

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 鈴木 周五 名古屋市立大学大学院・医学研究科・実験病態病理学 講師

研究要旨

本研究は、膀胱を標的とする発がん物質を早期に検出できる指標の探索を目的としている。現在まで DNA 二重鎖切断マーカーである H2AX が、遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標として利用し得る可能性を示した。平成 29 年度は H2AX に関して、遺伝毒性物質のみではなく、膀胱発がん物質全てを検出できる可能性について、また、その検出法としての精度をより詳しく検討するため、既存の膀胱発がん物質 5 種類について、28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて検討した。対照群との比較検討において、遺伝毒性の有無に関わらず今回用いた膀胱発がん物質 5 種類いずれにおいても H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、Ki67 では、NDPA を除く 4 種類で陽性細胞の有意な増加が認められた。以上の結果から、化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱において、遺伝毒性の有無に関わらず膀胱発がん物質を検出できる可能性を示した。

A．研究目的

近年、発がん過程における 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である H2AX が速やかにリン酸化され、H2AX を形成する。H2AX は DNA 修復因子の結合標的となり、二重鎖切断修復に必須の役割を果たすことが知られている。H2AX は損傷部位から離れた領域まで広範囲に集積する特徴があり、特異抗体によって核内の小型点状巣として検出することが可能となっている。

以前の研究において、膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質について化審法で実施される 28 日間反復投与試験のプロトコールに基づいて採取した膀胱について検討した結果、遺伝毒性膀胱発がん物質を投与された膀胱尿路上皮において、H2AX 免疫染色による核陽性細胞が有意に上昇することが示され、遺伝毒性膀胱発がん物質を短期間（4 週間）の投与で検出し得る可能性が示唆された。

平成 29 年度は、この検出法が、遺伝毒性を有する発がん物質のみならず、膀胱を標的とする発がん物質全てについて検討可能であるか、また、その発がん物質検出精度について、ラットにおいて膀胱発がんを示す化学物質を 5 種類用いて検討した。

B．研究方法

6 週齢 F344 雄ラットに、1%
1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)、
0.5% Phenacetin (PNC)、0.4%
N-Nitrosodiphenylamine (NDPA)、2% Sodium
o-phenylphenol (SOPP)、1.5%
11-Aminoundecanoic acid (AUDA) を混餌投与し、4
週間後に屠殺・剖検し、種々の臓器を採取した。

肝臓を分担研究者に要望された状態（凍結）で送付した。膀胱組織について免疫組織染色を行い、 γ H2AX および Ki67 の標識率を検討した。

倫理面への配慮

倫理面の配慮については、名古屋市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C．研究結果

試験期間中、ADBAQ、SOPP および AUDA 投与群において対照群に比べ、体重増加抑制傾向を認め、屠殺・剖検時の体重は、上記 3 つの化学物質投与群で有意に抑制された。

膀胱組織学的検討の結果、AUDA 投与群において 5 匹中 2 匹に simple hyperplasia を認めた。

膀胱粘膜上皮における γ H2AX 標識率は、いずれの投与群でも上昇傾向を示し、多群間比較検定では、対照群に比べ、AUDA のみ有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対一での比較を行った結果、いずれも有意な上昇を認めた(図1)。

膀胱粘膜上皮における Ki67 標識率は、いずれの投与群でも上昇傾向を示し、多群間比較検定では、対照群に比べ、SOPP および AUDA で有意な上昇を示した。一方、各化学物質と対照群との一対一での比較を行った結果、NDPA 以外は、有意な上昇を認めた(図2)。

図1. 膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞の定量解析

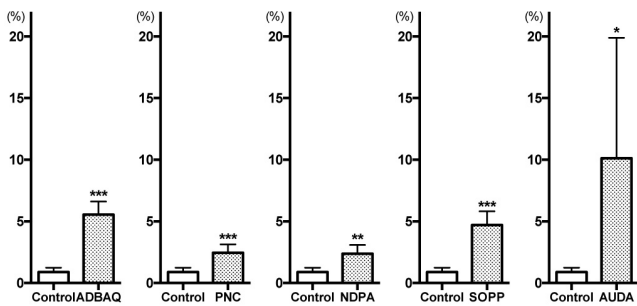
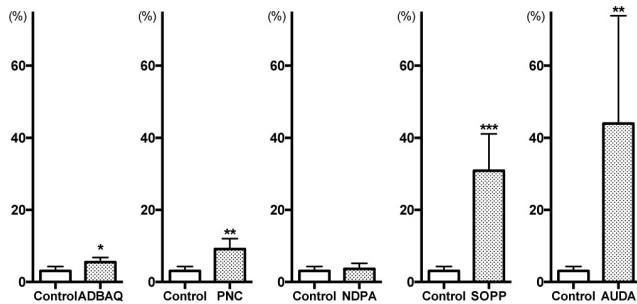


図2. 膀胱粘膜上皮細胞におけるKi67陽性細胞の定量解析



D. 考察

化審法で実施される28日間反復投与試験においては、各化学物質を対照群と比較検討すると考えるため、今回の膀胱発がん物質検出法を検討するに当たり、各化学物質と対照群との一対一での比較が重要と考えている。その結果、H2AXは今回検討した全ての膀胱発がん物質を検出できた。一方、Ki67は5つの化学物質のうちNDPAを除く4つの化学物質について検出できた。

E. 結論

化審法で実施される28日間反復投与試験において摘出した膀胱を用いて、H2AX免疫染色による標識率の検討は、膀胱発がん物質検出法として、有用であること可能性を示せた。また、Ki67よりも感度が高い結果を示せた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fuji, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kato, H., Hayakawa, M., Yamashita, Y., Kuno, T., Takahashi, S.: The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats. *Toxicol Pathol*, (2017) 45:544-550.

- 2) Kataoka, H., Miura, Y., Kawaguchi, M., Suzuki, S., Okamoto, Y., Ozeki, K., Shimura, T., Mizoshita, T., Kubota, E., Tanida, S., Takahashi, S., Asai, K., Joh, T.: Expression and subcellular localization of AT motif binding factor 1 in colon tumours. *Mol Med Rep*, (2017) 16:3095-3102.
- 3) Suzuki, S., Cohen, S. M., Arnold, L. L., Kato, H., Fuji, S., Pennington, K. L., Nagayasu, Y., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., and Takahashi, S.: Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology* (2018) 398-399:31-40.
- 4) Ito, Y., Naiki-Ito, A., Kato, H., Suzuki, S., Kuno, T., Ishiguro, Y., Takahashi, S., and Uemura, H.: Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor. *Oncotarget* (2018) 9(17):13859-13869.
- 5) Suzuki, S., Kato, H., Fuji, S., Kaiki, T., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., and Takahashi, S.: Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2. *J. Toxicol. Sci.* (2018) in press.

2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第106回日本病理学会総会、2017年4月、東京。
- 2) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質早期検出のための分子マーカーおよびラットモデルの確立、第76回日本癌学会学術総会、2017年9月、横浜。
- 3) 鈴木周五、他、前立腺発がん物質の早期検出モデルの確立、第34回日本毒性病理学会総会および学術集会、2018年1月、沖縄。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし