

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340042

研究課題名(和文) 職業性肝内胆管がんの発症機構の解明と原因物質を検出するための動物モデルの開発

研究課題名(英文) Study of mechanism of carcinogenesis by 1,2-dichloropropane using animal experiment model

研究代表者

鰐淵 英機 (Wanibuchi, Hideki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90220970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、職業性胆管がんの原因物質のひとつとされている1,2-ジクロロプロパン(1,2-DCP)およびジクロロメタン(DCM)について動物実験モデルを用いて種々の検討を行った。その結果、1,2-DCPおよびDCMの単独曝露での動物試験において、マウスおよびハムスターで胆管発がん性はみとめられなかった。しかし、1,2-DCPおよびDCMの複合的な曝露は、1,2-DCP単独曝露と比較してより強い肝発がん性があることが明らかとなった。また、その腫瘍発生・増悪メカニズムとして、細胞増殖関連因子の発現亢進により、多岐にわたるシグナル経路が活性化されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, 1,2-dichloropropane (1,2-DCP) and toxicity were investigated using an animal experiment model. As a result, bile duct carcinogenicity was not observed in mouse, rat and hamster in animal test with single exposure of 1,2-DCP and DCM. However, co-exposures of 1,2-DCP and DCM revealed a stronger liver carcinogenic potential compared to single exposure to 1,2-DCP. In addition, it was suggested that as a mechanism of tumor development, a variety of signaling pathways are activated by increased expression of cell proliferation-related factors.

研究分野：実験病理学

キーワード：1,2-ジクロロプロパン 動物実験モデル 発がん性 二段階発がん

## 1. 研究開始当初の背景

大阪のオフセット印刷工場において肝内胆管がんの発症が報告されており、これらの会社における業務で、担がん患者は IARC に分類されるジクロロメタン(DCM)及び 1,2-ジクロロプロパン(1,2-DCP)に高度に曝露されていることが明らかになっており、本化合物を含む有機溶剤への高濃度・長期間曝露によって肝内胆管がんが発症したと疑われている。一方、これまでの研究から少なくとも DCM に関しては、2 つの代謝経路が知られている。CYP2E1 を介した主要な経路と、CYP2E1 代謝量が飽和した際に補填的に機能する GST-T1 を介した 2 次性の代謝経路である。さらに今回の発がん性は、CYP 経路の代謝量とは相関せず、GST 経路での代謝量と相関していることから、GST-T1 により代謝された際の代謝中間体が発がんに関与する可能性が報告されている。すなわち、今回の印刷会社における肝内胆管がんの発症機序として、高濃度曝露した有機溶剤により CYP2E1 経路を介した代謝が飽和され、GST-T1 による代謝活性化を受けた究極発がん物質をイニシエーターとした化学発がん機序が推測される。しかし、動物発がんモデルにおいてこれらの有機化合物の胆管発がん性は証明されていない。

## 2. 研究の目的

マウスおよびハムスターを用いた 1,2-DCP の毒性影響及びその発現機構の検討。ハムスター BOP 二段階発がんモデルによる 1,2-DCP の胆管発がん性の検討。

## 3. 研究の方法

(1)1,2-ジクロロプロパン(1,2-DCP)の肝毒性および毒性発現機序の検討

1,2-DCP の肝毒性および毒性発現機序を検討するために、ハムスターおよび B6C3F1 マウスに 1,2-DCP を単回、3 日間および 4 週間反復して強制胃内投与を行った。試験後、剖検により得られた肝臓組織を用いて、病理組織学的解析および免疫組織化学的解析による 1,2-DCP のマウスおよびハムスター肝臓への影響について検討を行った。

(2)BOP 二段階発がんモデルによるハムスター胆道系および膵管に対する 1,2-DCP の発がん修飾作用の検討

膵胆道系に対する感受性が高いハムスターを用いて、発がん物質である BOP を用いた二段階発がん性試験を行った。

6 週齢雄性シリアンゴールドンハムスターに対し、実験開始第 1,3,5,7 日目にイニシエーション処置として BOP を 10 mg/kg b.w. の用量で皮下投与し、1 週間休薬後、実験開始 3 週目から 1,2-DCP を 0, 62.5, 125 mg/kg b.w. の用量で直接胃内投与する二段階発がん修飾作用群を 3 群に分けた。また、BOP 処置の溶媒対照として生理食塩液 10 mg/kg b.w. を同様に皮下投与し、1 週間の休薬後、実験開

始 3 週目から 1,2-DCP を 0, 125 mg/kg b.w. の用量で直接胃内投与する DCP 単独群および非投与群の 2 群、合計 5 群に分けて実験を行い、実験開始から 19 週後まで飼育し、最終日に剖検を行い、肝臓・総胆管・膵臓を採取し、病理組織学的解析および免疫組織化学的解析を行った。

(3)1,2-DCP および DCM 複合曝露におけるマウス肝発がん影響の検討

これまでの研究で、1,2-DCP および DCM の単独曝露での動物試験において、マウス、ラットおよびハムスターなどで胆管発がん性は認められていない。また、発がんに至った事例のほとんどは 1,2-DCP と DCM の両方を曝露しており、1,2-DCP のみの曝露は少数である。さらに、マウスに 1,2-DCP と DCM を同時に吸入曝露させた実験では、遺伝子の変異頻度が対照群と比較して 2.6 倍に増加したという報告もあり、1,2-DCP と DCM の複合曝露による毒性影響および発がん性の検討を行うことが、有機塩素化合物の安全性を評価するうえで非常に重要であると考えられる。

したがって本実験では、マウスに 1,2-DCP および DCM の複合投与を行い、複合曝露による発がん性について検討した。

実験開始時よりマウスに 1,2-DCP を 0 (対照群) および 500 mg/kg B.W. (1,2-DCP 単独投与群)、1,2-DCP および DCM をそれぞれ 500 mg/kg (複合投与群) の用量で、コーンオイル 10 mg/kg B.W. を溶媒として 1,2-DCP を週 2 回、52 週間連続強制胃内投与を行った。最終投与から 5 日後に全生存動物に対して、イソフルラン吸入麻酔下で腹部大動脈より放血をおこない安楽死処置をした。剖検にて得られた肝臓を用いて種々の検討を行った。

## 4. 研究成果

(1)1,2-ジクロロプロパン(1,2-DCP)の肝毒性および毒性発現機序の検討

病理組織学的解析の結果、高用量の 1,2-DCP の反復投与では、ハムスターおよびマウスの肝臓において、小葉中心性肝細胞壊死が全例でみられ、同領域内で CYP2E1 の強い発現がみられたが、GST-T1 の発現はみられなかった。一方、非壊死部の肝細胞において CYP2E1 の発現はみられなかったが、GST-T1 の高発現がみられた。なお、マウスでは肝細胞および胆管上皮細胞において GST-T1 の発現が認められたが、ハムスターでは肝細胞のみに認められた。本研究の結果から、ハムスターおよびマウスにおいて CYP2E1 によって 1,2-DCP が代謝されることで、小葉中心性肝細胞壊死が誘導されることが確認された。また、GST-T1 が GSH 抱合を触媒することによって解毒酵素として働き、細胞を保護していることが示唆された。さらに、ハムスターの胆管上皮細胞において GST-T1 の発現がみられなかったことに対し、マウスでは GST-T1 の発現がみられた原因として、マウス胆管上皮

細胞では GST-T1 の GSH 抱合を触媒作用により 1,2-DCP の毒性から保護されているのに対して、ハムスターの胆管上皮細胞では GST-T1 が消耗され解毒作用が働かなかった、または GSH 抱合によって生じた中間代謝物による DNA 損傷によって肝毒性が発生した可能性が考えられた。1,2-DCP 短期間投与実験によるハムスターおよびマウスの胆管上皮細胞において、1,2-DCP の毒性反応がみられなかったことから、ハムスターとマウスの間で 1,2-DCP に対する毒性反応が異なる可能性が示唆された。

(2)BOP 二段階発がんモデルによるハムスター胆道系および膵管に対する 1,2-DCP の発がん修飾作用の検討

病理組織学的解析および免疫組織学的解析の結果、肝内胆管および膵管における前がん病変および腫瘍性病変の発生頻度・発生数に 1,2-DCP 投与による有意な差は認められなかった。また、二段階修飾作用群の胆管上皮細胞における腫瘍性病変および異型過形成の Ki-67 陽性率の半定量的解析を行った結果、細胞増殖能に有意差はみられなかった。また、1,2-DCP 125 mg/kg b.w. 投与群および溶媒対照群の全胆管上皮細胞においても同様に有意な変化がみられなかった 1,2-DCP はハムスター肝内胆管および膵管に対して発がん促進作用を有さないことが明らかとなった。

(3)1,2-DCP および DCM 複合曝露におけるマウス肝発がん影響の検討

いずれの投与群においても肝細胞腺腫がみられ、その発生率は、対照群および 1,2-DCP 単独投与群と比較して複合投与群で有意に増加し、またその発生個数も同様に、対照群および 1,2-DCP 単独投与群と比較して複合投与群で有意に増加した。加えて、その肝細胞腺腫において、対照群および 1,2-DCP 単独投与群と比較して、複合投与群で細胞増殖能の有意な増加がみられた。また、マイクロアレイにおいて、複合投与群の腫瘍で特異的に、腫瘍細胞増殖遺伝子の発現変動が 12 個みられた。以上より、1,2-DCP および DCM の複合的な曝露は、1,2-DCP 単独曝露と比較してより強い肝発がん性があることが明らかとなった。また、その腫瘍発生・増悪メカニズムとして、細胞増殖関連因子の発現亢進により、多岐にわたるシグナル経路が活性化されることが示唆された。ヒトと異なり、1,2-DCP および DCM の長期間曝露が、マウスにおいて胆管がんではなく肝細胞がんを引き起こす理由については明らかではないが、可能性として、マウスでは 1,2-DCP および DCM に対する感受性がヒトと異なり、胆管ではなく肝細胞に対して発がん影響が強いことが考えられる。げっ歯類とヒトとの種差の例として、フィブラート系薬物のような生体異物を慢性的にげっ歯類に投与すると肝がんを引き起こすが、ヒトにおいてこれらのがんのリス

クはないことが挙げられる。また、マウスなどのげっ歯類では、化学誘発および遺伝子操作された実験モデルを除き、自然発生での胆管発がんはこれまでに報告されていないということにも留意する必要がある。さらに、我々はこれまでに膵・胆道系に高い感受性を示すハムスターにおける二段階発がん性試験を実施したが、1,2-DCP はハムスターにおいても胆管発がん性を増大しないことを報告している。したがって、1,2-DCP および DCM における、ヒトとげっ歯類での発がんの標的臓器の違いは、1,2-DCP および DCM に対する感受性について種差が存在すると思われる。以上の結果から、本研究において 1,2-DCP 単独投与と比較して 1,2-DCP および DCM 複合曝露で肝細胞腫瘍の発生頻度及び発生個数を有意に増加することが初めて明らかとなった。また、その腫瘍発生・増悪メカニズムとして、細胞増殖関連因子の発現亢進により、多岐にわたるシグナル経路が活性化されることが示唆された。また本研究が 1,2-DCP および DCM のリスク評価において、単独曝露における影響だけでなく複合曝露によるリスクについても、重要な知見の提供に貢献することができたと考える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 29 件)

Gi, M., Fujioka, M., Yamano, S., Shimomura, E., Kanki, M., Kawachi, S., Tachibana, H., Tatsumi, K., Fang, H., Ishii, N., Kakehashi, A. and Wanibuchi, H. 2015. Modifying effects of 1,2-dichloropropane on N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine -induced cholangiocarcinogenesis in male Syrian hamsters. *The Journal of toxicological sciences*. 40, 5 (2015), 647-56.  
査読あり DOI: 10.2131/jts.40.64

Gi, M., Fujioka, M., Yamano, S., Shimomura, E., Ishii, N., Kakehashi, A., Takeshita, M. and Wanibuchi, H. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-Dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 145, 1 (2015), 196-208.  
査読あり DOI: 10.1093/toxsci/kfv045

〔学会発表〕(計 68 件)

Kawachi S, Gi M, Fujioka M, Tatsumi K, Kakehashi A, Okuno T, Wanibuchi H, Carcinogenic effects of concurrent administration of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in mice, Society of Toxicological Pathology 56<sup>th</sup> Annual

Meeting and ToxExpo, 2017.03.12-16,  
Baltimore, Maryland USA

藤岡正喜、魏 民、河内聡子、梯アンナ、  
鰐淵英機, 1,2-ジクロロプロパンおよび  
ジクロロメタン複合曝露によるマウス  
肝臓への影響, 第 16 回分子予防環境医  
学研究会, 平成 29 年 2 月 3 日~4 日, 熊  
本市国際交流会館 熊本県熊本市

河内聡子、魏 民、藤岡正喜、辰己久美  
子、多胡善幸、梯アンナ、鰐淵英機, 1,2-  
ジクロロプロパンおよびジクロロメタ  
ン複合曝露におけるマウス肝発がん影  
響, 第 33 回日本毒性病理学会総会およ  
び学術集会, 平成 29 年 1 月 26 日~27  
日, 国際障害者交流センタービッグア  
イ 大阪府堺市

魏 民、辰己久美子、藤岡正喜、河内聡  
子、熊田賢次、梯アンナ、鰐淵英機, ハ  
ムスター二段階発がんモデルにおける  
1,2-DCP の発がん修飾作用, 第 75 回日  
本癌学会学術総会, 平成 28 年 10 月 6 日  
~8 日, パシフィコ横浜 神奈川県横浜  
市

河内聡子、魏 民、藤岡正喜、辰己久美  
子、梯アンナ、土井賢一郎、鰐淵英機,  
1,2-DCP および DCM 複合曝露がマウス肝  
発がんを促進する, 第 75 回日本癌学会  
学術総会, 平成 28 年 10 月 6 日~8 日,  
パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太  
郎、梯アンナ、三島胡桃、鰐淵英機, ハ  
ムスターBOP 二段階淡水肝発がんモデル  
を用いた 1,2-dichloropropane の発がん  
修飾作用の検討, 第 29 回発癌病理研究  
会, 平成 26 年 9 月 1 日-3 日, スパリゾート  
ハワイアンズコンベンションセンタ  
ー福島県・いわき市

魏 民、山野荘太郎、藤岡正喜、梯アン  
ナ、下村衣里、神吉将之、鰐淵英機, シ  
リアンハムスターにおける  
1,2-dichloropropane の強制経口投与に  
よる肝毒性とその発癌機序の検討, 第  
72 回日本癌学会学術総会, 平成 25 年 10  
月 3 日-5 日, パシフィコ横浜 神奈川県  
横浜市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鰐淵 英機 (WANIBUCHI, Hideki)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 90220970

### (2) 研究分担者

魏 民 (GI, Min)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 70336783