

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究

令和元年度 分担研究報告書

非遺伝毒性発がんの免疫組織化学染色による評価法確立に関する研究

研究分担者 チョウ ヨンマン

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部 室長

研究分担者 小川 久美子

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部長

研究要旨

非遺伝毒性の発がん機序には、prolactin (PRL) や甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone : TSH)、thyroxine (T4) を含む各種ホルモンレベルの変動と関連しているものも多くみられる。近年、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD) では試験法ガイドライン (TG : Test Guideline) 408 のげっ歯類を用いた 90 日間反復投与毒性試験等において、内分泌攪乱作用の有無を検討するため血清中の triiodothyronine (T3)、T4 や TSH などの測定が追加された。変動の意義やヒトへの外挿性を考慮する上でも、これらの指標の重要性が認識されているが、汎用性が高く、より高感度の測定方法、あるいは血清以外を用いたホルモン変動の解析方法が必要と考えられる。平成 31 年度 (令和元年度) においては、前年度に作製した血清ホルモン濃度が変動したラットモデルのサンプルにおいて、十分な感度が得られていなかった血清 TSH 値について測定方法を改良した。また、血清 T4 値と免疫組織化学染色による甲状腺の T4 発現動態について比較検討した。その結果、抗体とビーズの複合体の蛍光強度についてフローサイトメーターを用いた TSH の測定により、雌雄の AMT 群及び雌の PTU 群で基礎食群に比べて有意な高値が確認された。また、有意差は認めなかったものの雄の PTU 群及び雌雄の AGT 群についても高値傾向が見られ、下垂体における抗 TSH 抗体を用いた免疫組織化学染色による評価に応用可能な検体が得られた。また、甲状腺における抗 T4 抗体を用いた免疫組織化学染色による検討では、血清での T4 低値を反映する結果が得られるとともに、変動の機序に関する情報も得られる可能性が示唆された。以上の検討法は、今後、他のホルモンの評価についても応用可能と考えられた。

A. 研究目的

非遺伝毒性の発がん機序には、prolactin (PRL) や甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone : TSH)、thyroxine (T4) を含む各種ホルモンレベルの変動と関連しているものも多くみられる。経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD) において開発が推

進されている有害性発現経路 (AOP : Adverse Outcome Pathway) では、起始となる標的分子の事象 (Molecular Initiating Event, MIE) 及びそれに引き続く重要な事象 (Key Event, KE) は測定可能であることが必須とされている。よって、毒性試験における血中 PRL、TSH 及び T4 等の発現変動の評価は、非遺伝毒性発がんにおける MIE 又は KE と

しても重要な意味を持っている。更に近年、OECD では 試験法ガイドライン (TG : Test Guideline) 408 のげっ歯類を用いた 90 日間反復投与毒性試験等において、内分泌攪乱作用の有無を検討するため血清中の triiodothyronine (T3)、T4 や TSH などの測定が追加された。変動の意義やヒトへの外挿性を考慮する上でも、これらの指標の重要性が認識されている。しかし、通常の方法 (ECLIA 等) によるホルモン濃度の測定には 1 項目について 0.4~0.5 ml の血清が必要であり、毒性評価の為必須である複数項目の血液生化学検査に追加することは、ラットでは可能性があるものの、マウスでは困難である。以上の背景から、汎用性が高く、より高感度の測定方法、あるいは血清以外を用いたホルモン変動の解析方法が必要と考えられる。

本分担研究では、非遺伝毒性の発がん機序に関連する、PRL、TSH、T4 を含む各種ホルモンレベルの簡便な半定量的検出法の確立を目的として、通常の毒性試験で得られる病理標本を用いた免疫組織化学染色による評価法の開発を目指す。平成 31 年度 (令和元年度) においては、前年度に作製した血清ホルモン濃度が変動したラットモデルのサンプルにおいて、十分な感度が得られていなかった血清 TSH 値について測定方法を改良した。また、血清 T4 値と免疫組織化学染色による甲状腺の T4 発現動態について比較検討した。

B. 研究方法

平成 30 年度に 6 週齢 SD ラット (雌雄各群 5 匹) をもちいて、基礎食 (Basal diet) 群、1000 ppm aminotriazole (AMT) 飲水投与群、20 ppm vitamin D₃ (VD3) 混餌投与群、50 ppm propylthiouracil (PTU) 飲水投与

群、500 ppm phenobarbital (PB) 混餌投与群、6000/1500 ppm aminogluthimide (AGT) 混餌投与群、10 ppm estradiol (E2) 混餌投与群の 7 群を設定し、29-30 日目にイソフルラン吸入麻酔下にて後大動脈からの採血後、放血し、解剖した。肝臓、腎臓、甲状腺、下垂体、卵巣、精巣及び副腎は重量測定を行い、それらに加え脾臓及び子宮についてホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、病理組織学的検討用の HE 標本を作製した。

血清生化学的検査として、平成 30 年度に、主要項目と共に T3、T4、TSH、ACTH、卵胞刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone、FSH)、黄体ホルモン (Luteinizing hormone、LH)、PRL、estradiol、progesterone、testosterone などの血清中濃度測定を実施したが、TSH はいずれの検体も検出限界以下とされた。本年度は TSH について、一般財団法人残留農薬研究所の協力を得て Milliplex Map Rat Thyroid Hormone TSH Panel (EMD Millipore, USA) を使用し、蛍光ビーズ法にて測定した。すなわち、それぞれの血清サンプルをビーズおよび検出抗体と混合し、サンプルの蛍光強度をフローサイトメーター (FACSVerse, BD, Tokyo) を用いて測定した。スタンダードにおける蛍光強度の検量線から血清サンプルの TSH 濃度 (ng/mL) を算出した。検体は、1 匹の血清サンプルに対して 2 本の測定用サンプルを用意し、2 本の測定値の平均値を個体ごとの TSH 濃度とした。

また、平成 30 年度の結果から、血清 T4 値の有意な変動が確認されたため、全動物の甲状腺サンプルを用いて T4 について免疫組織化学染色を実施した。標本は脱パラフィン後、抗原の賦活化のためクエン酸緩衝液 pH6.0 (関東化学) に浸漬してオートク

レーブで 121°C 15 分間熱処理を行い、3% H₂O₂ メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼ阻害処理、10% 正常ヤギ血清 (ニチレイ) にてブロッキングを行った。1 次抗体には、抗 Thyroxin(T4) マウスモノクローナル抗体 (Clone XM212, Dako; 希釈倍率: x 2,000) を用いて 4°C 下で 1 晩反応させ、2 次抗体にはヒストファインシンプルステインラット MAX-PO(M) を 30 分反応させたのち、DAB を用いて発色させた。

統計解析

データは Prism により集計し Basal diet 群を基準とした Dunn の多群検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。図標中には、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ で有意差の程度を示した。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌及び飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

C.1. 血清 TSH の測定 (Table 1, Figure 1a,1b)

今回の測定においては、前年度検出限界以下とされた検体を凍結保存したサンプルを用いた。3 検体については、保存状態から計測不可となったが、その他の検体は測定値を得ることができた。2 回に分けて測定された測定日ごとの検量線は、相関係数 R^2 が 0.9987 及び 0.9912 であり、直線性を担保していることから、測定の適切性が示され

た。雌雄の AMT 群及び雌の PTU 群で基礎食群に比べて有意な高値を認めた。また、有意差は認めなかったものの雄の PTU 群及び雌雄の AGT 群についても高値傾向が見られた。

C.2. T4 の免疫組織化学染色による検討 (Figure 2)

前年度に得られた各群の甲状腺組織について抗 T4 抗体を用いた免疫組織化学染色を実施したところ、雌雄の AMT 群および PTU 群では甲状腺の内腔での陽性所見はほとんど認めず、明らかな T4 の染色性低下が見られた。

D. 考察

本分担研究では、非遺伝毒性の発がん機序に関連する、PRL、TSH、T4 を含む各種ホルモンレベルの簡便な検出法の確立を試みている。本年度においては、血清 TSH の測定を抗体とビーズの複合体の蛍光強度についてフローサイトメーターを用いた測定で再検討したところ、十分な結果が得られた。すなわち、スタンダードサンプルでは適切な検量線が得られ、雌雄の AMT 投与群及び雌の PTU 群のサンプルでは有意な高値を認めた。これらの群では前年の検討において血清 T3 及び T4 の有意な低値が確認されており、そのネガティブフィードバックによって下垂体からの TSH 産生が高まるとされるこれらの化合物の既知の毒性所見が反映されていた。1 群あたりの検体数が 5 と限られていることから有意差はないものの、雄の PTU 群においても TSH 値の高値傾向が見られた。一方、雌のみが有意な T3 の低値を示していた AGT 群においては、雌雄で高値傾向がみられた。TSH については、現在の所、免疫組織化学染色による検出方法が

確立できておらず、引き続き検討を継続する必要がある。

また、前年の検討において、血清 T4 の低値が明らかであった個体を含む全個体の甲状腺について T4 の免疫組織化学染色を実施したところ、雌雄の AMT 群および PTU 群では明らかな T4 の染色性低下が見られ、ホルモンレベルの変動を毒性試験において恒常的に採取検討される甲状腺の病理標本を用いてスクリーニングできる可能性が示唆された。一方で、T4 の有意な高値を示した雄の E2 群では、甲状腺の腺内腔での発現は認められるものの、細胞質の染色性の亢進は明らかではなかった。血中の T4 の制御には、甲状腺からの産生と血中等での分解/排泄が関わっており、E2 投与では T4 の分解・排泄が抑制されている可能性が示唆された。

HE 染色標本では、雌雄とも AMT 群および PTU 群では甲状腺濾胞上皮細胞の肥大、過形成、単細胞壊死とうっ血所見が認められており (Figure 3)、TSH の亢進による影響が反映されていると考えられる。一方、E2 群では HE 染色標本上も、明らかな所見は認められておらず、組織像は甲状腺ホルモンレベルよりも甲状腺刺激ホルモンレベルに影響を強く受ける可能性が示唆された。

E. 結論

前年度に得られたサンプルにおいて、TSH 値の有意な変動が確認され、下垂体における抗 TSH 抗体を用いた免疫組織化学染色による評価に応用可能な検体が得られた。また、甲状腺における抗 T4 抗体を用いた免疫組織化学染色による検討では、血清での T4 低値を反映する結果が得られるとともに、変動の機序に関する情報も得られる可能性が示唆された。今後、他のホルモンの評価に

についても応用可能と考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

G.1. 特許取得

なし

G.2. 実用新案登録

なし

G.3.その他

なし

Table 1. Concentration of serum hormone in rats treated with various chemicals

		Basal	AMT	VD3	PTU	PB	AGT	E2
Male	TSH (ng/mL)	3.39 ± 1.29 (5)	23.92 ± 6.27 * (5)	2.82 ± 1.18 (5)	14.92 ± 2.54 (5)	6.37 ± 2.38 (5)	10.89 ± 2.39 (5)	2.71 ± 0.98 (5)
	T3 (ng/mL)	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.00 **	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0 **	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1 **
	T4 (µg/mL)	4.5 ± 0.9	0.4 ± 0.0 **	4.1 ± 1.0	0.4 ± 0.0 **	4.1 ± 0.4	3.8 ± 2.1	6.4 ± 0.8 *
Female	TSH (ng/mL)	1.67 ± 0.75 (5)	42.54 ± 7.14 ** (4)	1.91 ± 0.67 (3)	35.89 ± 7.54 ** (5)	2.68 ± 1.01 (5)	24.25 ± 8.79 (5)	1.65 ± 0.31 (5)
	T3 (ng/mL)	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0 **	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1 **	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.2 *	1.1 ± 0.1
	T4 (µg/mL)	3.2 ± 1.1	0.4 ± 0.0 **	4.0 ± 0.9	0.4 ± 0.0 **	2.9 ± 0.6	3.0 ± 1.5	4.5 ± 0.8
	Histology	np	Follicular cell hypertrophy Follicular cell hyperplasia Follicular cell single cell necrosis Congestion	np	Follicular cell hypertrophy Follicular cell hyperplasia Follicular cell single cell necrosis Congestion	np	Follicular cell hypertrophy	np

Values are expressed as mean ± standard deviation.

(); number of rat for TSH. Number of rat for T4/T3 is 5.

* and **: Significantly different from the basal diet group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

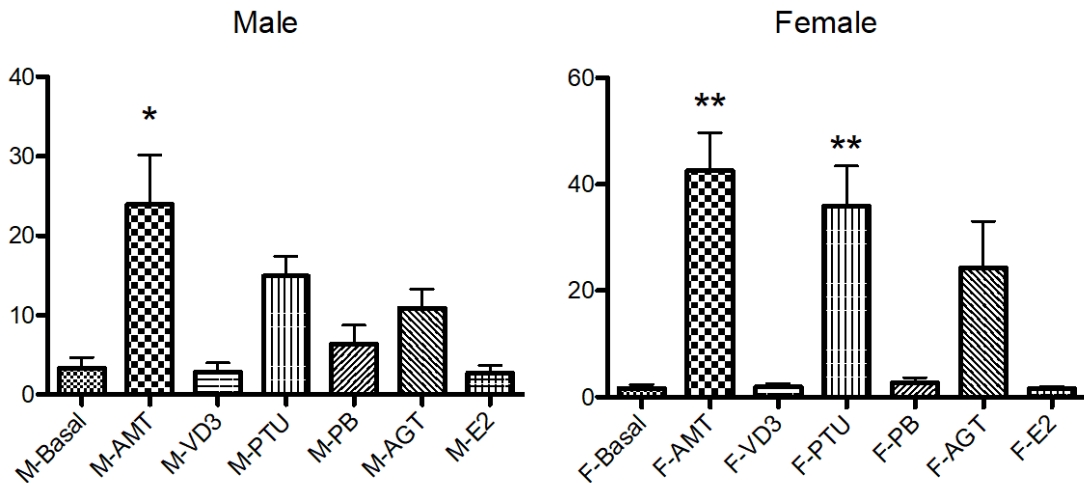


Figure 1 Concentration of serum thyroid stimulating hormone in rats

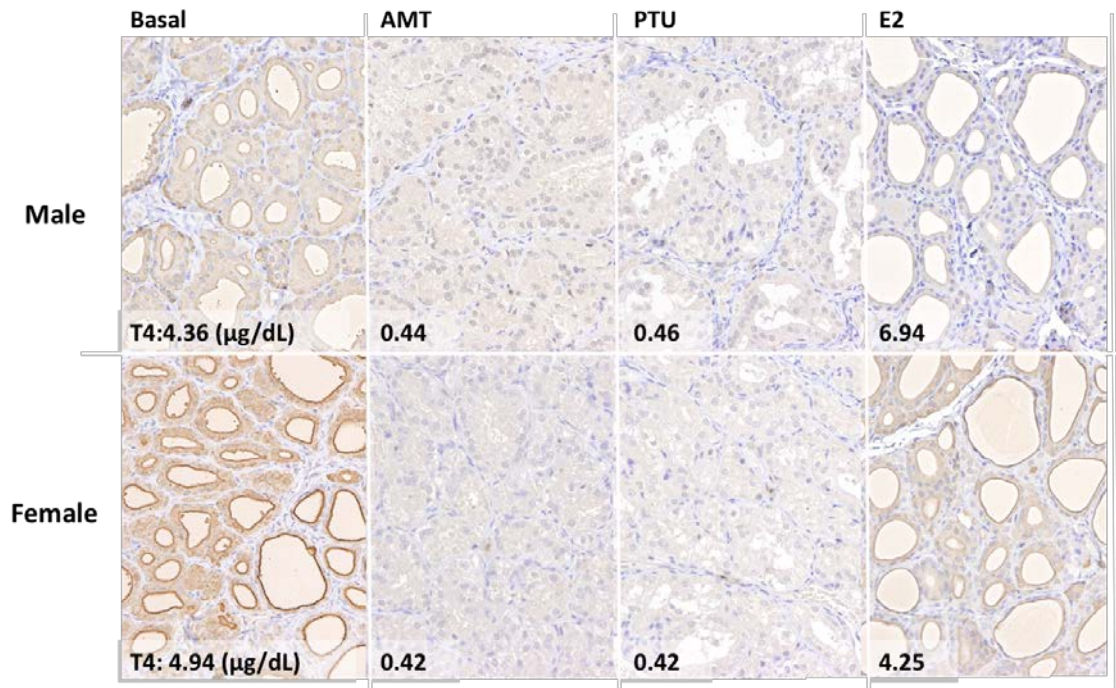


Figure 2 Representative observation of the immunohistochemical T4 expression in the thyroid of rat treated with various chemicals (numbers indicate serum T4 level)

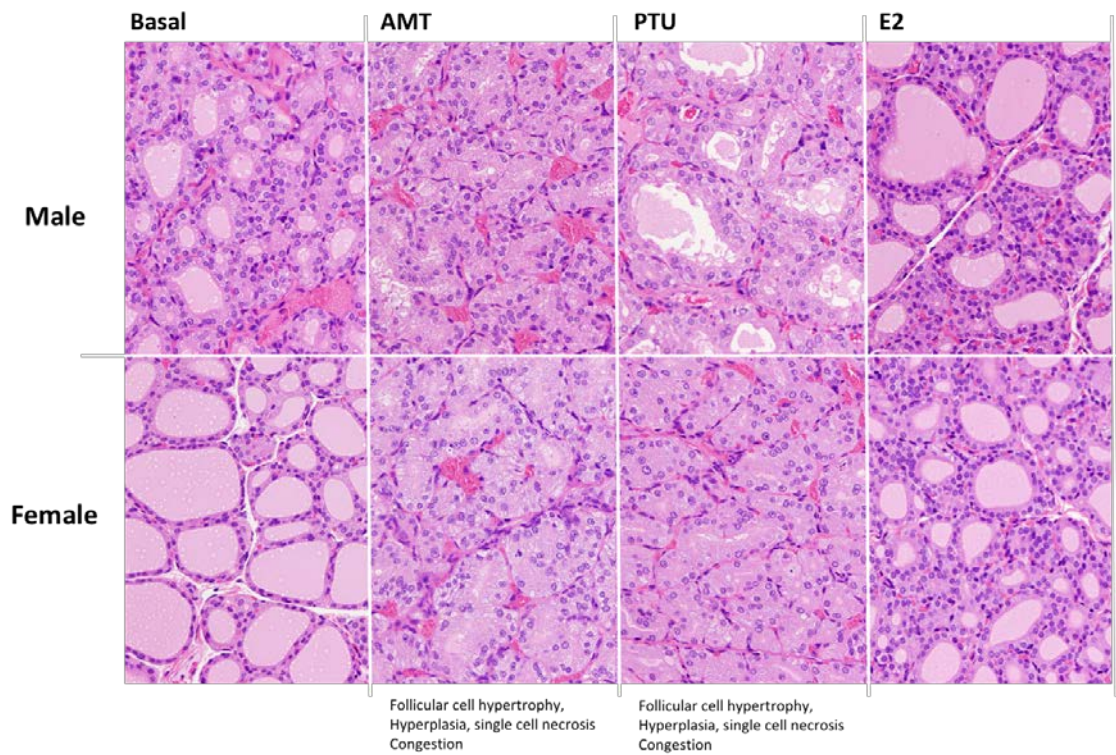


Figure 3 HE-staining in the thyroid of rat treated with various chemicals