

称号及び氏名 博士（獣医学） 近藤 美和

学位授与の日付 2021年2月20日

論文名 合成殺虫剤ペルメトリンのマウスにおける肝発がん
作用様式の解明とヒトへの外挿性に関する研究

論文審査委員 主査 岡田 利也
副査 山手 丈至
副査 森山 光章
副査 西村 和彦

論文要旨

序論

合成殺虫剤ペルメトリンはピレスロイド系殺虫剤で農業用および家庭防除用殺虫剤として、長年世界各国で使用され、農産物の収穫量の確保や衛生的な環境の確保に現在大いに貢献している。農業用ならびに家庭用殺虫剤として使用されるため、ヒトは本剤に暴露される可能性がある。ラット・マウスを用いたペルメトリンの発がん性試験において、ラットでは発がん性が認められないが、マウスでは高・中用量で肝臓と肺で腫瘍頻度の増加が認められることがこれまでに報告されている。これまでペルメトリンの発がん作用様式は実験的に明らかにされていなかったことから、本剤の発がん作用様式を明らかにすることは、本剤のヒトにおける発がん性をより適切に予測する上で重要と考えられる。本研究では、ペルメトリンによるマウス肝臓での発がん性に関してその作用様式を明らかにすること、ならびにその発がん作用様式がヒトでも起こり得るかどうかを明らかにすることを目的とした。

これまでの研究で遺伝毒性による発がん性は否定されていることから、非遺伝毒性の肝発がん作用様式が想定された。非遺伝毒性の肝発がん過程において肝細胞の増殖亢進作用が必須の要因であることから、第1章では、肝細胞に対する増殖亢進作用に関して、マウス・ラットを用いて解析した。第2章では、第1章で認められたマウスの肝細胞での増殖亢進の発生機序を、肝臓における薬物代謝酵素誘導、病理組織学的解析、ならびに網羅的な遺伝子発現プロファイルとの関連で解析し、主にペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) α を介する作用であることを明らかにした。第3章では、培養肝細胞の実験系の適正を確認の上、マウス、ラットおよびヒト培養肝細胞を用いて、細胞増殖性を指標にペルメトリンのヒトにおける肝発がんポテンシャルを比較解析することで、ヒトへの外挿性を考察した。

第1章 マウスおよびラットの肝細胞増殖性に及ぼすペルメトリンの影響

前述の如くペルメトリンの肝臓における発がん性は非遺伝毒性の作用様式によるものと考えられる。一般的に、非遺伝毒性の発がん作用様式においては、標的細胞の増殖亢進作用が必須過程と言われている。そこで、まずはペルメトリン投与による肝細胞の細胞増殖作用の有無ならびに肝発がん性との因果関係をマウスおよびラットにおいて解析した。

第1節 マウスを用いた検討

マウスにペルメトリンを7日間混餌投与(雄:20、500、2,500 および 5,000 ppm、雌:20、500、2,500、5,000 および 10,000 ppm)し、肝細胞の増殖活性を5-Bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)の標識率を指標に解析した。その結果、雌では発がん性試験で肝腫瘍を増加させた用量である2,500 ppm以上の群で肝細胞の有意な増殖亢進が示された。一方、発がん性が認められなかった雄では、発がん性試験で用いた投与量よりも高い用量(2,500 および 5,000 ppm)で肝細胞の有意な増殖亢進が示されたものの、発がん性が認められなかった用量(20 および 500 ppm)では細胞増殖亢進は認められなかった。

第2節 ラットを用いた検討

発がん性試験において、ペルメトリンはラットでは発がん性を示さなかった。そこで、ラットに、ペルメトリンを発がん性試験の最高用量である2,500 ppmの濃度で7日間混餌投与し、肝細胞のBrdU標識率を測定した結果、細胞増殖亢進は認められなかった。以上のことから、非遺伝毒性の発がん作用様式において必須と言われる標的細胞の増殖亢進作用について、ペルメトリン投与により発がん性を示す動物種、性、用量との間に明確な対応関係があった。したがって、ペルメトリンによる肝発がん性は、肝細胞増殖亢進作用に起因することが示された。

第2章 ペルメトリンのマウス肝細胞における増殖亢進の作用機序の解析

非遺伝毒性の肝発がん作用様式において必須要因と言われる肝細胞の増殖亢進作用は、受容体を介する作用様式と受容体を介さない作用様式に二分される。受容体を介する作用様式には酵素誘導型で核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR)や PPAR α を介するものやエストロゲン受容体を介するものがあり、一方、受容体を介さない作用様式には細胞傷害型が挙げられる。これまでの研究で、ペルメトリンはエストロゲン作用を示さないこと、および肝細胞傷害に関連する変化は認められないことが分かっている。よって、これらの作用様式は否定される。一方、この第2章では、ペルメトリンの肝臓への影響において、核内受容体 CAR あるいは PPAR α が関与する可能性に焦点を当てて解析した。

第1節 ペルメトリンの核内受容体 CAR を介した肝臓影響の解析

ペルメトリンを雌マウスに発がん性試験の最高用量である 5,000 ppm およびその 2 倍量の 10,000 ppm の濃度で 14 日間混餌投与し、肝重量測定、肉眼的検査、病理組織学的検査（光学顕微鏡観察および電子顕微鏡観察）、肝臓における CAR 活性化の指標である薬物代謝酵素 CYP2B 活性の測定を実施した。さらに CAR 活性化物質 phenobarbital (PB)を陽性対照として 500 ppm の濃度で混餌投与し、比較した。その結果、ペルメトリン投与群では肝重量の高値、肝臓の腫大、中心性肝細胞肥大、CYP2B 活性の軽度な増加が認められた。これらの変化は PB 投与による変化と類似していたことから、ペルメトリンはマウスの肝臓において CAR を活性化することが示唆された。しかしながら、肝臓の電子顕微鏡検査において、PB 投与群では滑面小胞体 (SER) の増生が認められたのに対し、ペルメトリン投与群では SER の増生は認められなかった。

第2節 ペルメトリンの核内受容体 PPAR α を介した肝臓影響の解析

ペルメトリン投与群については前節の実験データを用い、さらに同肝臓サンプルを用いて、肝臓における PPAR α 活性化の指標である薬物代謝酵素 CYP4A 活性を測定した。さらに PPAR α 活性化物質 clofibrate (CLO)を陽性対照として 5,000 ppm の濃度で混餌投与し、比較した。その結果、ペルメトリン投与群では前節での結果に加え、CYP4A 活性の著明な増加が認められた。また、肝臓の電子顕微鏡検査において、ペルメトリン投与により CLO 投与群と同様、ペルオキシソームの増加および拡大といった形態学的変化が認められた。

第3節 ペルメトリンの肝臓への影響に関する PPAR α 活性化作用の優位性の解析

第1、2節において、ペルメトリンは CAR および PPAR α に作用する可能性が示唆されたことから、その優位性を肝臓の網羅的遺伝子解析を行い比較検討した。第1、2節で得られた肝組織を用いてマイクロアレイ解析を行った結果、ペルメトリンで変動した遺伝子群は CLO のそれと多くの遺伝子群で類似していた。特に、そのほとんどは PPAR α 活性化で生じることが知られている脂質または脂肪酸の代謝または合成過程に関連する遺伝子群であった。また、複数の異なる作用様式の肝発がん誘発化合物での変動遺伝子群との階層的クラスター解析を行った結果、ペルメトリンは CLO と最も類似性が高い遺伝子プロファイルであることが分かった。以上の結果から、ペルメトリンはマウスにおいて主として PPAR α の活性化を介して肝臓に影響をもたらすことが示された。

第4節 ペルメトリンの肝細胞増殖亢進作用における PPAR α の関与

野生型 (WT) マウスおよび PPAR α 欠損(KO)マウスにペルメトリンを 5,000 ppm の濃度で 7 日間混餌投与し、肝細胞の BrdU 標識率を測定してペルメトリンの肝細胞増殖亢進作用における PPAR α の関与を解析したところ、肝細胞増殖亢進は野生型 (WT) マウスにおいて認められたが、一方 PPAR α KO マウスでは観察されなかった。この結果から、ペルメトリンは PPAR α を介して肝細胞増殖亢進作用を示すことが明らかとなった。

第3章 ペルメトリンのヒトにおける肝発がんに関する外挿性の検討

第1節 肝細胞増殖性検討における培養肝細胞の有用性の検討

第2章で示すようにペルメトリンの *in vivo* での PPAR α を介した肝細胞増殖亢進作用を *in vitro* 培養肝細胞を用いて検討した。まず、PPAR α agonist である WY14643 を陽性対照として Cyp4a10 mRNA 発現を指標にマウス培養肝細胞の PPAR α が機能していることを確認した。次いで、上皮成長因子 (EGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、PB、WY14643 を陽性対照として複製 DNA 合成を指標にマウス培養肝細胞の細胞増殖性を解析したところ、増殖能が維持されていることが分かった。同様にラット培養肝細胞の機能も確認した。その後、ペルメトリンの培養肝細胞での複製 DNA 合成への影響を両種で調べた結果、マウス培養肝細胞では亢進したのに対して、ラット培養肝細胞では亢進しなかった。

これらの結果は *in vivo* で認められたペルメトリンの雌マウスに対する肝細胞増殖作用を反映していた。

第2節 ペルメトリンのヒト培養肝細胞の増殖性に及ぼす影響

ヒト培養肝細胞を用いてペルメトリンに対する細胞増殖性を検討した。まず、ヒトの特異的 PPAR α agonist である GW7647 を陽性対照として CYP4A11 mRNA 発現を指標にヒト培養肝細胞の PPAR α が機能していることを確認した。次いで、HGF および EGF を陽性対照として、CLO および PB を陰性対照として複製 DNA 合成へのペルメトリン (1,500 μ M まで) の影響を調べた。その結果、増殖能が維持されている条件下において、ペルメトリンはヒト培養肝細胞では複製 DNA 合成を亢進しなかった。肝細胞の増殖亢進作用は肝発がん過程において必須の要因であることから、ペルメトリンはヒトにおいて肝発がん性を示さないと考えられた。これは、近年の疫学研究では本剤の暴露と肝発がん性に関連性が認められないとの報告がなされていることから支持される。

総括

本研究では、細胞増殖作用の測定、病理組織学的解析、網羅的遺伝子発現解析、生化学・分子生物学的技術等を活用し、ペルメトリンのマウスにおける肝発がん性の作用様式を解明すること、加えて、ヒトにおける肝発がん性のリスクを評価することを目的として実施し、以下の成績を得た。

1. ペルメトリンの雌マウスにおける肝発がん性には肝細胞の増殖亢進作用が係ることが示された。
2. マウスの肝臓におけるペルメトリンの細胞増殖亢進作用は PPAR α を介して生じることを明らかにした。
3. ペルメトリンの PPAR α を介した細胞増殖能への影響は、肝細胞の培養系において評価可能であり、ペルメトリンはヒト培養肝細胞では細胞増殖を亢進しないことを明らかにした。

以上より、ペルメトリンのヒトにおける肝発がん性はないと結論した。なお、本研究は、農薬・防疫薬の安全性評価において重要である規制科学の観点から重要な知見を提示している。加えて、残留農薬のリスク評価における食品の安全性確保および良好な生活環境の維持を通してのヒトの健康の維持に大きく寄与する成果である。

審査結果の要旨

化学物質のヒトにおける発がん性は、実験動物（げっ歯類）を用いたバイオアッセイにより評価されているが、偽陽性や偽陰性が生じている場合もある。ここ数十年間の発がん性研究の結果、非遺伝毒性発がん物質のなかには、バイオアッセイでの陽性結果が必ずしもヒトにおける発がん性を真に反映しているとは言えないケースが存在することが分かってきたことから、げっ歯類で発がん性が認められた場合、発がん作用様式を解明し、その発がん作用様式がヒトにおいても起こりうるかどうかを検証することが重要となってくる。ペルメトリンはマウス発がん性試験において、雌で肝発がんが認められたことから、本研究ではその発がん作用様式を明らかにすること、ならびにその発がん作用様式がヒトでも起こり得るかどうかを明らかにすることを目的とした。

第1章では発がん過程に必須の細胞増殖亢進作用について、発がん性との関連を調べた。肝発がんが認められた雌マウスでは、発がん用量以上の群において肝細胞増殖亢進作用が認められた。肝発がん性が認められなかった雄マウスでは、発がん性試験で用いた投与量よりも高い用量で肝細胞増殖亢進作用が認められたものの、発がん性が認められなかった用量においては肝細胞増殖亢進作用が認められなかった。さらに、肝発がん性が認められなかったラットにおいては発がん性試験の最高用量においても肝細胞増殖亢進作用は認められなかった。以上のことから、ペルメトリン投与により発がん性を示す動物種、性、用量との間に明確な対応関係があった。したがって、ペルメトリンによる雌マウスでの肝発がん性は、肝細胞増殖亢進作用に起因することが示された。

第2章では、ペルメトリンの肝臓への影響において、核内受容体であるconstitutive androstane receptor (CAR) やペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) α が関与する可能性に焦点を当てて解析した。ペルメトリン投与による肝臓への影響として、肝臓重量の増加、肝細胞の好酸性化および小葉中心性肝細胞肥大を伴う肝臓の腫大および色調暗化、ペルオキシソームの増加および大型化、ならびにCYP2B活性の軽微な増加およびCYP4A活性の顕著な増加が認められ、ペルメトリンはCARおよびPPAR α に作用する可能性が示唆された。そこで、その優位性を肝臓の網羅的遺伝子解析を行い比較検討したところ、ペルメトリンによる肝臓への影響は、PPAR α 活性化物質であるクロフィブレートと同様なPPAR α を介した機序であることが強く支持された。さらに、PPAR α 欠損マウスを用いて、ペルメトリンはPPAR α を介して肝細胞増殖亢進作用を示すことを明らかにした。

第3章では、ペルメトリンの*in vivo*でのPPAR α を介した肝細胞増殖亢進作用の種差を明らかにする目的でマウス、ラットおよびヒトの*in vitro*培養肝細胞を用いて検討した。まずPPAR α 活性化物質処理によりマウスおよびラットの初代培養肝細胞においてPPAR α が機能していること、さらに種々の増殖性因子処理により細胞増殖能が維持されていることを確認し、ペルメトリン処理により培養肝細胞での細胞増殖性を検討したところ、マウス培養肝細胞では増

殖亢進したのに対して、ラット培養肝細胞では亢進しなかった。これらの結果は*in vivo*で認められたペルメトリンの Maus およびラットに対する肝細胞増殖作用および肝発がん性への影響を反映していたことから、肝細胞増殖性検討において、Maus およびラットの培養肝細胞の評価系が有用であることが明らかとなった。次に、ペルメトリンによる肝細胞増殖亢進作用のヒトへの外挿性を検討する目的で、ヒト培養肝細胞を用いて、ペルメトリンに対する細胞増殖性を検討した。PPAR α が機能し細胞増殖能が維持されている培養実験条件下で、ペルメトリンを処理したところ、Maus で認められたようなPPAR α を介した肝細胞の増殖亢進作用は認められなかった。以上より、ペルメトリン投与によるMausの肝発がん作用様式の決定的な要因である肝細胞増殖亢進作用がヒトでは生じなかったことから、この発がん作用様式はヒトでは起こらない、すなわちペルメトリンはヒトにおいて肝発がん性を示さないと結論した。

以上、本研究はペルメトリンの Maus における肝発がん性がPPAR α を介する発がん作用様式であること、加えて、その発がん作用様式がヒトでは起こらないことを明らかにした。これらの成果は、獣医学の発展、農薬・防疫薬の安全性評価において重要な規制科学の発展、ならびに食品の安全性および良好な生活環境の確保を通じてヒトの健康維持に貢献するものであり、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。