

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5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**

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5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  $\gamma$ -H2AX 形成の免疫組織化学的解析を行った。腎発がん物質のうち3種（1,2,3-TCP, BDCM, 8-MOP）は、尿細管上皮細胞における  $\gamma$ -H2AX 形成を有意に増加させた。このうち1,2,3-TCP および BDCM は、腎臓における病理組織学的所見の発生頻度を増加させなかったことから、 $\gamma$ -H2AX がより鋭敏な指標となり得ることが示唆された。以上の結果から、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色は腎発がん物質の早期検出手法として利用し得ると考えられた。

**A. 研究目的**

近年、化学物質の安全性評価の効率化・迅速化および実験動物福祉（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および腎臓への応用を検討する必要があると考えられる。腎臓を対象とした評価を種々の化学物質を用いて実施した結果、 $\gamma$ -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 形成の感度およ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5年度に検索する新規被験物質として、腎発がん物質5種：Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP), 1,2,3-Trichloropropane (1,2,3-TCP), Bromodichloromethane (BDCM), 8-Methoxypsoralen (8-MOP) および Hydroquinone (HQ)を、6週齢の雄F344ラットに28日間混餌投与した（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90 mg/kg TCEP、50 mg/kg 1,2,3-TCP、100 mg/kg BDCM、75 mg/kg 8-MOP および100 mg/kg HQに設定した。

投与期間終了時に解剖し、腎臓およ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。右腎横断面において皮質およ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陽性細胞をカウントすることで陽性細胞率を測定した。

（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

対照群と各被験物質投与群の、体重および摂餌量を表1に示す。投与期間終了時点で、1,2,3-TCPおよびBDCM投与群において有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量に各群間で明らかな差は認められなかった。

各群における臓器重量を表2に示す。1,2,3-TCP・8-MOP投与群では腎絶対/相対重量の増加、TCEP・BDCM投与群では腎相対重量の増加が、統計学的有意差をもって認められた。肝臓については、TCEP・1,2,3-TCP・8-MOP投与群で絶対/相対重量増加、BDCM・HQ投与群で相対重量の増加が観察された。

各群における腎臓の病理組織学的検索結果を表3に示す。8-MOP投与群において、再生尿細管および尿細管上皮細胞の変性壊死の発生頻度が、対照群と比較して有意に増加した。TCEP・BDCM・HQ投与群でもこれらの所見および硝子円柱が散発的に観察されたが、統計学的有意差はみられなかった。1,2,3-TCP投与群では、明らか

な腎病変は観察されなかった。

各群の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、1,2,3-TCP・BDCM・8-MOP投与群では皮質または髄質外層外帯における $\gamma$ -H2AX陽性率の有意な増加が認められた（図1）。一方、TCEP・HQ投与群では $\gamma$ -H2AX形成の誘導は認められなかった。

### D. 考察

令和5年度は、新規被験物質として腎発がん物質5種についてラット28日間反復経口投与試験を実施し、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、5種の腎発がん物質のうち3種が、腎尿細管上皮細胞での $\gamma$ -H2AX形成を有意に増加させることが明らかとなった。このうち1,2,3-TCPおよびBDCMでは、腎臓における病理組織学的所見の発生頻度の増加を伴わなかったことから、 $\gamma$ -H2AX免疫染色は化学物質の腎発がん性評価においてより鋭敏な指標となり得ることが示唆された。

### E. 健康危険情報

特になし

### F. 結論

これまでの検討結果を総合すると、腎発がん物質26種のうち、22物質（感度：84.6%）が $\gamma$ -H2AX陽性細胞の有意な増加を示した一方、非腎発がん物質は検索した9種のうち8物質（特異度：88.9%）が陰性であった。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ことが示唆された。

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

1. Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors. *J Appl Toxicol* (in press)
2. Sun Y, Saito K, Ushiki A, Abe M, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Takemoto K, Ishikawa R, Momiyama T, Matsuyama S, Arakawa N, Akane H, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Identification of kynurenine and quinolinic acid as promising serum biomarkers for drug-induced interstitial lung diseases. *Respir Res* 25, 31, 2024
3. Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Mucosal damage and  $\gamma$ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to *o*-toluidine and *o*-anisidine. *Arch Toxicol* 97, 3197-3207, 2023
4. Toyoda T, Sone M, Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of  $\gamma$ -H2AX. *J Toxicol Sci* 48, 323-332, 2023
5. Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Ogawa K. EpCAM and APN expression in combination with  $\gamma$ -H2AX as biomarkers for detecting hepatocarcinogens in rats. *Cancer*

*Sci* 114, 4763-4769, 2023

6. Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T, Ogawa K. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. *Part Fibre Toxicol* 20, 13, 2023
7. Cattley RC, Kromhout H, Sun M, Tokar EJ, Abdallah MA, Bauer AK, Broadwater KR, Campo L, Corsini E, Houck KA, Ichihara G, Matsumoto M, Morais S, Mráz J, Nomiyama T, Ryan K, Shen H, Toyoda T, Vähäkangas K, Yakubovskaya MG, Yu JJ, DeBono NL, de Conti A, Ghissassi FE, Madia F, Mattock H, Pasqual E, Suonio E, Wedekind R, Benbrahim-Tallaa L, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of anthracene, 2-bromopropane, butyl methacrylate, and dimethyl hydrogen phosphite. *Lancet Oncol* 24, 431-432, 2023

### G-2 学会発表

1. Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Uneyama M, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of renal carcinogens in rats by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2024.3.11 Salt Lake City)
2. 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、畝山瑞穂、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質の早期検出. 第40回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2024.1.24 東京)
3. 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子. 腎発がん物質の28日間反復経口投与はラット腎臓に $\gamma$ -H2AX形成を誘導する. 第82回日本癌学会学術総会 (2023.9.22 横浜)
4. 豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX を指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開

- 発. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21 横浜)
5. 岡本悠佑、長谷川千恵、赤根弘敏、豊田武士、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介. 医療用マイクロニードルアレイにおける皮膚透過性評価及び滅菌要否検証. 日本薬学会第 144 回年会 (2024.3 横浜)
  6. Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Uneyama M, Akane H, Toyoda T. Titanium dioxide with crystallite diameters of 6, 30, and 180 nm induced no toxicological effects after oral administration to rats for 90 days. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2024.3.14 Salt Lake City)
  7. Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Effective method for early detection of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2024.3.12 Salt Lake City)
  8. 水田保子、赤木純一、豊田武士、木村美恵、爲廣紀正、安達玲子、曹永晩、小川久美子. 経皮/経口暴露によるアレルギーマウスモデルにおけるナノ銀のアジュバント作用の検討. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024.1.24 東京)
  9. 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、畝山瑞穂、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. TSH 産生阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出における病理学的解析と血中ホルモン値の比較. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024.1.24 東京)
  10. 畝山瑞穂、豊田武士、赤木純一、赤根弘敏、水田保子、森川朋美、小川久美子. ラット肝発がん物質の早期検出における ALDH3A1 と  $\gamma$ -H2AX 免疫染色の有用性評価. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024.1.23 東京)
  11. 赤根弘敏、豊田武士、石井雄二、高須伸二、小川久美子. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の効率的な検出. 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023.9.22 横浜)
  12. 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対する MEK インヒビターの治療効果の検討. 第 81 回日本癌学会学術総会 (2023.9.21 横浜)
  13. 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、畝山瑞穂、豊田武士、小川久美子. 結晶子径 6nm の酸化チタンナノ粒子のラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.20 横浜)
  14. 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. 脱ヨウ素酵素阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.20 横浜)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1. 特許取得

該当なし

### H-2. 実用新案登録

該当なし

### H-3. その他

該当なし

表1. 腎発がん物質投与群における体重・摂餌量。

**Table 1.** Body weight and Food consumption data for male F344 rats

Treatment	Body weight (g)		Food consumption (g/rat/day)
	Initial	Day 28	
Control	148.0 ± 4.7	239.0 ± 6.5	12.2
TCEP	148.4 ± 4.8	239.3 ± 9.0	12.4
1,2,3-TCP	148.1 ± 5.7	224.8 ± 6.5**	12.5
BDCM	148.4 ± 8.3	222.1 ± 8.5**	12.6
8-MOP	148.3 ± 6.9	232.2 ± 8.9	12.2
HQ	148.0 ± 5.5	236.4 ± 15.5	11.9

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

表2. 腎発がん物質投与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	1.52 ± 0.052	0.64 ± 0.02	8.3 ± 0.18	3.5 ± 0.08
TCEP	1.60 ± 0.067	0.67 ± 0.01**	9.0 ± 0.44*	3.7 ± 0.07**
1,2,3-TCP	1.60 ± 0.038*	0.71 ± 0.01**	10.0 ± 0.60**	4.5 ± 0.14**
BDCM	1.49 ± 0.067	0.67 ± 0.01**	8.5 ± 0.58	3.8 ± 0.15**
8-MOP	1.67 ± 0.077**	0.72 ± 0.03**	11.2 ± 0.48**	4.8 ± 0.19**
HQ	1.52 ± 0.142	0.64 ± 0.02	8.9 ± 0.94	3.7 ± 0.15*

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

表3. 腎発がん物質投与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	90 mg/kg TCEP	50 mg/kg 1,2,3-TCP	100 mg/kg BDCM	75 mg/kg 8-MOP	100 mg/kg HQ
<i>Findings</i>						
Regenerative tubule (±, +, ++)	0	1 (0, 1, 0)	0	0	5** (0, 0, 5)	1 (1, 0, 0)
Degeneration/necrosis (±, +)	0	0	0	2 (2, 0)	5** (1, 4)	0
Hyaline cast (±)	0	0	0	1	0	0

\*\*;  $P < 0.01$  vs. Control by Fisher's exact probability test.

±, +, and ++: slight, mild, and moderate, respectively.

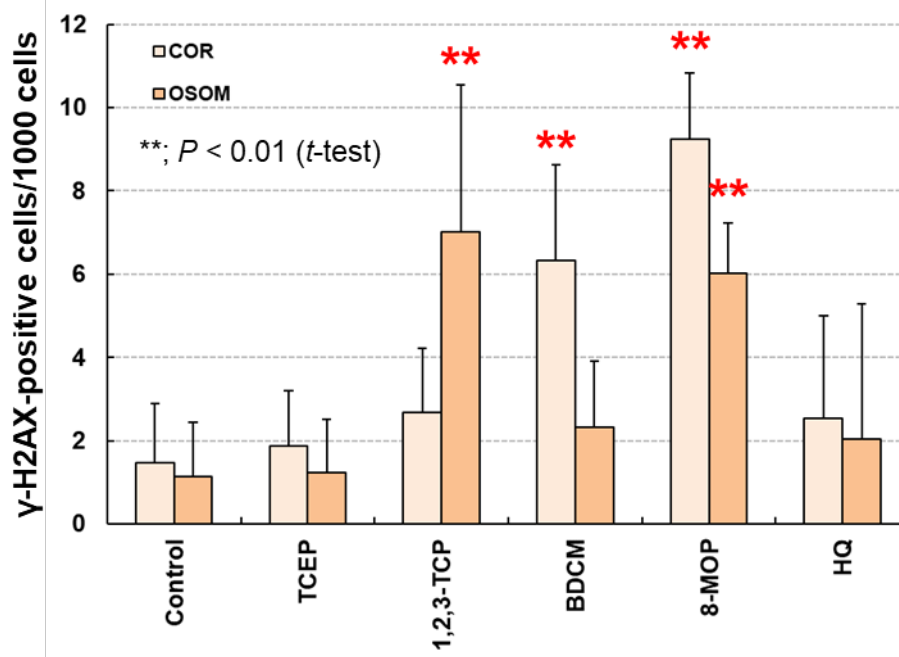


図1. 腎発がん物質投与群における  $\gamma$ -H2AX 陽性率。COR：皮質、OSOM：髄質外層外帯。