

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 2 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 豊田 武士

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

### 研究要旨

非遺伝毒性の発がん機序には各種ホルモンレベルの変動と関連しているものが多くみられる。近年、経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) 試験法ガイドライン (TG: Test Guideline) 「齧歯類を用いた 90 日間反復投与毒性試験」に内分泌攪乱作用の検出を目的として、血清中の各種ホルモン値が測定項目として追加された。しかし、ホルモン値測定は高コストかつ個体差が大きい等の問題があり、より簡便かつ汎用性の高い解析方法が必要とされている。本研究では、化学物質のホルモン動態への影響を病理組織学的・免疫組織化学的に検出する手法の確立を目指し、6 種 (AMT, VD3, PTU, PB, AGT, E2) の被験物質をラットに 4 週間経口投与する動物実験を実施した。令和 2(2020)年度は、従来の測定法では検出限界以下であった血清プロラクチン (PRL) 値の再測定を実施し、定量可能な測定法を確立した。また、ラット下垂体組織標本を用いて、甲状腺刺激ホルモン (TSH)・副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)・PRL の免疫組織化学的解析を実施した。その結果、ACTH・PRL については、各群間において発現レベルに差異は認められなかった。一方、下垂体前葉における TSH 陽性細胞の面積率は、血清 TSH 値の増加を示した AMT・PTU・AGT 投与群の雌雄で有意な増加を示した。これらの面積率は各個体の血清 TSH 値と明瞭な相関を有し、同ホルモンレベルの病理組織標本を用いた評価が可能であると考えられた。本研究により、血清 TSH レベルの亢進を引き起こす化学物質を免疫組織化学的解析によって検出できる可能性が示された。

### A. 研究目的

非遺伝毒性の発がん機序には、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 及びサイロキシン (T4) 等の、各種ホルモンレベルの変動と関連しているものが多くみられる。OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) において開発が推進されている AOP (Adverse Outcome Pathway) では、起始となる標的分子の事象 (MIE: Molecular Initiating Event) 及びそれに引き続く重要な

事象 (KE: Key Event) は測定可能であることが必須とされている。よって、毒性試験における甲状腺刺激ホルモン (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 または KE としても重要な意味を持つと考えられる。さらに近年、OECD では TG (Test Guideline) 408 の齧歯類を用いた 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、血中トリヨードサイロニン (T3)・T4・TSH 等

の測定が検索項目として追加された。しかし、ホルモン濃度の測定には各項目 0.5 mL 程度の血清が必要であり、従来の必須測定項目である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、マウスでは明らかに困難である。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、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組織標本を用いた病理組織学的・免疫組織化学的評価法の開発を実施した。

## B. 研究方法

平成 30(2019)年度～令和元(2020)年度にかけて、6 週齢の SD ラット(各群雌雄 5 匹)に対し、ホルモン動態への影響が想定される被験物質 6 種 (1000 ppm AMT (aminotriazole), 20 ppm VD3(vitamin D)、50 ppm PTU(propylthiouracil) , 500 ppm PB(phenobarbital), 6000/1500 ppm AGT(aminogluthethimide), 10 ppm E2(estradiol) を 4 週間反復経口投与する動物実験を行った。甲状腺・下垂体・副腎の重量測定及び病理組織学的検索ならびに血中 T3・T4・TSH・副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) ・卵胞刺激ホルモン (FSH) ・黄体ホルモン (LH) ・PRL ・エストラジオール (E2) ・プロゲステロン・テストステロンの測定を実施した。

令和 2(2020)年度は、従来の測定法では検出限界以下であった血清 PRL について、一般財団法人残留農薬研究所・青山博昭博士の協力による再測定を実施した。また、全動

物の下垂体組織標本を用いて、TSH・PRL・ACTH の免疫組織化学的検索を実施した。定量解析として、下垂体前葉における TSH 陽性細胞の面積率を測定した。

(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程に基づき、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

### C.1. 血清ホルモン値

PRL 再測定結果を含めた、各種血清ホルモン値を Table 1 に示す。AMT・PTU 投与群では、T3・T4・TSH の変動に加えて、雌における PRL の増加が認められた。また、E2 投与群では、雄で T3・T4 に加えて PRL の有意な増加がみられた。

### C.2. 免疫組織化学的検索 (下垂体 TSH・PRL・ACTH)

各投与群の下垂体における TSH・PRL・ACTH 発現を、免疫染色により検索した。下垂体前葉における TSH 陽性細胞は、血清 TSH 値の有意な増加を示した AMT・PTU・AGT 投与群の雌雄で増加が認められ (Figure 1)、陽性面積率の増加は対照群と比較して有意であった (Figure 2)。また、これらの陽性面積率は、各個体の血清 TSH レベルと明瞭な相関関係を有することが示唆された (Figure 3)。一方、PRL・ACTH 発現については、各投与群で明らかな差異は認められなかった。

## 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各種ホルモン動態の簡便な検出法確立を目指し、通常の反復投与毒性試験で得られる病理組織標本を用いた、免疫組織化学的手法による評価法の開発を行った。

下垂体組織標本を用いた TSH 免疫染色では、血清 TSH 値の増加を示した AMT・PTU・AGT 投与群において、雌雄ともに TSH 陽性細胞の面積率増加が認められた。これらの面積率は各個体の血清 TSH 値と明瞭な相関を有し、同ホルモンレベルの病理組織標本を用いた評価が可能であると考えられた。一方、PRL・ACTH については、各群間において下垂体組織標本での発現レベルに差異は認められなかった。

## E. 結論

本分担研究では、非遺伝毒性の発がん機序に関連する各種ホルモン動態の簡便な検出法確立を目指し、通常の反復投与毒性試験で得られる病理組織標本を用いた、免疫組織化学的手法による評価法の開発を行った。

下垂体組織標本を用いた TSH 免疫染色では、血清 TSH 値の増加を示した AMT・PTU・AGT 投与群において、雌雄ともに TSH 陽性細胞の面積率増加が認められた。これらの面積率は各個体の血清 TSH 値と明瞭な相関を有し、同ホルモンレベルの病理組織標本を用いた評価が可能であると考えられた。一方、PRL・ACTH については、各群間において下垂体組織標本での発現レベルに差異は認められなかった。

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

- 1) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Cho YM, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Ogawa K. Expression of stem cell markers as useful complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. *Arch Toxicol*, 95: 715-26, 2021
- 2) Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. *o*-Anisidine dimer, 2-methoxy-*N*<sup>4</sup>-(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 34: 912-9, 2021
- 3) Matsushita K, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. Specific expression of survivin, SOX9, and CD44 in renal tubules in adaptive and maladaptive repair processes after acute kidney injury in rats. *J Appl Toxicol*, 41: 607-17, 2021
- 4) Suzuki S, Gi M, Toyoda T, Kato H, Naiki-Itô A, Kakehashi A, Ogawa K, Takahashi S, Wanibuchi H. Role of  $\gamma$ -H2AX as a biomarker for detection of bladder carcinogens in F344 rats. *J Toxicol Pathol*, 33: 279-85, 2020
- 5) Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. A novel *o*-toluidine metabolite in rat urine associated

with urinary bladder carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 33: 1907-14, 2020

- 6) 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*. 2020; 40: 1373-83.
- 7) Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Ogawa K. Dose dependency of  $\gamma$ -H2AX formation in the rat urinary bladder treated with genotoxic and nongenotoxic bladder carcinogens. *J Appl Toxicol*. 2020; 40: 1219-27.
- 8) 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.

## F.2. 学会発表

- 1) 豊田武士、松下幸平、山田貴宣、赤木純一、森川朋美、小川久美子. 腎臓がん物質早期検出指標としての  $\gamma$ -H2AX の応用可能性：用量相関性の検討. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 2) 豊田武士、小川久美子. ラット膀胱粘膜における  $\gamma$ -H2AX 形成を指標とした芳香族アミンの膀胱傷害性および発がん性評価. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
- 3) 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、森川朋美、小川久美子. オルト-トルイジン類似構造を持つ芳香族アミンによるラッ

ト膀胱傷害および遺伝子発現解析. 第 47 回日本毒性学会学術年会、Web 開催 (2020 年 6 月)

- 4) 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における CD44 の役割. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 5) 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、井手鉄哉、小川久美子. ラット肝臓標本を用いた肝臓がん物質早期検出のためのバイオマーカーの探索. 第 37 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、Web 開催 (2021 年 1 月)
- 6) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. *o*-Anisidine 曝露ラット尿中代謝物の探索. 日本環境変異原学会第 49 回大会、Web 開催 (2020 年 11 月)
- 7) 赤木純一、豊田武士、小川久美子. 肝臓がん物質投与ラット肝細胞における  $\gamma$ -H2AX 誘導と細胞増殖活性の相関. 第 79 回日本癌学会学術総会、Web 開催 (2020 年 10 月)
- 8) 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之. *o*-Anisidine 曝露ラット尿中代謝物の探索. がん予防学術大会 2020、Web 開催 (2020 年 9 月)
- 9) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. 腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた急性腎障害から慢性腎臓病への進展メカニズムの解明. 第 163 回日本獣医学会学術集会、Web 開催

(2020年9月)

- 10) 松下幸平、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子. mRNA-microRNA 統合解析を用いた腎代償性メカニズムの包括的解析. 第47回日本毒性学会学術年会、Web開催(2020年6月)

#### F. 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

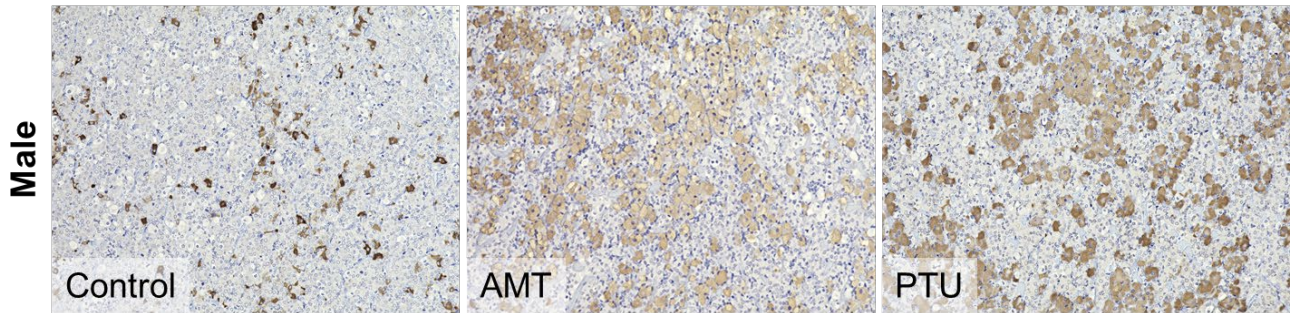
Table 1. Serum hormone data for SD rats treated with chemicals for 28 days

	Basal diet	1000 ppm AMT	20 ppm VD3	50 ppm PTU	500 ppm PB	6000/1500 ppm AGT	10 ppm E2
<i>Male</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
T3 (ng/mL)	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0 **	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0 **	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1 **
T4 (µg/dL)	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 *
TSH (ng/mL)	3.4 ± 1.3	23.9 ± 6.3 **	2.8 ± 1.2	14.9 ± 2.5 **	6.4 ± 2.4	10.9 ± 2.4 **	2.7 ± 1.0
ACTH (pg/mL)	74.0 ± 36.0	26.0 ± 9.1	43.1 ± 13.5	73.5 ± 71.7	56.8 ± 17.7	216.0 ± 126.6 **	68.1 ± 40.5
FSH (mIU/mL)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
LH (mIU/mL)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Prolactin (ng/mL)	1.8 ± 1.3	2.8 ± 2.8	2.5 ± 3.0	0.8 ± 1.0	0.5 ± 1.0	1.1 ± 1.6	11.9 ± 10.9 **
Estradiol (pg/mL)	11.9 ± 3.3	20.5 ± 6.9	11.8 ± 4.0	13.9 ± 1.5	11.6 ± 3.5	20.4 ± 6.3	19.4 ± 11.8
Progesterone (ng/mL)	6.5 ± 3.6	5.1 ± 1.8	3.6 ± 0.9	7.5 ± 3.5	3.0 ± 1.3	5.9 ± 3.0	4.0 ± 1.4
Testosterone (ng/mL)	3.1 ± 2.2	4.5 ± 3.2	3.3 ± 2.2	6.0 ± 8.0	5.1 ± 3.1	4.0 ± 0.9	0.4 ± 0.5
<i>Female</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	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/dL)	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
TSH (ng/mL)	1.7 ± 0.8	42.5 ± 7.1 **	1.9 ± 0.7	35.9 ± 7.5 **	2.7 ± 1.0	24.3 ± 8.8 **	1.7 ± 0.3
ACTH (pg/mL)	56.4 ± 33.3	62.2 ± 40.6	97.2 ± 40.2	48.5 ± 12.5	86.6 ± 48.3	162.6 ± 43.2 **	28.4 ± 10.9
FSH (mIU/mL)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
LH (mIU/mL)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Prolactin (ng/mL)	1.8 ± 1.5	10.3 ± 6.3 *	3.1 ± 4.2	8.9 ± 6.9 *	0.8 ± 0.4	1.4 ± 1.1	0.3 ± 0.2
Estradiol (pg/mL)	20.2 ± 4.9	18.5 ± 5.4	10.4 ± 0.8	22.7 ± 11.4	20.8 ± 9.2	22.1 ± 8.9	21.7 ± 6.9
Progesterone (ng/mL)	16.3 ± 9.0	11.8 ± 6.9	12.9 ± 4.7	23.7 ± 15.3	17.8 ± 14.4	7.4 ± 4.2	7.2 ± 5.2
Testosterone (ng/mL)	<0.03	<0.03	<0.03	0.03 ± 0.01	<0.03	1.71 ± 0.51	<0.03

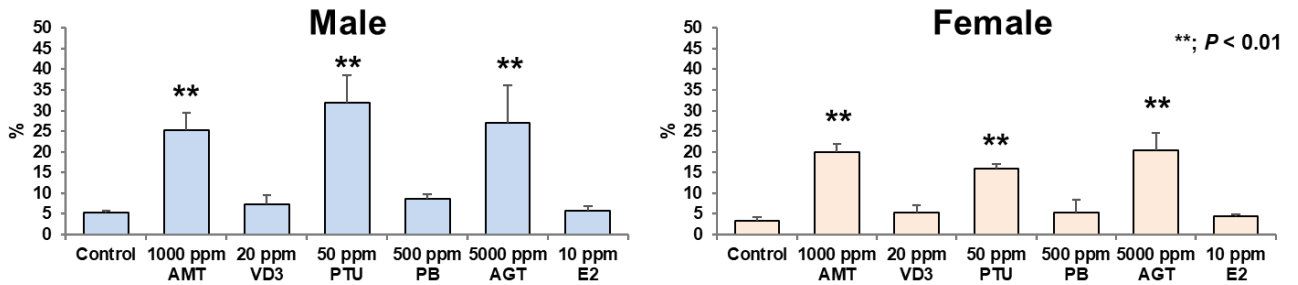
Values are mean ± S.D.

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

**Figure 1. Immunohistochemistry for TSH in the pituitary gland**



**Figure 2. Percentage of area of TSH-positive cells in the pituitary gland**



**Figure 3. Correlation between serum TSH levels and percentage of positive area**

