

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3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3年度は、6週齢の雄SDラットに300 mg/kg Clofibrate (CFB)、300 mg/kg Hexachlorobenzene (HCB)、100 mg/kg Pirinixic acid (Wy-14643)、250 mg/kg Chlorobenzene (CB) および30 mg/kg Furanを28日間反復経口投与し、肝臓の病理組織学的検索および遺伝子発現解析用のRNA抽出を行った。その結果、投与物質はそれぞれ肝細胞肥大あるいは胆管線維症等、特徴的な肝病変を誘発することが明らかとなった。今後、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、追加の被験物質による検討を実施する予定である。

### 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2～3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3年度の被験物質として非遺伝毒性肝発がん物質5種：Clofibrate (CFB)、Hexachlorobenzene (HCB)、Pirinixic acid (Wy-14643)、Chlorobenzene (CB)およびFuranを、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（各群5匹）。被験物質の中で、HCBは化審法に定める第一種特定化学物質、CBは優先評価化学物質にそれぞれ指定されている。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量として、300 mg/kg CFB、300 mg/kg HCB、100 mg/kg Wy-14643、250 mg/kg CBおよび30 mg/kg Furanに設定した。

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 Clarion 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）

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の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。投与開始後3週目以降、HCB投与群の2匹が投与前後に振戦を呈し、25日目に斃死した。Wy-14643・CB・Furan投与群において、有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量はFuran投与群でやや低値の傾向を示し、飲水量に群間で差はみられなかった。

各投与群における肝および腎重量を表2に示す。CFB・HCB・Wy-14643・Furan投与群では肝絶対/相対重量の増

加、CB 投与群では肝相対重量の増加、HCB 投与群では腎絶対/相対重量の増加、CFB・Wy-14643・CB・Furan 投与群では腎相対重量の増加がそれぞれ認められた。

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	186.4 ± 8.9	432.4 ± 40.4	23.0	36.9
CFB	186.2 ± 6.8	395.0 ± 23.0	21.9	41.3
HCB	186.2 ± 7.5	394.4 ± 33.4	19.8	36.4
Wy-14643	186.8 ± 12.0	348.1 ± 36.7**	20.1	30.9
CB	186.4 ± 7.7	371.3 ± 29.9*	21.9	38.0
Furan	186.0 ± 8.0	355.0 ± 44.1*	18.4	41.3

\*, \*\*;  $P < 0.05$  and  $0.01$  vs. Control by *t*-test, respectively.

CFB, clofibrate; HCB, hexachlorobenzene; Wy-14643, pirinixic acid; CB, chlorobenzene.

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	18.4 ± 2.25	4.25 ± 0.14	2.99 ± 0.32	0.69 ± 0.02
CFB	23.1 ± 0.58**	5.87 ± 0.33**	3.38 ± 0.22	0.85 ± 0.03**
HCB	31.1 ± 1.28**	7.92 ± 0.59**	3.84 ± 0.25**	0.98 ± 0.02**
Wy-14643	28.0 ± 5.35**	8.00 ± 0.91**	3.20 ± 0.30	0.92 ± 0.06**
CB	18.1 ± 1.71	4.88 ± 0.32**	2.97 ± 0.26	0.80 ± 0.03**
Furan	24.8 ± 2.49**	7.00 ± 0.48**	2.79 ± 0.31	0.79 ± 0.05**

\*\*;  $P < 0.01$  vs. Control by *t*-test.

CFB, clofibrate; HCB, hexachlorobenzene; Wy-14643, pirinixic acid; CB, chlorobenzene.

肝臓の病理組織学的検索の結果、CFB・Wy-14643 投与群では細胞質の好酸性顆粒状変化を伴う肝細胞肥大が、CFB 投与群では小葉中心性、Wy-14643 投与群ではび漫性に認められた (図 1)。HCB・CB 投与群においても小葉中心性肝細胞肥大が認められ、細胞質はそれぞれ好酸性、あるいは淡明なすりガラス状を呈した。Wy-14643 投与群にはこれに加えて、小葉辺縁部における胆管過形成も観察された。Furan 投与群では、肝細胞の変性および壊死、核の大型化がび漫性にみられたほか、胆管線維症および oval cell の過形成が、特に尾状葉において顕著に認められた。

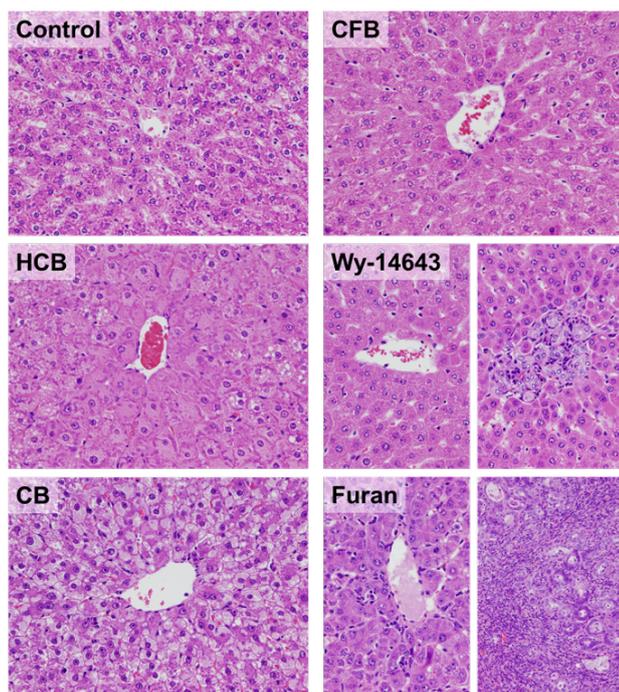


図 1. 各投与群の肝臓における病理組織学的変化

## D. 考察

令和 3 年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 5 種について、短期試験での最大耐量を用いたラット 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。その結果、好酸性顆粒状またはすりガラス状肝細胞肥大および胆管線維症等、投与物質ごとに異なる特徴的な肝病変を誘発することが明らかとなった。

CFB および Wy-14643 は高脂血症治療薬として利用され、PPAR $\alpha$  活性化を介してペルオキシソームを増加させ、組織学的に好酸性顆粒状の肝細胞肥大を誘発することが知られている。HCB はかつて農薬 (殺菌剤) や工業的用途に用いられたが、現在は第一種特定化学物質に指定され、流通は限定的である。ラットに対し滑面小胞体の増加を誘導することが報告されており、今回認められた好酸性すりガラス状の肝細胞肥大が該当する所見と考えられた。CB は合成中間体や有機溶媒として汎用され、優先評価化学物質に指定されている。ほとんどの遺伝毒性試験に陰性を示し、非遺伝毒性肝発がん物質とされているが、がん原性試験における雄 F344 ラットでの肝腫瘍発生率は 16% (8/49) と、対照群 (8%, 8/100) と比較してわずかな増加にとどまる (NTP, 1985)。Furan は合成中間体の一種であるが、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。ラット肝臓に対して本研究で認められたような種々の病変を引き起こし、長期的には肝細胞・胆道系腫瘍を発生させる。発がん機序として、代謝物 (シス-2-ブテン-1, 4-ジアルデヒド) を介した遺伝毒性の関与も疑われている (JECFA, 2011)。

今後、肝臓の網羅的遺伝子発現解析を実施し、遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の検証を行う予定である。

## E. 結論

令和 3 年度は、非遺伝毒性肝発がん物質 5 種について、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遺伝子発現解析用の RNA 抽出を行った。その結果、いずれの投与物質も肝細胞肥大あるいは胆管線維症等、それぞれ特徴的な肝病変を誘発することが明らかとなった。今後、追加の被験物質による検討を実施し、遺伝子セットを用いた肝発がん性短期検出法の開発を目指す。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-(1-menthoxy)ethanol in F344 rats. *Journal of toxicologic pathology*. 2021; 34: 309-17.
- 2) Akane H, Toyoda T, Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *Journal of applied toxicology*. (in press)

- 3) Matsushita K, Takasu T, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. *In vivo* mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of *gpt* delta rats. Archives of toxicology. 2021; 95: 3117-31.
- 4) Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu K, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Homma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. International journal of pharmaceutics. 2021; 595: 120241.
2. 学会発表
- 1) 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齊藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、斎藤嘉朗、平林容子、飯村康夫、本間正充、奥田晴宏、合田幸広。脱離エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析イメージングによるシクレソニドの 1  $\mu$ m エアロゾル吸入後のラット肺におけるシクレソニドとその代謝物の空間的局在の可視化。日本薬剤学会第 36 年会、Web 開催 (2021 年 5 月)
- 2) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子。ラットを用いたヘム鉄の 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 27 回総会・学術大会、Web 開催 (2021 年 6 月)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。 $\gamma$ -H2AX 免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性および発がん性短期評価手法。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 4) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、曾根瑞季、小川久美子。肝発がん物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM および CD13 の有用性検討。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 5) 赤根弘敏、豊田武士、水田保子、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子。内分泌攪乱物質による血中ホルモン値変動と病理組織学的・免疫組織化学的評価。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 6) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の発現。第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021 年 7 月)
- 7) 孫雨晨、齊藤公亮、牛木淳人、安部光洋、齋藤好信、柏田建、堀益靖、弦間昭彦、巽浩一郎、服部登、津島健司、荒川憲昭、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、佐藤元信、高松一彦、森和彦、西矢剛淑、泉高司、大野泰雄、斎藤嘉朗、花岡正幸。メタボローム解析を用いた薬剤性間質性肺炎のバイオマーカー探索。第 65 回日本薬学会関東支部大会、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 8) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、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。単環芳香族アミン化合物の試験管内反応による二量体形成。がん予防学術大会 2021、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 9) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発 AKI to CKD モデルラットにおける CD44 の病態生理学的役割。第 164 回日本獣医学会学術集会、Web 開催 (2021 年 9 月)
- 10) 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子。 $\gamma$ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質早期検出法の開発。第 80 回日本癌学会学術総会、横浜 (2021 年 10 月)
- 11) 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。ラット膀胱発がん物質早期検出における  $\gamma$ -H2AX 免疫染色の特異性。第 80 回日本癌学会学術総会、横浜 (2021 年 10 月)
- 12) 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、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遺伝毒性に関わる代謝活性化機構。環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、横須賀 (2021 年 11 月)
- 13) 松下幸平、高須伸二、石井雄二、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。*gpt* delta ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による 1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明。環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、横須賀 (2021 年 11 月)
- 14) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。急性腎障害後に発現する CD44 は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する。第 4 回医薬品毒性機序研究会、Web 開催 (2021 年 12 月)
- 15) 豊田武士、小林琢磨、三好規之、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。オルト-トルイジンおよびオルト-アニジン代謝物の 28 日間反復経口投与によるラット膀胱への影響。第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
- 16) 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン (IV) の 28 日間反復経口投与毒性試験。第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
- 17) 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。ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較。第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)
- 18) 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。薬剤性腎障害の慢性化を予測するバイオマーカーとしての CD44 の有用性の検証。第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、神戸 (2022 年 1 月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし