

令和7年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: 染色体不安定性を指標とする発がん性の定量的評価法の検討

研究分担者：石井雄二

所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部

研究要旨

近年、小核はchromothripsisを介した発がんとの関連が示唆されており、染色体不安定性の指標として注目されている。本研究では、病理組織学的手法による小核検出法（HMN assay）の肝発がん性評価法としての有用性を検討するとともに、新規小核マーカーの探索を行った。雄性F344ラットに遺伝毒性肝発がん物質である2,4-dinitrotoluene（2,4-DNT）及び*p*-dimethylaminoazobenzene（DAB）、ならびに非遺伝毒性肝発がん物質であるclofibrate（CFB）を28日間反復経口投与し、肝臓小核試験及びHMN assayを実施した。その結果、2,4-DNT及びDAB投与群では両試験で小核含有肝細胞（MNHEP）頻度の有意な増加が認められた一方、CFB投与群では肝臓小核試験のみで増加が認められた。しかしながら、肝臓小核試験において分裂細胞数の増加が認められなかったことは、前処理過程における細胞破壊とそれに伴うアーティファクトが生じていることを示唆しており、肝臓小核試験の結果については再現性の確認が必要と考えられた。さらに、新規小核マーカー候補としてcGAS及びPolqを検討した結果、Polqは一部の細胞で陽性を示したものの、小核マーカーとしての有用性は限定的であった。以上より、HMN assayは遺伝毒性肝発がん物質の検出に有用であることが示されたが、一部の非遺伝毒性肝発がん物質には適用困難である可能性が示唆され、今後さらなる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）における優先評価化学物質のリスク評価（一次）では、遺伝毒性試験の情報が存在するにもかかわらず、発がん性試験結果が得られていない優先評価化学物質については、発がん性の定量的評価を行うことができない。そのため、優先評価化学物質に指定された閾値なし発がん性の懸念を有する物質が評価Ⅱ段階に停滞しないよう、多数の動物、長期間、及び多大な費用を要する発がん性試験に代わる、新たな発がん性定量的評価手法の開発と確立が求められている。

染色体不安定性や細胞分裂異常の結果生じる小核は、化学物質の安全性評価におい

て古くから染色体異常の指標として用いられてきたが、小核そのものの意義や、小核を有する細胞に及ぼす影響については十分に理解されていなかった。しかし近年、chromothripsisと呼ばれる現象が報告され、小核そのものが発がんの原因になりうるということが明らかになってきた¹⁻³⁾。Chromothripsisは、小核の核膜崩壊に伴う染色体粉砕と再構成によって生じる劇的な遺伝子変異であり、一度に複数のがん関連遺伝子の発現変化を引き起こすと考えられている。さらに、小核の発がんへの関与を裏付けるように、ラット肝臓小核試験の結果が遺伝毒性の有無にかかわらず肝発がん性と高い相関を示すことが報告されており⁴⁾、化学発がんの根底には染色体不安定性が関与している可

能性が示唆されている。このような背景から、本研究では、染色体不安定性を指標とした発がん性の定量的評価法として、病理組織学的手法による小核検出法 (HMN assay) を用いた肝発がん性評価を提案する。

HMN assayは、令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「化審法における発がん性定量評価を見据えた新たな遺伝毒性評価技術構築のための基盤研究」において構築した新たな小核検出法である。本法は、抗 γ -H2AX抗体を用いた免疫組織化学染色 (IHC) により陽性を示した小核を計数するもので、ラットを用いた28日間反復投与毒性試験で得られたパラフィン切片を用いて実施する。これまでに種々の小核誘発物質を用いて検討した結果、従来の肝臓小核試験と比較して、前処理が簡便であること、小核の判定が容易であること、対照群における小核含有肝細胞 (micronucleated hepatocyte; MNHEP) 頻度の再現性が高いこと、幅広い用量範囲で用量相関性が認められる等の利点を確認されている。また、本法は肝臓以外の臓器への応用や、過去に実施された毒性試験のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 試料を用いた評価への応用も期待される。一方、抗 γ -H2AX抗体を用いたIHCでは、小核以外にもDNA損傷細胞、アポトーシス細胞及び有糸分裂細胞などが陽性を呈するため、小核の計数には形態学的判別が必要となる。また、将来的な画像解析システムによる自動化においても、これら陽性像が障害となる可能性がある。

本研究では、HMN assayの肝発がん性評価法としての有用性評価に加え、より特異性の高い新規小核マーカーの探索を実施した。令和7年度は、遺伝毒性肝発がん物質2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), *p*-dimethylnitroazobenzene (DAB) と、非遺伝毒性肝発がん物質clofibrate (CFB) について、HMN assayによる評価を行った。さらに、新規小核マーカー候補としてcGAS及びPolqタンパク質について、その有用性を検討した。

B. 研究方法

B-1. HMN assayの有用性評価

B-1-1. 材料および試薬

2,4-DNT (>99.0%), DAB (>98.0%) 及びCFB (>98.0%) は東京化成工業 (東京) から購入した。

B-1-2. 動物実験

雄性5週令のF344ラットを日本エスエルシー株式会社より購入し、CRF-1粉末基礎飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) と水道水で飼育した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物にて行った。室内の環境は温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 換気回数18回/時 (オールフレッシュ), 12時間蛍光灯照明/12時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに5匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い、週2回交換を行った。また、飼料及び水道水は試験期間中、自由に摂取させた。一週間の馴化期間の後、ラット20匹を各群5匹に配し、対照群と2,4-DNT, DNB及びCFB投与群の計4群を設けた。2,4-DNTは100 mg/kg体重/日, DNBは100 mg/kg体重/日, CFBは400 mg/kg体重/日の用量で28日間強制経口投与した。対照群には溶媒として用いたコーン油を投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週1回、一般状態観察を連日実施した。最終投与の翌日にイソフルラン麻酔下にて腹部大動脈より放血し、肝臓を採取し、重量測定後、一部を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製後、病理組織学的検索又はHMN assayに供した。

B-1-3. 肝臓小核試験

10%中性緩衝ホルマリン液で固定した肝組織を用いた。2~3 mm大にカットした肝組織10個を12N水酸化カリウム溶液に入れ、室温で16時間インキュベーションし、洗浄

後、水でホモジナイズした。遠心分離後、10%中性緩衝ホルマリンで洗浄し、固定した。細胞懸濁液をSYBR Goldで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。2000個の肝細胞（HEPs）をカウントし、そのうちMNHEPsの割合を算出した。

B-1-4. HMN assay

10%中性緩衝ホルマリン液で固定後にパラフィン包埋した肝組織標本を薄切した組織切片を使用した。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンした後、クエン酸緩衝液（関東化学、東京）を用いたオートクレーブ処理により抗原を不活化した。3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、1次抗体として抗 γ -H2AXマウスモノクローナル抗体（Cell Signaling Technology, 米国）を用い、4°Cで一晩インキュベートした。Phosphate-buffered salineにて洗浄後、2次抗体としてヒストファイン シンプルステインマウス一次抗体用（ニチレイバイオサイエンス）を用いて30分間インキュベートした。発色にはdiaminobenzidineを用いた。

小核形成頻度の計測にはBX51システム生物顕微鏡（オリンパス、東京）を用い、肝臓の中葉のMNHEPをカウントした。さらに、Aperio AT2（Leica Biosystems, ドイツ）を用いてバーチャルスライドの作成を行い、画像解析ソフトウェアHALO（indicalabs, 米国）にて中葉の総核数を算出した。MNHEPを総核数で除することでMNHEPの割合を算出した。

B-1-5. 統計学的解析

肝臓小核試験の統計学的解析には、Kastenbaun and Bowman's tableによる条件付き二項検定を用いた。最終体重、臓器重量およびHLMN assayの統計学的解析には、Bartlett検定により分散の均一性を検定し、分散が均一であった場合はDunnnett検定を用いた。分散が均一でなかった場合はSteel検定を用いた。

B-2. 新たな小核マーカーの検索

IHCには、N-nitrosodipropylamineを20 mg/kg体重/日の用量で、28日間反復投与したラット肝臓の10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。キシレン、無水エタノールにて脱パラフィンした後、クエン酸緩衝液（関東化学、東京）を用いたオートクレーブ処理により抗原を不活化した。3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、cGAS及びPolqの染色には正常ウサギ血清（ニチレイバイオサイエンス、東京）、その他の染色には正常ヤギ血清（ニチレイバイオサイエンス）を用いてブロッキングを行った。1次抗体として、Invitrogen社製（米国）抗cGAS及び抗POLQラビットポリクローナル抗体を用い、4°Cで一晩インキュベートした。Phosphate-buffered salineにて洗浄後、2次抗体にはヒストファイン ウサギ一次抗体用（ニチレイバイオサイエンス）を用いて30分間インキュベートした。発色にはdiaminobenzidineを用いた。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

C-1. HMN assayの有用性評価

試験期間中の体重の推移及び摂餌量の推移をFigure 1に示す。いずれの投与群においても、投与2週目以降に体重増加抑制が認められた。2,4-DNT投与群では摂餌量の減少が見られたが、その他の群では明らかな

変化は認められなかった。最終体重はいずれの投与群においても対照群と比較して有意な低値を示した (Table 1)。一方、肝実重量は全ての投与群で増加傾向を示し、肝比重量は有意に増加した。病理組織学的検索の結果、2,4-DNT投与群ではオーバルセル過形成、単細胞壊死の増加及び空胞変性が認められ、CFB投与群ではびまん性の肝細胞肥大及び顆粒状変性が認められた。一方、DAB投与群では明らかな変化は認められなかった (Table 2)。

肝臓小核試験では、いずれの投与群においても対照群と比較してMNHEP頻度の有意な上昇が認められたが (Fig. 2A)、分裂細胞頻度に変化は認められなかった (Fig. 2C)。一方、HMN assayでは、2,4-DNT投与群およびDAB投与群においてMNHEP頻度の有意な上昇が認められたが、CFB投与群では変化は認められなかった (Fig. 2B)。また、分裂細胞頻度は2,4-DNT投与群及びDAB投与群において有意に上昇した (Fig. 2D)。

C-2. 新たな小核マーカーの検索

抗cGAS抗体を用いたIHCの結果、陽性を示す小核は認められなかった。一方、抗POLQ抗体を用いたIHCでは、小核様の陽性構造物を有する肝細胞が散見された (Fig. 3A)。さらに、蛍光免疫染色による γ -H2AXとPolqの二重染色の結果、一部の γ -H2AX陽性小核においてPolq陽性像が認められたが、Polq陰性の γ -H2AX陽性小核も認められた (Fig. 3B)。

D. 考察

D-1. HMN assayの有用性評価

遺伝毒性肝発がん物質である2,4-DNT及びDAB、ならびに非遺伝毒性肝発がん物質であるCFBを用いて、HMN assayの有用性について検討した。その結果、2,4-DNT及びDAB投与群では、肝臓小核試験及びHMN assayのいずれにおいてもMNHEP頻度の有意な増加が認められ、小核誘発物質と

して検出可能であった。一方、CFB投与群では、肝臓小核試験で有意な増加が認められたのに対し、HMN assayでは明らかな変化は認められなかった。前処理を必要としないHMN assayに対し、肝臓小核試験ではアルカリ処理後にホモジナイズを行うことから、組織傷害を伴う試料では細胞破壊が生じやすく、アーティファクトが生じる可能性がある。実際に、2,4-DNT及びDAB投与群では、HMN assayにおいて分裂細胞数の増加が認められた一方、肝臓小核試験では同様の変化は認められず、分裂細胞が前処理過程で破壊されている可能性が考えられた。また、HMN assayではIHCを用いて γ -H2AX陽性の小核を検出するのに対し、肝臓小核試験では核染色のみを用いて小核を検出することから、アーティファクトによる小核の誤検出が生じやすい。このため、肝臓小核試験については再解析を実施し、本結果の再現性について検討する予定である。

HMN assayによる肝発がん性評価の可能性について、本結果は、2,4-DNT及びDABの様な遺伝毒性肝発がん物質の検出が可能であるのに対し、CFBの様な一部の非遺伝毒性肝発がん物質を検出できない可能性を示すものであった。一方、過去に実施した検討では、thioacetamideやmethapyrileneといった非遺伝毒性肝発がん物質の検出が可能であったことを考慮すると、今後はさらに多様な非遺伝毒性肝発がん物質を用いた検討を行い、本法の適用範囲と限界を明らかにする必要があると考えられた。

D-2. 新たな小核マーカーの検索

抗POLQ抗体を用いたIHCの結果、一部の小核は陽性を呈し、小核で生じた染色体粉砕に応答してPolqが集積することが示唆された。しかしながら、 γ -H2AXに陽性にも関わらず、Polqに陰性の小核も多数認められたことから、小核マーカーとしての有用性は低いと考えられた。

E. 結論

本研究により，HMN assayは2,4-DNT及びDABのような遺伝毒性肝発がん物質を検出可能であり，肝発がん性評価法として有用であることが示された．一方，CFBでは明らかな変化が認められず，一部の非遺伝毒性肝発がん物質は検出できない可能性が示唆された．また，HMN assayは前処理に伴う細胞破壊やアーティファクトの影響を受けにくく，従来の肝臓小核試験を補完し得る手法と考えられる．さらに，Polqは一部の小核で発現が認められたものの， γ -H2AX陽性小核との一致性に乏しく，小核マーカーとしての有用性は限定的であると考えられた．

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Mitsumoto T., Ishii Y., Takimoto N., Takasu S., Namiki M., Toyoda T., Ogawa K. Evaluation of 2-isopropyl-N-2,3-trimethylbutyramide by a comprehensive toxicity study using gpt delta rats. Toxicol. Appl. Pharm. 507, 117686 (2026)
2. 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. Pharm. 496, 117243 (2025).

G.2 学会発表

1. 石井雄二，瀧本憲史，山上洋平，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，渋谷 淳，小川久美子：ラットを用いたカルバミン酸メチルのin vivo遺伝毒性評価．日本食品

化学学会第31回総会・学術大会，滋賀（2025.6）

2. 山上洋平，石井雄二，中村賢志，原島洋文，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，村上智亮，小川久美子：アセトアミド誘発ラット肝腫瘍で見られた染色体外環状DNAの特徴とクロモスリプシスの関与．第52回日本毒性学会学術年会，沖縄（2025.7）
3. 石井雄二：クロモスリプシスによるラット肝発がん機序の解明．がん予防学術大会2025，名古屋（2025.9）
4. 相馬明玲，石井雄二，山上洋平，高須伸二，豊田武士，小川久美子：アセトアミドの大型小核形成に関わる構造的特徴の検討．第52回日本毒性学会学術年会，沖縄（2025.7）
5. 山上洋平，石井雄二，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，村上智亮，小川久美子：アセトアミド誘発大型小核によるクロモスリプシス様染色体再構成と肝発がんへの寄与．第54回日本環境変異原ゲノム学会，静岡（2025.11）
6. 山上洋平，石井雄二，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，村上智亮，小川久美子：アセトアミドのラット肝発がんに寄与する肝細胞質内封入体の形成機構．第42回日本毒性病理学会，名古屋（2026.1）
7. 石井雄二，山上洋平，高須伸二，相馬明玲，豊田武士，小川久美子：Acetamideのラット肝発がんに寄与する大型小核の形成機序．日本薬学会第146年会，大阪（2026.3）

H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む．）

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

参考文献

- 1) Zhang CZ., Spektor A., Cornils H., Francis JM., Jackson EK., Liu S., Meyerson M., Pellman D. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. *Nature* 2015, 522, 179-184, DOI:10.1038/nature14493.
- 2) Stephens PJ., Greenman CD., Fu B., Yang F., Bignell GR., Mudie LJ., et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development.

Cell 2011, 144, 27-40, doi: 10.1016/j.cell.2010.11.055.

- 3) Cortes-Ciriano I., Lee JJ., Xi R., Jain D., Jung YL., Yang L., et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nat. Genet.* 2020, 52, 331-341, doi: 10.1038/s41588-019-0576-7.
- 4) Hamada S., Shigano M., Wako Y., Kawasako K., Satomoto K., Mitsumoto T., Fukuda T., Ohyama W., Morita T., Hayashi M. Detection of hepatocarcinogens by combination of liver micronucleus assay and histopathological examination in 2-week or 4-week repeated dose studies. *Genes Environ.* 2022, 44, doi: 10.1186/s41021-021-00222-1.

Table 1. Body and organ weights data for F344 rats treated with test compounds for 4 weeks

	Control	2,4-DNT	DAB	CFB
No. of animals	5	5	5	5
Body weight	234.0 ± 13.3 ^a	190.1 ± 8.9**	204.2 ± 12.1**	206.1 ± 11.5**
Absolut liver weight (g)	7.02 ± 0.67	7.70 ± 0.48	7.36 ± 0.72	13.59 ± 0.80**
Relative liver weight (g/100gBW)	2.99 ± 0.12	4.05 ± 0.09**	3.60 ± 0.20**	6.60 ± 0.10**

^a Mean ± SD*, **Significantly different from the control group at $p < 0.05$, 0.01 , respectively.

Table 2. Histopathological findings in rat liver treated with materials for 4 weeks.

Findings(±, +, ++, +++)	Control	2,4-DNT	DAB	CFB
No. of animals	5	5	5	5
Hypertrophy, hepatocyte, diffuse	0	0	0	5(0/3/2/0)
Oval cell hyperplasia	0	5(2/3/0/0)	0	0
Apoptosis	0	5(0/3/2/0)	0	0
Vacuolar, hepatocyte, diffuse	0	5(0/0/5/0)	0	0
Granular degeneration, hepatocyte, diffuse	0	0	0	5(0/5/0/0)

Grade: ±, minimal; +, slight; ++, moderate; +++, marked

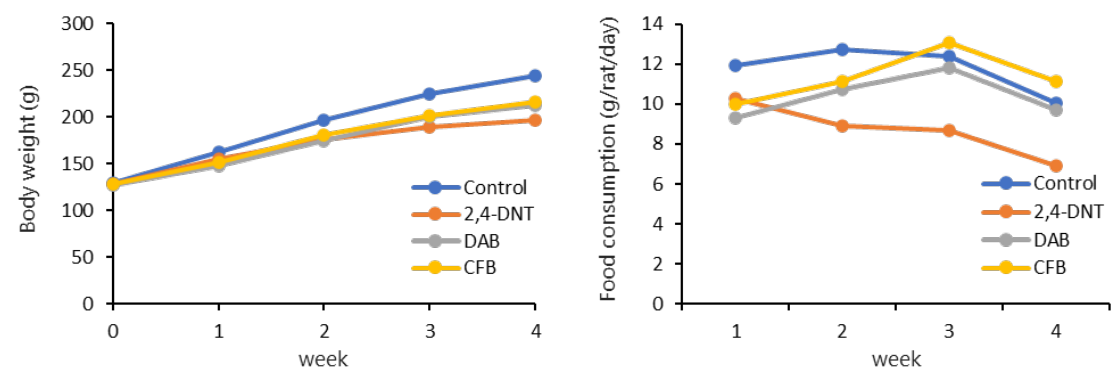


Figure 1. Body weight and food consumption for F344 rats treated with test compounds for 4 weeks

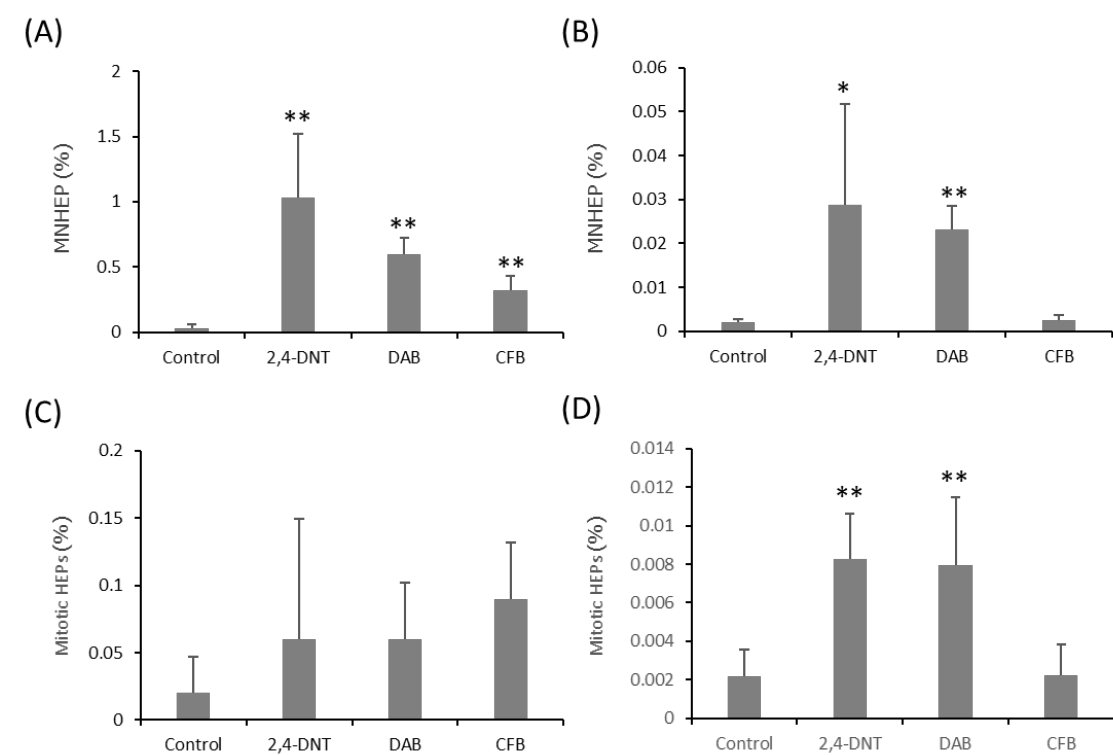


Figure 2. Comparison of the liver micronucleus assay and HMN assay in the livers of F344 rats treated with test compounds for 4 weeks. Frequencies of MNHEPs in the liver micronucleus assay (A) and HMN assay (B), and frequencies of mitotic HEPs in the liver micronucleus assay (C) and HMN assay (D).

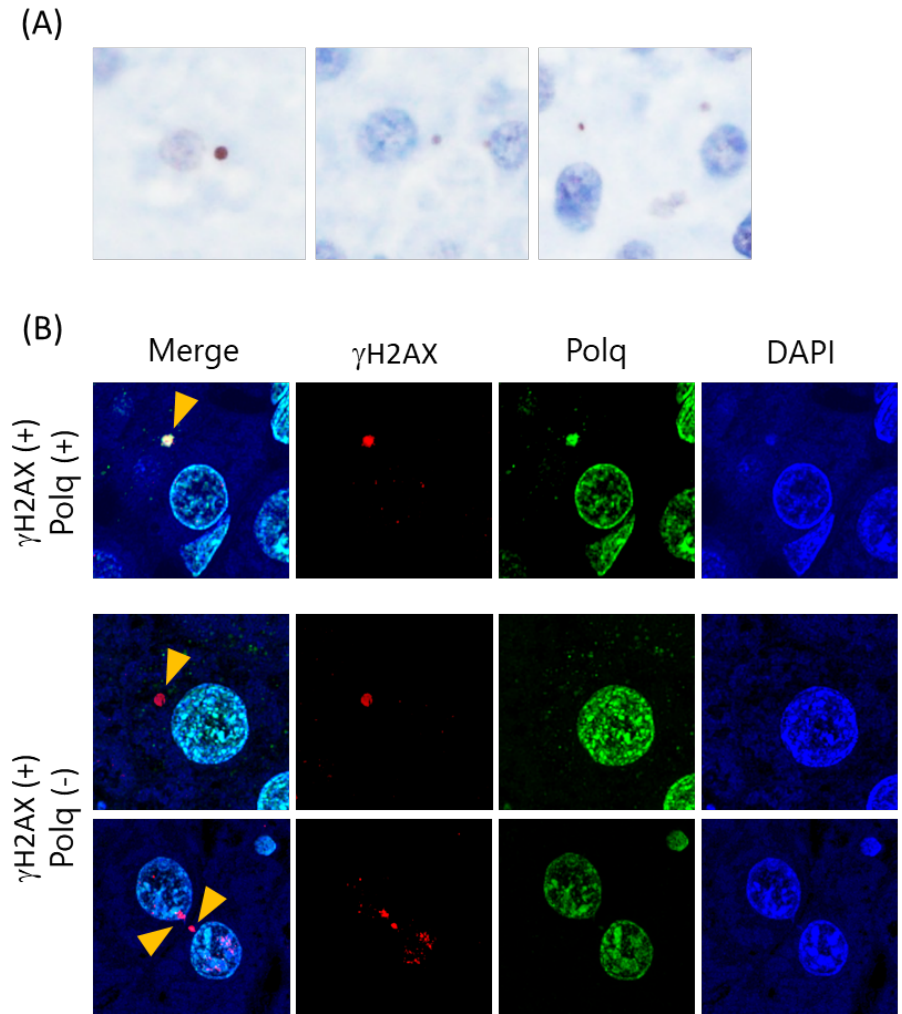


Figure 3. Representative images of immunohistochemical and immunofluorescence staining of micronucleus in the liver of F344 rats treated with N-nitrosodipropylamine at 20 mg/kg/day for 4 weeks. Representative images of Polq-positive micronuclei (A), and representative images of immunofluorescence staining for g-H2AX and Polq (B).