

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 30 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、病理組織発がんマーカーとして -H2AX を用いた短期膀胱発がんリスク評価法の確立を目指す。平成 30 年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに膀胱発がん物質等新規化学物質 5 種を 28 日間経口投与し、膀胱粘膜における -H2AX 形成を検索した。また、以前の検討で -H2AX 形成の増加を示さなかった偽陰性物質 4 種について、投与条件を変更した再検討を実施した。その結果、新規物質のうち膀胱発がん物質 1 種（2-Nitrosotoluene; 2-NT）および再検討物質のうち 1 種（ニトリロ三酢酸三ナトリウム一水和物；NTA）で、-H2AX 陽性細胞の有意な増加が確認された一方、膀胱を標的としない発がん物質では対照群と同じレベルにとどまった。これまでに蓄積されたデータを総合すると、-H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 84.4% (27/32) および特異度 100% (22/22) と、高い精度で予測できることが示された。以上の結果を受けて、化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的とした「膀胱における -H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に、オプションとして追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を厚生労働省を通じて提出した。

## 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 日間反復経口投与試験を実施し、病理組織発がんマーカーを用いた膀胱発がんリスク短期評価法の確立を目指す。これまでに我々は、鋭敏な DNA 損傷マーカーである -H2AX 形成を指標として、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、化学物質の効率的かつ迅速なリスク評価に寄与し得ると考えられる。

平成 30 年度は、膀胱発がん物質等新規化学物質 10 種類（名古屋市立大と分担）についてラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、-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。また、以前の検討で偽陰性を示した膀胱発がん物質 4 種について、投与条件を変更した再検討を実施した。

## B. 研究方法

国立衛研担当分の新規化学物質として、膀胱発がん物質 3 種：2-Nitrosotoluene (2-NT), *m*-Cresidine (*m*-Cre), Sulfasalazine (SSZ)、膀胱発がんプロモーター物質：Sodium L-ascorbate (Na-AsA) および非膀胱発がん物質：2-Nitropropane (2-NP) 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、0.338% 2-NT 混餌、160 mg/kg/day *m*-Cre 強制経口（溶媒：コーン油）675 mg/kg/day SSZ 強制経口、5% Na-AsA 混餌、40 mg/kg/day 2-NP 強制経口投与に設定した。

偽陰性物質の再検討として、Dimethylarsinic acid (DMA), 4-Amino-2-nitrophenol (ANP), ニトリロ三酢

酸三ナトリウム一水和物 (NTA), *N*-Nitrosomorpholine (NMOR) を 1 週 (0.02% DMA 飲水、2% NTA 混餌) または 4 週間 (0.015% DMA 飲水、0.5% ANP 混餌、0.0125% NMOR 飲水、2% NTA 混餌) 経口投与した。NTA の 4 週投与群には、同物質による膀胱発がん感受性が高い雌 F344 ラットを用いた。

膀胱の採材方法は、先行研究班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を作製し、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。膀胱粘膜における -H2AX および Ki67 陽性細胞をカウントし、陽性率を対照群と比較した。

（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。その結果、新規物質のうち 2-NT 投与群において、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）。

細胞増殖マーカーである Ki67 についても、-H2AX と同様の方法で検索を行った。その結果、Na-AsA 投与群において、陽性細胞の割合が有意に増加した（図 2）。

再検討物質を投与したラットの膀胱を用いて、同様に -H2AX 陽性細胞をカウントした結果、NTA を 1 週間投与した雄および 4 週投与後の雌において、有意な増

加が認められた（図 3）。0.5% ANP および 0.015% DMA の 4 週投与群においても増加傾向がみられたものの、統計学的有意差は認められなかった。

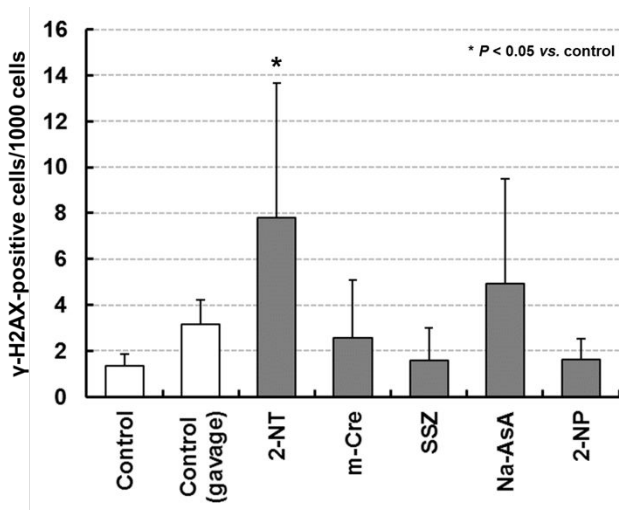


図 1. ラット膀胱粘膜上皮細胞における γ-H2AX 陽性細胞の定量解析（新規物質）。（統計：Student *t*-test）

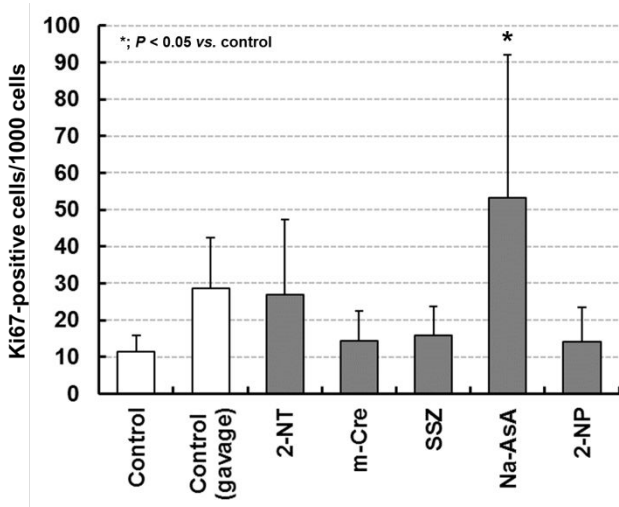


図 2. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析（新規物質）。（統計：Student *t*-test）

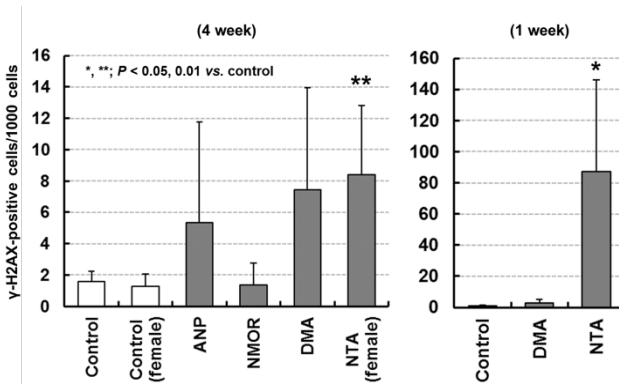


図 3. ラット膀胱粘膜上皮細胞における γ-H2AX 陽性細胞の定量解析（再検討物質）。（統計：Student *t*-test）

OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME  
Standard Project Submission Form

If you require further information please contact the OECD Secretariat  
Return completed forms to:  
Anne Gourmelon (anne.gourmelon@oecd.org)  
and Christina Quaglio (christina.quaglio@oecd.org)

PROJECT TITLE  
Update of the repeated dose oral toxicity 28-day study (OECD TG 407) with optional inclusion of immunohistochemistry for γ-H2AX in the urinary bladder

SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)  
Japan

DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT  
31 October 2018

DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM

Country / Organisation:	Japan
Agency/ministry/Other:	National Institute of Health Sciences, NIHS / Ministry of Health, Labour and Welfare, MHLW
Mail Address:	NIHS: 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan MHLW: 1-2-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8916, Japan
Phone/fax:	NIHS: (phone) +81-44-270-6651, (fax) +81-44-270-6655/ MHLW: (phone) +81-3-3595-2298
Email:	NIHS: t-toyoda@nihs.go.jp MHLW: tsukano-masaaki12@mhlw.go.jp

図 4. 既存の OECD テストガイドライン（TG 407）に、γ-H2AX 免疫染色による膀胱発がん性早期検出法の追加を提案する SPSF（表紙）。（厚生労働省を通じて提出）

#### D. 考察

今年度に新たに検討した 3 種の膀胱発がん物質のうち、2-NT 投与群の膀胱には、γ-H2AX 陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、膀胱発がんプロモーター物質である Na-AsA 投与群では、γ-H2AX 形成の増加傾向および Ki67 発現の有意な増加がみられた。膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質である 2-NP は、γ-H2AX/Ki67 いずれの増加も誘導しなかった。

再検討を実施した膀胱発がん物質 4 種のうち、NTA は雄の 1 週投与群および雌の 4 週投与群において、γ-H2AX 形成の有意な増加を示した。NTA の 2%混餌投与によるラット 2 年間発がん性試験において、膀胱腫瘍発生率は雄で 4%（1/24）雌で 21%（5/24）と、雌の方が感受性が高いことが報告されている（National Toxicology Program, 1977）。γ-H2AX による膀胱発がん性の検出は、発がん感受性の雌雄差を反映し得ることが示唆された。

当研究班においてこれまでに蓄積されたデータを総合すると、γ-H2AX 免疫染色によって化学物質のラット膀胱に対する発がん性を、感度 84.4%（27/32）および特異度 100%（22/22）と、高い精度で予測できることが示された。以上の結果を受けて、「膀胱における γ-H2AX 免疫染色」を、28 日間反復経口投与毒性試験に対する

既存の OECD テストガイドライン (TG 407) に追加する改定案 (Standard Project Submission Form; SPSF) を厚生労働省を通じて提出した (図 4)。

本改定案は化学物質の膀胱発がん性早期検出を目的として、膀胱を用いた -H2AX 免疫染色をオプションとして追加するものである。免疫染色は多くの研究機関で実施されている一般的な解析手法であり、既存の試験への組み込みが容易である。また、早期に発がん性を検出することで、不要な長期がん原性試験の実施を回避できるなど、実験動物の 3R にも貢献し得る。一方で、本手法のみでは膀胱発がん過程における遺伝毒性機序の関与を評価することはできず、別個の試験・情報が必要となる。他のマーカーとの併用等、今後の検討課題と考えられる。

## E. 結論

本研究の結果から、-H2AX 免疫染色は、化学物質の膀胱発がん性早期検出マーカーとして応用できることが示された。平成 31 年度は、提出したガイドライン改定案について、OECD ワーキンググループ (Working Group of the National Coordinators for the Test Guidelines Programme; WNT) からの指摘に対して必要な対応を実施する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Yamada T, Miyoshi N, Ogawa K. Distinct differences in the mechanisms of mucosal damage and -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with *o*-toluidine and *o*-anisidine. *Arch Toxicol*. 2019; 93: 753-62.
- 2) Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Matsushita K, Nishikawa A, Imaida K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of acetaminophen using an obese rat model. *J Toxicol Sci*. 2018; 43: 423-33.
- 3) Toyoda T, Cho YM, Matsushita K, Tachibana S, Senuma M, Akagi J, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of hexyl acetate in SD rats. *J Toxicol Pathol*. In press.
- 4) Sone M, Toyoda T, Cho YM, Akagi J, Matsushita K, Mizuta Y, Morikawa T, Nishikawa A, Ogawa K. Immunohistochemistry of -H2AX as a method of early detection of urinary bladder carcinogenicity in mice. *J Appl Toxicol*. In press.
- 5) Yang Q, Yasuda T, Choi E, Toyoda T, Roland JT, Uchida E, Yoshida H, Seto Y, Goldenring JR, Nomura S. MEK inhibitor reverses metaplasia and allows re-emergence of normal lineages in *Helicobacter pylori*-infected gerbils. *Gastroenterology*. 2019; 156: 577-81.
- 6) Hirata T, Cho YM, Suzuki I, Toyoda T, Akagi J, Nakamura Y, Numasawa S, Ogawa K. 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) induced apoptotic cell death and G2/M cell cycle

arrest via ROS production in human esophageal epithelial cancer cells. *J Toxicol Sci*. 2019; 44: 73-81.

- 7) Funahashi S, Okazaki Y, Nagai H, Chew SH, Ogawa K, Toyoda T, Cho YM, Toyokuni S. Twist1 was detected in mesenchymal cells of mammary fibroadenoma and invasive components of breast carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*. 2019; 32: 19-26.
- 8) Tanoue Y, Toyoda T, Sun J, Mustofa MK, Tateishi C, Endo S, Motoyama N, Araki K, Wu D, Okuno Y, Tsukamoto T, Takeya M, Ihn H, Vaziri C, Tateishi S. Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure. *J Invest Dermatol*. 2018; 138: 2550-7.
- 9) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Takahashi M, Inoue K, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-ethylbutanal in F344 rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018; 100: 118-26.
- 10) Akagi J, Cho YM, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Subchronic toxicity evaluation of 5-hexenyl isothiocyanate, a nature identical flavoring substance from *Wasabia japonica*, in F344/DuCrj rats. *Food Chem Toxicol*. 2018; 122: 80-6.
- 11) Furihata C, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki T. Using RNA-Seq with 11 marker genes to evaluate 1,4-dioxane compared with typical genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Mutat Res*. 2018; 834: 51-5.

### 2. 学会発表

- 1) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、齋島由二 RNA アプタマーを利用した機能性医療材料開発 . 日本薬学会第 139 年会、千葉 (2019 年 3 月)
- 2) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K. Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore (2019.3)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . 膀胱発がん物質投与初期における遺伝子発現解析および新規膀胱発がんマーカーの探索 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 4) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子 . 1,3-Dichloro-2-propanol の F344 ラットを用いた 28 日間反復強制経口投与による毒性プロファイルの検索 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 5) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . 膀胱発がん物質投与による -H2AX 形成の用量相関性及び経時的変化 . 第 35 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 2 月)
- 6) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、大森治夫、小川久美子 . C57BL/6J 野生型および

PoI 欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレンおよび  
-ナフトフラボン併用投与の効果 . 第 35 回日本毒性  
病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年 1 月 )  
7) 曹永晩、水田保子、赤木純一、豊田武士、井手鉄  
哉、小川久美子 . 腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c  
マウスの急性毒性における抗酸化剤の影響 . 第 35 回  
日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2019 年  
1 月 )  
8) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T,  
Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K,  
Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics  
and DNA adductome analysis of urinary bladder  
carcinogen *o*-toluidine. The 23rd Shizuoka Forum  
on Health and Longevity, Shizuoka (2018.11)  
9) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Hashidume T,  
Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K,  
Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Metabolomics  
and DNA adductome analysis of urinary bladder  
carcinogen *o*-toluidine. The 4th International  
Conference on Pharma-food General Information,  
Shizuoka (2018.11)  
10) Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yokoi M,  
Hanaoka F, Ohmori H, Ogawa K.  
Benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis in  
PoI -knockout mice. 3R&3C Symposium, Kanazawa  
(2018.11)  
11) 野村祐介、藤澤彩乃、松下幸平、豊田武士、福  
井千恵、森下裕貴、小川久美子、鄭雄一、中村義一、  
齋島由二 . RNA アプタマーを用いた新規骨再生用材料  
の in vivo 性能評価 . 第 40 回日本バイオマテリアル  
学会大会、神戸 (2018 年 11 月 )  
12) 野村幸世、豊田武士、菅原寧彦 . 胃癌バイオマ  
ーカーとしての血清 TFF3 の起源とその上昇機序の解  
明 . 第 22 回日本肝臓学会大会、神戸 (2018 年 11 月 )  
13) 田島悠也、豊田武士、平山裕一郎、橋詰力、松  
下幸平、小川久美子、渡辺賢二、戸塚ゆ加里、若林  
敬二、三好規之 . 膀胱発がん性芳香族アミン  
*o*-toluidine の代謝物分析と DNA 付加体 . 日本環境変  
異原学会第 47 回大会、京都 (2018 年 11 月 )  
14) 降旗千恵、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌 .  
RNA-Seq による 1,4-ジオキサン (D0) のラット肝臓  
における遺伝子発現プロファイル : 遺伝毒性および  
非遺伝毒性肝発がん物質との比較 . 日本環境変異原  
学会第 47 回大会、京都 (2018 年 11 月 )  
15) 豊田武士、山田貴宣、三好規之、小川久美子 .  
芳香族アミン誘発ラット膀胱発がん過程の初期段階  
における遺伝子発現動態 . 第 77 回日本癌学会学術総  
会、大阪 (2018 年 9 月 )  
16) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子 . 幹細胞マ  
ーカー免疫染色による膀胱発がん物質の早期検出 . 第  
77 回日本癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月 )  
17) 保田智彦、吉田寛、内田英二、豊田武士、瀬戸  
泰之、野村幸世 . MEK 阻害剤によるヘリコバクター・  
ピロリ菌感染スナネズミ胃粘膜の回復 . 第 77 回日本  
癌学会学術総会、大阪 (2018 年 9 月 )  
18) 保田智彦、Qing Yang、豊田武士、Eunyoung Choi、

内田英二、吉田寛、瀬戸泰之、James R. Goldenring、  
野村幸世 . MEK 阻害剤 Selumetinib による *H. pylori*  
感染スナネズミ胃粘膜における化生粘膜の回復 . 第  
27 回消化器疾患病態治療研究会、高知 (2018 年 9 月 )  
19) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro  
N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K. Dose-dependent  
sensitization effects of transcutaneously  
exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 16th  
European Congress of Toxicologic Pathology,  
Brussels (2018.9)  
20) 豊田武士、山田貴宣、鈴木周五、松下幸平、曹  
永晩、赤木純一、森川朋美、水田保子、西川秋佳、  
小川久美子 . -H2AX を指標とした化学物質の膀胱発  
がん性早期検出系の開発 . 第 33 回発癌病理研究会、  
御殿場 (2018 年 8 月 )  
21) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、  
松下幸平、小川久美子、若林敬二 . 芳香族アミン類  
の代謝物分析と DNA 付加体 . 第 33 回発癌病理研究会、  
御殿場 (2018 年 8 月 )  
22) 豊田武士、松下幸平、森川朋美、山田貴宣、小  
川久美子 . 膀胱発がん性芳香族アミンの短期投与に  
よるラット膀胱粘膜遺伝子発現動態への影響 . 第 45  
回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018 年 7 月 )  
23) 曹永晩、赤木純一、水田保子、豊田武士、小川  
久美子 . コレラトキシン及びコレラトキシン B サブ  
ユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバン  
トとしての可能性 . 第 45 回日本毒性学会学術年会、  
大阪 (2018 年 7 月 )  
24) 山田貴宣、豊田武士、曾根瑞季、鈴木周五、松  
下幸平、森川朋美、小川久美子 . -H2AX を指標とし  
た膀胱発がん性の早期予測 - 追加の化学物質による  
検証 - . 第 45 回日本毒性学会学術年会、大阪 (2018  
年 7 月 )  
25) 豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、森川朋美、  
山田貴宣、三好規之、若林敬二、小川久美子 . 膀胱  
がんリスク因子としてのノルハルマン代謝物 : ラッ  
トを用いた検討 . がん予防学術大会 2018 高松、高松  
(2018 年 6 月 )  
26) Nomura S, Yasuda T, Yang Q, Toyoda T, Choi E,  
Uchida E, Seto Y, Goldenring JR. Amelioration of  
metaplasia and re-emergence of normal gastric  
lineages after treatment of *H. pylori* infected  
gerbils with a MEK inhibitor. Digestive Disease  
Week 2018, Washington (2018.6)  
27) 森川朋美、松下幸平、豊田武士、山田貴宣、高  
橋美和、井上薫、小川久美子 . ラットを用いた 2-エ  
チルブタナールの 90 日間亜慢性反復経口投与毒性試  
験 . 日本食品化学学会第 24 回総会・学術大会、東京  
(2018 年 5 月 )  
28) 野村幸世、豊田武士、大津洋、石橋祐子、愛甲  
丞、長田梨比人、市田晃彦、菅原寧彦、國土典弘、  
瀬戸泰之 . 胃癌、膵癌、乳癌早期発見バイオマ  
ーカーとしての血清 TFF3 とその起源の解明 . 第 118 回日  
本外科学会定期学術集会、東京 (2018 年 4 月 )

## 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