

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 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。本年度は非遺伝毒性肝発がん物質として昨年度の摂餌投与で陰性を示した dl-Ethionine、Doxylamine succinate、新規物質として Methapyrilene hydrochloride、優先化学評価物質として Nitrobenzene、非発がん物質として昨年度摂餌投与を行った Hexachlorophene の5被験物質を用いて、28日間胃内投与を行った。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遺伝子セットによる肝発がん性予測を行った。その結果、dl-Ethionine、Methapyrilene hydrochloride、Nitrobenzene 投与により体重抑制が見られ、Methapyrilene hydrochloride 投与では肝臓での高度な組織学的変化と Ki-67 陽性率の増加を伴っていた。肝発がん性予測において、従来の106遺伝子セットによる評価では、Methapyrilene hydrochloride が陽性、それ以外の4物質は陰性を示し、一致率は40%(2/5)であった。一方で、新規の14遺伝子セットによる評価では、Methapyrilene hydrochloride と Doxylamine succinate が陽性を示し、一致率は60%(3/5)となり改善がみられた。

### 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。

令和2年度においては、検討した16物質と予測モデルで検討した物質[感度73%(11/15物質)、特異度100%(42/42)]を加えた結果、感度54%(14/26)、特異度100%(47/47)で、正答率が84%(61/73)となった。問題点として、感度が低い点が挙げられた。本年度は改善策として遺伝子セットの構築の変更や、遺伝子セット構築で行った試験と同様に、胃内投与による検討を行う事などが挙げられた。

そこで令和3年度においては、本大学で令和2年度に偽陰性を示した非遺伝毒性肝発がん物質である dl-Ethionine (DL-ET)、Doxylamine succinate (DOX)および非発がん物質である Hexachlorophene (HCP)のラット28日間投与を、摂餌ではなく胃内投与で再度試験を行うとともに、新規の非遺伝毒性肝発がん物質である Methapyrilene hydrochloride (MPH)と優先評価化学物質である Nitrobenzene (NB)のラット28日間胃内投与試験を行った。その後肝臓からRNAを抽出し、遺伝子セットを用いた発がん性検出能について評価した。

(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21-005)。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。

### 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雄ラットに各群5匹(DL-ET, NBのみ6匹)でDL-ET(200 mg/kg/day)、DOX(200 mg/kg/day)、MPH(100 mg/kg/day)、NB(125 mg/kg/day)、HCP(20 mg/kg/day)を28日間胃内投与した。その後解剖を行い、肝臓のHEによる組織学的解析、Ki-67、GST-Pの免疫組織学的解析を実施した。Ki-67は外側左葉における陽性率をAperio CS2 (Leica)で測定した。また肝臓の外側左葉の一部を摘出後、RNA laterで凍結保存した。その検体からmRNAを抽出し、Clariom D Assayのマイクロアレイ解析を行い、

以前に構築した106遺伝子セットにより発がん性評価を実施した。また、新しく再構築した14遺伝子セットによる発がん性検出能を評価した。

### C. 研究結果

MPH群(100mg/kg/day)は、day 17, 28で1匹ずつ投与直後に全身痙攣を起こして死亡した。屠殺時(n=3)は体重、絶対肝重量の有意な抑制と相対腎重量の有意な増加がみられた(表1)。組織学的には、Kupffer細胞の増生、門脈域における偽胆管増生、リンパ球浸潤、褐色色素の沈着など比較的強い変化がみられた(図1)。また、肝細胞におけるKi-67陽性率の有意な上昇(図2)と、門脈域周囲の肝細胞主体にGST-P発現が観察された(図3)。

表1: 屠殺時体重と臓器重量

n	体重 (g)	肝		腎(左右)		脾(固定後)	
		重量 (g)	相対 (%)	重量 (g)	相対 (%)	重量 (g)	相対 (%)
Cont	422±27	14.8±2.4	3.50±0.40	2.74±0.19	0.65±0.04	0.71±0.11	0.17±0.02
MPH	302±6 <sup>***</sup>	10.4±0.6 <sup>**</sup>	3.44±0.16	2.33±0.17	0.77±0.07 <sup>*</sup>	0.46±0.09	0.15±0.03
DL-ET	347±37 <sup>**</sup>	10.7±1.0 <sup>**</sup>	3.09±0.19	2.33±0.23	0.67±0.05	0.55±0.08	0.16±0.02
DOX	407±14	17.3±1.4	4.23±0.25 <sup>**</sup>	2.76±0.19	0.68±0.06	0.67±0.06	0.16±0.01
NB	359±24 <sup>**</sup>	16.0±1.5	4.47±0.42 <sup>***</sup>	2.66±0.14	0.74±0.06	2.18±0.51 <sup>***</sup>	0.60±0.11 <sup>***</sup>
HCP	374±37	15.3±1.5	4.10±0.14 <sup>*</sup>	2.74±0.39	0.73±0.07	0.59±0.15	0.16±0.03

\*\*\*,\*\*\*\*: P < 0.05, 0.01, 0.001 v.s. Cont

DL-ET群(200 mg/kg/day)は、実験期間中の死亡はみられなかった。屠殺時(n=6)は体重、絶対肝重量の有意な抑制がみられた(表1)。組織学的には、Kupffer細胞の増加はみられたが、令和2年度の摂餌投与例と比較して肝細胞における核分裂像、Ki67陽性率の増加傾向はみられなかった(図1, 2)。

DOX群(200mg/kg/day)では、実験期間中の死亡や体重抑制はみられなかったが、屠殺時(n=5)は相対肝重量の有意な増加を認めた(表1)。組織学的には、令和2年度の摂餌投与例と同様に中心静脈周囲の肝細胞肥大が軽度みられるとともに、同部位における小脂肪滴沈着(3/5匹)が観察された(図2)。

NB群(125 mg/kg/day)はday 9においてNB群で2匹にメトヘモグロビン血症と考えられる麻痺が出現し、day 10で1匹死亡したため、1日の休薬後投与量を半量(62.5 mg/kg/day)に変更した。屠殺時(n=5)には有意な体重減少と相対肝重量の上昇と著明な脾腫を認めた(表1)。組織学的には、軽度の中心静脈周囲の肝細胞肥大と小リンパ球集簇像を散見した(図1)。また、中心静脈周囲のGST-P陽性細胞を確認した(図3)。

HCP群(20 mg/kg/day)は、実験期間中の死亡や体重抑制はみられず、屠殺時(n=5)は相対肝重量の増加が観察された(表1)。組織学的には少量であるがリンパ球小集簇像を散見した(図2)。

マイクロアレイデータを用いた106遺伝子による解析では、発がん性物質であるMPH、DL-ET、DOXのうちMPHは陽性判定を示し、DL-ET、DOXは令和2年度の摂餌投与例と同様に陰性であった。陰性物質であるHCPは令和2年度の摂餌による検討と同様に陰性を示した。また、優先化学物質で肝発がん物質であるNBは陰性を示し、一致率は40%(2/5物質)であった。一方、新規の14遺伝子セットによる検討では、DOXが陰性から陽性判定に変化し、それ

以外の物質は106遺伝子セットによる予測と同様の結果であったため、一致率は60%(3/5物質)となり、改善が見られた(表2)。

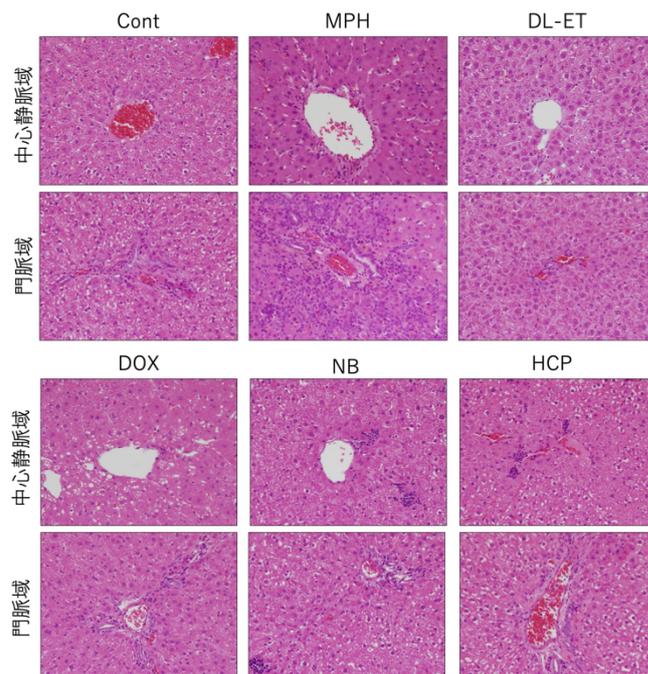


図1. 肝臓のH&E (x200)

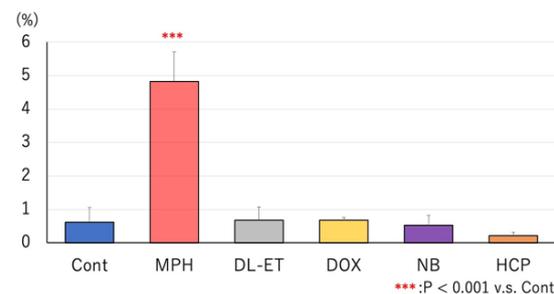


図2. Ki-67 labeling index (外側左葉)

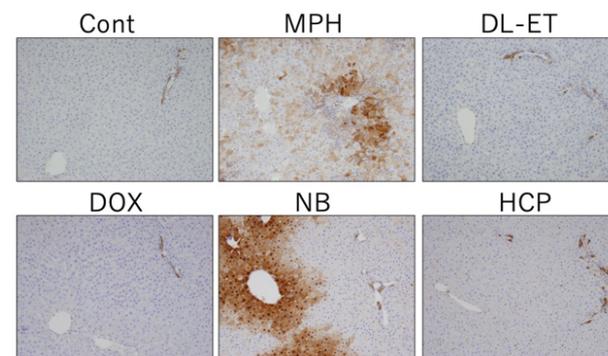


図3. GST-P 陽性細胞 (x100)

### D. 考察

令和2年度に行ったDL-ET、DOX、HCPに関しては、28日間での平均摂取量がそれぞれ、78 mg/kg/day、145 mg/kg/day、11 mg/kg/dayに対し、本実験では200 mg/kg/day、200 mg/kg/day、20 mg/kg/dayと前回より多い量の投与を行い死亡個体なく実験を完遂した。そのため、DL-ET群では体重抑制が強くみられた。DOX群、

HCP群では、昨年度は肝臓の変化はほとんどみられなかったが、本実験においては相対肝重量の増加や、肝組織ではDOX群では小脂肪滴の沈着がみられ、より強い変化が観察された。

表2：肝発がん性予測の結果

肝発がん性		106遺伝子 による判定	成否	14遺伝子 による判定	成否
MPH	非遺伝性肝発がん物質	陽性	○	陽性	○
DL-ET	非遺伝性肝発がん物質	陰性	×	陰性	×
DOX	非遺伝性肝発がん物質	陰性	×	陽性	○
NB	優先評価化学物質	陰性	×	陰性	×
HCP	非発がん物質	陰性	○	陰性	○

非遺伝毒性肝発がん物質であるMPHは体重増加抑制とともに肝臓の組織学的に著明な変化やKi-67陽性率の増加がみられ、発がん性を示す十分量の投与ができたと考える。

優先評価化学物質であるNBではメトヘモグロビン血症と考えられる麻痺の出現や著明な脾腫など肝以外の全身性変化が強く、投与量の減量を余儀なくされた。肝臓の変化はそれ程強くみられないものの、中心静脈周囲にGST-P発現が誘導される興味深い所見が得られた。NBの代謝物であるNitrosobenzeneはグルタチオン抱合により代謝されるため、グルタチオン活性の高い中心静脈周囲でGST-Pの発現が高くなったと推測されるが、詳細な機序についてはさらなる検討が必要である。

本年度は評価遺伝子の再検討を行い、発がん性検出能の向上がみられた(総括研究報告書参照)。我々の検討においても、106遺伝子セットによる発がん性予測の検討では、DL-ET、DOX、HCPは令和2年度の摂餌による投与における結果と同様に陰性を示した。一方、新規に構築した14遺伝子セットによる評価では、DL-ET、HCPは混餌投与、胃内投与のいずれも発がん性の有無と一致した結果となり、DOXでは混餌投与では発がん性の有無と不一致、胃内投与では一致した結果となった。このことから、投与経路の変更による改善も示唆された。

一方で、今年度に初めて検討した肝発がん性物質のMPHは組織学的にも著明な変化を示し、従来の106遺伝子セットと新規の14遺伝子セットの両者において、発がん性予測は陽性を示した。また、優先評価化学物質であるNBは肝発がん物質であるものの両遺伝子セットによる解析で陰性を示した。その原因として、メトヘモグロビン血症の出現により62.5 mg/kg/dayの半量にしたことが考えられる。CIITで行われたSDラットを用いた2年間吸入暴露試験では、25 ppm暴露で有意な肝発がん促進(0 ppm:2/63, 25 ppm:9/65, P=0.036)を認めているが、25 ppmはラットの呼吸量(73 ml/min)と体重(400 g換算)から32.85 mg/g/day相当であることから、今回のNB投与量は発がんの観点から十分量であると考えられる。しかし、2年間の発がん性実験からNBの肝発がん性は比較的弱い事が示唆されるため、そのような物質に対しては高用量を含めた複数の濃度における検討が必要である。

## E. 結論

令和2年度に行ったDL-ET、DOX、HCPの試験を摂餌から

胃内投与に変更して再検討した結果、従来の106遺伝子セットでは令和2年度と同様の判定を示したが、新規の14遺伝子セットでは、胃内投与におけるDOXの陽性を確認する事が可能になった。また新規に検討した肝発がん性物質のMCPはいずれの遺伝子セットでも陽性を示し、その有用性を確認できた。優先化学物質のNBはいずれの遺伝子セットでも陰性を示し、弱い肝発がん性が示唆される物質の検出については、再度濃度設定を含めた検討が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ozeki T, Shimura T, Ozeki T, Ebi M, Iwasaki H, [Kato H](#), et al. The risk analyses of lymph node metastasis and recurrence for submucosal invasive colorectal cancer: Novel criteria to skip completion surgery. *Cancers*. 2022; 14:822.
- 2) Asano G, Miyabe K, [Kato H](#), et al. Relevance of gene mutations and methylation to the growth of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms based on pyrosequencing. *Sci Rep*. 2022; 12: 419.
- 3) Aoyama Y, Naiki-Ito A, Xiaochen K, Komura M, [Kato H](#), et al. Lactoferrin prevents hepatic injury and fibrosis via the inhibition of NF-kappaB signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients*. 2021; 14:42.
- 4) Wanifuchi-Endo Y, Kondo N, Dong Y, Fujita, T. Asano T, Hisada T, Uemoto Y, Nishikawa S, Katagiri Y, Kato A, Terada M, Sugiura H, Okuda K, [Kato H](#), et al. Discovering novel mechanisms of taxane resistance in human breast cancer by whole-exome sequencing. *Oncol Lett*. 2022; 23: 60.
- 5) Kachi K, [Kato H](#), Naiki-Ito A, et al. Anti-allergic drug suppressed pancreatic carcinogenesis via down-regulation of cellular proliferation. *Int J Mol Sci*. 2021; 22:7444.
- 6) Subhawa S, Naiki-Ito A, [Kato H](#), et al. Suppressive effect and molecular mechanism of *Houttuynia cordata* Thunb. extract against prostate carcinogenesis and castration-resistant prostate cancer. *Cancers*. 2021; 13:3403.
- 7) Nishikawa S, Uemoto Y, Kim TS, Hisada T, Kondo N, Wanifuchi-Endo Y, Fujita T, Asano T, Katagiri Y, Terada M, Kato A, Dong Y, Sugiura H, Okuda K, [Kato H](#), et al. Low RAI2 expression is a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2021; 187: 81-93.
- 8) [Kato H](#), Naiki-Ito A, Suzuki S, et al. DPYD, down-regulated by the potentially chemopreventive agent luteolin, interacts with STAT3 in pancreatic cancer.

Carcinogenesis. 2021; 42: 940-950.

- 9) Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, et al. PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients. Virchows Arch. 2021; 479:277-284.
- 10) Tsuda H, Yoshida M, Akiyama F, Ohi Y, Kinowaki K, Kumaki N, Kondo Y, Saito A, Sasaki E, Nishimura R, Fujii S, Homma K, Horii R, Murata Y, Itami M, Kajita S, Kato H et al. Nuclear grade and comedo necrosis of ductal carcinoma in situ as histopathological eligible criteria for the Japan Clinical Oncology Group 1505 trial: an interobserver agreement study. Jpn J Clin Oncol. 2021; 51: 434-443.

## 2. 学会発表

- 1) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. エラグ酸の膵発癌抑制効果の検討. 第110回日本病理学会

総会、東京 (2021年4月)

- 2) 加藤寛之、内木綾. STAT3-DPYD 経路を介した Luteolin の膵癌化学予防効果の検討. 第27回日本食品化学学術大会、東京 (2021年6月)
- 3) 加藤寛之、内木綾、稲熊真悟、小村理行、高橋智. DPYD regulation in pancreatic cancer cell. 第80回日本癌学会学術総会、横浜 (2021年10月)
- 4) 加藤寛之、内木綾、小村理行、高橋智. 膵癌における DPYD 発現の寄与と発現抑制機序の検討. 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