

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 横平 政直 香川大学医学部医学教育学 教授

## 研究要旨

遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力を検証するため検討を行った。多種の遺伝毒性肝発がん物質、非肝発がん物質、及び非遺伝毒性非発がん物質をラットに単回投与し、24時間後の肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。その結果、遺伝子セットを用いた判定の結果、令和2年度では、Phytic\_acid や Cyclohexanone については、陰性であり予想通りとなったが、positive control である、Phenobarbitalが発癌物質として検出されなかった。令和3年度は、Bis(2-ethylhexyl) Phthalateのみ陽性であり、その他の3物質は肝発がん物質であるが検出できなかった。令和4年度では、3物質のいずれも結果は陰性であり予想通りとなった。本モデルは未知の物質に対して肝発がん予測に有用な情報を与えること期待されるが、その検出限界に注意が必要である。

## A. 研究目的

生活環境を取り巻く化学物質の発がん性を迅速にかつ高精度に検証できるシステムの確立は、社会的にも経済的にも非常に重要であり、システムで得られた結果は国民生活の安全・安心を保証する。本研究では化学物質の発がん性評価の迅速化・高度化・標準化を目的に、平成23年度～28年度「化学物質の安全性と発がん性リスク評価としての短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究」（吉見班）で蓄積してきた病理組織発がんマーカーおよび試験法をより一層精度化し、確立する必要性がある。多施設による協同体制にて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実現する。

当施設ではこれま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短期検出モデルの有用性をより一層検証し、確立することを目的とした。本研究の特色は化学物質の発がん性を迅速に、かつ高精度に予測できる評価法及びヒトへの外挿に必要な発がんメカニズムに関する情報が得られる試験系を確立することにある。

平成29年度および平成30年度の検討の結果、遺伝毒性発がん物質の検出に本モデルの有用性が確認された一方で、擬陽性や偽陰性を示す物質が認められた。令和元年度（平成31年度）では、偽陰性物質についてさらに投与容量の設定を詳細に検証する検討を行った。その結果、本モデルでは大多数の遺伝毒性肝発癌物質の検出を行うことができると考えられるが、稀に偽陰性となる物質があり、投与濃度等に留意する必要があると考えられた。

本研究では、TGP由来ラット肝臓遺伝子発現データをもとに構築した非遺伝毒性肝発がん物質検出モデル（SVMモデル）の検出力をさらに検証するため、種々の化学物質をラットに4週間投与し、肝臓における遺伝子マーカーセットの発現変化を調べた。

## 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。

本研究全体における動物試験は4施設で行われた。

香川大担当分として、令和2年度は、非遺伝毒性肝発がん物質2種：Phenobarbital, sodium (500 mg/L)、1,4-Dioxane (5 g/L) と、非肝発がん物質2種：Phytic acid (2.5%)、Cyclohexanone (6.5 g/L) を飲水投与し検討を行った。令和3年度は、Chlorendic acid (5 g/kg)、N,N-Dimethylformamide (5 g/kg)、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (50 g/kg) を混餌投与、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride (2 g/kg) を飲水投与し検討を行った。令和4年度は、非肝発がん物質3種：Nitrilotriacetic acid (0.1%)、Acrylic acid (0.5%)、Triethanolamine (2%) を飲水投与し検討を行った（表1）。

日本チャールズリバー社（神奈川県厚木）より購入した4週齢のSDラット（雄性）について、2週間の馴化期間の後に実験を開始した。馴化期間に体重測定を行い、各群の平均体重にばらつきがないよう群分けを行った。実験中は、被験物質を水道水に混じて遮光給水瓶にいれ、自由に摂取させた。投与期間中は、体重測定を週1回、飲水量および摂餌量についても週1回の測定を行った。実験開始29日目に剖検を行ったが、剖検は、イソフルラン（abbvie #B506）吸入麻酔後、腹部大動脈から自然放血により安楽死させた。安楽死後、臓器に肉眼的異常の有無を観察した。肝臓を摘出し、RNA抽出用として、外側左葉(LL)を摘出後、下端辺縁部を約2cm×0.5cmの大きさに2スライス切り出した。それぞれ1mLのRNAlaterが

入った1.5mLチューブへ移した（合計2本、そのうち1本は、他施設でのバリデーション用）。1.5mLチューブを4℃で一晩保管後、-80℃へ長期保管した。凍結保存サンプル用として、RNA抽出用に採材した後の残りの外側左葉の上半分を1.5mLチューブ2本分採取し、液体窒素により凍結後、ディープフリーザーにて凍結保管した（一本はDNA adduct 解析用）。ホルマリン固定用サンプルは、外側左葉の下半分、内側右葉(RM)および右葉尾部(R2)から計3スライス切り出し、カセットにおいて10%ホルマリンにて固定した。

肝臓からのtotal RNA抽出はRNeasy mini kit（キアゲン）を使用し、3mm×3mm程度の肝組織片からtotal RNAを抽出した。1群4匹から得たRNAをそれぞれ同一量混ぜて、一つのサンプルとした。アレイ解析は株式会社セルイノベーターに受託した。

アレイ解析の結果について、遺伝子発現データを構築済の肝発がん性予測モデル(サポートベクターマシンのような数理学的アルゴリズムによるモデル)に入力し、肝発がん性の陽性または陰性の判定を行った。

#### (倫理面の配慮)

いずれの動物実験も実験に先立ち、香川大学、動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に総合生命科学研究センター、同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

### C. 研究結果

全研究期間の結果を表1に示す。令和2年度について、Phytic acid群において実験開始1週目から有意な飲水量および摂餌量の低下が見られ、2週目から有意な体重減少を認めた。また、実験27日目にPhytic acid群の2匹が死亡した。このため、1群4匹から得たRNAをそれぞれ同一量混ぜて、一つのサンプルとする予定であったが、この群のみ2匹分のRNAによりアレイ解析を行った。Phenobarbital, sodium群およびPhytic acid群について有意な体重減少を認めた。また、肝重量について、Cyclohexane群では絶対重量および相対重量のいずれも有意な増加を認めた。Phytic acid群では絶対重量の有意な低下が見られた。肉眼所見および病理組織所見では、いずれの群もControl群と比べて、肝臓に明らかな変化は認められなかった。アレイ解析の結果を肝発がん性予測モデルに入力したところ、今回検討した4物質のいずれも陰性の結果であった。

令和3年度では、hydrochloride群において、実験開始1週目に著明な体重減少が見られたため、これ以降、用量を2 g/kgから1 g/kgへ減量して投与することとした。実験終了時まで動物の死亡例はなく、予定通り、29日目に実験終了した。全群において、動物の状態に著変は認められなかった。Bis(2-ethylhexyl) Phthalate群について有意な体重減少を認めた。また、肝重量について、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate群では絶対重量および相対重量のいずれも有意な増加を認めた。肉眼所見では群間の相違は見られなかったが、病理組織所見では、Control群と比べて、Chlorendic acid群では門脈域を中心とした肝細胞の核周囲空胞化、N,N-Dimethylformamide群では門脈域を中心とした広範で顕

著な肝細胞の核周囲空胞化、Bis(2-ethylhexyl) Phthalate群では中心静脈域を中心とした肝細胞腫大、Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride群では門脈域を中心とした肝細胞空胞化が認められた。アレイ解析の結果を肝発がん性予測モデルに入力したところ、今回検討した4物質は、103遺伝子(106遺伝子)での解析の場合、Bis(2-ethylhexyl) Phthalateのみ陽性であった。その他の3物質は肝発がん物質であるが検出できなかった。新たに作成した14遺伝子によるセットでの解析の場合、Chlorendic acidとBis(2-ethylhexyl) Phthalateのいずれも陽性と判定された。

令和4年度では、Nitrilotriacetic acid群やAcrylic acid群において有意な飲水量および摂餌量の低下が見られる週があったが、いずれの群についても、体重および肝重量(絶対および相対)の有意な変化は見られなかった。肉眼所見および病理組織所見では、いずれの群もControl群と比べて、肝臓に明らかな変化は認められなかった。アレイ解析の結果を肝発がん性予測モデルに入力したところ、今回検討した3物質のいずれも陰性という結果であった。

### D. 考察

令和2年度では、Phytic acid群では絶対重量の有意な低下が見られたが、相対重量では群間の有意差は認められず、肝重量減少は体重減少に伴う変化と考えられた。実験当初から被験物質を混じた飲水量が少なく、それに伴って摂餌量の減少および体重減少を来したと考えられる。アレイ解析からの肝発がん性予測モデルの結果について、positive controlである、Phenobarbitalや1,4-Dioxaneが発癌物質として検出されなかった。Phytic acidやCyclohexanoneについては、陰性であり、予想通りの結果となった。

令和3年度で用いた被験物質の発癌性については、Chlorendic acid, IARC Group 2B ; N,N-Dimethylformamide, IARC group 4 ; Bis(2-ethylhexyl) Phthalate, IARC Group 2B ; Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride, suspected of causing cancer (EU)とされている。103遺伝子の解析よりも14遺伝子の解析は、感度が高いと推測される。

令和4年度の4群(被験物質3群)については、一時的な摂餌量や飲水量の低下が見られたものの、各指標の群間差は見られず、肝発がん性予測モデルにおいて、3物質のいずれも陰性の結果であったことから、想定通りとなった。

### E. 結論

遺伝子セットを用いた判定の結果、令和2年度では、Phytic acidやCyclohexanoneについては、陰性であり、予想通りとなった。一方で、positive controlである、Phenobarbitalが発癌物質として検出されなかった。令和3年度は、Bis(2-ethylhexyl) Phthalateのみ陽性であり、その他の3物質は肝発がん物質であるが検出できなかった。令和4年度では、3物質のいずれも結果は陰性であり、予想通りとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nishino T, Abe T, Kaneko M, Yokohira M, Yamakawa K, Imaida K, Konishi H. GAREM1 is involved in controlling body mass in mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022; 628: 91-7.
- 2) Yokohira M, Oshima M, Yamakawa K, Ye J, Nakano-Narusawa Y, Haba R, Fukumura Y, Hirabayashi K, Yamaguchi H, Kojima M, Okano K, Suzuki Y, Matsuda Y. Adequate tissue sampling for the assessment of pathological tumor regression in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2021; 11: 6586.
- 3) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Ye J, Tanimoto M, Wu L, Mukai Y, Imaida K, Matsuda Y. Relationship between Lung Carcinogenesis and Chronic Inflammation in Rodents. *Cancers (Basel).* 2021; 13.
- 4) Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Matsuda Y, Imaida K. Lung proliferative lesion-promoting effects of left pulmonary ligation in A/J female mice.

*Pathol Int.* 2020; 70: 340-7.

- 5) Nakano-Narusawa Y, Yokohira M, Yamakawa K, Sao K, Imaida K, Matsuda Y. Single Intratracheal Quartz Instillation Induced Chronic Inflammation and Tumorigenesis in Rat Lungs. *Sci Rep.* 2020; 10: 6647.
- 6) Kishi S, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Kanie S, Hashimoto N, Sao K, Yokohira M, Imaida K, Matsuda Y. Preexisting diabetes mellitus had no effect on the no-observed-adverse-effect-level of acetaminophen in rats. *J Toxicol Sci.* 2020; 45: 151-62.

### 2. 学会発表

なし

## 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

表 1. 全研究期間のまとめ

実施年度	Groups	Treatment	Dose	No.	Body weights (g)		Liver weights		病理組織学的所見	物質特性	アレイ判定
							Absolute (g)	Relative (%)			
R2	1	1,4-Dioxane	5g/L drinking	4	384.8 ± 22.7	13.1 ± 1.0	3.4 ± 0.2	著変なし	非遺伝毒性肝発がん物質	陰性	
R2	2	Phenobarbital, sodium	0.5g/L drinking	4	365.5 ± 31.5*	14.7 ± 2.0	4.0 ± 0.2	著変なし	非遺伝毒性肝発がん物質	陰性	
R2	3	Phytic acid	25g/L drinking	2	276.5 ± 28.9*	9.2 ± 0.7*	3.3 ± 0.1	著変なし	非肝発がん物質	陰性	
R2	4	Cyclohexanone	6.5g/L drinking	4	441.7 ± 20.3	20.7 ± 2.0*	4.7 ± 0.4*	著変なし	非肝発がん物質	陰性	
R2	5	Control		4	429.5 ± 20.1	16.6 ± 1.6	3.9 ± 0.2	著変なし	-	-	
R3	1	Chlorendic acid	5g/kg diet	5	333.4 ± 20.9	9.2 ± 1.5	2.7 ± 0.4	肝細胞核周囲空胞化	肝発がん物質	陰性	
R3	2	N,N-Dimethylformamide	5 g/kg diet	5	334.4 ± 25.2	14.7 ± 2.7	4.4 ± 1.0	肝細胞核周囲空胞化	肝発がん物質	陰性	
R3	3	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate	50 g/kg diet	5	224.6 ± 48.9*	17.6 ± 3.8*	7.9 ± 1.1*	肝細胞腫大	肝発がん物質	陽性	
R3	4	Poly(hexamethylenebiguanide) hydrochloride	1 g/kg in water	5	328.4 ± 16.7	13.3 ± 1.4	4.1 ± 0.3	肝細胞核周囲空胞化	肝発がん物質	陰性	
R3	5	Control		5	375.5 ± 32.1	12.2 ± 2.3	3.3 ± 0.5	著変なし	-	-	
R4	1	Nitritriacetic acid	0.1% in water	5	388.0 ± 18.5	16.5 ± 2.2	4.2 ± 0.4	著変なし	肝発がん物質	陰性	
R4	2	Acrylic acid	0.5% in water	5	404.8 ± 20.5	17.6 ± 2.0	4.3 ± 0.3	著変なし	非肝発がん物質	陰性	
R4	3	Triethanolamine	2% in water	5	393.1 ± 21.7	16.7 ± 0.9	4.2 ± 0.2	著変なし	非肝発がん物質	陰性	
R4	4	Control		5	395.3 ± 20.8	16.9 ± 2.2	4.3 ± 0.4	著変なし	-	-	

\*P<0.05 vs control group