

膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発

研究分担者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長

研究要旨

本研究は、短・中期に膀胱を標的とする遺伝毒性を予見できる指標の検索を目的としている。昨年度までに、既知の遺伝毒性物質 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) 投与ラット膀胱粘膜の正常様粘膜、過形成粘膜および悪性腫瘍組織における各種 DNA 損傷修復関連マーカーの発現を、無処置ラット膀胱粘膜と免疫組織化学的に比較検討した。DNA 二重鎖切断のマーカーである H2AX は、無処置粘膜に認められなかった一方、BBN 投与ラットの増殖性病変のみならず、正常様粘膜上皮においても核内に顆粒状陽性巣が観察され、遺伝毒性物質の曝露指標となる可能性が示唆された。平成 25 年度は、膀胱に増殖性病変を誘発する種々の化学物質をラットに投与し、膀胱上皮細胞における H2AX の発現を病理組織学的に検討した。6 週齢の雄 F344 ラット各群 10 匹に、0.05% BBN、1.8% 2-nitroanisole (2-NA)、2% 2,2-bis (bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、3%メラミン、または 3%ウラシルを 4 週間混餌 (BBN のみ飲水) 投与し、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖した。膀胱を採材し、尿路上皮での H2AX の発現を免疫組織化学的に検索した。4 週時には、BBN および 2-NA 群のラット膀胱上皮細胞で H2AX の発現が高頻度に認められた。2 週間の休薬後、BBN および 2-NA 群では H2AX 発現が残存したが、他の群では過形成の退縮とともに陽性細胞は稀となった。以上より、H2AX は膀胱に対する遺伝毒性/発癌性の指標として利用し得る可能性が示唆された。

A . 研究目的

本研究は、短・中期に膀胱を標的とする遺伝毒性を予見できる指標の検索を目的としている。昨年度までに、既知の遺伝毒性物質 *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) 投与ラット膀胱粘膜の正常様粘膜、過形成粘膜および悪性腫瘍組織における各種 DNA 損傷修復関連マーカーの発現を、無処置ラット膀胱粘膜と免疫組織化学的に比較検討した。その結果、DNA 二重鎖切断のマーカーである H2AX は、無処置粘膜には発現が認められない一方、BBN 投与ラットの増殖性病変および正常様粘膜上皮において核内に顆粒状陽性巣が観察され、遺伝毒性物質の曝露指標となる可能性が示唆された。

近年、発癌過程における DNA 損傷・修復経路の重要性が明らかにされつつあり、特に DNA 二重鎖切断はゲノム不安定性の原因となる深刻な傷害と認識さ

れている。DNA に二重鎖切断が生じると、ヒストン構成タンパクの一種 (H2AX) が速やかにリン酸化され、H2AX を形成する。癌化における H2AX の役割には不明な点が多く、中でも膀胱癌との関連についての研究は非常に少ない。平成 25 年度は、膀胱に増殖性病変を誘発する種々の化学物質をラットに投与し、膀胱上皮細胞における H2AX の発現を病理組織学的に検討した。

B . 研究方法

6 週齢の雄 F344 ラットに、0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)、1.8% 2-nitroanisole (2-NA)、2% 2,2-bis (bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、3%メラミン、または 3%ウラシルを 4 週間混餌 (BBN のみ飲水) 投

与した。各群 10 匹を用い、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖した。膀胱を採材し、尿路上皮での H2AX の発現を免疫組織化学的に検索した。

(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

BBN および 2-NA (膀胱発癌性/遺伝毒性あり) を 4 週間投与したラット膀胱上皮細胞には、H2AX の発現が高頻度に認められた一方、対照群にはほとんど観察されなかった(表、図 1)。H2AX は上皮細胞の核内にドット状の foci として観察され、陽性細胞は膀胱粘膜の基底側に多い傾向を示した。BMP(過形成誘発、遺伝毒性±)投与ラットでは、H2AX 発現は粘膜表層の大型核を有する細胞を中心に観察された。PEITC(過形成誘発、遺伝毒性±)メラミンおよびウラシル(膀胱発癌性あり、遺伝毒性なし)を投与した膀胱に軽度から高度の過形成性病変が認められ、局所的に H2AX 発現を示す部位がみられた。2 週間の休薬後、いずれの群でも H2AX 発現は減少し、BBN および 2-NA 群では一定数の残存が認められた一方(図 2)他の群では過形成の退縮とともに陽性細胞は稀となった。以上より、H2AX は膀胱に対する遺伝毒性/発癌性の指標として利用し得る可能性が示唆された。今後、定量解析等のさらなる検討を加える予定である。

表 .膀胱粘膜における H2AX 発現の免疫組織化学的評価

Group	Bladder toxicity	Genotoxicity	Urothelium 4w	Urothelium 4w + 2w
Control	None	None	—	—
BBN	Carcinogenic	Positive	++	±~+
2-NA	Carcinogenic	Positive	+++	±~+
BMP	Hyperplastic	+/- (Equivocal)	+	—~±
PEITC	Hyperplastic/ Carcinogenic?	+/- (Equivocal)	±	—~±
Melamine	Carcinogenic	Negative	±	—~±
Uracil	Carcinogenic	Negative	±	—~±

IHC grade: -, almost negative; ±, focal; +, scattered; ++, diffuse; +++, extensive

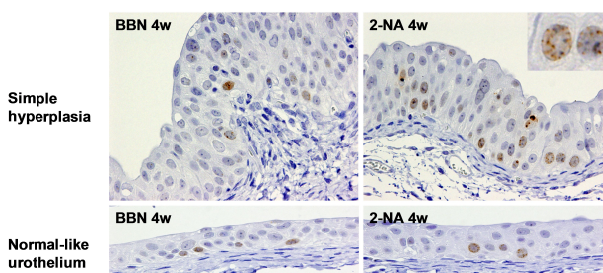


図 1 . BBN および 2-NA 4 週間投与後の膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 発現。上段：単純過形成、下段：正常様上皮

E . 研究発表

1 . 論文発表

1) Toyoda T, Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Onami S, Suzuki I, Ogawa K. Detection of -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats. *J Toxicol Pathol*, 26: 215-221, 2013

2 . 学会発表

1) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、鈴木勇、小川久美子 . 化学物質投与ラット膀胱における DNA 二重鎖切断マーカー (H2AX) 発現の病理組織学的特徴 .第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会、徳島、2014 年 1 月 31 日

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし