

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）

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7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開発を目的とする。令和7年度は、本手法による腎発がん性の評価と腎臓における病理組織学的所見の関係を検証するため、これまでに評価した47物質（腎発がん物質26種を含む）を投与したラット腎臓の病理組織学的解析を実施した。その結果、ラット28日間反復経口投与試験における腎臓の病理所見として尿細管上皮細胞の変性/壊死またはカリオメガリーが認められた場合、 γ -H2AX 陽性細胞の増加を伴うことが多く、腎発がん性の評価に有用な指標となり得ることが示唆された。一方で、 γ -H2AX 形成の有意な増加を示しながら病理組織学的所見の発生頻度増加を伴わない腎発がん物質も5種類認められたことから、 γ -H2AX 免疫染色が最も高感度な指標であることも併せて確認された。以上の結果から、ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験において、腎臓の病理組織学的解析に加えて 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。

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 損傷マーカーとして知られる γ -H2AX が、化学物質の膀胱発がん性早期検出のための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に、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、 γ -H2AX の免疫組織化学的解析による、腎発がん物質の早期検出手法の開発を目的とする。具体的には、様々な被験物質を用いたラット28日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における γ -H2AX 形成の定量解析および病理組織学的解析を行う。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 7 年度は、 γ -H2AX 免疫染色による腎発がん性の評価と腎臓における病理組織学的所見の関係を検証するため、これまでに評価した 47 物質（腎発がん物質 26 種を含む）を投与したラット腎臓の詳細な病理組織学的解析を実施した。6 週齢、雄の F344 または SD 系ラットに被験物質を 28 日間反復経口投与し、投与終了後に腎臓を採材、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。各被験物質の投与濃度には、原則として短期試験における最大用量を用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所が定める「動物実験の適正な実施に関する規程」に基づいた審査・承認を得た上で、使用する動物数ならびに動物が受ける苦痛を最小限とするよう配慮して実施した。

C. 研究結果

47 物質の投与群のうち、腎臓における尿細管上皮細胞の変性/壊死が 18 物質で認められ、うち 10 物質で発生頻度の有意な増加を伴っていた（表 1）。同所見は多くの腎毒性物質により様々な機序で誘発されるが、10 物質すべての投与群で γ -H2AX 陽性細胞の増加が認められたことから、腎発がん性との相関が示唆された。

また、再生尿細管および間質における炎症細胞浸潤の発生頻度の有意な増加が、それぞれ 12 および 3 物質の投与群において認められ、2 物質（*p*-Cre・MDA）を除きいずれも γ -H2AX 形成の有意な増加を伴っていた。 γ -H2AX は直接的な DNA 損傷のみならず、再生に伴う複製ストレスや、慢性炎症で生じる酸化ストレスによっても

引き起こされることが知られている。変性/壊死と同様に腎発がん性に関連する可能性がある一方、これらの所見は対照群でも一定の頻度で観察されることから、物質ごとに慎重な評価が必要と考えられた。

さらに、近位尿細管上皮細胞における好酸性顆粒の増加または巨大核の出現（カリオメガリー）が、それぞれ 7 物質の投与群に認められた。細胞質における好酸性顆粒は、雄ラットに特異的な α_{2u} グロブリンと推定される。過剰な蓄積に続発する α_{2u} グロブリン腎症は腎発がんに関与することが知られており、本研究において増加を示した 7 物質のうち、*p*-Cre を除く 6 物質で γ -H2AX 陽性細胞の増加が認められた。 α_{2u} グロブリンはヒトには存在しないことから、外挿性を評価する上でも重要な所見と考えられた。カリオメガリーは尿細管上皮細胞の核が顕著に大型化した状態を指し、再生時の DNA 複製の異常による所見と考えられている。必ずしも前がん状態を示すわけではないとされているが、本研究においてカリオメガリーを誘発した 7 物質はすべて γ -H2AX 形成の増加を示した腎発がん物質であったことから、腎発がん性の短期評価において有用な指標になり得ると考えられた。

D. 考察

腎発がん物質 26 種を含む計 47 物質を用いたこれまでの検討において、 γ -H2AX 免疫染色により腎発がん物質を高い感度（84.6%;22/26）および特異度（95.2%;20/21）で判定可能であることを報告した。令和 7 年度は、各被験物質を投与したラット腎臓の詳細な病理組織学的解析を実施し、 γ -H2AX 免疫染色の結果との比較検討を行った。

その結果、ラット 28 日間反復経口投与

毒性試験における腎臓の病理組織学的所見として尿細管上皮細胞の変性/壊死またはカリオメガリーが認められた場合、 γ -H2AX 陽性細胞の増加を伴うことが多く、腎発がん性の評価に有用な指標となり得ることが示唆された。一方で、 γ -H2AX 形成の有意な増加を示しながら、病理組織学的所見の発生頻度増加を伴わない腎発がん物質も 5 種類 (BDCM、2-NF、NMOR、1,2,3-TCP、Phph) 認められたことから、 γ -H2AX 免疫染色が最も高感度な指標であることも併せて確認された。

以上の結果から、腎臓における γ -H2AX 免疫染色および病理組織学的解析は、腎発がん物質の早期検出に有用であることが示された。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。

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、腎臓の病理組織学的解析に加えて 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. 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 Pharmacol*, 2026;507:117686.

doi: 10.1016/j.taap.2025.117686.

2. Murata Y, Akagi J, Doi Y, Iso T, Umamo T, Masumura K, Matsumoto M, Toyoda T, Ogawa K. Evaluation of 13-week repeated-dose oral toxicity of zirconium(IV) butoxide in Crl:CD(SD) rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2026;164:105968. doi: 10.1016/j.yrtph.2025.105968.

F.2 学会発表

1. 豊田武士. 抗甲状腺物質の *in vivo* 評価法開発および *in vitro* 系との比較. 第 32 回 HAB 研究機構学術年会 (2025.5.9)
2. 豊田武士、赤根弘敏、石井雄二、小川久美子. ラット反復経口投与毒性試験における抗甲状腺物質の検出および機序推定. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.2)
3. 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 (2025.7.2)
4. 畝山瑞穂、赤根弘敏、森川朋美、豊田武士: Crl:CD(SD)ラットにおける Perfluorobutanesulfonic acid の生体影響解析. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.3)
5. 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 (2025.7.3)
6. 石井雄二、高須伸二、山上洋平、相馬明玲、豊田武士、小川久美子: カルバミン酸メチルのラット肝発がん機序の

- 検討. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.3)
7. 赤根弘敏、畝山瑞穂、森川朋美、小坂忠司、青山博昭、小川久美子、豊田武士. ラット 28 日間反復投与毒性試験における病理組織学的及び免疫組織化学的解析による TSH 産生阻害剤の検出および機序推定. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.3)
8. 高須伸二、石井雄二、相馬明玲、豊田武士、小川久美子：レポーター遺伝子導入動物を用いた香料化合物の *in vivo* 遺伝毒性・発がん性の評価. 第 38 回発癌病理研究会 (2025.8.22)
9. 畝山瑞穂、赤根弘敏、森川朋美、高須伸二、小川久美子、豊田武士：免疫染色を用いたラット肝発がん物質早期検出法の開発. 第 11 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 (2025.9.13)
10. 赤根弘敏、松下幸平、畝山瑞穂、森川朋美、高須伸二、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 VA-K-14 のラットにおける抗甲状腺作用機序の評価. 第 84 回日本癌学会学術総会 (2025.9.25)
11. 赤木純一、曹永晩、横井雅幸、花岡文雄、松下幸平、豊田武士、小川久美子. 野生型および Pol κ 欠損マウスにおけるベンゾ[a]ピレン誘発前胃腫瘍の突然変異解析. 第 84 回日本癌学会学術総会 (2025.9.25)
12. 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. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11.23)
13. 石井雄二、高須伸二、山上洋平、相馬明玲、豊田武士、小川久美子. カルバミン酸メチルのラット肝発がんにおけるクロモスリプシス様染色体再構成の関与の検討. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11.23)
14. 赤木純一、横井雅幸、三宅ゆみ、松下幸平、菅澤薫、岩井成憲、豊田武士. アクリルアミド代謝物により誘導される多様な DNA 修飾とその生理的影響. 第 48 回日本分子生物学会年会 (2025.12.3)
15. 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. 薬剤性間質性肺炎における Stratifin の発現変動の機序解析. 第 46 回日本臨床薬理学会学術総会 (2025.12.5)
16. 畝山瑞穂、高須伸二、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子、豊田武士：免疫染色結果に基づく決定木分析によるラット肝発がん物質の早期検出法の検討. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2026.1.22)
17. 石井雄二、高須伸二、山上洋平、相馬明玲、豊田武士、小川久美子：カルバミン酸メチルのラット肝発がん過程におけるクロモスリプシスの関与. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2026.1.23)
18. 高須伸二、赤根弘敏、畝山瑞穂、森川朋美、豊田武士：フラン誘発肝傷害の早期に生じる肝漿膜下領域における変化の経時的解析. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2026.1.23)
19. 赤根弘敏、高須伸二、畝山瑞穂、森川朋美、小坂忠司、青山博昭、小川久美子、豊田武士：免疫組織化学的解析を用いたヨウ素取込み及び脱ヨウ素酵素

阻害剤のラットにおける抗甲状腺作用
の評価. 第 42 回日本毒性病理学会総会
及び学術集会 (2026.1.23)

20. 畝山瑞穂、高須伸二、赤根弘敏、森川
朋美、豊田武士. 雄性 Crl:CD(SD)ラッ
トを用いた 2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-
butanol の 28 日間反復経口投与毒性試
験. 第 13 回日本獣医病理学専門家協会
学術集会 (2026.3.26)

21. 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 (2026.3.27)

G. 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

表 1. 47 種の化学物質を 28 日間反復経口投与した雄ラット腎臓における代表的な病理組織学的所見

Table. Representative histopathological findings in the kidney of male rats orally treated with chemicals for 28 days

		Number of animals examined	Increased γ-H2AX	Result of Ames test	Degeneration/ necrosis (±, +, ++)	Regenerative tubule (±, +, ++)	Inflammation, interstitial (±, +)	Eosinophilic granule (±, +)	Karyomegaly (+)
Control (total)		69 ^a	-	N/A	0	6 (6, 0, 0)	7 (7, 0)	0	0
<i>Renal carcinogen</i>		<i>Abbreviation</i>							
1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone	ADBAQ	5	+	+	3 (3, 0, 0)	5** (3, 2, 0)	2 (2, 0)	5** (5, 0)	0
1-Amino-2-methylantraquinone	Disperse orange	5	+	+	1 (0, 1, 0)	4* (0, 1, 3)	3 (3, 0)	0	0
Aristolochic acid I	AAI	5	+	+	0	3 (3, 0, 0)	5 (1, 4*)	0	5**
Azoxymethane	AOM	5	+	+	4* (4, 0, 0)	1 (1, 0, 0)	4* (4, 0)	0	2
Bromodichloromethane	BDCM	5	+	+	2 (2, 0, 0)	0	0	0	0
1,3-Dichloro-2-propanol	1,3-DCP	5	-	+	0	0	0	0	0
Dimethylnitrosamine	DMN	5	+	+	1 (1, 0, 0)	4* (4, 0, 0)	5** (5, 0)	0	0
N-Ethyl-N'-hydroxyethylnitrosamine	EHEN	5	+	+	5** (5, 0, 0)	1 (1, 0, 0)	0	0	3
Hydroquinone	HQ	5	-	+	0	1 (1, 0, 0)	0	0	0
8-Methoxypsoralen	8-MOP	5	+	+	5** (1, 4, 0)	5** (0, 0, 5)	0	0	0
2-Nitrofluorene	2-NF	5	+	+	0	1 (1, 0, 0)	2 (2, 0)	0	0
Nitrofurantoin	NFT	5	+	+	5** (5, 0, 0)	0	0	5** (0, 5)	0
N'-Nitrosomorpholine	NMOR	5	+	+	0	0	1 (1, 0)	0	0
Potassium bromate	KBrO ₃	5	+	+	3 (3, 0, 0)	5** (4, 1, 0)	1 (1, 0)	5** (0, 5)	0
Quercetin		5	+	+	2 (2, 0, 0)	3 (2, 1, 0)	2 (2, 0)	3 (1, 2)	0
1,2,3-Trichloropropane	1,2,3-TCP	5	+	+	0	0	0	0	0
Tris(2,3-dibromopropyl) phosphate	TBPP	5	+	+	0	5** (0, 5, 0)	2 (2, 0)	0	5**
3-(4-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea	Monuron	5	-	-	5** (5, 0, 0)	0	0	0	5**
Chlorothalonil	CTN	5	-	-	0	3 (3, 0, 0)	0	0	0
Hexachlorobutadiene	HCBD	5	+	-	5** (5, 0, 0)	5** (5, 0, 0)	2 (2, 0)	5** (5, 0)	0
Lead(II) acetate trihydrate	LAT	5	+	-	0	0	0	0	5**
d-Limonene	LIM	5	+	-	5** (0, 5, 0)	5** (0, 3, 2)	2 (2, 0)	5** (0, 5)	0
Ochratoxin A	OTA	5	+	-	5** (0, 5, 0)	5 (0, 0, 5**)	1 (1, 0)	0	5**
Phenolphthalein	Phph	5	+	-	1 (1, 0, 0)	2 (2, 0, 0)	1 (1, 0)	0	0
Tris(2-chloroethyl) phosphate	TCEP	5	-	-	0	1 (0, 1, 0)	0	0	0
Trisodium nitrilotriacetate monohydrate	NTA	5	+	-	5** (0, 1, 4)	0	2 (1, 1)	0	0
<i>Non-renal carcinogen</i>		<i>Abbreviation</i>							
2-Acetylamino fluorene	2-AAF	5	-	+	1 (0, 1, 0)	0	0	0	0
4-Aminoazobenzene hydrochloride	AAB	5	-	+	0	0	0	0	0
p-Cresidine	p-Cre	4	-	+	0	3* (1, 2, 0)	0	4** (2, 2)	0
3,3'-Dichlorobenzidine dihydrochloride	DCB	5	-	+	0	1 (1, 0, 0)	0	0	0
Glycidol		5	-	+	0	0	0	0	0
4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)	MOCA	5	-	+	0	0	0	0	0
4,4'-Methylenedianiline	MDA	5	-	+	0	5** (3, 2, 0)	2 (2, 0)	0	0
N-Nitrosodiethylamine	DEN	5	-	+	0	0	1 (1, 0)	0	0
Acrylamide		5	-	-	0	2 (2, 0, 0)	1 (1, 0)	0	0
Chlorendic acid	CRA	4	-	-	0	0	0	0	0
Chlorobenzene	CB	5	-	-	0	0	0	0	0
Clofibrate	CFB	4	-	-	0	0	0	0	0
Furan		5	-	-	0	1 (1, 0, 0)	0	0	0
<i>Noncarcinogen</i>		<i>Abbreviation</i>							
2,6-Diaminotoluene	2,6-DAT	5	-	+	0	1 (1, 0, 0)	1 (1, 0)	0	0
6-Mercaptopurine monohydrate	6-MP	5	-	+	0	0	2 (2, 0)	0	0
5-Nitro-o-toluidine	PNOT	5	-	+	0	0	0	0	0
Anthranilic acid	o-AA	5	-	-	0	0	0	0	0
Carboxin (low dose)	CBX (0.04%)	5	-	-	0	5* (3, 2, 0)	1 (1, 0)	0	0
Carboxin (high dose)	CBX (0.2%)	5	+	-	4* (4, 0, 0)	5* (0, 0, 5)	2 (2, 0)	0	0
Ethionamide	ETP	5	-	-	0	0	0	0	0
5-Fluorouracil	5-FU	5	-	-	0	1 (1, 0, 0)	1 (1, 0)	0	0
Fradiomycin sulfate	Neomycin	5	-	-	0	0	0	0	0

* and **: $P < 0.05$ and 0.01 , respectively, vs. corresponding control groups by Fisher's exact test.

±, +, and ++: slight, mild, and moderate, respectively. ^aTotal of 14 separate studies.