

現系の構築を行い、この系ではそれぞれの単独発現系と比べて経細胞輸送が促進されることを確認した。側底膜有機アニオントランスポーター（OAT1、OAT3）について、サル、ラット、ヒト間での種差の検討を行った。その結果、2,4-Dの輸送も含めてOAT1についてはほとんど種差がみられないものの、OAT3についてはサル・ヒト間では種差がみられないものの、サル・ラット、ヒト・ラット間では種差がみられた。少なくとも、尿細管分泌についてはサルがヒトのいいモデルとなることを明らかにした。

⑥SFE法では、14年度に市販食品の残留農薬調査を行った試験溶液を用いて調査対象外の農薬及びその他の化学物質の検索を行った。市販の保持時間データベースを用いた検索から benzophenone、*p*-dichlorobenzene、tributyl phosphate及びcresol類が肉類及び魚介類から高頻度で検出された。このほかethoxyquin、chlorfepos、furathiocarb、cycloate、thionazin、9,10-anthraquinone及びmethyldymronが検出された試料が散見された。また、マススペクトルライブラリーによる検索から250化合物以上が検索されたが、確認するためには更に標準品を用いた検討が必要である。しかしこれらすべての化合物について標準品との比較を行うことは非常に困難であり、効率的な検索を行うためには保持時間情報などマススペクトル以外の情報が必要である。溶媒抽出法では、魚介類から微量のDDT類及びクロルデン類が検出される場合もあるが、動物性食品中の

農薬の残留は、農作物に比べて、検出農薬数、検出濃度ともに、きわめて低レベルであった。また、動物性食品群について、マーケットバスケット方式による摂取量調査を行ったところ、X群4検体、XI群1検体に*p,p'*-DDEをはじめとするDDT類の痕跡を認めたのみで、一日摂取量に換算しても、total DDTとして0.5 µg未満、その他の農薬については0.1 µg未満と推定された。⑦ 残留農薬の暴露評価の精密化を目的として、暴露評価に特化した食品摂取量データベースの拡充を図るために以下の検討を行った。

1 2001年より新しい食品番号体系となった国民栄養調査について、食品番号及び調理コード等の再整理を行い、残留農薬の暴露評価の対象となる各農作物において加工・調理係数を実際に適用した場合、どの程度の暴露量が推定されるかについて試算を開始した。

2 残留農薬の暴露評価の対象となる各農作物の摂取量を求めるために現在使用されている「食品番号の分類及び処理係数（材料比、重量比、他の係数）」の見直しのための基礎データを得るために、既存資料を用いて、代表的と考えられる食品の原材料構成、使用量、調理・加工に関する情報を整理し、データベース化した。

これらの食物摂取に関する基本データの整備を進めることにより、国内外における規格基準案の検討やマーケットバスケットに代表されるモニタリング調査が、より信頼性の高いものとなることが期待される。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

(1) 論文発表

- 1 Takeshita, F , Ogawa, K , Asamoto, M , Shirai, T Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine Cancer Lett 194 25-35, 2003
- 2 Suzuki, S , Asamoto, M , Tsujimura, K , Shirai, T Specific differences in gene expression profile revealed by cDNA microarray analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) immunohistochemically positive rat liver foci and surrounding tissue Carcinogenesis 25 439-443, 2004
- 3 Hokaiwado, N , Asamoto, M , Tsujimura, K , Hirota, T , Ichihara, T , Satoh, T , Shirai, T Rapid analysis of gene expression changes caused by liver carcinogens and chemopreventive agents using a newly developed three-dimensional microarray system Cancer Sci 95 123-130, 2004
- 4 Teshima, R , Nakamura, R , Nakajima, O , Hachisuka, A and Sawada, J Effect of two nitrogenous diphenyl eth-

r pesticides on mast cell activation
Toxicol Lett 150, 277-283, 2004

- 5 Deguchi T, Kusuhara H, Takdate A, Endou H, Otagiri M and Sugiyama Y Characterization of Uremic Toxin Transport by Organic Anion Transporters in the Kidney Kidney Int, 65 162-174, 2004
- 6 Nozaki Y, Kusuhara H, Endou H and Sugiyama Y Quantitative Evaluation of the Drug-Drug Interactions between Methotrexate and Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in the Renal Uptake Process based on the Contribution of Organic Anion Transporters and Reduced Folate Carrier J Pharmacol Exp Ther, 309 226-234, 2004
- 7 阿部としよ, 吉池信男, 山口英昌
学童の農薬暴露量推定における学校給食データの活用 日本衛生学雑誌 58(3), 376-384, 2003

(2) 学会発表

- 1 広瀬雅雄, 今井俊夫 臓器障害時における amitrole の DHPN ラット甲状腺発がん修飾作用 第92回日本病理学会総会(福岡) 2003
- 2 瀧澤保, 今井俊夫, 上田誠, 小野瀬淳一, 蓮村麻衣, 広瀬雅雄 Amitrole によるラット甲状腺発がん促進作用に対する臓器障害の影響 第30回日本トキシコロジー学会学術年会(東京) 2003

- 3 小野瀬淳一, 蓮村麻衣, 永晩, 瀧澤保, 今井俊夫, 広瀬雅雄 消化管障害時における Amitrole の DHPN ラット甲状腺発がん修飾作用 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋) 2003
- 4 北村泰樹, 岡崎和志, 西川秋佳, 神吉けい太, 梅村隆志, 今沢孝喜, 広瀬雅雄 IQ 9 及び亜硝酸ナトリウム併用投与によるラット大腸 肝発がんの増強作用 (第 62 回日本癌学会, 2003 年 9 月)
- 5 鈴木周五, 朝元誠人, 白井智之 GST-P 陽性細胞巢からの RNA 抽出と cDNA array への応用, 第 92 回日本病理学会総会, 福岡, 2003 年 4 月 23 日-25 日。
- 6 栗林正伯, 朝元誠人, 鈴木周五, 白井智之 薬物代謝酵素誘導物質による MeIQx の肝発がん修飾作用, 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋, 2003 年 9 月 25 日-27 日。
- 7 Suzuki, S , Asamoto, M , Kazunari Tsujimura, K , Ogawa, K , Futakuchi, M , Shirai, T SPECIFIC DIFFERENCES IN GENE EXPRESSION PROFILE REVEALED BY CDNA MICROARRAY ANALYSIS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PLACENTAL FORM (GST-P) IMMUNOHISTOCHEMICALLY POSITIVE RAT LIVER FOCI AND SURROUNDING TISSUE JSTP/IFSTP (IATP), Kobe, Feb , 2004
- 8 Kandori, H , Kuribayashi, M , Inaguma, S , Asamoto, M , Hokaiwado, N , Takahashi, S , Shirai, T Lack of modification of MeIQx rat liver carcinogenesis by caffeine induction of CYP1A2 JSTP/IFSTP (IATP), Kobe, Feb , 2004
- 9 紅林秀雄, 大野泰雄 除草剤プロメトリンおよびアメトリンのヒト肝ミクロソームにおける代謝 日本薬学会第 124 年会 (2004 3)
- 10 根本 了, 山口 拓, 佐々木久美子, 米谷民雄 畜水産物中の残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用—肉、魚試料について—日本食品衛生学会第 86 回学術講演会(2003 10)
- 11 阿部としよ, 吉池信男, 山口英昌 学童の TMDI 推定における学校給食データの活用 日本家政学会関西支部第 25 回研究集会, 2003 11 1 大阪市
- H 知的財産権の出願 登録状況 (予定を含む)
なし

食品中化学物質の発がん評価に及ぼす諸要因の検討

国立医薬品食品衛生研究所 広瀬雅雄

研究要旨

実験1は、2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) の発がん性に対する肝、腎障害の及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。本実験に先立ち、肝及び腎に対する障害物質である四塩化炭素及び葉酸のラットにおける投与条件を明らかにするため予備実験を行った。本実験では、F344雄ラット120匹に肝発癌物質であるdiethylnitrosamine(DEN)及び大腸発癌物質である1,2-dimethylhydrazine(DMH)で処置した後、四塩化炭素(1ml/kg体重、2回/週)あるいは葉酸(200mg/kg体重、1回/週)を隔週で間歇投与し、それらの休業期間中に隔週でIQを混餌投与(300ppm)し、さらにIQ、四塩化炭素、葉酸の各単独投与群及びDEN+DMH投与のみを行った群も設けた。現在本実験開始36週目で、イニシエーション後にIQ+CCl₄を投与した死亡例3例にはすべて肝腫瘍が発生しており、CCl₄による肝障害はIQ肝発がんを促進する可能性が高い。40週で最終屠殺を行う。実験2では、抗酸化酵素及び第2相酵素群の誘導因子であるnrf2の、IQ誘発肝発がんへの関与を調べる目的で、Nrf2ノックアウトマウスを用いた検討を行った。また、その発がんメカニズムを検討する目的で、酸化的ストレスによるDNA傷害の指標である8-OHdGを測定した。その結果、Nrf2(-/-)ではNrf2(+/-)より発がん感受性が高かったが、これには、酸化ストレスではなく、解毒酵素の低下が関与していると考えられた。

A 研究目的

残留農薬や食品添加物のADI設定にあたっては、それらの複合作用やヒトが日常的に暴露されている食品中の化学物質、あるいは摂取するヒトの病的状態は考慮されていないことから、化学物質が生体に及ぼす影響をより実態に即した条件下で検討するための基礎研究の推進が必要である。魚/肉の焼け焦げ中に含まれる変異原/発がん物質であるヘテロサイクリンクアミン(HCA)の一つである2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)は、ラットの肝、肺、小腸及び大腸に発がん性を示し、ヒトに対する発がんリスクが懸念されている。実験1は、HCAの発がん性に対して、化学物質による肝あるいは腎障害が及ぼす影響を検討する目的で実験を開始した。化学物

質による肝障害及び腎障害モデルについては、比較的短期間の実験に関する報告はみられるが、慢性障害に関する報告は極めて限られている(Wang et al, 2003, Shirai et al, 1984)。そこでまず、慢性肝障害及び腎障害モデルを確立するため、肝及び腎に対する障害物質である四塩化炭素(CCl₄)及び葉酸(FA)の至適投与用量と頻度を明らかにするためF344ラットを用いた予備実験を行った。本実験では、IQのF344ラットにおける主に肝及び大腸における発がん性に対する肝、腎障害の修飾作用を検討するため、肝発癌物質であるdiethylnitrosamine (DEN)及び大腸発癌物質である1,2-dimethylhydrazine(DMH)にて処置した後、IQ及び四塩化炭素/葉酸の間歇投与を開始した。

IQ は、Nrf2 欠損マウスの由来系統である ICR マウスでの発がん性は未知であるが、CDF1 マウスへの長期投与により、肝臓、前胃及び肺を発がんの標的臓器に持つことが証明されている。IQ の代謝活性化経路として、まず CYP1A2 により *N*-ヒドロキシ-IQ に代謝活性化され、さらに *O*-アセチルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼなどにより活性化されて、最終的に親電子性物質のアリルニトロニウムイオンを産生し、これが DNA とアダクトを形成し、結果として発がんに至ると考えられている。一方、IQ の解毒メカニズムとしては、主として C5 位で CYP 酵素群を介した水酸化を受け、硫酸抱合あるいはグルクロン酸抱合で処理されると考えられている。従って、Nrf2 ノックアウトマウスに IQ を投与した場合、肝障害を受けた場合と同様に、IQ は解毒されずに生体内で蓄積し、DNA アダクト形成が増加し最終的に発がんが増強されることが期待される。従って実験 2 では、Nrf2 ノックアウトマウスを用いて、IQ を 52 週間混餌投与することによる肝発がんへの影響を病理組織学的手法で検討した。HCA では、自動酸化や P450 reductase を介した酸化性ストレスが発がんの 1 要因と考えられており、その発がんメカニズムを検討する目的で、1 週間あるいは 4 週間 IQ 投与後の肝臓について、DNA への 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 形成量を HPLC 電気抵抗変化検出法により既に測定した。

B 研究方法

【実験 1】

【予備実験】 F344 系雄ラット(6 週齢)36 匹を 6 群に分けて実験を行った。CCl₄ 及び FA の投与用量及び投与間隔は文献的に報告されている各々 9 週間及び 35 週間の実験の結果を参考にした (Wang et al, 2003, Shirai et al, 1984)。(1 群) CCl₄ を 2ml/kg 体重の用量で週 2 回、隔週で 2×4 回強制経口投与、(2 群) CCl₄ を

1ml/kg 体重の用量で週 2 回、隔週で 2×4 回強制経口投与、(3 群) CCl₄ を 2ml/kg 体重の用量にて週 2 回 2 週連続で強制経口投与した後、2 週間休薬することの 2 回繰返し、(4 群) CCl₄ を 1ml/kg 体重の用量にて週 2 回 2 週連続で強制経口投与した後、2 週間休薬することの 2 回繰返し、(5 群) FA を 200mg/kg 体重の用量で週 1 回、隔週で 4 回皮下投与、(6 群) FA を 200mg/kg 体重の用量にて週 1 回 2 週連続で皮下投与した後、2 週間休薬することの 2 回繰返しを行った。最終投与週及び最終休薬週にて各 3 匹の動物をエーテル麻酔下にて屠殺剖検し、肝あるいは腎を摘出して重量を測定するとともに、病理組織学的に検索した (Figure 1)。

【本実験】F344 系雄ラット(6 週齢)120 匹に DEN(200mg/kg 体重)を単回腹腔内投与し、その 3 日後から DMH(40mg/kg 体重)を 2 週間に 4 回皮下投与した。DEN 及び DMH による処置後、ラットを 6 群に分け、CCl₄ を 1ml/kg 体重の用量で週 2 回強制経口投与、あるいは FA を 200mg/kg の用量で週 1 回皮下投与する処置を隔週で行い、さらに CCl₄ あるいは FA の休薬期間中に隔週で IQ を 300ppm 濃度で混餌投与している。DEN+DMH 処置のみを行った群及び DEN+DMH 処置を行った後 IQ、CCl₄ あるいは FA を単独投与する群も設けた (Figure 2)。40 週まで投与を継続 (CCl₄/FA 及び IQ の投与を 19 回繰返し) した後、全動物をエーテル麻酔下にて開腹、大動脈より採血して、肝、腎障害の状況を血清生化学検査 (ALT, AsT, BUN) にて確認し、動物を剖検し、肝、腎、肺、小腸及び大腸を摘出して病理組織学的に検索する。

【実験 2】

Nrf2 ノックアウトマウスは伊東らの方法 [1] と同様の手法で作成した。Nrf2 ノックアウトマウスの遺伝子型 (Nrf2 (+/+), Nrf2 (+/-), Nrf2 (-/-)) は、尾から抽出されたゲノム DNA を PCR で増幅することにより確認し

た。各遺伝子型の雌雄各 60 匹を、7 週齢時に 6 群 (4 群 5 匹、2 群 20 匹) に群分けした。動物はバリエーションシステムの動物室でプラスチック製ケージに各 5 匹ずつ収容し、床敷にはソフトチップを用いた。室内の環境条件は、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、換気回数 18 回/時間、12 時間照明/消灯とした。基礎飼料としての CRF-1 粉末 (オリエンタル酵母工業(株)) 及び水道水は自由に摂取させた。雌雄各遺伝型について、8 週齢時より IQ (Toronto Research Chemicals Inc) 300 ppm を混餌投与する群、あるいは基礎飼料のみを与える群を 3 群 (2 群 5 匹、1 群 20 匹) ずつ設けた。投与期間については 5 匹の群は 1 週間あるいは 4 週間、また 20 匹の群は 52 週間とした。体重測定及び摂餌量測定については、実験開始後第 4 週までは週 1 回の割合で測定し、以降は 4 週に 1 回の割合で測定した。全生存動物は実験期間終了時にエーテル麻酔下で放血致死後、剖検した。1 週及び 4 週解剖群については、肝臓を摘出し、8-OHdG 量、DNA アダクト量 (4 週のみ) 及び第 1 相及び第 2 相酵素群の酵素活性 (4 週のみ)、並びに局在 (4 週のみ) を測定する目的で、液体窒素で凍結処理し -80°C の冷凍冷蔵庫で保存した。また、52 週解剖群については、諸器官・組織については肉眼的に観察後摘出し、肝臓、腎臓及び肺については器官重量を測定した。また、肝臓、腎臓、肺、胃、小腸、大腸、シンプル腺及びその他肉眼的異常部位については、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で固定後、ヘマトキシリン エオシン (H&E) 染色標本を作製した。肝臓の核内 DNA は DNA Extracter WB Kit (和光純薬工業(株)) により抽出した。DNA はヌクレアーゼ P₁ 及びアルカリフォスファターゼでデオキヌクレオチドに分解した。8-OHdG 量 (8-OHdG/ 10^5 デオキシグアノニン) は HPLC 電気抵抗変化検出測定装置 (Coulochem II, ESA) により検出した。

C 研究結果

【実験 1】

[予備実験] CCl₄ の 2ml/kg を 1 週間隔で投与した 1 群及び CCl₄ の 2ml/kg を 2 週間隔で投与した 3 群の各 6 例中 1 例が投与過誤により途中死亡した。各群の最終体重と肝及び腎の相対重量を Table 1 にまとめた。CCl₄ 投与後休薬期間なしで剖検した各群では、CCl₄ を 1 週間隔で投与した動物と比較して、2 週間隔で投与した動物では体重が明らかに低値を示した。CCl₄ の投与用量による差はみられなかった。しかし、CCl₄ 投与後休薬した後剖検した群では、1 ml/kg 投与と比較して 2ml/kg 投与では体重増加抑制を示す傾向がみられた。相対肝重量については、CCl₄ 投与後休薬期間なしで剖検した群では、CCl₄ を 1 週間隔で投与した動物と比較して、2 週間隔で投与した動物では肝重量が高値を示した。休薬期間後に剖検した群では、肝重量において投与間隔、投与用量による差はみられなかった。FA を投与した動物については、休薬期間なしで剖検した動物については、腎重量が明らかに増加したが、投与間隔による差はみられなかった。休薬期間終了後、腎重量は明らかな回復傾向を示した。

病理組織学的検索において、CCl₄ 投与後休薬期間なしで剖検した群では、肝臓において、小葉中心性肝細胞肥大及び空胞化が観察されたが、投与間隔あるいは投与用量による明らかな違いは認められなかった。休薬期間後に剖検した群では、CCl₄ 投与による肝臓の変化は明らかな回復傾向を示した。FA 投与後休薬期間なしで剖検した群では、腎臓の皮質から髓質にかけて慢性に尿細管及び集合管の拡張がみられ、さらに軽度ながら尿細管上皮壊死、再生尿細管及び巣状細胞浸潤が認められた。投与間隔あるいは投与用量による明らかな違いは認められなかった。休薬期間後に剖検した群では、FA 投与による腎臓の変化は明らかな回復傾向を示した。

[本実験]DEN+DMH 処置後、IQ 及び CCl₄ を投与した 2 群において、実験開始 13 週目以降に 20 例中 3 例が途中死亡し、IQ のみを投与した 1 群において、13 週目以降に 20 例中 3 例が途中死亡した。13 週目以降における 2 群の死亡動物の肝臓及び腎臓の病理組織学的検索を実施した結果、肝臓においては肝細胞腺腫、肝細胞がん、肝細胞空胞化及び軽度の線維化が観察され、腎臓では軽度の巢状尿細管上皮空胞化が認められた。各群の体重の推移を Figure 3 に示した。IQ 及び IQ+FA 投与により、基礎飼料対照群あるいは FA 単独群と比較して軽度の体重増加抑制が観察された。また、CCl₄ 投与により、IQ 併用投与の有無に関わらず、著しい体重増加抑制がみられた。FA 投与による影響として、軽度な体重増加抑制が認められた。

【実験 2】

実験終了時における生存率は雄で各群とも 75~95%、雌では 85~100%で、群間で有意差は認められなかった。最終体重は雄では群間に差はなく、雌では Nrf2(-/-)の基礎飼料群の値は Nrf2(+/-)の値に比べて有意に低かった。器官重量は、雄では、肝臓において IQ 投与群は IQ 非投与群に比べて高値を示す傾向がみられ、また IQ 投与群内では Nrf2(-/-)は Nrf2(+/-)より高値傾向を示したが、有意な変化ではなかった。腎臓及び肺については、ともに各群間で有意差はみられなかった。一方、雌では、肝臓、腎臓及び肺ともに IQ 投与群は IQ 非投与群に比べて高値を示す傾向がみられ、Nrf2(+/-)の IQ 300 ppm 投与群の値は Nrf2(+/-)の基礎飼料群の値に比べていずれも有意に高かった(p<0.01)。

肝臓の病理組織学的検索結果を Table 2 に示した。肝細胞腺腫及び肝細胞癌の合計で評価すると、腫瘍発生率及び 1 個体当たりの腫瘍発生数は、雌雄いずれにおいても Nrf(+/-)では IQ 投与の有無に関わらず有意差は認められなかったが、Nrf(+/-)及び Nrf(-

-)では IQ 投与群は IQ 非投与群に比べて有意な高値を示した(雄 Nrf(+/-)の発生率及び雌 Nrf(+/-)の発生数, p<0.05, 雌 Nrf(+/-)の発生率及び雌雄 Nrf(-/-)のいずれの項目, p<0.01)。IQ 投与群間で比較すると、雄 Nrf(-/-)の 1 個体当たりの腫瘍発生数及び雌 Nrf(-/-)の腫瘍発生率は Nrf(+/-)のそれぞれの値に比べていずれも有意に高い値を示した(p<0.05)。他臓器における増殖性病変の病理組織学的検索結果を Table 3 (雄) 及び Table 4 (雌) に示した。雌雄とも前胃で、扁平上皮細胞過形成の発生率が雄 Nrf2(+/-)を除いた各遺伝子型において IQ 投与群では IQ 非投与群に比べて有意に高かった(雌 Nrf2(+/-), p<0.05, 雌雄 Nrf2(+/-) 及び Nrf2(-/-), p<0.01)。特に、雄では IQ 投与群間において Nrf2(+/-) 及び Nrf2(-/-)の発生率は Nrf2(+/-)の発生率に比べて有意な高値を示した(Nrf2(+/-), p<0.01, Nrf2(-/-), p<0.05)。また、乳頭腫の発生率が雄 Nrf2(+/-)の IQ 300 ppm 投与群では Nrf2(+/-)の基礎飼料群に比べて有意に高い値を示した(p<0.05)。他に、肺、肝臓、脾臓、造血系組織(白血病/悪性リンパ腫)、腎臓、包皮腺及び皮下組織において Table 3, 4 に示した所見がみられたが、その発生率に群間での差はなかった。

肝臓における 8-OHdG 形成量は、雌雄とも、1 週及び 4 週いずれのサンプルにおいてもほぼ同様な値を示し、群間での有意差は認められなかった。

考察

実験 1 では、それぞれ肝及び腎に対する障害物質である CCl₄ 及び FA の至適投与用量と頻度を明らかにするため F344 ラットを用いた予備実験を行った。CCl₄ を 2 及び 1ml/kg 体重の用量で 1 及び 2 週間間隔で週 2 回投与した結果、体重に対しては、CCl₄ 投与後休養した後剖検した群では、1ml/kg 投与と比較して 2ml/kg 投与では体重増加抑制を示す傾向がみ

られ、CCl₄ 投与後休薬なしで剖検した群では、CCl₄ を 1 週間隔で投与した動物と比較して、2 週間隔で投与した動物では体重が明らかに低値を示した。相対肝重量については、CCl₄ 投与後休薬期間なしで剖検した群では、CCl₄ を 1 週間隔で投与した動物と比較して、2 週間隔で投与した動物では肝重量が高値を示したが、休薬期間後に剖検した群では、肝重量において投与間隔、投与用量による差はみられなかった。病理組織学的検索において、CCl₄ 投与後休薬期間なしで剖検した群では、肝臓において、小葉中心性肝細胞肥大及び空胞化が観察されたが、投与間隔あるいは投与用量による明らかな違いは認められなかった。休薬期間後に剖検した群では、CCl₄ 投与による肝臓の変化は明らかな回復傾向を示した。以上より、本実験では 30~40 週間までの長期間 CCl₄ を投与することを考慮し、体重増加抑制を指標としたラットの全身に及ぼす影響が少なく、かつ病理組織学的には同等の変化が誘発されると考えられる 1ml/kg 体重にて 1 週間隔で投与することとした。予備実験では、投与期間後にみられた小葉中心性肝細胞肥大及び空胞化が、休薬期間後は回復性を示したが、文献的には 9 週間程度投与することにより肝臓の線維化が誘発されることが報告されており (Wang et al, 2003)、今回の本実験では線維化を伴う慢性肝障害が誘発されることが予測された。FA を投与した動物については、その体重において、休薬期間なしで剖検した動物については、腎重量が明らかに増加したが、投与間隔による差はみられず、病理組織学的には腎臓の皮質から髄質にかけて彌慢性に尿細管及び集合管の拡張がみられ、さらに軽度ながら尿細管上皮壊死、再生尿細管及び巣状細胞浸潤が認められた。休薬期間後に剖検した群では、FA 投与による腎臓の変化は明らかな回復傾向を示したが、文献的にはラットに 300mg/kg 体重の FA を 8 週間投与後、投与用量を 100mg/kg 体重に減じて 27 週間投与

した場合、高頻度に間質性腎炎が誘発されることが報告されており (Shirai et al, 1984)、本実験では 30~40 週間までの長期間 FA を投与することを考慮すると、慢性腎障害が誘発されることが予測された。

本実験において、DEN+DMH 処置後、IQ と CCl₄ を投与した群において、実験開始 13 週以降 20 例中 3 例が途中死亡し、肝臓及び腎臓の病理組織学的検索を実施した結果、肝臓においては既に肝細胞腺腫、肝細胞がんの他、肝細胞空胞化及び軽度の線維化が観察され、腎臓では巣状の尿細管上皮空胞化が認められた。従って、1 群 20 例中 3 例の死亡例の結果をみる限りにおいては、CCl₄ を 1ml/kg 体重にて 1 週間隔で投与することにより、所期の慢性肝障害が誘発され、肝発がんが促進されている可能性が示唆された。現在本実験開始 36 週目で、40 週まで継続した後剖検し、各臓器における腫瘍性病変発生頻度及び発生数を比較検討する。

実験 2 では、IQ 肝発がん作用に抗酸化酵素及び第 2 相酵素群の誘導因子である nrf2 が関与しているかを調べる目的で Nrf2 ノックアウトマウスを用いて検討を行った。また、その発がんメカニズムを検討する目的で、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 形成量を測定した。その結果、雌雄とも IQ 投与により Nrf(-/-)では Nrf(+/-)に比べて肝発がんの著明な増加が認められた。ただ、その肝発がん増強作用は 8-OHdG 形成量とは関連性の無いものであった。IQ 肝発がん性と酸化ストレスの関連性については、ラットにおいていくつかの天然抗酸化物質が IQ の肝発がんイニシエーション作用を有意に抑制するという報告がある。また、合成フェノール系抗酸化物質である 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) は IQ を含む HCA 混合物による肝発がんを抑制し、HTHQ や BHT、BHA は MeIQx の肝発がんを強力に抑制するという報告もあり、発がんにおける酸化性

ストレスの関与も否定できない。Nrf2 ノックアウトマウスは酸化ストレスに対して非常に高感受性のマウスと考えられているが、今回の実験結果からは IQ 投与による Nrf(-/-)群における 8-OHdG 形成量の著明な上昇は認められなかった。今回の結果と同様に、IQ 投与後の Big Blue ラットの肝臓では、濃度依存的 DNA アダクト形成及び DNA 鎖切断は見られたが、酸化ストレスのマーカークラスの値には変化がなかったことが報告されている。従って、IQ 肝発がん性に酸化ストレスは大きく関与しないことが示唆される。また、抗酸化酵素や第 2 相酵素が低下する様な病的状態では、IQ による肝発がんに対する感受性が高くなることも示唆された。

今後、今回見られた肝発がん性のメカニズムを解明する目的で、IQ 発がん性の主要因と考えられている DNA へのアダクト形成量を ^{32}P ポストラベル法により、また IQ の代謝解毒の観点から第 1 相及び第 2 相酵素群の酵素活性、並びに局在をウエスタンブロット法により解析する予定である。

E 結論

HCA の発がん性に対して、化学物質による肝あるいは腎障害が及ぼす影響を検討する目的で実験を行った。これまで、化学物質による適切な慢性肝障害及び腎障害モデルが確立されていなかったことから、本実験に先立ち予備実験を行い、肝及び腎に対する障害物質である CCl_4 及び FA のラットにおける投与条件を明らかにした。IQ のラットにおける主に肝及び大腸における発がん性に対する肝、腎障害の修飾作用を検討する本実験では、途中死亡例の所見から、肝障害が IQ 肝発がんを増強する可能性を示唆する結果が得られている。また、抗酸化酵素や第 2 相酵素が低下する様な病的状態では、IQ による肝発がんに対する感受性が高くなることも示唆された。

F 健康危険情報

なし。

G 研究発表

(1) 論文発表

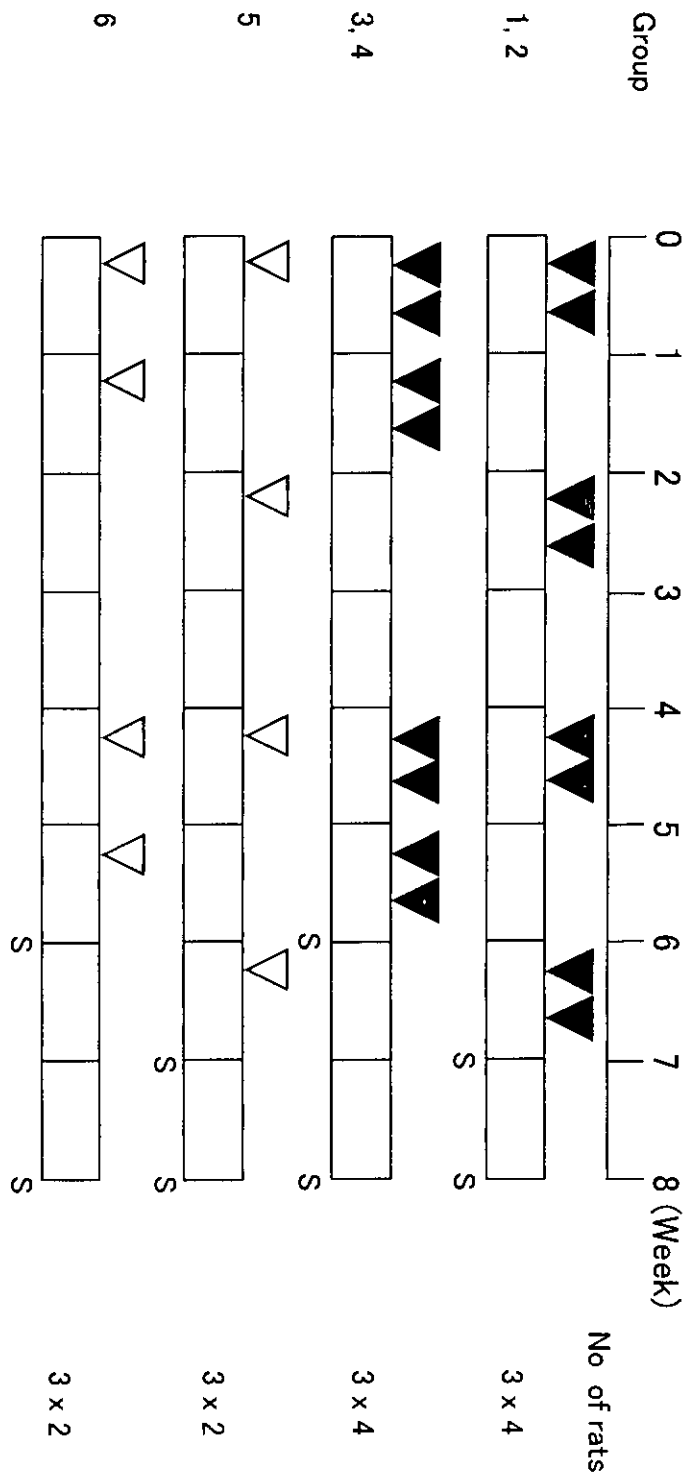
なし。

(2) 学会発表

- 1 広瀬雅雄, 今井俊夫 臓器障害時における amitrole の DHPN ラット甲状腺発がん修飾作用 第 92 回日本病理学会総会 (福岡) 2003
- 2 瀧澤保, 今井俊夫, 上田誠, 小野瀬淳一, 蓮村麻衣, 広瀬雅雄 Amitrole によるラット甲状腺発がん促進作用に対する臓器障害の影響 第 30 回日本トキシコロシー学会学術年会 (東京) 2003
- 3 小野瀬淳一, 蓮村麻衣, 曹永晩, 瀧澤保, 今井俊夫, 広瀬雅雄 消化管障害時における Amitrole の DHPN ラット甲状腺発がん修飾作用 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋) 2003
- 4 北村泰樹, 岡崎和志, 西川秋佳, 神吉けい太, 梅村隆志, 今澤孝喜, 広瀬雅雄 IQ 及び亜硝酸ナトリウム併用投与によるラット大腸・肝発がんの増強作用 第 62 回日本癌学会総会 (名古屋) 2003

H 知的所有権の取得状況

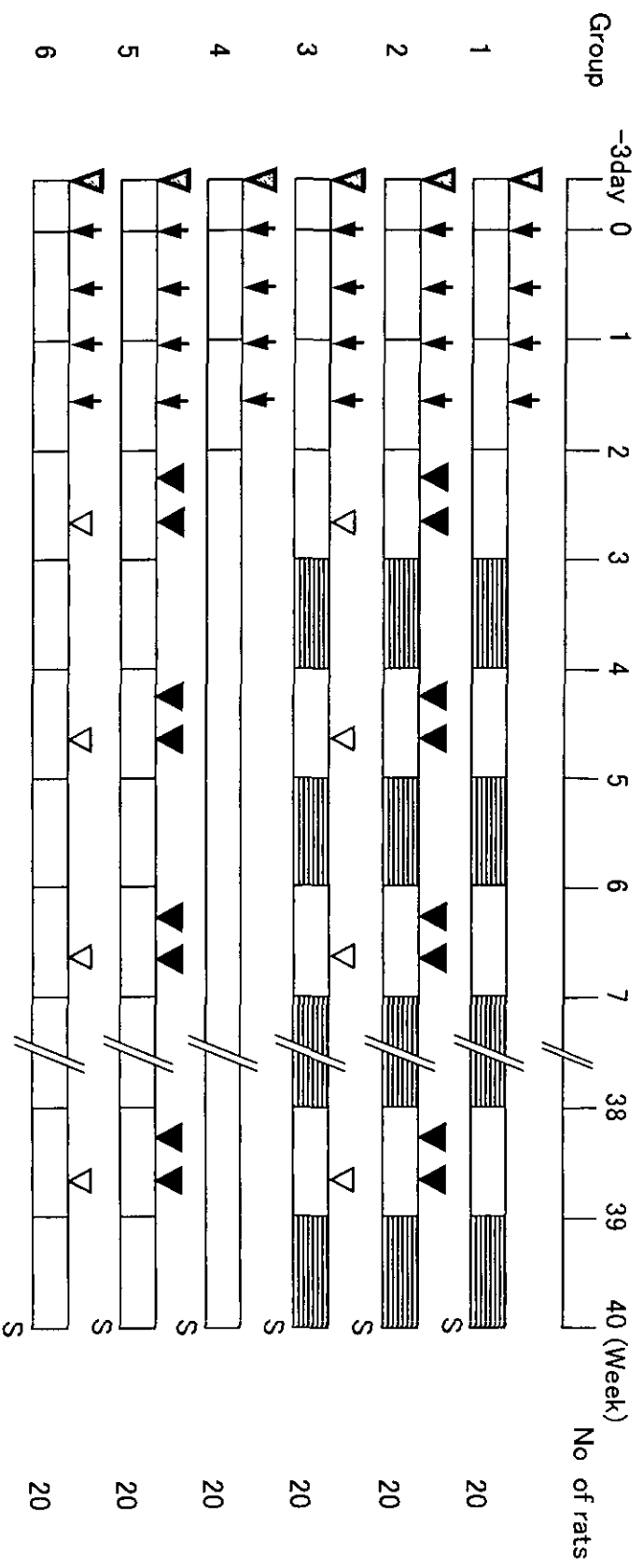
なし。



Animal F344 female rats, 6-week-old

- ▼ Carbon tetrachloride (CCl₄, Groups 1,3, 2ml/kg Groups 2,4, 1ml/kg, 1 g)
- ▽ Folic acid (FA, 200mg/kg, s.c)
- S Sacrifice (Sampling, Liver, kidneys)

Fig 1 Design of preliminary study for appropriate interval and dose of carbon tetrachloride and folic acid treatment in F344 rats



Animal F344 male rats, 6-week-old









-  2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ, 300ppm, in diet)
-  Carbon tetrachloride (CCl4, 1ml/kg, i.g.)
-  Diethylnitrosamine (DEN, 200mg/kg, i.p.)
-  Folic acid (FA, 200mg/kg, s.c.)
-  1,2-dimethylhydrazine (DMH, 40mg/kg, s.c.)
-  Sampling & measurement, Liver, kidneys, Colon, Lung, Small intestine
-  Sacrifice
-  GOT, GPT, BUN

Fig 2 Design of main study for influence of liver damage by carbon tetrachloride and renal damage by folic acid on IQ-induced carcinogenesis in F344 rats

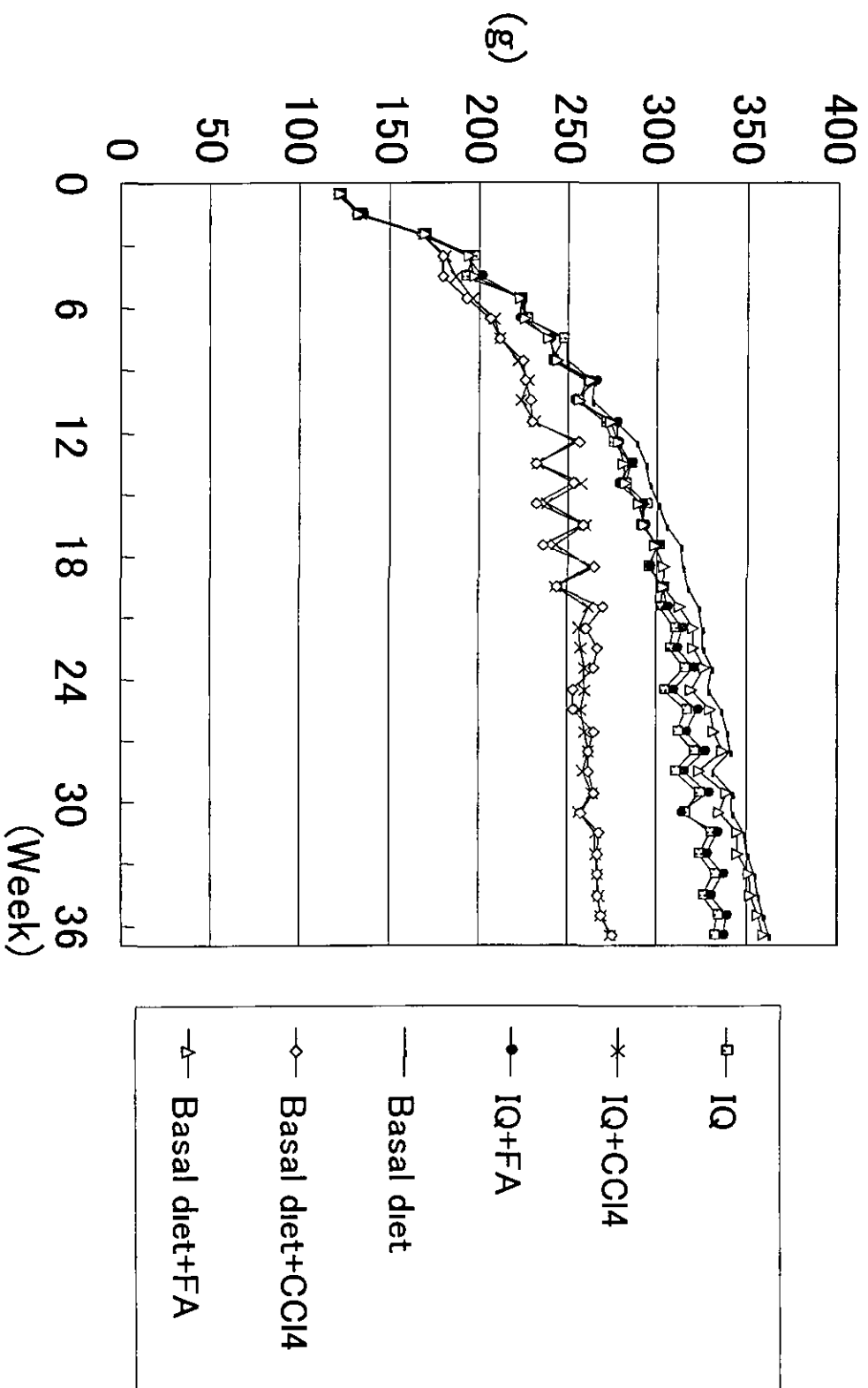


Fig. 3 Body Weight Curves of rats intermittently treated with IQ and CCl4/FA

Table 1 Final body and organ weights of rats treated with carbon tetrachloride or folic acid

Group	Treatment (interval)	Dose (dose)	Week	N	B.W. (g)	Relative organ weights	
						(Liver)	(Kidney)
1	1 week	CCl4 2 mL/kg b.w.	7	2	149.3 ^a	4.52	0.80
			8	3	157.6	3.10	0.70
2	1 week	CCl4 1 mL/kg b.w.	7	3	149.3	4.47	0.78
			8	3	165.9	3.00	0.69
3	2 week	CCl4 2 mL/kg b.w.	6	2	132.9	4.95	0.79
			8	3	160.5	3.06	0.69
4	2 week	CCl4 1 mL/kg b.w.	6	3	135.0	4.77	0.74
			8	3	171.6	3.10	0.70
5	1 week	FA 200 mg/kg b.w.	7	3	151.1	3.13	1.04
			8	3	167.6	3.12	0.75
6	2 week	FA 200 mg/kg b.w.	6	3	144.1	3.12	1.06
			8	3	164.0	3.08	0.78

^a Mean

Table 2
Final Incidence, multiplicity and histological classification of liver tumors

Sex	Treatment	No of mice	Hepatocellular Adenoma		Hepatocellular Carcinoma		Total	
			Incidence (%)	Multiplicity (no./mouse)	Incidence (%)	Multiplicity (no./mouse)	Incidence (%)	Multiplicity (no./mouse)
♂	Basal Diet Nr12(+/+)	18	4 (22)	0.28 ± 0.57	1 (6)	0.11 ± 0.47	4 (22)	0.39 ± 0.98
	Basal Diet Nr12(+/-)	17	1 (6)	0.06 ± 0.24	1 (6)	0.06 ± 0.24	2 (12)	0.12 ± 0.33
	Basal Diet Nr12(-/-)	19	2 (11)	0.16 ± 0.50	1 (5)	0.11 ± 0.46	3 (16)	0.26 ± 0.65
	300 ppm IQ Nr12(+/+)	17	1 (6)	0.12 ± 0.49	7 (41) ^{a)}	0.41 ± 0.51	7 (41)	0.53 ± 0.80
	300 ppm IQ Nr12(+/-)	17	5 (29)	0.53 ± 1.23	6 (35) ^{a)}	0.41 ± 0.62 ^{a)}	9 (53) ^{a)}	0.94 ± 1.68
	300 ppm IQ Nr12(-/-)	15	4 (27)	0.33 ± 0.62	10 (67) ^{b)}	1.13 ± 0.99 ^{b)e)}	11 (73) ^{b)}	1.47 ± 1.13 ^{b)e)}
♀	Basal Diet Nr12(+/+)	17	0 (0)	0.00 ± 0.00	0 (0)	0.00 ± 0.00	0 (0)	0.00 ± 0.00
	Basal Diet Nr12(+/-)	20	0 (0)	0.00 ± 0.00	0 (0)	0.00 ± 0.00	0 (0)	0.00 ± 0.00
	Basal Diet Nr12(-/-)	19	0 (0)	0.00 ± 0.00	0 (0)	0.00 ± 0.00	0 (0)	0.00 ± 0.00
	300 ppm IQ, Nr12(+/+)	18	4 (22)	0.39 ± 0.78 ^{a)}	2 (11)	0.28 ± 0.96	4 (22)	0.67 ± 1.57
	300 ppm IQ Nr12(+/-)	20	7 (35) ^{b)}	0.40 ± 0.60 ^{b)}	3 (15)	0.70 ± 1.87 ^{b)}	7 (35) ^{b)}	1.10 ± 2.31 ^{a)}
	300 ppm IQ Nr12(-/-)	19	6 (32) ^{b)}	0.63 ± 1.12 ^{a)}	8 (42) ^{b)e)}	0.53 ± 0.70 ^{b)}	11 (58) ^{b)e)}	1.16 ± 1.42 ^{b)}

a) p<0.05 b) p<0.01 vs Basal Diet, Respective Genotype
c) p<0.05 vs 300 ppm IQ, Nr12(+/+)

Table 3

Incidence of other preneoplastic and neoplastic lesions (Male)

Organs/Findings	No of animals	Basal Diet, Nrf2(+/+)	Basal Diet, Nrf2(+/-)	Basal Diet, Nrf2(-/-)	300ppm IQ, Nrf2(+/+)	300ppm IQ, Nrf2(+/-)	300ppm IQ, Nrf2(-/-)
Fore stomach	18		17	19	17	17	15
Squamous cell hyperplasia	0	0	0	0	1 (6%)	8 (47%) ^{b) d)}	7 (47%) ^{b) d)}
Papilloma	0	0	0	0	1 (6%)	4 (24%) ^{a)}	3 (20%)
Squamous cell carcinoma	0	0	0	0	1 (6%)	2 (12%)	0
Lung							
Alveolar epithelial hyperplasia	1 (6%)	1 (6%)	0	0	2 (12%)	0	0
Adenoma	0	0	0	0	0	1 (6%)	1 (7%)
Adenocarcinoma	2 (11%)	0	4 (21%)	0	1 (6%)	0	2 (13%)
Liver							
Cholangiocellular adnoma	0	0	0	0	0	0	1 (7%)
Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	1 (7%)
Spleen							
Hemangioma	0	0	1 (5%)	0	0	0	0
Kidney							
Mastocytoma	0	0	0	0	0	1 (6%)	0
Preputial gland							
Adenoma	0	0	1 (5%)	0	0	0	0
Subcutaneous tissue							
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	1 (6%)	0
Leukemia/malignant lymphoma	0	1 (6%)	2 (11%)	0	0	2 (12%)	1 (7%)

a) p<0.05, b) p<0.01 vs Basal Diet, Respective Genotype
c) p<0.05 d) p<0.01 vs 300 ppm IQ, Nrf2(+/+)

Table 4

Incidence of other preneoplastic and neoplastic lesions (Female)

Organs/Findings	Basal Diet, Nr12(+/+)		Basal Diet, Nr12(+/-)		Basal Diet, Nr12(-/-)		300ppm IQ, Nr12(+/+)		300ppm IQ, Nr12(+/-)		300ppm IQ, Nr12(-/-)	
	No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals	
Forestomach	17		20		19		18		20		19	
Squamous cell hyperplasia	0		0		0		6 (33%) ^{a)}		11 (55%) ^{b)}		8 (42%) ^{b)}	
Papilloma	0		0		0		4 (22%)		4 (20%)		4 (21%)	
Squamous cell carcinoma	0		0		0		0		1 (5%)		1 (5%)	
Lung												
Alveolar epithelial hyperplasia	0		1 (5%)		1 (5%)		1 (6%)		1 (5%)		0	
Adenoma	1 (6%)		0		0		0		0		0	
Adenocarcinoma	1 (6%)		3 (15%)		0		0		0		0	
Liver												
Histiocytic sarcoma	0		0		1 (5%)		0		0		0	
Spleen												
Histiocytic sarcoma	0		0		0		0		1 (5%)		0	
Leukemia/malignant lymphoma	0		0		1 (5%)		1 (6%)		2 (10%)		3 (16%)	

a) p<0.05, b) p<0.01 vs Basal Diet, Respective Genotype

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

肝中期発がん試験法を用いた食品中化学物質の相互作用の影響に関する研究

分担研究者 白井智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学教授

研究要旨 MeIQx を代謝活性化する CYP1A2 誘導物質である *caffeine* を MeIQx と同時投与し、化学物質の相互作用を検討したところ、*caffeine* は MeIQx 活性化酵素 CYP1A2 および NAT2 を誘導したものの、MeIQx 発癌に対する明らかな作用は見いだされなかった。そこでその原因を検討すべく、網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果周囲肝細胞に特異的な p21 の発現亢進と MeIQx 投与による CDK4 発現亢進を *caffeine* が抑制するという結果が得られ、*caffeine* の Sdc2 発現抑制を介した細胞増殖抑制作用により発がん増強が減弱されたものと考えられた。

A 研究目的

食品中には無数の化学物質が含まれており、ヒトは多数の化学物質に暴露されている。それらの物質がいかなる相互作用、複合作用が体内で起こっているかはそれらの発がん性を考える上で重要な課題であるが、殆ど研究されていないのが現状である。本研究は、食品中の化学物質の発がん作用に対する複合作用を検索する一つのモデルとして、加熱調理した肉類などに含まれる MeIQx と、茶類やコーヒー等様々な飲料に含まれ、薬物代謝酵素誘導物質として知られる *caffeine* とを同時投与した場合、MeIQx の発がん性がいかに変化するかを検索した。その結果、*caffeine* は MeIQx 活性化酵素 CYP1A2 および NAT2 を誘導したものの、MeIQx 発癌に対する明らかな作用は見いだされなかった。そこでその理由を解明すべく、どのような遺伝子変化が生じているか

を詳細に検討した。

B 研究方法

動物は F344 雄ラット 6 週令を用い、3 群に分け、中期肝発がん性試験法に従い DEN 投与後、1 群には MeIQx (0.01%、混餌)、2 群には MeIQx と *caffeine* (0.1%、飲水)、3 群には *caffeine* を 6 週間投与した。実験開始 3 週後に肝部分切除を行い、実験期間 8 週で剖検屠殺を行った (図 1)。得られた肝臓を用い、肝の前癌病変である GST-P 陽性細胞巢の発生を免疫組織学的手法により解析した。GST-P 陽性細胞巢の発生については画像解析装置を用いて定量的に計測した。また、GST-P 陽性細胞巢あるいはその周囲肝細胞をレーザーマイクロダイセクション法にて選択的に組織を採取し、RNA を抽出して遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析には肝発がんへの関与が示唆される 126

遺伝子についてオリンパス PAM マイクロアレイシステム（オリンパス）を用い、さらに詳細な検討には定量的 PCR を行った。

（倫理面への配慮）

本研究における倫理面への配慮については、本大学における実験動物倫理委員会の承諾を得たものであり、動物愛護の精神を十分に考慮にいれ行われたものである。

C 研究結果

MeIQx 単独投与群では、GST-P の単位面積あたりの数(No/cm^2)と面積(mm^2/cm^2)はそれぞれ 101 ± 34 と 0.6 ± 0.3 であり、MeIQx の代謝活性化酵素である CYP1A2 を誘導する caffeine の同時投与では 94 ± 2.8 (no/cm^2)、 0.6 ± 0.2 (mm^2/cm^2) と明らかな発がん修飾作用はみられなかった。（表 1）また、GST-P 陽性細胞巢あるいはその周囲肝細胞における遺伝子発現解析において CYP1A2 および NAT2 の発現亢進が caffeine 投与の周囲肝細胞に認められた。（図 2）そこで、周囲肝組織での変化をマイクロアレイを用いて検索したところ 27 の遺伝子で変化が認められた。（表 2）これらの遺伝子のうち Syndecan2 (Sdc2) は cell cycle を介した増殖に関与することが報告されており、さらに cell cycle に関与する遺伝子発現を検討したところ、MeIQx と caffeine を同時投与したときの周囲肝細胞特異的な p21 の発現亢進と MeIQx 投与による CDK4 発現亢進を caffeine が抑制するという結果が得られた。（図 3）

D 考察

MeIQx の発がんへの同時投与物質による修飾作用は、単に代謝活性化酵素の誘導のみ

では説明できないことが明らかとなった。そこでそのメカニズムの解明を当研究室とオリンパスにより共同開発された定量性に優れる 3D-マイクロアレイを用い、レーザーマイクロダイセクション法による選択的組織採材によって詳細な検討を行ったところ、Sdc2 という遺伝子が得られた。Sdc2 は大腸癌でがん細胞の接着および cell cycle を介した増殖に関与することが報告されており、本実験においては MeIQx による Sdc2 発現上昇を caffeine が抑制するという結果であった。そこで cell cycle に関与する遺伝子発現を検討したところ、MeIQx と caffeine を同時投与したときの周囲肝細胞特異的な p21 の発現亢進と MeIQx 投与による CDK4 発現亢進を caffeine が抑制するという結果が得られた。これらの結果により、CYP1A2 により代謝活性化された MeIQx による発がん性亢進が caffeine の Sdc2 発現抑制を介した細胞増殖抑制作用により減弱されたものと考えられ、CYP1A2 誘導物質である caffeine が MeIQx 発がんに対する明らかな作用を示さなかった一序であると考えた。さらに、肝発がんには前がん病変部位のみでなくその周囲肝細胞の遺伝子発現変化も重要であることが示唆された。

E 結論

投与物質の発がん修飾作用を予測するにはその代謝活性化に関わる遺伝子群のみならず、種々の遺伝子の発現変化を網羅的に解析する必要がある事が示唆された。

F 健康危惧情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- Takeshita, F, Ogawa, K, Asamoto, M, Shirai, T Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine Cancer Lett, 194 25-35, 2003
- Akagi, K, Sano, M, Ogawa, K, Hirose, M, Goshima, H, Shirai, T Involvement of toxicity as an early event urinary bladder carcinogenesis induced by phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, and analogues in F344 rats Toxicol Pathol 31 388-396, 2003
- Cheng, J-L, Futakuchi, M, Ogawa, K, Iwata, T, Kasai, M, Tokudome, S, Hirose, M, Shirai, T Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawley rats Cancer Lett 196 161-168, 2003
- Hokaiwado, N, Asamoto, M, Cho, Y-M, Tsuda, H, Shirai, T Lack of effect of human *c-Ha-ras* proto-oncogene overexpression on prostate carcinogenesis in *probasin/SV40 T antigen* transgenic rats Cancer Sci, 94 1042-1045, 2003
- Inaguma, S, Takahashi, S, Ohmishi, H, Suzuki, S, Cho, Y-M, Shirai, T High susceptibility of the ACI and spontaneously hypertensive rat (SHR) strains to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) prostate carcinogenesis Cancer Sci, 94 974-979, 2003
- Ito, A, Asamoto, A, Hokaiwado, N, Shirai, T Regulation of cell proliferation by induction of p21/WAF1 in rat bladder carcinoma cells using the Cre-loxP system Cancer Lett, 193 183-188, 2003
- Sugiura, S, Ogawa, K, Hirose, M, Takeshita, F, Asamoto, M, Shirai, T Reversibility of proliferative lesions and induction of non-papillary tumors in rat urinary bladder treated with phenylethyl isothiocyanate Carcinogenesis, 24 547-553, 2003
- Yoshida, M, Shimamoto, T, Katashima, S, Shirai, T, Nakae, D, Watanabe, G, Taya, K, Maekawa, A Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats J Toxicol Pathol, 16 259-266, 2003
- 二口 充、朝元誠人、小川久美子、白井智之 ラット肝癌肺転移モデルを用いた肺転移規定因子の検索、名古屋市立大学医学会雑誌、54(1) 63-69、2003。
- 白井智之、二口 充 動物の自然転移モデル、日本臨床、61(8) 44-48、2003。
- Futakuchi, M, Ogawa, K, Tamano, S,

Takahashi, S, Shirai, T Suppression of metastasis by nuclear factor KB inhibitors in an *in vivo* lung metastasis model of chemically induced hepatocellular carcinoma *Cancer Sci* 95 18-24, 2004

Hokaiwado, N, Asamoto, M, Tsujimura, K, Hirota, T, Ichihara, T, Satoh, T, Shirai, T Rapid analysis of gene expression changes caused by liver carcinogens and chemopreventive agents using a newly developed three-dimensional microarray system *Cancer Sci* 95 123-130, 2004

Tsutsumi, T, Ichihara, T, Kawabe, M, Yoshino, H, Asamoto, M, Suzuki, S, Shirai, T Renal toxicity induced by folic acid is associated with the enhancement of male reproductive toxicity of di(n-butyl)phthalate in rats *Reprod Toxicol* 18 35-42, 2004

Suzuki, S, Asamoto, M, Tsujimura, K, Shirai, T Specific differences in gene expression profile revealed by cDNA microarray analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) immunohistochemically positive rat liver foci and surrounding tissue *Carcinogenesis* 25 439-443, 2004

Hikosaka, A, Asamoto, M, Hokaiwado, N, Kato, K, Kuzutani, K, Kohri, K, Shirai, T Inhibitory effects of soy isoflavones on rat prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) *Carcinogenesis* 25 381-387, 2004

Orta, S, Hirose, M, Takahashi, S, Imaida, K, Ito, N, Shudo, K, Ohigashi, H, Murakami, A, Shirai, T Modifying effects of 1'-acetoxychavicol acetate (ACA) and the novel Synthetic retinoids Re-80, Am-580 and Am-55P in a two-stage carcinogenesis model in female rats *Toxicol Pathol* 32 250-257, 2004

2 学会発表

二口 充、高橋青志郎、朝元誠人、白井智之 ラット前立腺癌骨浸潤モデルを用いた bisphosphonate の抑制効果、第 92 回日本病理学会総会、福岡、2003 年 4 月 23 日-25 日。

鈴木周五、朝元誠人、白井智之 GST-P 陽性細胞巢からの RNA 抽出と cDNA array への応用、第 92 回日本病理学会総会、福岡、2003 年 4 月 23 日-25 日。

朝元誠人、外岩戸尚美、白井智之 がん予防物質による遺伝子発現変化、第 10 回日本がん予防研究会、北海道、2003 年 6 月 26 日-25 日。

白井智之 ラット前立腺癌モデルを用いてのイソフラボンによる化学予防、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003 年 9 月 25 日-27 日。

伊藤 綾、朝元誠人、外岩戸尚美、稲熊真悟、白井智之 アポトーシス関連遺伝子としての Tbx3、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003 年 9 月 25 日-27 日。