

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プロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和3年度 分担研究報告書

発がん性試験におけるAOP及びTGの実験データ支援

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

我々はこれまでに、DNA 損傷マーカーである  $\gamma$ -H2AX が、化学物質の膀胱発がん性早期検出に有用な指標となることを示してきた。本研究では、腎発がん物質検出における  $\gamma$ -H2AX の感度・特異度の検証を目的とする。令和3年度は、腎発がん物質5種を用いたラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における病理組織学的検索および  $\gamma$ -H2AX 形成の免疫組織化学的解析を行った。その結果、いずれの投与群でも、尿細管上皮細胞における  $\gamma$ -H2AX 形成が有意に増加することが明らかとなった。以上より、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色は腎発がん物質の早期検出に有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

近年、化学物質の安全性評価の効率化・迅速化及び実験動物福祉(3R)の観点から、長期がん原性試験をより短期間の試験で代替する手法の開発が求められている。我々はこれまでに、DNA 損傷マーカーである  $\gamma$ -H2AX が、化学物質の膀胱発がん性早期検出に有用な指標となり得ることを報告してきた。一方で、主要な毒性標的臓器である肝臓及び腎臓への応用を検討する必要があると考えられる。腎臓を対象として、これまでに16物質について検討した結果、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色は膀胱と同様、腎発がん物質の早期検出にも有用である可能性が示唆された。

そこで本研究では、腎発がん物質早期検出における  $\gamma$ -H2AX 形成の感度及び特異度を検証することを目的とする。具体的には、新規の被験物質を用いた28日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における  $\gamma$ -H2AX 形成の定量解析を行う。また、過去

に実施した28日間反復投与試験で得られた腎臓についても同様に検討し、 $\gamma$ -H2AX 形成を指標とした腎発がん物質検出法の妥当性を評価する。

### B. 研究方法

令和3年度の新規被験物質として、腎発がん物質5種: Hexachlorobutadiene (HCBd)、1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ)、Dimethylnitrosamine (DMN)、N-Ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) 及び Azoxymethane (AOM) を、6週齢の雄F344ラットに28日間混餌(HCBd・ADBAQ・DMN)または飲水(EHEN・AOM)投与した(各群5匹)。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量として、300 ppm HCBd, 10000 ppm ADBAQ, 500 ppm DMN, 1000 ppm EHEN 及び 40 ppm AOM に設定した。ただし EHEN 投与群については、顕著な体重増加抑制が認められたため、3週目以降投与濃度を 500 ppm に変更した。

投与期間終了時に解剖し、腎臓及び肝臓の重量を測定した。腎臓の病理組織学的検索を実施するとともに、免疫組織化学的手法による $\gamma$ -H2AX形成の定量解析を実施した。右腎横断面から、皮質及び髄質外層外帯の特定部位を顕微鏡下(x400)でそれぞれ4か所撮影し、尿細管上皮細胞の総数ならびに $\gamma$ -H2AX陽性細胞数を元に、陽性細胞率を計測した。

(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

対照群及び各被験物質投与群の、体重・摂餌量・飲水量・被験物質摂取量を表1に示す。投与期間終了時点で、HCB $\cdot$ DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM投与群において、対照群と比較して有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量はHCB $\cdot$ DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM投与群、飲水量はEHEN $\cdot$ AOM投与群で低値の傾向を示した。

各群における臓器重量を表2に示す。HCB $\cdot$ ADBAQ投与群では腎絶対・相対重量の有意な増加が、DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM投与群では腎絶対重量の低下及び相対重量の増加が認められた。また、ADBAQ投与群で肝絶対・相対重量の増加、HCB投与群で肝相対重量の増加、DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM投与群では肝絶対重量の低下が観察された。

腎臓の病理組織学的検索の結果を表3に示す。HCB $\cdot$ ADBAQ投与群では再生尿細管及び尿細管上皮への好酸性顆粒沈着増加等が、DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM投与群では間質における炎症性細胞浸潤、尿細管上皮細

胞の変性/壊死及び核の大型化等が種々の程度で認められた。

腎尿細管上皮細胞における $\gamma$ -H2AX形成を免疫組織化学的に検討した結果、対照群では陽性細胞は稀であったのに対し、被験物質を投与した各群ではいずれも $\gamma$ -H2AX陽性細胞の有意な増加が認められた(図1)。

### D. 考察

令和3年度は、新規被験物質として腎臓がん物質5種について、短期試験での最大耐量を用いたラット28日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における病理組織学的検索及び $\gamma$ -H2AX形成の免疫組織化学的解析を行った。その結果、被験物質投与群ではいずれも、腎臓における病理組織学的所見及び尿細管上皮細胞での $\gamma$ -H2AX形成が誘発されることが明らかとなった。これまでの検討結果を総合すると、腎臓がん物質14物質中13種が $\gamma$ -H2AX陽性率の増加を引き起こした一方、非腎臓がん物質7種ではいずれも対照群と同じレベルにとどまった。以上の結果から、 $\gamma$ -H2AX免疫染色によって化学物質の腎臓がん性を、短期間かつ高い感度及び特異度で検出可能であることが示唆された。

### E. 結論

今年度の新規被験物質(腎臓がん物質5種)はいずれも短期間の投与により、ラット腎尿細管上皮細胞における $\gamma$ -H2AX形成を有意に増加させることが明らかとなり、 $\gamma$ -H2AX免疫染色は腎臓がん物質の早期検出に有用である可能性が示唆された。

### F. 研究発表

#### F.1. 論文発表

1. Akane H, Toyoda T, Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *J Appl Toxicol.* (in press)
  2. Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of 2-(l-menthoxy)ethanol in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 2021; 34: 309-17.
  3. Matsushita K, Takasu T, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. In vivo mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of gpt delta rats. *Arch Toxicol.* 2021; 95: 3117-31.
  4. Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu K, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Homma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm.* 2021; 595: 120241.
- F.2. 学会発表
1. 豊田武士、小林琢磨、三好規之、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。オルト-トルイジンおよびオルト-アニシジン代謝物の28日間反復経口投与によるラット膀胱への影響。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022年1月)
  2. 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子。γ-H2AX免疫染色によるラット腎臓がん物質早期検出法の開発。第80回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2021年10月)
  3. 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。γ-H2AX免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性およびがん性短期評価手法。第48回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021年7月)
  4. 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。F344ラットを用いたナノサイズ酸化チタン(IV)の28日間反復経口投与毒性試験。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022年1月)
  5. 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子。ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022年1月)
  6. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。薬剤性腎障害の慢性化を予測するバイオマーカーとしてのCD44の有用性の検証。第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会、兵庫県、(2022年1月)
  7. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。急性腎障害後に発現するCD44は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する。第4回医薬品毒性機序研究会、Web開催、(2021年12月)
  8. 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、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。単環芳香族アミンの遺伝毒性に関わる代謝活性化機構。環境変異原ゲノム学会第50回記念大会、神奈川県、(2021年11月)
9. 松下幸平、高須伸二、石井雄二、豊田武士、山田貴宣、森川朋美、小川久美子。gpt deltaラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による1,3-dichloro-2-propanolの発がん機序の解明。環境変異原ゲノム学会第50回記念大会、神奈川県、(2021年11月)
  10. 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。ラット膀胱発がん物質早期検出における $\gamma$ -H2AX免疫染色の特異性。第80回日本癌学会学術総会、神奈川県、(2021年10月)
  11. 孫雨晨、齊藤公亮、牛木淳人、安部光洋、齋藤好信、柏田建、堀益靖、弦間昭彦、巽浩一郎、服部登、津島健司、荒川憲昭、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、佐藤元信、高松一彦、森和彦、西矢剛淑、泉高司、大野泰雄、齋藤嘉朗、花岡正幸。メタボローム解析を用いた薬剤性間質性肺炎のバイオマーカー探索。第65回日本薬学会関東支部大会、Web開催、(2021年9月)
  12. 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。単環芳香族アミン化合物の試験管内反応による二量体形成。がん予防学術大会2021、Web開催、(2021年9月)
  13. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発AKI to CKDモデルラットにおけるCD44の病態生理学的役割。第164回日本獣医学会学術集会、Web開催、(2021年9月)
  14. 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、曾根瑞季、小川久美子。肝発がん物質検出のためのバイオマーカーとしてのEpCAMおよびCD13の有用性検討。第48回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021年7月)
  15. 赤根弘敏、豊田武士、水田保子、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子。内分泌攪乱物質による血中ホルモン値変動と病理組織学的・免疫組織化学的評価。第48回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021年7月)
  16. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展におけるCD44の発現。第48回日本毒性学会学術年会、兵庫県、(2021年7月)
  17. 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子。ラットを用いたヘム鉄の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27回総会・学術大会、Web開催、(2021年6月)
  18. 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齋藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、齋藤嘉朗、平林容子、飯村康夫、本間正充、奥田晴宏、合田幸広。脱離エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析イメージングによるシクレソニドの1 $\mu$ mエアロゾル吸入後のラット肺におけるシクレソニドとその代謝物の空間的局在の可視化。日本薬剤学会第36年会、徳島県、(2021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

表 1. 各群における体重・摂餌量・飲水量・被験物質摂取量。

**Table 1.** Body weight and chemical intake data for male F344 rats

Treatment	Body weight (g)		Food consumption (g/rat/day)	Water intake (g/rat/day)	Chemical intake (mg/rat/day)
	Initial	Day 28			
Control	116.5 ± 3.4	225.2 ± 5.4	14.7	22.1	-
HCBD	116.7 ± 3.3	198.6 ± 8.8**	11.6	20.6	20.6
ADBAQ	116.7 ± 3.6	221.5 ± 5.8	13.7	21.9	742.5
DMN	116.4 ± 8.1	170.5 ± 12.1**	10.1	17.2	33.1
EHEN	116.7 ± 4.5	119.3 ± 28.4**	7.0	8.4	60.8
AOM	116.5 ± 4.0	171.6 ± 5.9**	11.8	14.0	3.8

\*\*;  $P < 0.01$  vs. Control by *t*-test.

HCBD, hexachlorobutadiene; ADBAQ, 1-amino-2,4-dibromoanthraquinone; DMN, dimethylnitrosamine; EHEN, *N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine; AOM, azoxymethane.

表 2. 各群における腎および肝重量。

**Table 2.** Liver and kidney weight data for male F344 rats

Treatment	Kidney weight		Liver weight	
	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	1.53 ± 0.04	0.68 ± 0.02	8.0 ± 0.28	3.55 ± 0.08
HCBD	1.66 ± 0.08*	0.84 ± 0.02**	7.6 ± 0.31	3.81 ± 0.15**
ADBAQ	1.69 ± 0.02**	0.76 ± 0.01**	10.0 ± 0.34**	4.51 ± 0.24**
DMN	1.30 ± 0.04**	0.76 ± 0.05**	6.3 ± 0.69**	3.67 ± 0.20
EHEN	1.03 ± 0.15**	0.88 ± 0.08**	3.8 ± 1.20**	3.18 ± 0.55
AOM	1.29 ± 0.03**	0.75 ± 0.02**	6.4 ± 0.17**	3.71 ± 0.19

\*, \*\*;  $P < 0.05$  and  $0.01$  vs. Control by *t*-test, respectively.

HCBD, hexachlorobutadiene; ADBAQ, 1-amino-2,4-dibromoanthraquinone; DMN, dimethylnitrosamine; EHEN, *N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine; AOM, azoxymethane.

表 3. 各群における腎臓の病理組織学的所見。

**Table 3.** Histopathological evaluation in the kidney of male F344 rats treated with renal carcinogens for 28 days

	Control	HCBD	ADBAQ	DMN	EHEN	AOM
<i>Findings</i>						
Regenerative tubule (±, +)	0	5** (5, 0)	5** (3, 2)	4* (4, 0)	1 (1, 0)	1 (1, 0)
Inflammation, interstitial (±)	0	2	2	5**	0	4*
Degeneration/necrosis (±)	0	5**	3	1	5**	4*
Eosinophilic granule (±)	0	5**	5**	0	0	0
Karyomegaly (±)	0	0	0	0	3	2

\* and \*\*: significantly different from control at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

± and +: slight and mild, respectively.

HCBD, hexachlorobutadiene; ADBAQ, 1-amino-2,4-dibromoanthraquinone; DMN, dimethylnitrosamine; EHEN, *N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine; AOM, azoxymethane.

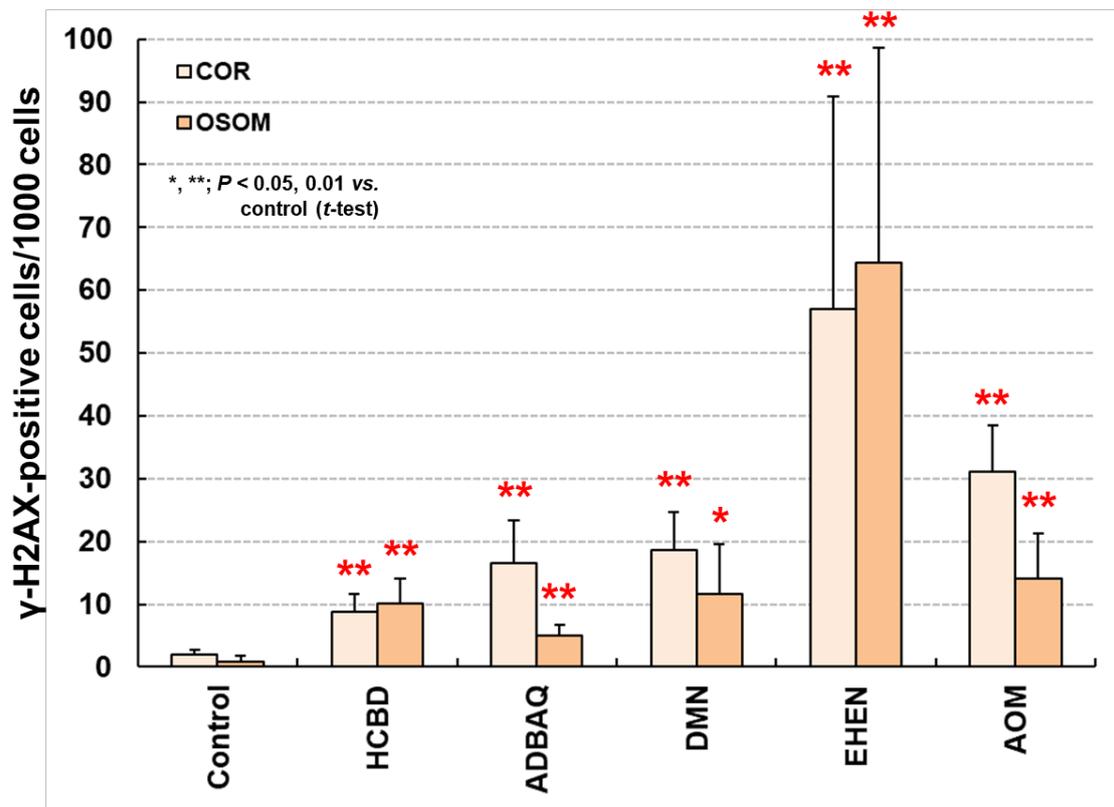


図1. 腎尿細管上皮細胞における  $\gamma$ -H2AX 陽性率。COR : 皮質、OSOM : 髓質外層外帯。