

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
平成 29 年度分担研究報告書

化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究（H29-化学-一般-001）  
分担研究項目：病理組織発がんマーカーを用いた中期発がんリスク評価法の確立：膀胱発がん物質の評価

研究分担者 豊田武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

## 研究要旨

本研究では、膀胱を標的とする発がん物質による 28 日間反復投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた膀胱発がんリスク評価法の確立を目指す。平成 29 年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに 4-Amino-2-nitrophenol (ANP), Disperse blue 1 (DB1), *N*-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN), *N*-Ethyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (EHBN), Cyclophosphamide monohydrate (CPA) を 28 日間経口投与し、投与終了時に膀胱を採材した。膀胱粘膜上皮細胞における -H2AX (DNA 損傷マーカー) 形成および Ki67 (細胞増殖関連因子) 発現を定量的に解析した結果、DB1、DHPN、EHBN および CPA 投与群では -H2AX 陽性細胞の有意な増加が、またこのうち DB1 を除く 3 群では Ki67 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、ANP 投与群では、-H2AX 形成および Ki67 発現の増加は観察されなかった。以上の結果から、検索した 5 種の膀胱発がん物質のうち 4 種は、28 日間の投与でラット膀胱粘膜に -H2AX 形成を誘導することが示され、-H2AX の膀胱発がん性早期検出指標としての有用性が示唆された。

## A. 研究目的

本研究では、膀胱を標的とする発がん物質による 28 日間反復投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた膀胱発がんリスク評価法の確立を目指す。これまでに我々は、鋭敏な DNA 損傷マーカーとして知られる -H2AX 形成を指標として、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出が可能であることを明らかにしてきた。本試験系は通常の 28 日間反復投与毒性試験の検体を用いて、免疫組織化学的手法を追加することで実施できる点を特色とし、化学物質の効率のかつ迅速なリスク評価に寄与し得ると考えられる。

平成 29 年度は、膀胱発がん物質 5 種類についてラットを用いた 28 日間反復投与試験を実施し、-H2AX の膀胱発がん性早期検出指標としての有用性を検証した。

## B. 研究方法

5 種類の膀胱発がん物質：4-Amino-2-nitrophenol (ANP), Disperse blue 1 (DB1), *N*-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN), *N*-Ethyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (EHBN), Cyclophosphamide monohydrate (CPA) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間経口投与した。各物質の投与濃度/経路は、報告されている発がん性試験の方法に基づき、0.25% ANP 混餌、0.5% DB1 混餌、0.2% DHPN 飲水、0.042% EHBN 飲水および 2.5 mg/kg/day CPA 強制経口投与に設定した。膀胱の採材は、先行研究で作成した多施設での共通臓器処理マニュアルに従った。膀胱のホルマリン固定パラフィン包埋標本作製し、免疫組織化学的手法により -H2AX 形成/Ki67 発現解析を実施した。膀胱

粘膜上皮における -H2AX および Ki67 陽性細胞を定量的に解析し、陽性率を対照群と比較した。また、-H2AX/Ki67 陽性細胞を、その局在に基づいて基底層 (basal layer) 中間層 (intermediate layer) 表層 (superficial layer) の三層に分類し、局在による標的性の差異について検討した。

(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

膀胱上皮細胞における -H2AX 形成および Ki67 発現を免疫組織化学的に検索した。2000 個以上/匹の粘膜上皮細胞をカウントし、1000 個あたりの -H2AX 陽性細胞数を算出した結果、DB1、DHPN、EHBN および CPA 投与群では、対照群と比較して -H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた (図 1)。ANP 投与群では、-H2AX 形成の増加はみられなかった。

細胞増殖マーカーである Ki67 についても同様の検索を行った。その結果、DHPN、EHBN および CPA 投与群において陽性細胞の割合が有意に増加した一方、ANP および DB1 投与群では増加は認められなかった (図 2)。-H2AX または Ki67 の増加が認められた各群について、陽性細胞をその局在に基づいて三層に分類した (図 3)。その結果、いずれの群でも基底層に位置する細胞の割合が高いことが明らかとなった。

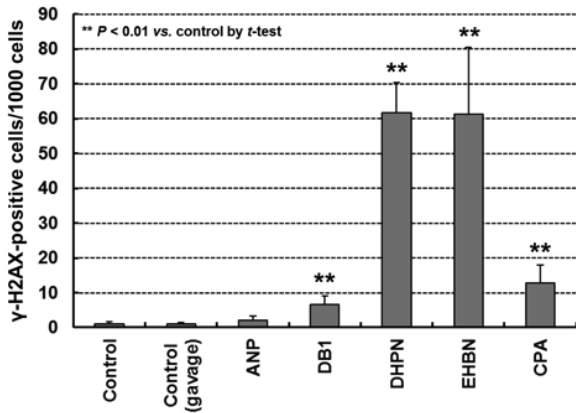


図 1. ラット膀胱粘膜上皮細胞における  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の定量解析。

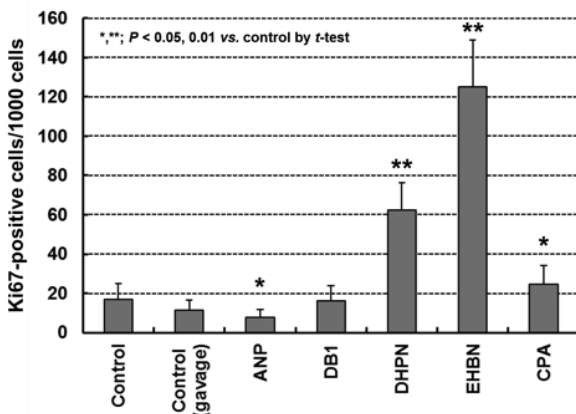


図 2. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析。

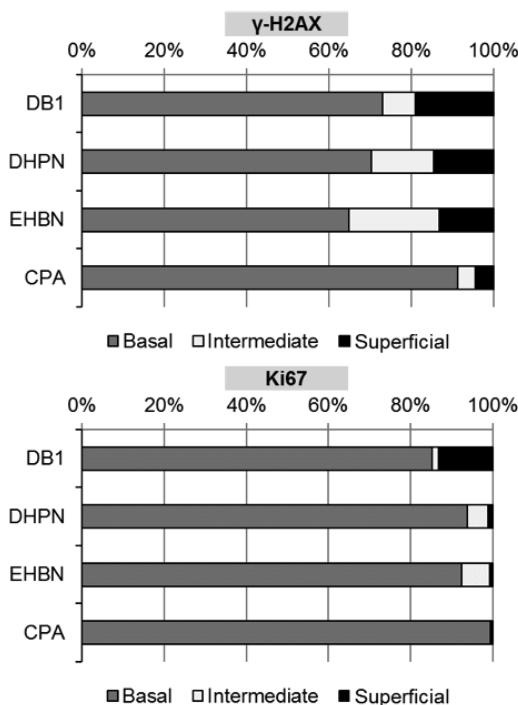


図 3.  $\gamma$ -H2AX および Ki67 陽性細胞の局在。基底層 (Basal)、中間層 (Intermediate)、表層 (Superficial)。

## D. 考察

本研究で検討した5種の膀胱発がん物質のうち、DB1、DHPN、EHBN および CPA 投与群の膀胱には、 $\gamma$ -H2AX 形成の有意な増加が認められ、このうち DB1 を除く3群では Ki67 発現も増加していた。一方、ANP 投与群ではいずれの増加も観察されなかった。ANP による  $\gamma$ -H2AX 形成の検出には、より高濃度あるいは長期間の投与が必要と考えられた。

今後、得られた結果について、他施設 (香川大・藤田保健衛生大・大阪市立大) でのバリデーションを行う予定である。平成 30 年度以降は、新たな膀胱発がん物質に加え、膀胱発がんプロモーター物質および膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質を用いた検討を行うとともに、OECD テストガイドライン化に関して必要な対応を実施する予定である。

## E. 結論

本研究の結果から、検索した膀胱発がん物質 5 種のうち 4 種はラット膀胱粘膜における  $\gamma$ -H2AX 形成の有意な増加を引き起こし、膀胱発がん性早期検出マーカーとして有用であることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) **Toyoda T**, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K.  $\gamma$ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from *o*-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol*, 38: 537-43, 2018
- 2) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, **Toyoda T**, Sone M, Ogawa K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol*, 31: 73-80, 2018
- 3) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, **Toyoda T**, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate mediates nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 activation by regulating reactive oxygen species production in human esophageal epithelial cells. *Food Chem Toxicol*, 111: 295-301, 2018
- 4) Akagi J, Yokoi M, Cho YM, **Toyoda T**, Ohmori H, Hanaoka F, Ogawa K. Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases  $\beta$  and  $\gamma$  to various genotoxic compounds: Its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair*, 61: 76-85, 2017
- 5) Takeshima H, Niwa T, **Toyoda T**, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T. The degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer Sci*, 108: 316-21, 2017
- 6) Tsukamoto T, Nakagawa M, Kiriyama Y, **Toyoda T**, Cao X. Prevention of gastric cancer: Eradication

of *Helicobacter pylori* and beyond. *Int J Mol Sci*, 18: 1699, 2017

## 2. 学会発表

- 1) 赤木純一、曹永晩、**豊田武士**、水田保子、横井雅幸、大森治夫、花岡文雄、小川久美子．ベンゾ[a]ピレン誘発がんに対する PoI の寄与の解析．日本薬学会第 138 年会、金沢、2018 年 3 月 26 日
- 2) **Toyoda T**, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. -H2AX formation induced by the bladder-carcinogenic aromatic amines *o*-toluidine and *o*-anisidine in the urinary bladder of rats. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 2018.3.13
- 3) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, **Toyoda T**, Ogawa K. Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, 2018.3.12
- 4) **豊田武士**、松下幸平、曹永晩、赤木純一、曾根瑞季、西川秋佳、小川久美子．-H2AX 免疫染色による膀胱発がんリスク早期検出法の開発．第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 25 日
- 5) 曹永晩、水田保子、赤木純一、**豊田武士**、小川久美子．経皮曝露感受性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシン B サブユニットのアジュバント作用．第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 26 日
- 6) 山田貴宣、松下幸平、**豊田武士**、森川朋美、高橋美和、井上薫、小川久美子．ラットを用いたバニリンプロピレングリコールアセタール (バニリン PGA) の 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試験．第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、那覇、2018 年 1 月 25 日
- 7) 赤木純一、曹永晩、**豊田武士**、水田保子、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子．ベンゾ[a]ピレン混餌投与によるマウス前胃腫瘍発生に対する PoI の寄与．第 40 回日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月 7 日
- 8) Tajima Y, **Toyoda T**, Matsushita K, Hashidume T, Wakabayashi K, Miyoshi N. Analysis of genotoxic

activities of urinary bladder carcinogenic aromatic amines. 12th International Conference on Environmental Mutagens, Incheon, 2017.11.15

- 9) 降旗千恵、鈴木孝昌、**豊田武士**、小川久美子．次世代シーケンス-Targeted mRNA Sequencing によるトキシコゲノミクス指標遺伝子の検証．日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、2017 年 11 月 7 日
- 10) 小川久美子、曹永晩、石井雄二、**豊田武士**．病理からみた遺伝毒性．日本環境変異原学会第 46 回大会、東京、2017 年 11 月 7 日
- 11) **豊田武士**、三好規之、小川久美子．*o*-トルイジンおよび *o*-アニシジンはラット膀胱粘膜に H2AX 形成を誘導する．第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 29 日
- 12) **豊田武士**、松下幸平、森川朋美、小川久美子．芳香族アミン投与ラット膀胱粘膜における H2AX 発現．第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜、2017 年 7 月 12 日
- 13) 曹永晩、赤木純一、水田保子、**豊田武士**、小川久美子．サイズによって異なるナノ銀の急性毒性．第 44 回日本毒性学会学術年会、横浜、2017 年 7 月 12 日
- 14) 野村幸世、**豊田武士**、長田梨比人、市田晃彦、大津洋、石橋祐子、愛甲丞、菅原寧彦、國土典弘、瀬戸泰之．胃癌、膵癌早期発見バイオマーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解明．第 26 回日本癌病態治療研究会、横浜、2017 年 6 月 2 日
- 15) 竹島秀幸、丹羽透、**豊田武士**、山下聡、牛島俊和．組織におけるエピゲノム傷害の程度は、発がん要因への曝露期間により決まる．第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2017 年 5 月 23 日

## G. 知的所有権の取得状況

### 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