

外 93-28

早稲田大学大学院理工学研究科

2013.11

# 博 士 論 文 概 要

## 論 文 題 目

有用化学物質の安全性評価法—  
早期判定マーカーの探索

申 請 者

斎 藤 幸 一

K O I C H I S A I T O

平成 5年 10月

農薬、医薬品等の有用化学物質を開発し、登録申請する場合、その化学物質のヒトへの安全性評価は、重要かつ必要不可欠なものである。この開発過程の中で実験動物になんらかの毒性が認められた場合、その毒性が果たしてヒトにも発現するか否かを判定するためには、まずその毒性の発現機構を明らかにしなくてはならない。また、毒性発現機構を明らかにすることは同種の毒性を発現する化学物質の早期スクリーニング法の開発にも応用が可能で、有用化学物質の早期開発に重要な情報を与えることとなる。

本論文は、様々な毒性の中で、検出に莫大な人力、費用、期間を必要とする発がん性について、早期判定法の開発が重要であることに着目し検討したものである。まず、遺伝子に変異を与える化学物質“イニシエーター”の早期判定を目的として、化学物質の発がん性と密接な関係を示す、*in vivo*における化学物質のDNAとの結合性を利用した早期判定法の検討をおこなった。さらに、ラットにおいて発がん促進作用を有する化学物質“プロモーター”の作用機構を解明し、得られた知見をもとにそれら作用を示す化学物質の早期判定マーカーの探索をおこなった。

本論文は全7章からなっている。

第1章では、本論文の研究にあたり化学物質の安全性評価の中で特に長期毒性試験の概要および化学物質の発がん性のメカニズムに関してこれまでの研究を概説し、本研究の意義と背景を明らかにした。

第2章では、DNA付加体の高感度検出法である<sup>32</sup>P-ポストラベリング法を利用した、*in vivo*でDNAとの結合性を示す化学物質の早期スクリーニング法に関する研究をまとめた。<sup>32</sup>P-ポストラベリング法は酵素的にDNAをヌクレオチドに分解し、さらにそのヌクレオチドを酵素的に<sup>32</sup>Pでリン酸化ラベルした後、正常なヌクレオチドをTLC、HPLC等で除去して、放射性のDNA付加体のみをTLC等で分析、検出するという方法である。今回、被験化合物として抗酸化剤3-*tert*-ブチルヒドロキシアニソール(3-BHA)とその代謝物である2種のキノン、*tert*-ブチルキノン(TBQ)、3-*tert*-ブチル-*o*-キノン(3-TBOQ)を用い、ラットに投与後、前胃のDNAを抽出して検討に用いた。まず、分析条件検討のため*in vitro*でウシの胸腺DNAと3種のキノン(ベンゾキノン、メチルベンゾキノン、TBQ)を反応させたDNAを分析し、その結果、最適分析条件は化学物質の極性により適正化する必要があることを明らかにした。そして、3-BHAの代謝物はベンゼン環骨格および*tert*-ブチル基を有していることが報告されていることから、3-BHA、TBQ、3-TBOQの分析条件として、*in vitro*の反応から得られたTBQのDNA付加体が検出可能な条件を選択した。また、実験の有効性と検出感度を求めるため、陽性対照化合物4-ニトロキノリン-1-オキシド(4-NQO)のDNA付加体を同時分析し、その付加体を高感度に検出した。しかし、これらの実験から3-BHAのDNA付加体は検出できず3-BHAは、

DNAへの結合性は有さないか非常に低いということが確認された。このように<sup>32</sup>P-ポストラベリング法は*in vivo*で化学物質のDNAの結合性を高感度に検出できる方法であり、最適分析条件の選択を行えば、陽性対照物質との同時分析により、DNAとの結合性を示す化学物質の早期スクリーニング法として応用が期待できることがわかった。

第3章では、天然香料*d*-リモネン、殺虫剤パラジクロロベンゼン、アンチノック剤2,2,4-トリメチルペンタン等の化学物質群が誘発する $\alpha$ 2u-グロブリン腎症の早期検出マーカーの探索に関する研究を中心にまとめた。上記化学物質群は、雄ラット特有のタンパク質である $\alpha$ 2u-グロブリンと結合することにより $\alpha$ 2u-グロブリンの分解を阻害し、雄ラットの腎臓中に $\alpha$ 2u-グロブリンを蓄積させる。この異常蓄積が腎障害を引き起こし腎臓がんの発生を促進させることが知られている。しかし、 $\alpha$ 2u-グロブリンはヒトには存在しないため、 $\alpha$ 2u-グロブリン腎症はヒトでは誘発されないと考えられている。従って、腎臓がんの原因が $\alpha$ 2u-グロブリン腎症であるか否かは、有用化学物質のヒトへの安全性評価上重要となる。そこで、 $\alpha$ 2u-グロブリン腎症誘発物質の*d*-リモネンを雄ラットに投与し、腎臓、血清、尿中のタンパク質の挙動をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)により検討した。その結果、*d*-リモネン投与群で分子量約16kDaのタンパク質が尿中で有意に増加する事実を見いだした。そして、このタンパク質は、精製 $\alpha$ 2u-グロブリンをウサギに免疫して得られた抗血清を使用したウェスタンブロッティング法により選択的に染色されたことから、腎臓中に再吸収され分子量が変換された腎臓型 $\alpha$ 2u-グロブリンであることが明らかとなった。また、この尿中に出現する腎臓型 $\alpha$ 2u-グロブリンを測定することにより、 $\alpha$ 2u-グロブリン腎症を誘発する化学物質を早期に知り得ることが示唆された。

第4章ではさらに $\alpha$ 2u-グロブリンの腎臓中での蓄積について生化学的に検討し、 $\alpha$ 2u-グロブリンの蓄積様式の差異により、 $\alpha$ 2u-グロブリン腎症誘発物質の分類を試みた。既知の $\alpha$ 2u-グロブリン腎症誘発物質を雄ラットに投与すると、腎臓中の $\alpha$ 2u-グロブリンが増加することは知られているが、SDS-PAGEによる検討より腎臓型の $\alpha$ 2u-グロブリン(分子量約16kDa)を増加させるタイプが多数をしめることが明らかになった。また、これらはすべて $\alpha$ 2u-グロブリンと結合し $\alpha$ 2u-グロブリンの分解を阻害する化学物質であった。しかし、 $\alpha$ 2u-グロブリンとの結合性は示さず、 $\alpha$ 2u-グロブリンの分解酵素を直接阻害するシステインプロテアーゼ阻害剤、E-64、ロイペプチンは腎臓型 $\alpha$ 2u-グロブリンだけでなく、腎臓中ではほとんど認められない尿中型の $\alpha$ 2u-グロブリン(分子量約19kDa)も増加させることを見いだした。これは、腎臓中に再吸収された尿中型 $\alpha$ 2u-グロブリンが腎臓型に変換される際、ある種のシステインプロテアーゼが重要な役割を果たしていることを示唆しており、また、腎臓中の尿中型 $\alpha$ 2u-グロブリンを測定することは、 $\alpha$ 2u-グロブリンを蓄積する化学物質の蓄積メカニズムを知る上で重

要な指標になることが明らかとなった。

第5章では化学物質がホルモンの変動により内分泌系組織に発がん性を示す場合とその安全性評価について、甲状腺ホルモン変動作用を有する殺菌剤ジエトフェンカルブ(DFC)を使用して生化学的に検討した。DFCは高用量で2、8、16ヶ月齢のラットに2週間摂食させるとチロキシン( $T_4$ )レベルの低下と甲状腺刺激ホルモン(Thyroid Stimulating Hormone: TSH)レベルの上昇をすべての月齢で引き起こす。また、このホルモン変動作用は、加齢により促進される傾向が認められた。そこで、まず2、8、16、21ヶ月齢のラットを用いDFCの代謝、排泄、残留性の月齢差を検討した。その結果、排泄率、代謝物の種類、組織残留に差異は認められず、甲状腺毒性との関係は見いだせなかった。しかし、代謝物の割合は月齢差が認められ、その差は肝臓中の薬物代謝酵素活性と良く相関することを明らかにした。次に、DFCの甲状腺への直接的な結合性を検討するため $^{14}C$ ラベルしたDFCをラットに摂食させた。しかし、DFCの甲状腺への蓄積性は認められなかった。そこで、さらにDFCを連続摂食させた後、 $^{125}I$ ラベルした $T_4$ をラットに投与し、 $T_4$ の胆汁排泄の変化を検討した。その結果、 $T_4$ の胆汁排泄はDFC投与により有意に促進され、それは主にグルクロン酸抱合体として排泄されることがわかった。また、DFCの連続投与により $T_4$ 代謝に重要な肝臓中のUDP-グルクロン酸転移酵素(UDP-GT)活性が上昇することも明らかになった。これらの結果からDFCは、肝臓中のUDP-GT活性を上昇させ $T_4$ の代謝排泄を促進し、間接的に血中の $T_4$ レベルを低下させるというメカニズムを解明した。

第6章では第5章で得られた知見をもとに、肝臓中UDP-GT活性と血中の甲状腺ホルモンおよびTSHレベルとの関係を各種肝薬物代謝酵素誘導剤をラットに投与して体系的に検討した。この結果、血中トリヨードチロニン( $T_3$ )、TSHレベルの変動と肝UDP-GT活性の変動には相関性は認められなかったが、 $T_4$ レベルの変動は、 $T_4$ を基質とした肝UDP-GT活性の変動と非常に良く相関することがわかった。従って、肝UDP-GT活性の変動は直接甲状腺に影響を与えずに、薬物代謝酵素誘導によりラット甲状腺毒性を示す化学物質の良い指標になることが明らかとなった。また、 $T_4$ 、 $T_3$ を基質とするUDP-GTは、その活性が類似の薬物代謝酵素の誘導剤で誘導されることから、これらは類似のUDP-GT分子種であることが示唆された。そして、その分子種は3-メチルコラントレン等で誘導される分子種であるという酵素学的知見も明らかにした。

第7章では前章までの著者の研究成果を総括し、本論文の有用化学物質の開発における工学的な意義と重要性および将来性についてまとめた。