

国内外で開発されOECDで公定化されるNAMを活用した試験法の行政的な
受け入れに対応するための研究

令和6年度 分担研究報告書

発がん性試験におけるAOP、IATA及びTGの開発、及び実験データ支援

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 部長

研究要旨

本研究では、DNA 損傷マーカー（ γ -H2AX）の免疫組織化学的解析を用いた、腎発がん物質の早期検出手法の感度・特異度を検証することを目的とする。令和6年度は、本手法の特異度検証のため、腎臓を標的としない発がん物質7種および非発がん物質5種を28日間経口投与したラット腎臓サンプルを用いて、 γ -H2AX形成の免疫染色による定量解析を行った。その結果、検討した12物質はいずれも、ラット腎臓における γ -H2AX陽性率の増加を引き起こさないことが明らかとなり、本手法は高感度であるだけでなく、高い特異性を有することが示された。現在、腎凍結サンプルを用いたRNAシーケンスを実施し、 γ -H2AXと併用可能な新規バイオマーカーの探索を目指したデータ解析を行っている。

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（3Rs）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 γ -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。これまでに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、 γ -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 γ -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 γ -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、 γ -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6年度は、 γ -H2AX免疫染色による腎発がん物質早期検出法の特異度を検証するため、腎臓を標的としない発がん物質7種：5-Nitro-*o*-toluidine（PNOT）、3,3'-Dichlorobenzidine 二塩酸塩（DCB）、4-Aminoazobenzene 塩酸塩（AAB）、4,4'-Methylenedianiline（MDA）、4,4'-

Methylenebis(2-chloroaniline) (MOCA)、Chlorobenzene (CB) および Furan、ならびに非発がん物質 5 種: Anthranilic acid (o-AA)、Ethionamide (ETP)、2,6-Diaminotoluene (2,6-DAT)、6-Mercaptopurine 一水和物 (6-MP) および 5-Fluorouracil (5-FU) を 28 日間反復経口投与した雄ラット (開始時 6 週齢、F344 または SD 系) の腎臓を用いた解析を実施した。各被験物質の投与濃度には、報告されている短期試験における最大耐量を用いた。

腎臓の病理組織標本を用いた γ -H2AX 免疫染色を実施し、 γ -H2AX 陽性細胞の定量解析を行った。右腎横断面において皮質 (COR) および髄質外層外帯 (OSOM) の特定部位を顕微鏡下 ($\times 400$) 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 γ -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。

また、 γ -H2AX と併用可能な新規バイオマーカー探索のため、ラット腎凍結材料を用いた RNA シークエンス (RNA-Seq) 解析を実施した。対照群、腎発がん物質 3 種: Chlorothalonil (CTN)、Phenolphthalein (Phph) および Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP)、ならびに腎傷害性非発がん物質である Carboxin (CBX) を 28 日間経口投与したラットの腎凍結サンプル (各群 $n=3$ または 4) から Total RNA を抽出し、DNBSEQ による RNA-Seq 解析を行った。

(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

腎尿細管上皮細胞における γ -H2AX 形

成について、免疫組織化学的解析を行った結果、腎臓を標的としない発がん物質 7 種および非発がん物質 5 種はいずれも、 γ -H2AX 陽性率の増加を引き起こさないことが明らかとなった (図 1)。

現在、腎凍結サンプルを用いた RNA-Seq 解析について、 γ -H2AX と併用可能な新規バイオマーカーの探索を目指したデータ解析を実施中である。

D. 考察

これまでの検討において、ラットへの 28 日間反復経口投与後の腎尿細管上皮細胞における γ -H2AX 陽性率は、腎発がん物質 26 物質中 22 種で有意に増加し、高い感度 (84.6%) を示すことが明らかとなっている。令和 6 年度は本手法の特異度を検討するため、腎臓を標的としない発がん物質および非発がん物質、計 12 種を投与したラット腎臓を用いて、 γ -H2AX 形成の免疫組織化学的解析を行った。その結果、検討済みの 9 物質と合わせた計 21 物質のうち 20 種が陰性となり、高い特異度 (95.2%) を示すことが確認された。以上の結果から、 γ -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。本手法は、OECD テストガイドライン 407 (齧歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験) での実施が容易であることから、化学物質の安全性評価の効率化・迅速化に寄与すると考えられ、今後 OECD への提案について検討を進める予定である。

一方で、 γ -H2AX 免疫染色に偽陰性を示す腎発がん物質も認められていることから、これらを検出し得る新規バイオマーカーの探索を目的とした RNA-Seq 解析を現在進めている。 γ -H2AX 陽性率において偽陰性を示した腎発がん物質として CTN・TCEP、増加の程度が比較的低い腎発がん

物質として Phph、および非発がん性の腎傷害物質である CBX の 4 物質について腎臓における遺伝子発現動態を解析し、 γ -H2AX と併用・補完が可能なバイオマーカー候補の確立を目指す。

E. 結論

ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験において、腎臓を用いた γ -H2AX 免疫染色を実施することで、腎発がん物質を高い感度・特異度で検出し得ることが示された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparisons of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses with blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with promoters of thyroid hormone metabolism. *Toxicol Pathol* (in press)
2. Yoshida A, Hashimoto Y, Akane H, Matsuyama S, Toyoda T, Ogawa K, Saito Y, Kikura-Hanajiri R, Arakawa N. Analysis of stratifin expression and proteome variation in a rat model of acute lung injury. *J Proteome Res* 24, 1941-1955, 2025
3. Takimoto N, Ishii Y, Mitsumoto T, Takasu S, Namiki M, Toyoda T, Shibutani M, Ogawa K. Involvement of nuclear atrophy of binucleated hepatocytes in the large micronucleus formation induced by rat hepatocarcinogen acetamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 496, 117243, 2025
4. Uneyama M, Toyoda T, Doi Y, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week

subchronic toxicity study of linalool oxide in Crl:CD(SD) rats. *J Toxicol Pathol* 37, 151-161, 2024

F.2. 学会発表

1. Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Uneyama M, Morikawa T, Ogawa K. Short-term evaluation of mucosal toxicity and carcinogenicity of aromatic amines in the rat urinary bladder by histopathology and γ -H2AX immunostaining. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3.17 Orlando)
2. 豊田武士、赤根弘敏、小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を指標としたラット腎発がん物質の早期検出. 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024.9.21 福岡)
3. 豊田武士、赤根弘敏、高須伸二、石井雄二、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. ラット 28 日間反復投与毒性試験における病理組織学的/免疫組織化学的解析による抗甲状腺物質の早期検出および機序推定. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.4 福岡)
4. 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子. ラットへの経口摂取によりパイエル板に取り込まれた二酸化チタンナノ粒子の毒性影響の検討. 日本薬学会第 145 年会 (2025.3.29 福岡)
5. 吉田彩夏、橋本由弥、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、齋藤嘉朗、花尻(木倉)瑠理、荒川憲昭. オレイン酸誘発急性肺損傷ラットモデルにおけるストラテフィン発現とプロテオームの変動. 日本薬学会第 145 年会 (2025.3.27 福岡)
6. 畝山瑞穂、チェンバーズ ジェームズ、赤根弘敏、豊田武士、内田和幸. IL-1 レセ

- プターアンタゴニスト KO マウスに生じた滑膜肉腫の 1 例. 第 12 回日本獣医病理学専門家協会学術集会 (2025.3.28 盛岡)
7. Ogawa K, Akane H, Takasu S, Gi M, Fujioka M, Ishii Y, Uneyama M, Morikawa T, Wanibuchi H, Tsuda H, Toyoda T. Comparison of the intra-tracheal intrapulmonary spraying (TIPS) and the systemic inhalation methods in rats for the classification of hazardous chemicals based on the GHS acute inhalation toxicity. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3.19 Orlando)
 8. Yamagami Y, Ishii Y, Nakamura K, Takasu S, Toyoda T, Murakami T, Shibutani M, Ogawa K: Investigation of the involvement of chromothripsis in the acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rats. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3.18 Orlando)
 9. Ishii Y, Nakamura K, Yamagami Y, Takasu S, Nohmi T, Toyoda T, Shibutani M, Ogawa K. Investigations of the mechanism underlying acetamide-induced hepatocarcinogenesis in rat. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3.18 Orlando)
 10. Akane H, Toyoda T, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Aoyama H, Ogawa K. Effective method for early detection and mechanism estimation of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3.18 Orlando)
 11. Akagi J, Mizuta Y, Uneyama M, Akane H, Matsushita K, Toyoda T, Ogawa K. Study of the biological effects of titanium dioxide with three different crystallite sizes following repeated oral administration in F344 rats. 64th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2025.3.18 Orlando)
 12. 高須伸二、赤根弘敏、石井雄二、豊田武士、津田洋幸、小川久美子. 経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法による急性毒性試験における投与液量および投与濃度の影響. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2025.1.31 三島)
 13. 赤根弘敏、高須伸二、魏民、藤岡正喜、豊田武士、石井雄二、畝山瑞穂、森川朋美、津田洋幸、小川久美子. 吸入による毒劇物の判定における経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 法の有用性の検討. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2025.1.31 三島)
 14. 畝山瑞穂、豊田武士、赤木純一、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 発がん機序に基づく免疫染色を用いたラット肝発がん物質の早期検出法の検討. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2025.1.31 三島)
 15. 石井雄二、相馬明玲、山上洋平、笠松建吾、高須伸二、豊田武士、小川久美子. 低分子アミド化合物によるラット肝細胞質内封入体形成の検討. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2025.1.30 三島)
 16. 山上洋平、石井雄二、高須伸二、相馬明玲、笠松建吾、豊田武士、村上智亮、小川久美子. アセトアミド誘発の大型小核による chromothripsis の発生機構. 第 41 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2025.1.30 三島)
 17. 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子. F344 ラットへの反復経口投与によりパイエル板に沈着した二酸化チタン粒子による生体影響の検討. 第 41 回日本毒

- 性病理学会総会及び学術集会（2025.1.30 三島）
18. 高須伸二、石井雄二、相馬明玲、笠松建吾、山上洋平、豊田武士、小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた 6-methoxyquinoline の *in vivo* 変異原性の評価. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会（2024.12.8 岡山）
 19. 山上洋平、石井雄二、笠松建吾、高須伸二、相馬明玲、豊田武士、村上智亮、小川久美子. ラット初代肝細胞を用いた acetamide が誘発する大型小核の形成機序に関する研究. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会（2024.12.7 岡山）
 20. 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子. ラットを用いた二酸化チタンナノ粒子の反復経口曝露による生体影響の検討. 第 47 回日本分子生物学会年会（2024.11.29 福岡）
 21. 吉田彩夏、橋本由弥、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、齋藤嘉朗、花尻(木倉)瑠理、荒川憲昭. 急性肺損傷ラットモデルによる新規びまん性肺胞傷害マーカー-SFN の発現機序解析. 第 10 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（2024.9.21 草津）
 22. 赤根弘敏、高須伸二、石井雄二、小川久美子、豊田武士. 病理組織学的及び免疫組織化学的解析を用いた抗甲状腺物質の早期検出. 第 83 回日本癌学会学術総会（2024.9.21 福岡）
 23. 久下恒明、杜婉瑩、豊田武士、大本安一、安川佳美、大津洋、吉田寛、竹島秀幸、牛島俊和、野村幸世. 胃癌切除後も門脈血流を介した IL-6 の刺激により肝で TFF3 が高発現するメカニズム. 第 83 回日本癌学会学術総会（2024.9.20 福岡）
 24. 赤木純一、水田保子、畝山瑞穂、赤根弘敏、松下幸平、豊田武士、小川久美子. さまざまな結晶子径の二酸化チタン粒子のラットへの 90 日間反復経口投与による生体影響と蓄積性の検討. 第 37 回発癌病理研究会（2024.8.22 米子）
 25. 赤根弘敏、高須伸二、魏民、藤岡正喜、豊田武士、石井雄二、畝山瑞穂、森川朋美、津田洋幸、小川久美子. ラットを用いた化学物質の吸入による毒劇物の判定における経気管肺内噴霧投与（TIPS）法と全身吸入暴露法の比較. 第 51 回日本毒性学会学術年会（2024.7.5 福岡）
 26. 畝山瑞穂、豊田武士、赤木純一、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. γ -H2AX と幹細胞マーカーの免疫染色を用いたラット肝発がん物質早期検出法の検討. 第 51 回日本毒性学会学術年会（2024.7.3 福岡）
 27. 吉田彩夏、橋本由弥、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子、齋藤嘉朗、花尻(木倉)瑠理、荒川憲昭. 急性肺損傷ラットモデルを用いた新規間質性肺炎バイオマーカーの発現機序解析. 日本プロテオーム学会 2024（2024.6.28 青森）
 28. 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、畝山瑞穂、小川久美子. ラットを用いた L-ラムノースの 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 30 回総会・学術大会（2024.5.24 東京）
- 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

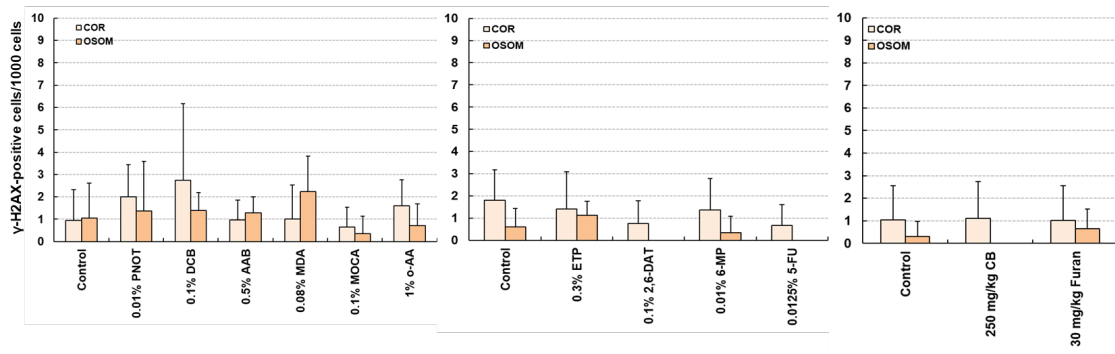


図 1. 12 種の非腎発がん物質投与群における γ -H2AX 陽性率。COR：皮質、OSOM：髄質外層外帯。