

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 大阪公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った。本年度は、これまでのモデルを用いた検討において偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の5種類について新たな肝発がん検出モデルを作成し検討した。その結果、新モデル作成に用いた2物質及び2つの陽性と判定された物質の合計4物質が陽性判定とされるモデル構築が出来た。我々の開発した2つのモデルを組み合わせることで、遺伝毒性肝発がん物質を感度97%及び特異度95%と、高い精度で検出可能である。

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4年度は、これまでのモデル（モデル-1）を用いた検討において、偽陰性となった遺伝毒性肝発がん物質の5種類について、新たな肝発がん検出モデル（モデル-2）を作成し検討した。

B. 研究方法

新たな遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-2作成に用いた物質を表1に記す。これまでに行った6週齢の雄SDラットに被験物質の単回強制胃内投与試験で採取した肝組織からRNeasy mini kit（キアゲン）を用いてtotal RNAを抽出・精製し、GeneChip Clarion D Assay（Rat）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、優先評価化学物質であるo-phenylenediamine（OPD）、既知の遺伝毒性肝発がん物質である1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone（ADBAQ）において対照群と2倍以上発現差がある共通遺伝子であるとともに、陰性対照であるcarbon tetrachloride（CCL4）で発現変動が異なる遺伝子を選出した。選出遺伝子の発現変動を基に、OPDおよびADBAQを陽性、CCL4および平成30年度および令和3年度の対照群を陰性とする教師セットを用いて、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新たな遺伝毒性肝発がん物質の検出モデル-2を作成した。

表1. 新たな遺伝毒性肝発がん物質検出モデルを用いた検討結果

被験物質	分類	TD50 (mg/kg)	LD50 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	判定結果 (新モデル)	正否
2-Nitropropane (2-NP)	遺伝毒性 肝発がん物質	不明	不明	240	陰性	不正解
Vinyl bromide (VB)	遺伝毒性 肝発がん物質	18.5	500	170	陽性	正解
CCL4	非遺伝毒性 肝発がん物質	27.8	2350	780	陰性	正解
Disperse Blue 134 (DB-134)	遺伝毒性 「発がん性不明」	不明	不明	2000*	陰性	不明
o-phenylenediamine (OPD)	遺伝毒性 肝発がん物質	不明	510	510	陽性	正解
Saflrole	遺伝毒性 肝発がん物質	441	1950	1950	陽性	正解
1-Amino-2,4- dibromoanthraquinone (ADBAQ)	遺伝毒性 肝発がん物質	46	不明	2000*	陽性	正解
4,4'-Diaminodiphenyl ether (ODA)	遺伝毒性 肝発がん物質	9.51	725	480	陰性	不正解

*OECD TG420 急性経口毒性試験において定められる最高用量

新たに作成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、2-Nitropropane（2NP）、Vinyl

bromide (VB)、*o*-phenylenediamine (OPD)、4,4'-Diaminodiphenyl ether (ODA)、Disperse Blue 134 (DB-134)及びSafroleの遺伝子発現結果を入力し、判定を行った。

(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

網羅的遺伝子発現解析で取得した遺伝子発現データを新規の遺伝毒性肝発がん物質検出モデル-2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。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(非遺伝毒性ラット肝発がん物質、遺伝毒性非発がん物質)を「陰性」と判定する。その結果、VB及びSafroleが陽性と判定された。教師セットとして用いたOPD及びDBAQに合わせて、5つの遺伝毒性発がん物質のうち4つが陽性(OPD,ADBAQ,VB及びSafrole)となる新しい遺伝子セットによるモデルが確立できた(表1)。一方、2NP、ODA、及びDB-134は陰性と判定された。

D. 考察

今回新たに作成したモデル-2において、5つの遺伝毒性発がん物質のうち4つが陽性となったことから、これまでに偽陰性となった遺伝毒性発がん物質には共通した発がん機序が存在する可能性が見られた。加えて、今までのモデルで陽性対照群として用いてきた2NPが陰性となったことから既存のモデル-1とは異なる発がん機序である可能性を示した。

また、遺伝毒性陽性で発がん性不明の「監視化学物質」DB-134はOECD TG420 急性経口毒性試験において定められている最高用量の2000 mg/kgにおいても「陰性」と判定されたことから、遺伝毒性非肝発がん物質である可能性が示唆された。

これまでに検討した69物質に対して、我々の開発した2つの検出モデルを組み合わせて用いることで、遺伝毒性肝発がん物質を感度97%及び特異度95%と、高い精度で検出可能である。

E. 結論

我々が遺伝子セットを用いた遺伝毒性肝発がん物質短期検出モデルおよび新規モデルを複合して用いることで、遺伝毒性肝発がん物質を極めて高い精度で検出できる可能性が示唆された。

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.* 2023; 488: 153483.

- 3) 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.
- 4) 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-kappaB- and KEAP1-mediated inflammatory responses and reactive oxygen species-associated cell death pathways. *Cell Death Dis.* 2022; 13: 694.
- 5) 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) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) 藤岡正喜、魏民、Vachiraarunwong 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)
 - 13) 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)
 - 14) 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)
 - 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)
 - 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 bladder 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、鰐淵英機. 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) 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)
 - 19) 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)
 - 20) 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