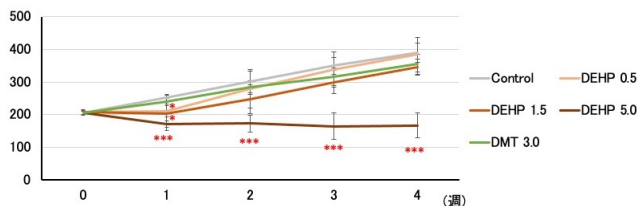


図1. 体重変化(g)

表1. 体重及び臓器重量

n	体重 (g)	肝		腎(左右)		脾	
		重量 (g)	相対 (%)	重量 (g)	相対 (%)	重量 (g)	相対 (%)
Control	391±29	14.53±2.21	3.71±0.38	2.51±0.25	0.64±0.05	0.72±0.08	0.18±0.01
DEHP 0.5	385±53	20.09±2.26***	5.25±0.46***	2.69±0.23	0.70±0.05	0.77±0.15	0.20±0.03
DEHP 1.5	346±24	21.99±1.85***	6.36±0.35***	2.83±0.19	0.82±0.04***	0.81±0.15	0.23±0.04
DEHP 5.0	168±37***	12.41±3.49	7.30±0.61***	1.64±0.35	0.98±0.07***	0.37±0.09***	0.22±0.01
DMT 3.0	355±30	15.01±1.13	4.25±0.40	2.35±0.24	0.66±0.03	0.62±0.10	0.18±0.03

体重と摂餌量の結果からDEHP 0.5%、1.5%、5.0%群とDMT 3.0%群の被検物質投与量はそれぞれ358、1,017、3,575 mg/kg/dayと2,428mg/kg/day相当と換算された。

病理組織学的検討では、DEHP群のいずれの濃度においても、細胞質の好酸性変化とともに肝細胞腫大を全例に認めたが、0.5%群ではその程度は弱かった。DMT群では明らかな組織学的な変化はみられなかった(図2)。Ki67陽性率はDHEP群の全群で有意な低下が見られた(図3)。GST-P陽性細胞はいずれの群でも観察されなかった。

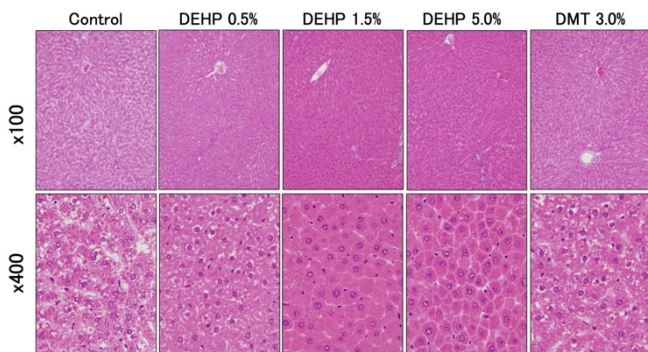


図2. 肝臓のHE所見

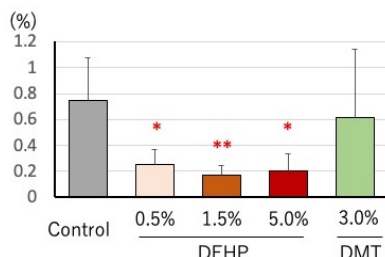


図3. 肝外側左葉Ki-67陽性細胞率

マイクロアレイデータを用いた肝発がん性予測の結果、DEHP 0.5%、1.5%、5.0%群は従来の106遺伝子セッ

ト、14遺伝子セット、高感受性セットのいずれにおいても肝発がん性予測判定陽性を示した。DMT群では従来の106遺伝子セットでは陰性判定であったが、14遺伝子セットや高感受性セットにおいては陽性判定となった(表2)。

表2. 肝発がん性予測の結果

	肝発がん性	106遺伝子モデル	成否	14遺伝子モデル	成否	高感受性モデル	成否
DEHP 0.5%	非遺伝性肝発がん物質	陽性	○	陽性	○	陽性	○
DEHP 1.5%	非遺伝性肝発がん物質	陽性	○	陽性	○	陽性	○
DEHP 5.0%	非遺伝性肝発がん物質	陽性	○	陽性	○	陽性	○
DMT 3.0%	優先評価化学物質	陰性	○	陽性	×	陽性	×

D. 考察

DEHP 5.0%投与群においては令和3年度に行った横平の実験結果と同様にいずれの遺伝子セットでも肝発がん性予測は陽性判定となり、再現性が確認された。5.0%は体重抑制が強く見られる濃度であったが、0.5%、1.5%の低濃度においても各遺伝子セットで肝発がん性予測は陽性となり、遺伝子発現変化による本検出系は低濃度でも検出可能であり、高感度のモデルと考えられる。Fischer 344ラットを用いた103週の長期混餌投与実験では、6,000 ppm以上の濃度で腫瘍発生増加を認めている。本実験においては、0.5% (5000 ppm)がその濃度に近似し、長期発がん性試験の濃度でも、28日間投与でその肝発がん性予測が可能であることが示された。遺伝子発現に関して詳細に見ていくと、その発現量がControl群 < DEHP0.5%群 < DEHP1.5%群 < DEHP5.0%群と濃度依存性に上昇していく遺伝子が、14遺伝子モデルにおいては58.3%、高感受性モデルでは60%みられた。それぞれの遺伝子発現量に対して順位付け(1~4)を行って、DHEP濃度との相関性をみると、14遺伝子モデルでSpearman $r = 0.7664$ ($P < 0.001$)、高感受性モデルでSpearman $r = 0.6668$ ($P < 0.001$)と強い相関が観察され、濃度依存性の遺伝子発現変化がみられた。

DMTは優先評価化学物質であるが、Fischer 344ラットでは0.175%~2%の13週混餌投与によって、肝細胞腫瘍が見られている。しかし、Fischer 344ラットにおける103週間混餌投与(最大0.5%)の長期試験において、有意な腫瘍発生は見られず、発がん性はないとされる。今回106遺伝子セットでは陰性判定であったが、14遺伝子モデル、高感受性モデルにおいては陽性を示した。本実験では3%と高い濃度で投与行っており、高用量における発がん性については慎重に検討する必要があると考えられる。

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抽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を低濃度から検出できる可能性が示唆された。優先評価物質であるDMTはモデルによって評価が変動するため、高用量における発がん性については慎重に検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chlopek M, Lasota J, Thompson LDR, Szczepaniak M, Kuzniacka A, Hincza K, Kubicka K, Kaczorowski M, Newford M, Liu Y, Agaimy A, Biernat W, Durzynska M, Dziuba I, Hartmann A, Inaguma S, Izycka-Swieszewska E, Kato H, Kopczyński J, Michal M, Michal M, Peksa R, Prochorec-Sobieszek M, Starzynska A, Takahashi S, Wasag B, Kowalik A, Miettinen M. Alterations in key signaling pathways in sinonasal tract melanoma. A molecular genetics and immunohistochemical study of 90 cases and comprehensive review of the literature. *Mod Pathol.* 2022; 35: 1609-17.
- 2) Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Osaga S, Fujita T, Asano T, Uemoto Y, Nishikawa S, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Sugiura H, Okuda K, Kato H, Komura M, Morita S, Takahashi S, Toyama T. Co-expression effect of LLGL2 and SLC7A5 to predict prognosis in ERalpha-positive breast cancer. *Sci Rep.* 2022; 12: 16515.
- 3) Kato A, Kato H, Naitoh I, Hayashi K, Yoshida M, Hori Y, Kachi K, Asano G, Sahashi H, Toyohara T, Kuno K, Kito Y, Takahashi S, Kataoka H. Use of Endoscopic Scraper and Cell Block Technique as a Replacement for Conventional Brush for Diagnosing Malignant Biliary Strictures. *Cancers (Basel).* 2022; 14.
- 4) Kato A, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Uemoto Y, Terada M, Kato H, Komura M, Okuda K, Takahashi S, Toyama T. Low TINAGL1 expression is a marker for poor prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022.
- 5) Kato A, Naitoh I, Naiki-Ito A, Hayashi K, Okumura F, Fujita Y, Sano H, Nishi Y, Miyabe K, Inoue T, Hirano A, Takada H, Yoshida M, Hori Y, Natsume M, Kato H, Takahashi S, Kataoka H. Class III beta-Tubulin Expression

Is of Value in Selecting nab -Paclitaxel and Gemcitabine as First-Line Therapy in Unresectable Pancreatic Cancer. *Pancreas.* 2022; 51: 372-9.

- 6) Uemoto Y, Katsuta E, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Hisada T, Terada M, Kato A, Okuda K, Sugiura H, Komura M, Kato H, Osaga S, Takahashi S, Toyama T. Low HECTD1 mRNA expression is associated with poor prognosis and may be correlated with increased mitochondrial respiratory function in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2022; 12: 1593-605.

2. 学会発表

- 1) 加藤寛之、小村理行、内木綾、稲熊真悟、高橋智. 全身性ヘモクロマトーシスを伴う有口赤血球症の1剖検例. 第111回日本病理学会総会、神戸(2022年4月)
- 2) 加藤寛之、内木綾、小村理行、稲熊真悟、高橋智. DPYD and STAT3 pathways are inhibited by luteolin and show interdependent expression in pancreatic cancer. The 7th JCA-AACR Special Joint Conference、京都(2022年7月)
- 3) 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智. The role of dipyrimidine dehydrogenase in pancreatic cancer. 第80回日本癌学会学術総会、横浜(2022年9月)
- 4) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. 膵癌におけるLuteolinのDPYD抑制効果の意義と5-FU併用投与による効果の検討. 第39回日本同区性病理解学会及び学術総会、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