

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和元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

本研究は、DNA 損傷関連因子である γ -H2AX を病理組織学的マーカーとして用いた、短期膀胱発がんリスク評価法の確立を目的とする。我々は前年度に、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 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に、オプションとして追加する改定案を提出した。令和元年度は、6 週齢の雄 F344 ラットに新規の被験物質として遺伝毒性または非遺伝毒性の非発がん物質 5 種を 28 日間経口投与し、膀胱粘膜における γ -H2AX 形成を検索することで、本解析手法の感度・特異度について検証を行った。また、遺伝毒性（BBN）および非遺伝毒性膀胱発がん物質（メラミン）を用いて、膀胱粘膜における γ -H2AX 形成の用量相関性を検討した。その結果、非発がん物質 5 種はいずれも γ -H2AX 陽性細胞の増加を誘導しないこと、膀胱発がん物質による γ -H2AX 形成は明瞭な用量相関性を示すことが明らかとなった。これまでに蓄積されたデータを総合すると、ラット膀胱に対する化学物質の発がん性検出における、 γ -H2AX 免疫染色の感度・特異度はそれぞれ 82.9% (29/35)・100% (30/30) と、高い精度で予測できることが示された。

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 γ -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。

令和元年度は、新規化学物質 5 種についてラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、 γ -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、遺伝毒性・非遺伝毒性膀胱発がん物質をそれぞれ複数の用量でラットに投与し、膀胱における γ -H2AX 形成の用量相関性を併せて検証した。

B．研究方法

新規被験物質として、遺伝毒性非発がん物質 3 種：2,6-Diaminotoluene (2,6-DAT), 6-Mercaptopurine monohydrate (6-MP), 5-Fluorouracil (5-FU) および非遺伝毒性非発がん物質 2 種：Ethionamide (ETP), Ampicillin trihydrate (AMP) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 4 週間経口投与した。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量として、0.1% 2,6-DAT 混餌、0.01% 6-MP 混餌、0.0125% 5-FU 飲水、0.3% ETP 混餌、1000 mg/kg/day AMP 強制経口(溶媒: コーン油)に設定した。

用量相関性の検討として、6 週齢の雄 F344 ラットに遺伝毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) または非遺伝毒性膀胱

発がん物質であるメラミンを、それぞれ 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.02, 0.05% (飲水) および 0, 0.3, 1, 3% (混餌) の用量で 2 日または 4 週間投与した。

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 γ -H2AX 形成/Ki67 発現解析を実施した。膀胱粘膜における γ -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

新規被験物質について、膀胱粘膜上皮細胞における γ -H2AX 形成を免疫組織化学的に検索した。粘膜上皮細胞 1000 個あたりの γ -H2AX 陽性率を算出した結果、いずれの被験物質も γ -H2AX 陽性率の有意な増加を誘導しないことが示された(図 1)。

BBN およびメラミンの複数用量による検討では、投与開始後 2 日の時点では、いずれの投与群にも病理所見は認められなかった。4 週時点では、BBN の 0.01% 以上投与群およびメラミンの 3% 投与群で、過形成等の病理組織学的変化が認められた。BBN 投与群では 2 日・4 週いずれの時点でも、膀胱粘膜上皮における γ -H2AX・Ki67 陽性率はそれぞれ 0.001% 以上・0.01% 以上の投与群で用量相関性を伴って有意に増加した(図 2, 3)。メラミン投与群では、 γ -H2AX・Ki67 陽性率は 2 日・4 週時点でもともに最高用量の 3% 群でのみ有意に増加した

(図4, 5) メラミン投与群(0.3%以上)におけるKi67発現は、2日目の時点で一過性の有意な増加を示した。

-H2AXおよびKi67の多重免疫蛍光染色を実施した結果、メラミン投与群では-H2AX陽性細胞の大半がKi67発現細胞と一致していた一方、BBN投与群では共発現細胞のみならず、-H2AX単独陽性細胞も多く認められた(図6)。

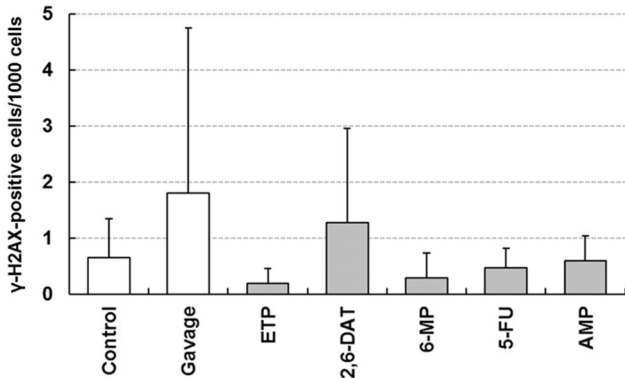


図1. 新規被験物質を投与したラット膀胱粘膜上皮細胞における-H2AX陽性率。(Student *t*-test).

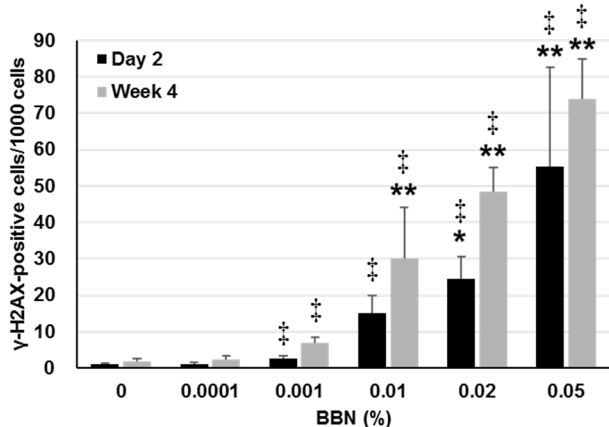


図2. BBN投与ラット膀胱粘膜上皮における-H2AX陽性率。*; $P < 0.01$ (Dunnett多群検定), †; $P < 0.01$ (Jonckheere傾向検定)。

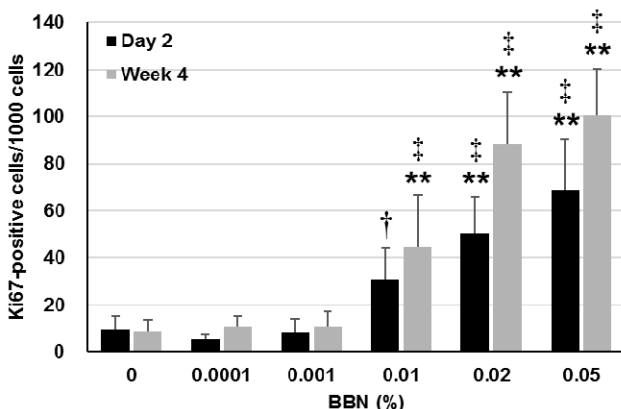


図3. BBN投与ラット膀胱粘膜上皮におけるKi67陽性率。*; $P < 0.01$ (Dunnett多群検定), †; ‡; $P < 0.05, 0.01$ (Jonckheere傾向検定)。

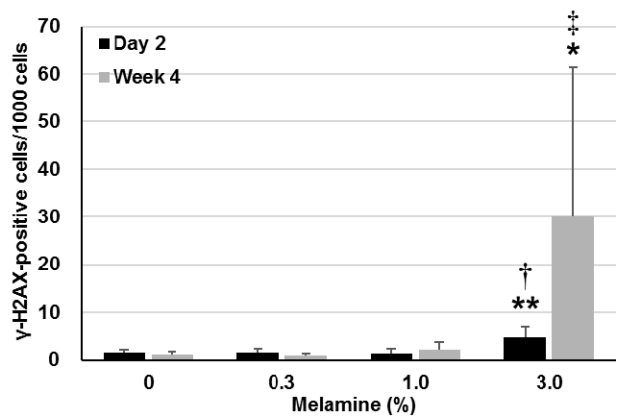


図4. メラミン投与ラット膀胱粘膜上皮における-H2AX陽性率。*, **; $P < 0.05, 0.01$ (Dunnett多群検定), †, ‡; $P < 0.05, 0.01$ (Jonckheere傾向検定)。

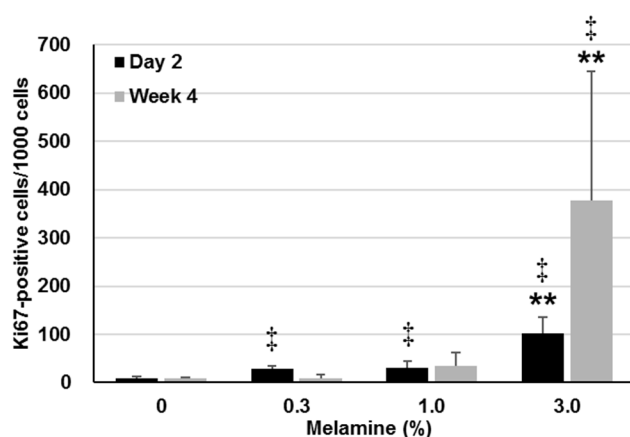


図5. メラミン投与ラット膀胱粘膜上皮におけるKi67陽性率。*; $P < 0.01$ (Dunnett多群検定), †, ‡; $P < 0.01$ (Jonckheere傾向検定)。

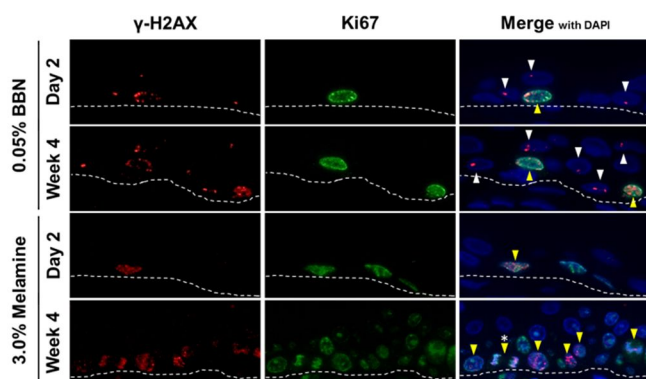


図6. BBNおよびメラミン投与ラット膀胱粘膜における-H2AX/Ki67免疫蛍光染色。-H2AX単独陽性細胞(白矢頭)、-H2AX/Ki67共発現細胞(黄矢頭)。

D. 考察

我々は前年度に、「膀胱における-H2AX免疫染色」を、28日間反復経口投与と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を提出し、OECD加盟国・機関から多くのレビューコメントを頂いた。令和元年度はこれらの指摘のうち、非発がん物質の評価が不足していること、および-H2AX形成の用量相関性が未検証であることへ

の対応を実施した。

今年度に新たに検討した 5 種の非発がん物質は、いずれも膀胱粘膜における -H2AX 形成を誘導しなかった。これまでに検討したデータと併せ、-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 82.9% (29/35) および特異度 100% (30/30) と、高い精度で予測できることが示された。

また、遺伝毒性および非遺伝毒性膀胱発がん物質の代表として、それぞれ BBN およびメラミンを用いて、-H2AX 形成の用量相関性を検証した。その結果、膀胱における -H2AX 形成は明瞭な用量相関性を示すことが確認された。

BBN 投与群の膀胱における -H2AX 形成の有意な増加は、過形成等の病理組織学的所見および Ki67 発現増加が生じる用量 (0.01%) よりも低い用量 (0.001%) から認められ、-H2AX がより鋭敏な指標であることが明らかとなった。また、BBN・メラミン投与群における -H2AX 陽性細胞は、いずれも投与開始後 2 日目の時点で有意な増加を示しており、より短期間の試験にも応用できる可能性が示唆された。一方で、いずれの投与群においても、4 週時点での -H2AX 陽性率が 2 日目よりも高いことから、28 日間投与試験への組み込みが適していると考えられる。

多重免疫蛍光染色を用いた解析では、-H2AX・Ki67 陽性細胞の局在パターンが、BBN・メラミン投与群では互いに異なることが明らかとなった。遺伝毒性発がん物質である BBN の投与群には -H2AX 単独陽性細胞が多数認められ、直接的な DNA 損傷が生じていることが示唆された。一方、メラミンは膀胱結石による物理的刺激を介して、尿路上皮細胞の増殖活性を高めることが知られている。メラミン投与群における -H2AX 形成の大半が Ki67 陽性細胞に生じている事実は、細胞増殖活性の増加に伴う複製エラー等、二次的な DNA 損傷の関与を示唆すると考えられる。以上の結果から、膀胱発がん過程における遺伝毒性機序の関与の有無を、病理組織標本上で評価し得る可能性が示された。

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法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) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose dependency of -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with genotoxic and nongenotoxic bladder carcinogens. *J Appl Toxicol.* in press.
- 2) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Comprehensive expression analysis of mRNA and microRNA for investigation of compensatory mechanisms in the rat kidney after unilateral nephrectomy. *J Appl Toxicol.* in press.
- 3) Furihata C, You X, Toyoda T, Ogawa K, Suzuki

T. Using FFPE RNA-Seq with 12 marker genes to evaluate genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens. *Genes Environ.* 2020; 42: 15.

- 4) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of vanillin propylene glycol acetal in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2019; 132: 110643.
2. 学会発表
 - 1) 豊田武士、山田貴宣、井手鉄哉、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . F344 ラットの膀胱に認められた神経筋血管過誤腫の一例 . 第 7 回日本獣医病理学専門家協会学術集会、宮崎 (2020 年 3 月)
 - 2) Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Mucosal damage and -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to that of o-toluidine. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020 年 3 月)
 - 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤木純一、曹永晩、森川朋美、小川久美子 . 腎発がん物質早期検出指標としての -H2AX の応用可能性: 至適評価時点の検討 . 第 36 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020 年 2 月)
 - 4) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、小川久美子 . 病理学的手法による膀胱発がん性の早期検出および機序解明 . 第 2 回医薬品毒性機序研究会、川崎 (2020 年 1 月)
 - 5) 豊田武士、山田貴宣、小川久美子 . オルト-トルイジン類似構造を有する芳香族アミンによるラット膀胱粘膜傷害および -H2AX 形成 . 第 78 回日本毒学会学術総会、京都 (2019 年 9 月)
 - 6) 豊田武士、山田貴宣、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 を指標とした膀胱発がん物質早期検出法 . 第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島 (2019 年 6 月)
 - 7) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose- and time-dependent formation of -H2AX, a biomarker for early detection of bladder carcinogens, and its potential role in tumorigenesis in the rat urinary bladder. 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Anaheim (2020 年 3 月)
 - 8) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、西川秋佳、小川久美子 . 肝発がん物質投与ラット肝臓における -H2AX 陽性細胞率の検討 . 第 36 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020 年 2 月)
 - 9) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子 . 急性腎障害から慢性腎臓病への進展を早期に予測する新規評価分子の探索 . 第 36 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2020 年 2 月)
 - 10) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子 . BBN 誘発ラット膀胱発がん過程における Hepatocyte growth factor (HGF) の関与 . 第 36 回

日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2020年2月）

- 11) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子．慢性腎臓病における再生機構の破綻した尿細管による線維化促進メカニズムの解明．第2回医薬品毒性機序研究会、川崎（2020年1月）
- 12) 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：DNA付加体を形成する膀胱発がん性芳香族アミン *o*-toluidine 代謝物の分析、ACEM/JEMS 2019、東京（2019年11月）
- 13) 降旗千恵、尤馨悦、豊田武士、小川久美子、鈴木孝昌．肝がん原物質 2-アセチルアミノフルオレンと *p*-クレシジンの遺伝毒性を FFPE-RNA-Seq で評価．ACEM/JEMS 2019、東京（2019年11月）
- 14) 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 DNA 付加体および代謝物分析．第8回食品薬学シンポジウム、静岡（2019年10月）
- 15) 山田貴宣、豊田武士、小川久美子．ラット膀胱発がん過程における γ -H2AX 及び膀胱がん幹細胞マーカー陽性細胞の役割．第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
- 16) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、横井雅幸、花岡文雄、小川久美子．ベンゾ[*a*]ピレンおよび β -ナフトフラボン併用投与による腫瘍形成における Pol 欠損の影響．第78回日本癌学会学術総会、京都（2019年9月）
- 17) Ogawa K, Cho YM, Ide T, Akagi J, Toyoda T, Yamashita S, Hirata T. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles. Global Summit on Regulatory Science 2019, Ispra (2019年9月)
- 18) 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 N-acetyl-L-cysteine の影響．第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京（2019年9月）
- 19) 曹永晩、水田保子、赤木純一、井手鉄哉、豊田武士、山下修司、平田岳史、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関する検討 第34回発癌病理研究会、鳥羽（2019年8月）
- 20) Matsushita K, Toyoda T, Morikawa T, Yamada T, Ogawa K. The toxicological profiles of 1,3-dichloro-2-propanol determined by a repeated-dose 28-day oral toxicity study in F344 rats. IUTOX 15th International Congress of Toxicology, Honolulu (2019年7月)
- 21) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K. Effects of antioxidant and inhibitor

of γ -glutamylcysteine synthetase on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. IUTOX 15th International Congress of Toxicology, Honolulu (2019年7月)

- 22) 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．メタボローム解析による膀胱発がん性芳香族アミン化合物の活性代謝物の解明．第26回日本がん予防学会総会、札幌（2019年6月）
- 23) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子．腎臓の再生尿管及び線維化病変内の尿管における Survivin、SOX9 及び CD44 の発現．第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 24) 井手鉄哉、山下修司、平田岳史、水田保子、赤木純一、豊田武士、曹永晩、小川久美子．レーザープラズマ質量分析計を用いたナノ粒子イメージングによる銀ナノ粒子の粒径依存的な肝毒性メカニズム検証の試み．第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 25) 山田貴宣、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小川久美子．BBN 誘発ラット膀胱発がん過程における γ -H2AX 形成及び膀胱がん幹細胞マーカー発現の経時的变化．第46回日本毒性学会学術年会、徳島（2019年6月）
- 26) 森川朋美、豊田武士、松下幸平、山田貴宣、小川久美子．ラットを用いた 2-(1-メントキシ)エタノールの 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25回総会・学術大会、松本（2019年6月）
- 27) 野村幸世、豊田武士．MEK 阻害剤 Selumetinib による *H. pylori* 感染スナネズミ胃粘膜の化生粘膜の回復．第97回日本消化器内視鏡学会総会、東京（2019年6月）
- 28) Nomura S, Toyoda T, Ishibashi Y, Ohmoto Y, Ohtsu H, Yasuda T, Seto Y, Goldenring JR. Evaluation of serum TFF3 levels in gastric cancer patients long after gastrectomy and the origin of high serum TFF3 in gastric cancer animal models. Digestive Disease Week 2019, San Diego (2019年5月)

G. 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