

2004 61123A

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

畜水産食品中の残留動物用医薬品の安全性に関する研究

平成16年度 総括・分担報告書

主任研究者 三森 国敏

平成17(2005)年 3月31日

目 次

I. 研究報告書		
畜水産食品中の残留動物用医薬品の安全性に関する研究	-----	1
三森国敏		
II. 分担研究報告書		
1. 非遺伝毒性発癌物質の発がんメカニズムに関する研究	-----	7
三森 国敏		
2. 網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析	-----	13
渋谷 淳		
3. 動物用医薬品の発がん過程における酸化ストレスの関与	-----	26
梅村 隆志		
4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究	-----	30
九朗丸 正道		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	58

畜水産食品中の残留動物用医薬品の安全性に関する研究

主任研究者 三森 国敏 東京農工大学大学院共生科学技術研究部 動物生命科学部門 教授

研究要旨

本研究では、非遺伝毒性発がん物質として分類されている動物用医薬品の発がん機序を明らかにし、その安全性評価における重要なデータを提供する事を目的として、以下の研究を行った。

昆虫成長調節剤のジサイクラニル（DC）については、その肝発がん機序への酸化的ストレスの関与を明らかにするため、マウスを用いた二段階肝発がんモデルでの 13 週間混餌投与実験を行い、その肝について詳細な検索を行った結果、前腫瘍性病変陽性巣の増加、および酸化的ストレス関連遺伝子の発現ならびに酸化的損傷マーカーに有意な上昇が認められ、DC の発がん機序には酸化的ストレスを介した二次的な DNA 損傷が一部関与する可能性が示唆された。

ラット甲状腺に対し発がん性を示すサルファ剤のサルファジメトキシシン（SDM）については、イニシエーション処理を施した F344 ラットに SDM を 4 週間飲水投与し、その甲状腺についてマイクロレイによる遺伝子発現解析を開始した。その結果、発現増加を示したものには細胞回転や細胞分裂に関連する複数の遺伝子、発現減少を示したものには細胞増殖抑制やアポトーシスに関連する複数の遺伝子が同定された。

イニシエーション作用ならびに発がん機序への酸化ストレスの関与の可能性が示唆されている抗菌剤のフルメキン（FL）については、*gpt delta* マウスへ 13 週間混餌投与し、その肝における酸化的 DNA 損傷と、それに伴う *in vivo* 遺伝毒性についての評価を実施した結果、酸化的 DNA 損傷ならびに変異誘発作用は認められず、FL の発がん機序への酸化的ストレスの関与の可能性ならびに変異誘発作用は明らかすることはできなかった。

特定危険部位に指定され全て廃棄される状況にある牛脊柱の資源活用および安全面への効果を目的として、と畜場における脊柱からの背根神経節完全除去の可能性について検討を開始した。本年度は背根神経節の形態計測および脊柱からの背根神経節の除去率について形態学的解析を行った。その結果、現在の技術では平均して全背根神経節の約 80% の除去がと畜場で可能であることが判明したが、現時点の技術では 100% の除去は困難であるものと推測された。

分担研究者 三森 国敏
東京農工大学大学院 共生科学技術研究部 動物生命科学部門 教授

分担研究者 九朗丸 正道
東京大学大学院農学生命研究科 獣医解剖学教室 教授

分担研究者 渋谷 淳
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

分担研究者 梅村 隆志
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

A. 研究目的

国際食糧農業機関（FAO）と世界保健機構（WHO）合同食品規格委員会では、畜産食品中に残留する動物用医薬品（動物薬）の毒性学的評価に基づく残留基準値

(MRL)の策定が進行中である。我が国においてもこのFAO/WHOの勧告を考慮し、輸入食品に含まれるこれらの動物薬についてのMRLの設定作業が進められている。その規格設定のための基本となる種々の安全性に関する情報を得るため、毒性上問題となっている動物薬の毒性・発がん性に関する研究が不可欠である。FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(JECFA)では、今までに発がん性試験では陽性を示したが、遺伝毒性試験では陰性であった動物薬を非遺伝毒性発がん物質と判定し、許容一日摂取量(ADI)を設定されているものがある。しかし、その発がん機序は必ずしも明確にはされておらず、消費者への食の安全は完全には担保されているとはみなしがたい。本研究の目的は、非遺伝毒性発がん物質として分類されている当該動物用医薬品の発がん機序を明らかにし、その安全性評価における重要なデータを提供する事にある。

ジサイクラニル(DC)やフルメキン(FL)は、マウスの肝に対して発がん性を示すが、遺伝毒性を示さない非遺伝毒性発がん物質に包括されている。その発癌機序に関する申請者の今までの研究では、DCおよびFL投与例でのマイクロアレイ解析により、発がん過程における酸化ストレスの関与を示唆する遺伝子発現クラスターを同定している。酸化ストレスは酸化DNA損傷を引き起こす可能性があり、発がんへの関与が注目されている。また、非遺伝毒性発癌物質と評価されているサルファジメトキシシン(SDM)もラットないしマウスの肝ないし甲状腺に腫瘍を誘発し、その発がん機序には、抗甲状腺物質であるSDMがTSHレベルを高めることにより甲状腺発がんを促進させることを申請者らが見出しているが、その過程での分子機序も不明なままである。

本年度は、DCおよびFLについては、肝発がん機序への酸化ストレスおよび酸化DNA損傷の関与の可能性を検索した。また、SDMについては甲状腺発がんに焦点を絞り、その発がん過程早期に特異的変動を示す遺伝子群の発現解析を行った。

また、牛脊柱内に存在する背根神経節が特定危険部位に指定されたことにより、これまで資源として有効活用されていた牛の脊柱が、現在すべて廃棄される状況となり、廃棄に要する経費は膨大なものとなっている。もし、と畜場において背根神経節が脊柱から完全に分離できる方法が確立できれば、その効果は経済的にも資源の活用という面からも多大なものになると考えられる。申請者は一昨年より国内外初めての取り組みとして本研究を開始し、と畜場との協力により、と畜場において背根神経節の脊柱からの除去が80%程度まで可能であるという成果を得ている。本研究は、背根神経節の除去・分離技術の改善・向上、およびそのための基礎データを蓄積することを目的として実施し、ヒトへの食の安全における危険度評価の一助としたい。本年度は、基礎データ収集として背根神経節の形態計測、および脊柱からの背根神経節の除去率について形態学的解析を行った。

B. 研究方法

DCの肝発がん機序への酸化ストレスの検索として、マウスを用いた二段階肝発がんモデルに13週間DCを混餌投与し、その肝について、病理組織学的検索、代謝ならびに酸化ストレス関連遺伝子の発現解析、および酸化損傷マーカーの測定を行った。

SDMについては、N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)によりイニシエーション処理を施したF344ラットに4週間飲水投与し、その甲状腺について、病理組織学的検索、およびマイクロアレイを用いた発がん早期過程での遺伝子発現解析を行った。

FLについては、雌雄の*gpt delta*マウスへ13週間混餌投与し、その肝DNAについて酸化DNA損傷マーカーの測定、および*in vivo*遺伝毒性評価として*gpt*アッセイならびにSpi⁻アッセイを実施した。

牛の背根神経節の形態計測は、2003年7月から2005年1月までにと畜場から得た脊髄を取り除いた脊柱について、背根神経節の数、重量、神経根の数、および硬膜か

らの背根神経節までの長さを測定した。背根神経節の除去率については、同由来試料の付随背根神経節を肉眼的に評価し、C1からS5までの背根神経節の数32(枝肉当たり：半頭分)に対する割合を算出した。(倫理面への配慮)

本研究では、投与実験は混餌あるいは混水による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限にとどめている。動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺するため、動物に与える苦痛は最小限に抑えている。また、動物飼育、管理に当たっては、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い倫理規定および米国国立衛生研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従う。

牛脊柱からの背根神経節除去に関する研究については、動物実験は行わず、と畜場の協力を得て、作業過程で除去された牛の硬膜を研究材料として使用することから、倫理面への配慮は特に必要としないと考える。

C. 研究結果

DCについては、投与群においてマウス肝の前腫瘍性病変マーカーであるgamma-glutamyltransferase 陽性巣の数/面積が増加し、代謝ならびに酸化ストレスに関連した遺伝子の遺伝子発現、肝組織中過酸化脂質レベル、および肝DNA中酸化DNA損傷マーカーである8-hydroxy-deoxyguanosine (8-HdG)レベルの有意な上昇が認められた。

SDMについては、甲状腺機能低下を示す病理変化(びまん性濾胞上皮過形成)と共に、前がん病変である限局性濾胞上皮過形成が用量に依存して認められた。マイクロアレイ解析により、発がん過程特異的に発現の増減する遺伝子数は、1000 ppmで2倍以上増加するものが86遺伝子、0.5倍以下に減少するものが110遺伝子であった。そのうち用量に関連して増加(2倍以上)ないし減少(0.5倍以下)したものは、DHPN+62.5 ppm SDM以上の群とともに各1遺伝子、DHPN+250 ppm SDM以上の群でそれぞれ14遺伝子、7遺伝子

であり、発現増加したものは細胞回転や細胞分裂に関連する複数の遺伝子、発現減少したものは細胞増殖抑制やアポトーシスに関連する遺伝子であった。

FLについては、雌雄共にフルメキン投与群で有意な体重減少が認められ、雄では肝比重量、雌では肝重量および比重量の有意な増加が観察された。肝DNA中の8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG)レベルは雌雄共に対照群と投与群の間で差は認められなかった。*in vivo* mutation assayの結果、*gpt* 遺伝子突然変異頻度、*red/gam* 遺伝子突然変異(Sp-)頻度ともに、雌雄の投与群で対照群に比べて有意な増加は観察されなかった

牛の背根神経節の形態学的解析では、背根神経節の個数は各脊髄神経に概ね1個であったが、腰神経、仙骨神経では複数の場合も散見され、頸神経、胸神経でもまれに複数認められた。背根神経節の重量はC7とL6を双峰としてその前後で目立って大きく、仙骨部の下位では小さかった。硬膜から背根神経節までの背根の長さは、上位の頸神経で短く、腰神経以降次第に長くなり、特に仙骨神経では顕著に長く100 mmに達するものもあった。脊柱からの背根神経節の除去率に関しては、2003年7月の作業開始から同年10月までに飛躍的に向上し、その後漸増して2004年3月には80%に達した。除去成績の低い部位は、下位の胸神経の背根神経節、下位の腰神経の背根神経節、仙骨神経の背根神経節であった。

D. 考察

DCについては、早期発がん過程におけるこれまでの研究で、DC投与により代謝、酸化ストレス、およびDNA損傷・修復関連遺伝子の変動する知見が得られている。今回の研究では、DCがマウス肝に対し腫瘍誘発を増強する可能性が示唆され、また、リポフスチンの沈着がDCを投与した群にのみ認められ、これに加え、肝組織中TBARSレベルも上昇していたことから、DCは肝に対し器質的な酸化損傷を引き

起こすことが明らかになった。また、遺伝子レベルの検討においても、DC 投与により代謝および酸化ストレスに関連した遺伝子が発現上昇を示し、更には、肝組織 DNA 中の 8-OHdG レベルにも有意な上昇が認められたことから、DC は酸化ストレスを介した二次的な酸化 DNA 損傷を引き起こす可能性が示唆され、これが DC による肝発がん機序の一部関与している可能性が示唆された。

SDM については、今回の研究により甲状腺発がんの早期過程に関与すると考えられる遺伝子を複数得ることができ、SDM による非遺伝毒性発がん機序を解明する端緒を開いた。今後は、SDM 投与後 10 あるいは 15 週で発生した腺腫、腺がんとその周囲組織での発現遺伝子のプロファイルを、独自に開発したパラフィン包埋微量組織でのマイクロアレイ解析法を利用し、腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を進めたい。

FL については、肝重量が雌雄共に増加しており、本実験条件下において FL がマウス肝臓に何らかの影響を及ぼしていることが確認された。しかし、肝 DNA 中の 8-oxodG レベルを測定した結果、雌雄ともに対照群との間に差は認められず、0.4% FL を 13 週間混餌投与しても、マウス肝 DNA に酸化損傷を生じ得ないことが示唆された。また、FL 投与による *gpt* 遺伝子への変異誘発は認められず、本実験条件下では肝細胞 DNA 中のその他の遺伝子に対する点突然変異誘発の可能性は低いと考えられた。今回の実験結果は、FL のイニシエーション作用はもしあるとしても極めて弱いものであることを示唆している。

本研究では背根神経節の体積及び密度は測定していないが、印象として、大きい背根神経節ほど重く、組織学的観点からも背根神経節の密度は脊髄神経によって差が大きい可能性は低いと考えられる。神経根は多数の根糸からなる太いものもあれば、比較的少数の根糸からなる細いものも

あった。除去率向上については、除去すべき背根神経節の位置が明確になってきたこと、および使用するナイフの改良によると思われる。腰部下位および仙骨部の背根神経節が除去されにくいのは、背根の硬膜から背根神経節までの距離が長く、殊に仙骨部の背根神経節は仙骨の外に位置するので、背根神経節から中枢側で脊髄神経を切断してしまう傾向にあるためと推察された。

E. 結論

DC を 1500 ppm 含有した飼料を二段階肝発がんモデルマウスに 13 週間投与し、肝組織における遺伝子発現解析ならびに酸化損傷マーカーの測定した結果、DC による肝腫瘍の発生増強が示唆され、その機序の一部には酸化ストレスを介した二次的な DNA 損傷が関与する可能性が強く示唆された。

ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて、SDM による発がん過程特異的な発現変動遺伝子を用量反応性の観点から選別した結果、発がん過程の早期には、細胞分裂ないし細胞回転関連蛋白が機能亢進し、細胞増殖抑制制御や抗アポトーシス制御の破綻する現象が生じることが示唆された。

フルメキンを 0.4% の濃度の混じた飼料を 13 週間、雌雄の *gpt delta* マウスに与え、肝 DNA 中の 8-oxodG レベル、*gpt* 遺伝子ならびに *red/gam* 遺伝子の突然変異誘発の頻度を検索したところ、いずれも有意な変化は観察されず、フルメキンはマウス肝発がん過程において、プロモーターとして関与している可能性が示唆された。

牛の背根神経節の形態計測の結果、背根神経節の重量は第 7 頸神経や第 6 腰神経及びそれらの前後で大きく、下位の仙骨神経で小さかった。硬膜から背根神経節までの背根の長さは、頸神経で短く、仙骨神経で長かった。除去率については、2004 年 3 月に 80% を超えてから停滞していた。除去成績の低い部位は、下位の胸神経の背根

神経節、下位の腰神経の背根神経節、仙骨神経の背根神経節であった。100%の除去は現時点の技術では困難であると推測される。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 投稿論文

Moto, M., Okamura, M., Muto, T., Kashida, Y., Machida, N. and Mitsumori, K.: Molecular pathological analysis on the mechanism of liver carcinogenesis in dicyclanil-treated mice. *Toxicology*, 207: 419-436, 2005.

Shibutani, M. and Uneyama, C.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells. In: Murray, G.I., Curran, S. (Eds). *Laser capture microdissection and its applications*. *Methods Mol. Biol.*, Totowa: Humana Press, 11-25, 2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Kato, N., Fujita, H., Lee, K.Y., Takigami, S., Mitsumori, K. and Hirose, M.: Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. *J. Histochem. Cytochem.*, 52: 903-913, 2004.

Umemura, T., Kitamura, Y., Kanki, K., Maruyama, S., Okazaki, K., Imazawa, T., Nishimura, T., Hasegawa, R., Nishikawa, A. and Hirose, M.: Dose-related changes of oxidative stress and cell proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate (KBrO₃). *Cancer Sci.*, 95: 393-398, 2004.

Kanki, K., Nishikawa, A., Masumura, K., Umemura, T., Imazawa, T., Kitamura, Y.,

Nohmi, T. and Hirose, M.: In vivo mutational analysis of liver DNA in *gpt* delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol. Carcinog.*, 42: 9-17, 2005.

2. 学会発表

檜田陽子, 高橋明子, 新井克彦, 町田登, 三森国敏: フルメキンのマウス肝発がんにおけるプロモーション作用の検討, 第137回日本獣医学会学術集会、藤沢、2004年4月

本光喜、梅村隆志、岡村美和、檜田陽子、町田登、三森国敏: マウス二段階発がんモデルを用いた dicyclanil による肝発がん機序の分子病理学的解析、第31回日本トキシコロジー学会、大阪、2004年7月

本光喜、梅村隆志、岡村美和、檜田陽子、町田登、三森国敏: Dicyclanil のマウス肝発がん機序の分子病理学的解析、第19回発癌病理研究会、諏訪、2004年8月

本光喜、梅村隆志、岡村美和、檜田陽子、町田登、三森国敏: Dicyclanil によるマウス肝腫瘍誘発における酸化ストレスの関与、第21回日本毒性病理学会、浜松、2005年1月

Moto M, Umemura T, Okamura M, Kashida Y, Machida N, and Mitsumori K.: Molecular pathological analysis of hepatocarcinogenesis in mice treated with dicyclanil. *Society of Toxicology, 44th Annual Meeting, New Orleans, March, 2005*

渋谷淳、李京烈、高木広憲、加藤奈津美、藤田春香、瀧上周、広瀬雅雄: メタカーン固定法を利用したパラフィン包埋組織でのリアルタイム RT-PCR とマイクロアレイによる定量的遺伝子発現解析、第137回日本獣医学会学術集会、藤沢、2004年4

月

渋谷淳、李京烈、井上薫、黒岩敬子、広瀬雅雄：メタカーン固定パラフィン包埋組織の固定・脱水及び保存条件の検討、第 21 回日本毒性病理学会、浜松、2005 年 1 月

梅村隆志、北村泰樹、神吉けい太、今沢孝喜、児玉幸夫、伊東健、山本雅之、西川秋佳、広瀬雅雄：Nrf2 欠損マウスの肝発がん物質ペンタクロロフェノールに対する感受性、第 31 回日本トキシコロジー学会、大阪、2004 年 7 月

梅村隆志、西川秋佳、神吉けい太、石井雄二、今沢孝喜、広瀬雅雄：ペンタクロロフェノールのジエチルニトロサミン誘発マウス肝および胆管発がん促進作用に対する緑茶の予防効果、福岡、第 63 回日本癌学会、2004 年 9 月

梅村隆志、石井雄二、西川秋佳、児玉幸夫、神吉けい太、黒岩有一、伊東健、山本雅之、広瀬雅雄：老齢 Nrf2 欠損マウスにおける

自然発生腫瘍性病変、第 21 回日本毒性病理学会、浜松、2005 年 1 月

Umemura, T., Hasegawa, R., Kanki, K., Kitamura, Y., Nishikawa, A. and Hirose, M.: Green Tea infusion prevents dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on hepato- and cholangio-carcinogenesis of mice induced by diethylnitrosamine. Society of Toxicology, 44th Annual Meeting, New Orleans, March, 2005.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書（平成 16 年度）

畜水産食品中の残留動物用医薬品の安全性に関する研究

—非遺伝毒性発がん物質の発がんメカニズム解明に関する研究—

分担研究者 三森 国敏 東京農工大学大学院共生科学技術研究部 動物生命科学部門 教授

研究要旨

非遺伝毒性発がん物質と評価されている動物用医薬品ジサイクラニル（DC）の発がんメカニズム解明の一環として、発がんメカニズムへの酸化的ストレスの関与を検索した。1500 ないし 0 ppm の DC を正常マウスおよび dimethylnitrosamine（DMN）によるイニシエーション処置を施した 2/3 肝部分切除（二段階発がんモデル）マウスに 13 週間混餌投与し、その肝について、病理組織学的検索、代謝ならびに酸化的ストレス関連遺伝子の発現変動、酸化的損傷マーカーの測定を行った。その結果、DC の投与により、マウス肝の前腫瘍性病変マーカーである gamma-glutamyltransferase（GGT）陽性巣の数/面積、代謝ならびに酸化的ストレスに関連した遺伝子の発現、肝組織中過酸化脂質レベル、および肝 DNA 中酸化的 DNA 損傷マーカーである 8-hydroxy-deoxyguanosine（8-OHdG）の上昇が認められた。以上の結果から、DC がマウス肝腫瘍の発生頻度を増強する可能性が示され、その肝発がんメカニズムの一部には、酸化的ストレスを介した二次的な DNA 損傷が関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

国際食糧農業機関（FAO）と世界保健機構（WHO）合同食品規格委員会では、畜産食品中に残留する動物用医薬品（動物薬）の毒性学的評価に基づく残留基準値（MRL）の策定が進行中である。我が国においても、この FAO/WHO の勧告を考慮し、輸入食品に含まれるこれら動物薬についての MRL の設定作業が進められており、その規格設定の基本となる安全性に関する情報として、それらの毒性上問題となっている毒性・発がん性に関する知見の集積が不可欠である。現在までのところ、FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会（JECFA）において、発がん性試験で陽性を示したが遺伝毒性試験で陰性であった動物薬については非遺伝毒性発がん物質と判定し、許容一日摂取量（ADI）を設定している事例がある。しかし、その発がん機序は必ずしも明確で

はないため、消費者への食の安全は完全に担保されているとはみなしがたい。

ジサイクラニル（DC）は、昆虫成長調節剤として羊に用いられる動物用医薬品であり、その母化合物および代謝物が、微量ながら体内に残留する事が報告されている。DC の発がんメカニズムに関する今までの研究では、発がん性試験で陽性が認められた用量の DC を投与したマウス肝におけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、代謝および酸化的ストレスに関与する遺伝子クラスターの発現変動が認められ、DC によるマウス肝発がんに関与する酸化的ストレスの関与を示唆するデータが得られている。酸化的ストレスは、酸化的 DNA 損傷を引き起こすことが報告されており、発がんへの関与が目されている。そこで本年度は、マウス二段階肝発がんモデルを用い、DC によるマウス肝発がんへの酸化的ストレスの関

与を更に明確にすることを目的として実験を行った。

B. 研究方法

実験デザインを Fig. 1 に示す。5 週齢の雄 ICR マウス（日本エスエルシー株式会社）に 5 ないし 0 mg/kg の dimethylnitrosamine (DMN) を腹腔内投与してイニシエーション処置を施し、最終処置 1 週間後より DC の発がん用量である 1500 ないし 0 ppm を混餌投与した。混餌投与開始 2 週目に再生性の肝細胞増殖を誘導させるためエーテル麻酔下で 2/3 肝部分切除術あるいは偽手術を施し、その後 13 週間 DC の混餌投与を行った。混餌投与終了後に全生存動物をエーテルによる深麻酔下で放血屠殺して肝臓を摘出し、肝組織の一部は 10 % 中性緩衝ホルマリン溶液で固定して組織学的検索用に、一部は凍結切片用に包埋して組織化学染色用に、一部は液体窒素に凍結させ DNA、mRNA およびタンパク抽出用にそれぞれ保存した。組織学的検索は、固定生検材料を常法に従いパラフィン包埋および薄切後にヘマトキシリン・エオシン (H-E) 染色およびシュモール染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。組織学的検索として、マウス肝の前腫瘍性病変マーカーである gamma-glutamyltransferase (GGT) の組織化学染色を実施し、光学顕微鏡および画像解析により陽性反応を検索した。肝の一部から抽出した mRNA は、酸化ストレスおよび薬物代謝関連遺伝子発現の変動を確認するため、リアルタイム RT-PCR 法により確認した。また、肝 DNA については、HPLC-ECD 法により酸化 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを測定した。肝より抽出したタンパクは、脂

質過酸化レベルの指標として、チオバルビタール酸反応物質 (TBARS) を測定した。

統計解析は、各対照群と DC 投与群との間の F-t 検定、あるいは非処置対照群との Dunnett の多重比較検定をそれぞれ実施し、有意水準 5 % 以下を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究は、投与実験は混餌による経口投与が主体であり、また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い倫理規定および米国国立衛生研究所 (NIH) が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

標的臓器である肝臓の病理組織学的検索では、小葉中心性の肝細胞肥大およびリポフスチン沈着が、DC 群および DMN+DC+PH 群のほぼ全例で軽度～中等度に認められた。マウス肝における前腫瘍性病変マーカーである GGT の組織化学染色による前腫瘍性病変の検索では、GGT 陽性細胞が非処理群に比べ DC 群で増加傾向、DMN+PH 群に比べ DMN+DC+PH 群で有意な増加が認められた。更に、GGT 陽性巣の数および面積の増加は、DMN+DC+PH 群でのみ有意な増加が認められた (Table 1)。

肝組織中の代謝および酸化ストレス関連遺伝子の発現変動の結果を Fig. 2 に示す。薬物代謝第一相酵素である cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)、その補酵素である P450 oxidoreductase 1 (POR)、代謝第二相酵素で還元酵素である thioredoxin reductase 1 (TRXR1)、ラ

ジカル消去酵素である superoxide dismutase 1 (SOD1)、および酸化的 DNA 損傷の一つである 8-OHdG の修復酵素 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) の各遺伝子のほとんどが、DC 群および DMN+DC+PH 群でそれぞれ対応する対照群に比べ有意な発現上昇を示し、DMN+DC+PH 群で最も高値であった。

肝組織から抽出した DNA 中 8-OHdG レベル、抽出タンパク中 TBARS レベルの測定結果を Fig. 3 に示す。8-OHdG レベルについては、DC 群で上昇傾向、DMN+DC+PH 群で顕著で有意な上昇が認められた。また、TBARS レベルについても DMN+DC+PH 群で有意な上昇が認められた。

D. 考察

DC の発がんメカニズムに関するこれまでの我々の研究では、DC には遺伝毒性ないし肝イニシエーション作用が認められていない一方で、イニシエーション処理を施した 2/3 肝切除マウスへの DC の 7 週間投与により肝臓での GGT 陽性細胞数の有意な増加が認められている。更に、短～中期である 2 および 7 週間 DC を投与したマウスの肝において、CYP1A1、1A2、GSTs、および TRXR1 などの薬物代謝あるいは酸化的ストレスに関連した酵素の遺伝子クラスターの変動が認められ、DC によるマウス肝発がんへ酸化的ストレスの関与が示唆されている。

本年度では、DC による酸化的ストレスの関与をより明確にするため、正常マウスならびにイニシエーション処理を施した 2/3 肝切除マウスに 13 週間 DC を投与し、その肝臓中の遺伝子発現に加え、酸化的損傷についても検索した。

組織学的な前腫瘍性病変マーカーによ

る評価では、DC 投与により GGT 陽性細胞数および GGT 陽性巣の数/面積の有意な増加が認められ、DC がマウス肝に対し腫瘍誘発を増強する可能性が示唆された。また、加齢性色素であり、細胞膜脂質の過酸化により生成されるリポフスチンの沈着が DC を投与した群にのみ認められ、これに加え、肝組織中 TBARS レベルも上昇していたことから、DC は肝に対し器質的な酸化的損傷を引き起こしていることが明らかになった。遺伝子レベルの検討においても、DC 投与により代謝および酸化的ストレスに関連した遺伝子が発現上昇を示し、更には、肝組織 DNA 中の 8-OHdG レベルにも有意な上昇が認められたことから、DC は酸化的ストレスを介した二次的な酸化的 DNA 損傷を引き起こす可能性が示唆された。

8-OHdG については、これまでに塩基配列中の G を T に置換し、遺伝子変異を引き起こして発がんの一因となり得ることや、様々な実験発がんモデルを用いた多くの研究において、その発がんとの関連性が示唆されてきている。これまでの我々の研究では、DC の 2 週間投与では遺伝子損傷に関連した遺伝子群に発現変動は認められていないが、7 週間投与ではそれらカテゴリーの遺伝子に発現変動が生じてくることを報告している。本研究でも、8-OHdG に加え、その修復酵素の遺伝子 OGG1 の発現が上昇していた。これらの成績は、DC の長期間投与が、応答(修復)範囲を超えた過度の酸化的ストレスを生じ、その結果、酸化的ストレスを介した二次的な酸化的 DNA 損傷を引き起こしたものと考えられる。更には、酸化的 DNA 損傷が遺伝子変異を引き起こし、GGT 陽性巣の数・面積の増加からなる腫瘍発生の増強を示唆する結果をもたらしたものと推察され、酸化的ストレスを介

した DNA 損傷がマウス肝発がん機序の一部に關与する可能性が強く示唆された。しかしながら、DC 投与がどのようにして酸化ストレスを生じるか、DC による酸化ストレスを介した酸化 DNA 損傷がどの程度の遺伝子変異を生じるかなど詳細については未だ不明であり、酸化ストレスの原因である活性酸素種産生系への DC が及ぼす影響や、酸化ストレスに起因した DNA 損傷による塩基変異を検出することが可能である *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 遺伝毒性アッセイを用いた更なる検討が必要であると思われる。

E. 結論

DC を 1500 ppm 含有する飼料を 13 週間、二段階肝発がんモデルマウスに与え、肝組織における遺伝子発現解析ならびに酸化損傷マーカーを測定した結果、DC が肝腫瘍の発生を増強し、その機序の一部には酸化ストレスを介した二次的な DNA 損傷が關与する可能性が強く示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 投稿論文

Moto, M., Okamura, M., Muto, T., Kashida, Y., Machida, N. and Mitsumori, K.: Molecular pathological analysis on the mechanism of liver carcinogenesis in dicyclanil-treated mice. *Toxicology*, 207: 419-436, 2005.

2. 学会発表

榎田陽子、高橋明子、新井克彦、町田登、三森国敏：フルメキンのマウス肝発がん

におけるプロモーション作用の検討、137 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2004 年 4 月

本光喜、梅村隆志、岡村美和、榎田陽子、町田登、三森国敏：マウス二段階発がんモデルを用いた dicyclanil による肝発がんメカニズムの分子病理学的解析、第 31 回日本トキシコロジー学会、大阪、2004 年 7 月

本光喜、梅村隆志、岡村美和、榎田陽子、町田登、三森国敏：Dicyclanil のマウス肝発がんメカニズムの分子病理学的解析、第 19 回発癌病理研究会、諏訪、2004 年 8 月

本光喜、梅村隆志、岡村美和、榎田陽子、町田登、三森国敏：Dicyclanil によるマウス肝腫瘍誘発における酸化ストレスの關与、第 21 回日本毒性病理学会、浜松、2005 年 1 月

Moto M, Umemura T, Okamura M, Kashida Y, Machida N, and Mitsumori K.: Molecular pathological analysis of hepatocarcinogenesis in mice treated with dicyclanil. Society of Toxicology, 44th Annual Meeting. New Orleans, May, 2005

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案

なし

3. その他

なし

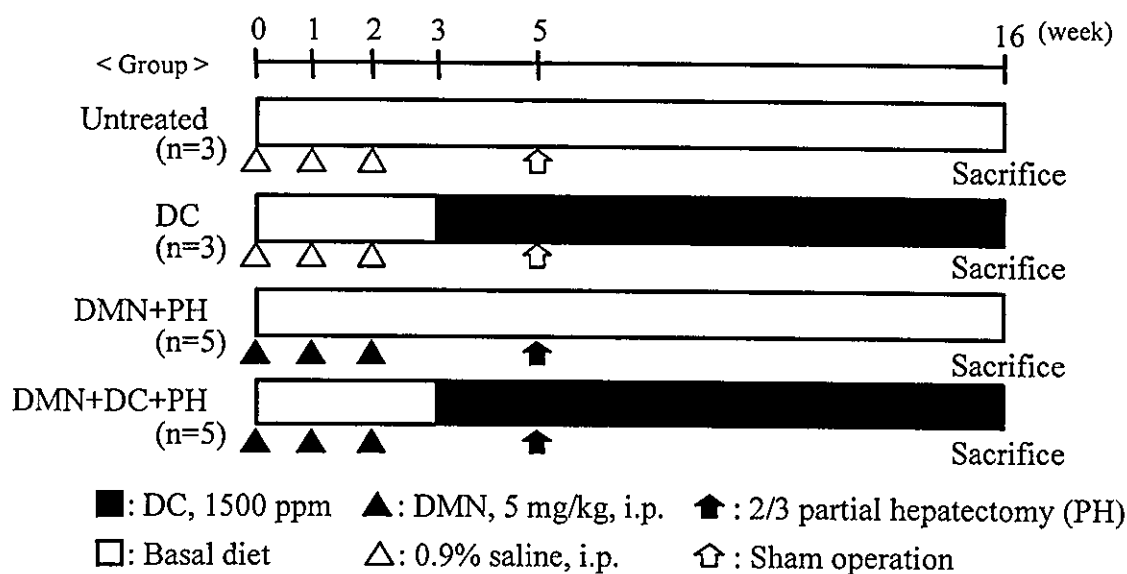


Fig. 1. Experimental design

Table 1.

Quantitative data of GGT positive cells and foci in the liver of mice treated with DC

Group	Number of Animals	GGT		
		Positive cell Numbers (No. / cm ²)	Positive focus (> 0.05 mm)	
			Numbers (No. / cm ²)	Total area (mm ² / cm ²)
Untreated	3	0 ^{a)}	0	0
DC	3	11.32 ± 8.09	0	0
DMN+PH	5	38.35 ± 20.87	0	0
DMN+DC+PH	5	394.21 ± 285.39 ^{**‡}	13.89 ± 11.22 ^{**‡}	0.072 ± 0.059 ^{**‡}

a) Mean ± SD.

** : Significantly different from the DMN+PH group at $p < 0.01$ (t -test).

‡ : Significantly different from the untreated group at $p < 0.01$ (Dunnett's-test).

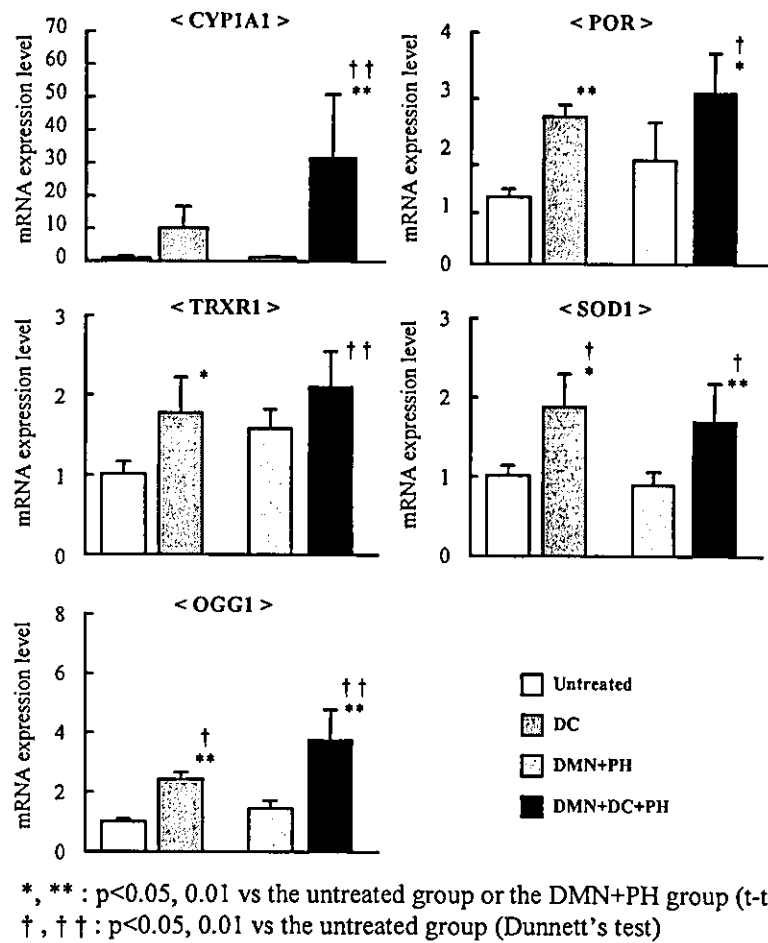


Fig. 2. Gene expressions of metabolism- and oxidative stress-related genes in the liver of mice treated with DC.

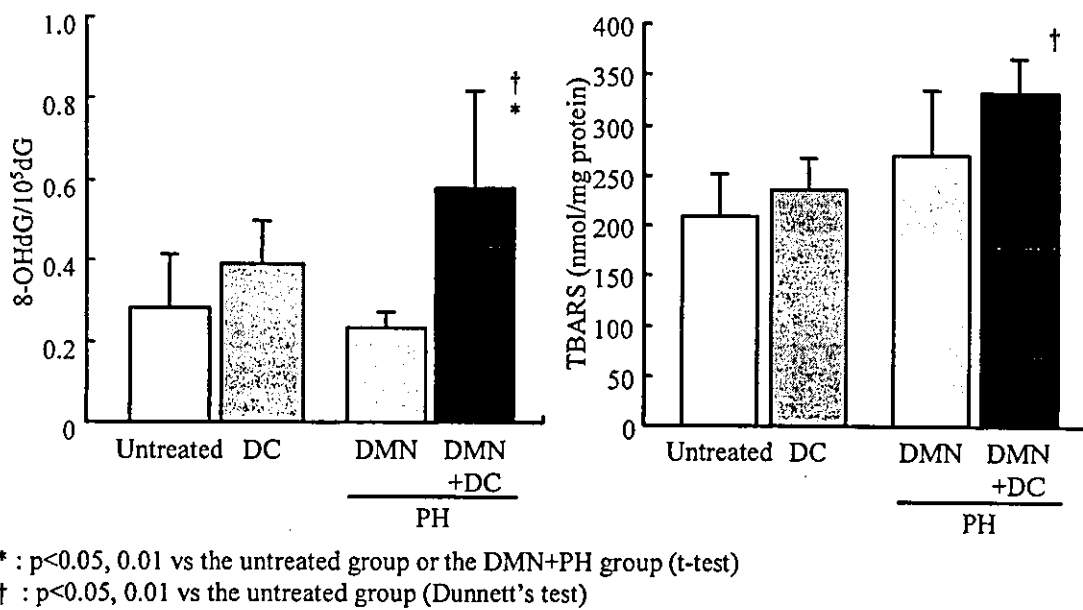


Fig. 3. Changes of 8-OHdG (A) in the liver DNA, and TBARS (B) levels in the liver of mice treated with DC.

畜水産食品中の残留動物用医薬品の安全性に関する研究

—網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析—

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨

本分担研究では、動物用医薬品による発がん性機序を解明する目的で、網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析を行う。今年度は、sulfadimethoxine (SDM) によって誘発される甲状腺発がん焦点を絞り、ラット甲状腺二段階発がんモデルを用いて、甲状腺の発がん過程の早期に特異的に発現変動する遺伝子群のマイクロアレイ解析を実施したので報告する。実験は、雄性 F344 ラットに N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) 単回投与によるイニシエーション処置後、プロモーション時期に SDM を 62.5、250 ないし 1000 ppm の割合で飲水投与した。イニシエーション作用特異的及び、SDM のみにより発現変動する遺伝子を除外する目的で、DHPN、SDM (1000 ppm) の単独投与群も設定し、SDM の投与開始後 4 週目に実験を終了した。その結果、250 ppm 以上で甲状腺機能低下を示す病理変化（びまん性濾胞上皮過形成）と共に、前がん病変である限局性濾胞上皮過形成が用量に依存して認められた。マイクロアレイ解析により、発がん過程特異的に発現の増減する遺伝子数は、1000 ppm で 2 倍以上増加するものが 86 遺伝子、0.5 倍以下に減少するものが 110 遺伝子であった。そのうち用量に関連して増加(2倍以上)ないし減少(0.5倍以下)したものは、DHPN+62.5 ppm SDM 以上の群で共に各 1 遺伝子、DHPN+250 ppm SDM 以上の群でそれぞれ 14 遺伝子、7 遺伝子であった。これらの内、遺伝子名が同定できたのは合計 10 遺伝子であった。発現増加したものは dopa/tyrosine sulfotransferase、Eph receptor A7、aurora kinase B、kinesin family member C1、glucagon、cyclin B1 であり、細胞回転や細胞分裂に関連する複数の遺伝子が得られた。発現減少を示した既知遺伝子の内訳は、lymphocyte cytosolic protein 2、vitamin D receptor、bone morphogenic protein 4、protocadherin α 等で、細胞増殖抑制やアポトーシスに関連する遺伝子が見出された。以上の結果、SDM により誘発される甲状腺発がん過程の早期には、細胞分裂ないし細胞回転関連蛋白が機能亢進し、細胞増殖抑制制御や抗アポトーシス制御の破綻する現象が生じることが示唆された。

A. 研究目的

動物用医薬品の一つである sulfadimethoxine (SDM) は、鶏コクシジウム症等に用いられるサルファ剤である。本剤や本剤と同様の構造を有する物質 (sulfamonomethoxine など) は、抗甲状腺作用を示すが、その作用は、甲状腺ペルオキシダーゼの抑制に起因した甲状腺ホルモンの合成抑制によることが報告されている。また、本剤はラット甲状腺に対し発がん性を示し、ラット甲状腺二段階発がんモデルにおいて、イニシエーターとして N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) を投与した後、本剤の連続投与

により、4 週目から甲状腺濾胞上皮細胞の過形成や腺腫が、8 週目から腺がんが誘発され、その進展には血清中の高い甲状腺刺激ホルモン (TSH) レベルが重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、その進展過程での分子機序はほとんど解明されていない。

近年、生物材料においてマイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析が可能となり、生物現象の解明に強力な手段となってきた。さらに、マイクロダイセクション法の発達により、病理組織切片中の特定の細胞・組織を採取することが可能となったため、我々は、メタカーン固定パラ

フィン包埋切片を用いたマイクロダイセクション法による採材とマイクロアレイ法またはリアルタイム PCR 法の組み合わせによる、組織中の微小細胞領域での遺伝子発現の定量解析法を確立してきた。

本研究では、まず SDM 誘発甲状腺発がん機序を解明するために、マイクロアレイ法による発がん過程の早期に特異的に発現変動する遺伝子群の同定と、マイクロダイセクション法とマイクロアレイ法の併用による腫瘍性増殖形質の獲得に関する遺伝子群の同定に着手した。今年度は、SDM 投与後 4 週目の病理組織学的検索と、発がん早期過程特異的な遺伝子群の発現解析結果について報告する。

B. 研究方法

動物は、5 週齢の雄性 F344 ラット（日本エスエルシー株式会社）を用い、無処置群、DHPN 単独投与群については一群 20 匹ずつ、その他の群については一群 8 匹ずつ計 6 群に群分けした (Fig. 1)。一週間馴化した後、DHPN 単独投与群と二段階発がんモデル群には DHPN を 2800 mg/kg、無処置群と SDM 単独投与群には生理食塩水を相当量単回皮下注射した。DHPN 投与一週後、SDM 単独投与群と二段階発がんモデル群には SDM を各々 1000 ppm (SDM 単独投与群)、62.5、250、1000 ppm (DHPN+SDM 群) の用量で飲水投与した。飼料は全ての群に基礎飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母) を自由摂取させた。実験期間中、動物の体重は週一回、飲水量の測定は週二回実施した。SDM は溶液中で不安定であるため、飲水量測定後、週 2 回溶液を調製し、遮光ボトルを用いて供与した。SDM 投与 4 週後に全動物をジエチルエーテル吸入麻酔下で放血殺し、RNase 除去した器具で上皮小体や結合組織など甲状腺周囲組織を除去し、両側の甲状腺を採取した。甲状腺の重量を測定後、無処置群、DHPN 単独投与群については 4 個体分の両側甲状腺をまとめ、計 4 サンプルを遺伝子解析用として RNA later (Ambion) に浸漬させ、残り 4 個体の両側甲状腺を形態観察用にホルマリン固定した。その他の群

については、各個体の両側の甲状腺を頭側、尾側に二分し、頭側をホルマリン固定、尾側を RNA later に浸漬し個体ごとに採材した。ホルマリン固定材料は、定法に従い切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色して病理組織学的検索を実施した。遺伝子解析用サンプルは、4°C 一晚 RNA later に浸漬した後、-80°C で保存した。Total RNA 抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて行い、回収量は RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe) を用いて測定した。さらに、RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies) を用いて、回収した total RNA のクオリティーを確認した。各群から 4 サンプル (DHPN+62.5 ppm SDM 群については 3 サンプル) を用意し、回収した 1 μ g の total RNA について MessageAmpTM II aRNA kit (Ambion) を用いて 1 回増幅した。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) にて発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、SDM による発がんに関与しない遺伝子発現を除外するために、DHPN によるイニシエーション特異的な遺伝子発現プロファイル及び SDM 投与のみに起因するプロファイルと比較し、発がん過程に特異的な遺伝子群を同定した。方法としては、GeneSpring ver.5.1 (Silicon Genetics) を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、明らかな SDM の発がん用量を投与した DHPN+1000 ppm SDM 群特異的に変化する遺伝子群を、イニシエーション単独あるいは 1000 ppm SDM 単独投与特異的に変化する遺伝子群と区別し、DHPN 群に比し有意に 2 倍以上または 0.5 倍以下の発現がみられる遺伝子群を選別した。具体的には、DHPN+1000 ppm SDM 群で変化する遺伝子群のうち、DHPN あるいは SDM 群でも同様の発現変化を示す遺伝子群を除外した。次いで、DHPN+1000 ppm SDM 群で有意に発現変化を示した遺伝子群を検索するために、発現の信頼性を示す flag が DHPN を投与

した全群、15 サンプル全てにおいて absent であった遺伝子を除外し、さらに、DHPN 単独投与に比べ 2 倍以上の発現がみられる遺伝子については DHPN+1000 ppm SDM 群の、0.5 倍以下の発現がみられる遺伝子については DHPN 群の 4 サンプル中 3 サンプルの flag が present であったものを選択した。次いで、flag で選抜された DHPN+1000 ppm SDM 群の遺伝子について Student の t 検定を行い、DHPN 群との間に有意差が認められた遺伝子群を選抜した。さらに、DHPN+62.5 ppm SDM 群、DHPN+250 ppm SDM 群について、DHPN+1000 ppm SDM 群と同様の方法で遺伝子を選択し、DHPN+1000 ppm SDM 群と共通に変化する遺伝子群、または無関係に変動する遺伝子群を選択した。発現が DHPN+1000 ppm SDM 群と共通に変化するもののうち、DHPN+62.5 ppm SDM 以上の群または DHPN+250 ppm SDM 以上の群で有意に変化する遺伝子群を同定した。また、DHPN+1000 ppm SDM 群のみで有意に発現が変動する遺伝子群を生物学的カテゴリー毎に分類した。

統計学的解析は、体重、甲状腺重量については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不当分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合、その多重比較は Dunnett の方法で無処置群または DHPN 群と DHPN+SDM 各群の間で有意差検定を行った。遺伝子発現の解析結果については、各群の分散を F 検定で調べ、等分散の場合は Student の t 検定を、不当分散の場合は Welch の t 検定を行い、無処置群と SDM 単独または DHPN 単独群、DHPN 単独群と DHPN+SDM 各群の間で有意差検定を行った。甲状腺に発生した病変の発生頻度は、無処置対照ないし DHPN 単独群との間で Fisher の直接確率法により検定を行い、病変の強度については、同様の比較を Mann-Whitney' s U-test により行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は飲水による経口投与が主体

であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

実験期間中の体重の変動を Fig. 2 に示した。DHPN+1000 ppm SDM 群においては DHPN 単独群と比べて、1000 ppm SDM 群においては無処置群に比べ、投与後 4 週で有意な体重減少が認められた。解剖時の甲状腺重量は、1000 ppm SDM 群においては無処置群と比べて、DHPN+250 ppm SDM 以上の群においては DHPN 単独群に比べて、絶対、相対重量ともに有意な増加が認められた (Table 1)。

甲状腺の病理組織学的検索の結果を Table 2 に示した。無処置群、DHPN 単独投与群とも明らかな病変を認めなかったが、1000 ppm SDM 群においては、全例に中等度のびまん性濾胞上皮過形成を認めた。DHPN+SDM 群のうち、62.5 ppm 投与群では、明らかな濾胞上皮の病変は認められなかったが、250 ppm 以上で全例にびまん性過形成を認め、その強度は用量依存的に増加した。さらに、前がん病変と考えられる濾胞上皮の限局性過形成が 250 ppm 以上で多発し、切面 (左右各 1 切面) あたりの発生個数は用量依存性に増加した。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析については、DHPN+1000 ppm SDM 群で変化する遺伝子群のうち、DHPN 単独あるいは SDM 単独群でも同様の発現変化を示す遺伝子群を除外した結果、除外した遺伝子群の割合は、DHPN 群との共通遺伝子が 4.5% (2 倍以上増加)、1000 ppm SDM 群との共通遺伝子が 47.3% (2 倍以上増加)、57.5% (0.5 倍以下減少) であった。DHPN 群において、無処置群と比較して 0.5 倍以下の発現を示す遺伝子は認められなかった。次いで flag による選抜により、DHPN+1000 ppm SDM 群で DHPN

群に比し2倍以上または0.5倍以下に変動した遺伝子がそれぞれ88遺伝子、116遺伝子、選択された。さらにそれらを統計学的に解析した結果、DHPN群に比し有意に増加または減少したのは、それぞれ86遺伝子、110遺伝子であった。DHPN+1000 ppm SDM群のみで有意に発現が変化した遺伝子群の機能クラスターをTable 3に示した。DHPN単独群に比し、有意な2倍以上の発現を示した遺伝子のうち、比較的多くの遺伝子が分類されたカテゴリーは、Cellular process、Physiological process (Biological process)、Cell (Cellular component)、Catalytic activity、Binding (Molecular function)であった。また、DHPN単独群に比し有意に0.5倍以下発現減少していた遺伝子のうち、比較的多くの遺伝子が分類されたカテゴリーは、Cellular process、Physiological process (Biological process)、Cell (Cellular component)、Binding (Molecular function)であった。これらの各カテゴリーに含まれる遺伝子のうち、比較的多くの遺伝子が細分類されたカテゴリーは、DHPN単独群に比し有意に2倍以上増加したものはCellular Physiological process (Cellular process)、Metabolism (Physiological process)、Intracellular (Cell)、Hydrolase activity (Catalytic activity)、Nucleic acid binding、Ion binding (Binding)であった。また、同様に、DHPN単独群に比し有意に0.5倍以下発現減少していた遺伝子のうち、比較的多くの遺伝子が細分類されたカテゴリーは、Cell communication (Cellular process)、Metabolism (Physiological process)、Intracellular、Membrane (Cell)、Nucleotide binding (Binding)であった。また、DHPN+SDM各群において、DHPN単独群に比し有意に発現が2倍以上増加または0.5倍以下減少していた遺伝子群のうち、SDMの用量と関連して、または各用量特異的に発現が変化した遺伝子数をFig. 3に示した。SDMの低用量あるいは中間用量から用量に関連して発現変動が認められた遺伝子数は、それぞれ合計15

個(2倍以上増加)、8個(0.5倍以下減少)であった。また、それらの内訳をTable 4、5に示した。これらのうち明確に遺伝子名が同定できたものは、発現増加群ではdopa/tyrosine sulfotransferase、eph receptor A7、aurora kinase B、kinesin family member C1、glucagon、cyclin B1 (Table 4)、発現減少群ではlymphocyte cytosolic protein 2、vitamin D receptor、bone morphogenic protein 4、protocadherin alpha (Table 5)、合計10遺伝子であった。SDMの用量に関連せず、DHPN+62.5 ppm SDM群あるいはDHPN+250 ppm SDM群特異的に発現変動を示した変化した遺伝子数をTable 6に示した。DHPN+62.5 ppm SDM群あるいはDHPN+250 ppm SDM群単独でDHPN単独投与群に比し有意に2倍以上発現が増加した遺伝子数は、それぞれ5個(DHPN+62.5 ppm SDM群)、25個(DHPN+250 ppm SDM群)であった。また、各群でDHPN単独投与群に比し有意に0.5倍以下に発現減少した遺伝子数は、それぞれ19個(DHPN+62.5 ppm SDM群)、8個(DHPN+250 ppm SDM群)であった。

D. 考察

今回の研究により、甲状腺二段階発がんモデルを用いて、イニシエーション特異的な遺伝子及びSDM投与による甲状腺機能減少に関連する遺伝子を除外することにより、SDMによる甲状腺発がん過程の早期に特異的な遺伝子発現プロファイルを得ることができた。さらに、発現の用量に関連した発現変動を重視して選別を加えることにより、より注目すべき遺伝子群の絞り込みに成功した。

遺伝子発現量の変動にSDMの用量に関連していた遺伝子群は合計23遺伝子あり、そのうち遺伝子を同定することができたものは10遺伝子だった。DHPN+250 ppm SDM以上の群で、DHPN群に比し有意に2倍以上発現が増加した遺伝子の一つ、dopa/tyrosine sulfotransferaseは、dopaないしtyrosineを硫酸抱合する酵素で、げ

っ歯類では主に肝臓に発現し、腎臓にも発現するとの報告があるが、他の組織では殆ど発現が認められない。また、甲状腺ホルモンや dopamine、p-nitrophenol も基質となり得る。発がんとの関連では、benzylic alcohol 類の代謝活性化に参与することが報告されているが、甲状腺腫瘍の発生に関する報告はない。

また、eph (erythropoietin-producing hepatocellular) は受容体型チロシンキナーゼであり、A7とは subtype は異なるが、最近、A2 isoform はリガンドである ephrin と共にヒト結腸・直腸がんを高発現することが報告されており、腫瘍血管の新生への関与が示唆されている。今回は SDM 投与後4週の時点での遺伝子発現解析を行ったが、eph receptor A7 は SDM の用量に相関して発現が増加しており、今回用いた甲状腺二段階発がんモデルにおいて SDM 投与後8週以降に認められる腺腫・腺がんへの進展に必要な腫瘍血管新生に関与することが示唆された。

最近見出された遺伝子 Abnormal spindle は、細胞分裂の際の紡錘糸の機能に重要な役割を果たし、大脳皮質の形成不全にこの分子の機能異常の報告があるものの、未だ発がんとの関連では報告がない。今回の解析では abnormal spindle 類似の遺伝子が SDM の用量に相関して発現が増加していたことから、本モデルの発がん過程で細胞分裂の異常が関与している可能性が示唆された。

Aurora kinases は、染色体分離と細胞分裂、特に中心体回転、紡錘糸の集積、染色体集合、微小管キネトコアの接着に機能しており、リン酸化により制御されている。この機能の異常が生じた場合、分裂異常を来す。aurora kinase はしばしばヒトの腫瘍で高発現していることが知られており、発がん感受性遺伝子として位置づけられている。今回検討した SDM 投与後4週目の甲状腺は、病理組織学的に 250 ppm 以上で濾胞上皮の前がん病変と考えられる限局性過形成が多発しており、先に述べた abnormal spindle や後述する kinesin や cyclin B1 と同様の aurora kinase の発現

上昇は、この時期で既に細胞分裂や細胞回転の異常が生じている可能性を示唆している。

Kinesin は微小管結合蛋白質のうちの一つで、その機能によっていくつかの subtype に分けられている。今回、高発現している遺伝子として見出された二種類の isoform の機能についての報告はないが、kinesin 自身は細胞分裂にも深く関与することが知られている。

Glucagon は、膵臓ランゲルハンス島の A 細胞から産生されるホルモンの一種で、血中グルコース濃度の調整に関与する。今回の結果により、glucagon が SDM による甲状腺発がんに関与することが示唆されたが、甲状腺組織での発現、あるいは発がんとの関連での報告はない。

細胞回転に関連する cyclin B1 の機能異常と発がんとの関連は数多くの報告があり、腫瘍細胞、特に転移性腫瘍細胞での過剰発現の報告がある。今回の結果より、SDM による甲状腺発がん過程の早期において、既に cyclin B1 の機能亢進が生じて、腫瘍化の過程を促進している可能性が示唆された。

以上、用量に依存して SDM による発がん過程の早期で発現増加する遺伝子のスクリーニングの結果、細胞分裂及び細胞回転関連の複数の蛋白質の機能亢進が見出された。SDM の用量に相関して有意に発現が減少した遺伝子のうち、DHPN+62.5 ppm SDM 以上の全群において有意に変化した唯一の遺伝子 lymphocyte cytosolic protein 2 (Lcp2) は、近年見いだされた遺伝子で、造血細胞特異的タンパクであり、多種の免疫系細胞のシグナル伝達に関与することが示唆されているが、甲状腺あるいは腫瘍との関連は報告がない。

また、DHPN+SDM250 ppm 以上の群で有意に発現が減少していた vitamin D receptor (VDR) は、steroid/thyroid/retinoic acid レセプターファミリーに属し、そのリガンド 1,25-dihydroxyvitamin D3 は、VDR を介して骨代謝や免疫機能の調節、細胞増殖・分化の調節（抗増殖作用など）に関わっている。VDR の腫瘍への関

与については、ある種の遺伝子型をもつ VDR を介し、1,25-dihydroxyvitamin D3 がヒト乳がんを抑制するという報告があり、前立腺その他の腫瘍についても VDR を介して vitamin D が腫瘍発生を抑制することが示唆されている。また、protocadherin はカドヘリンファミリーに属するカルシウム依存性細胞接着分子であり、多様な組織で様々な作用を示すが、中枢神経系、特にシナプス機能に対し中心的な役割をもつ。腫瘍に関連しては、大腸がんの危険因子である葉酸欠乏幼弱ラットにおいて、protocadherin-4 の遺伝子発現が減少したという報告がある。今回の結果より、これら2種の遺伝子の発現がSDMの用量に相関して減少していたことから、本モデルにおいて、これら因子による発がん抑制作用が減弱することにより、発がん過程を進展させる可能性が示唆された。

BMPs (Bone morphogenetic proteins) は、TGF- β (Transforming growth factor β) superfamily に属する増殖因子であり、細胞膜に存在する特異的レセプターを介し、細胞の分化、増殖、遊走、がんの転移等、多彩な作用を示す。BMP-4 は、retinoic acid とともに培養ヒト胎児がん細胞 (P19 EC cells) に作用させると、caspase-9 を活性化させアポトーシスを誘発させることが報告されている。腫瘍に関連する報告としては、ラットとヒトの培養前立腺がん細胞において BMP-4 を含む BMPs mRNA の発現が確認されている他、骨、下垂体、卵巣腫瘍でも発現が認められたという報告がある。甲状腺濾胞上皮由来腫瘍における BMP-4 の発現に関する報告はないが、今回の結果より、SDM 用量に相関して発現が減少したことから、アポトーシスを抑制することにより発がん過程に寄与すると考えられた。以上の発がんの早期過程に発現が減少する遺伝子のスクリーニングの結果、細胞増殖抑制制御や、SDM の用量に相関した抗アポトーシス制御の破綻を示唆する結果が得られた。

以上、SDM による甲状腺発がんの早期過程に関与すると考えられる遺伝子を複数同定することができ、SDM による非遺

伝毒性発がんメカニズムを解明する端緒を開いた。今後は、SDM 投与後 10 あるいは 15 週で発生した腺腫、腺がんとその周囲組織での発現遺伝子のプロファイルを、独自に開発したパラフィン包埋微量組織でのマイクロアレイ解析法を利用し、腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を進める。また、今回の結果をリアルタイム PCR 法等で検証し、可能であれば細胞局在等の解析を進め、それらの発がんにおける役割について検討を進める。

E. 結論

ラット二段階甲状腺発がんモデルを用いて、SDM による発がん過程特異的な発現変動遺伝子を用量反応性の観点から選別した結果、発がん過程の早期には、細胞分裂ないし細胞回転関連蛋白が機能亢進し、細胞増殖抑制制御や抗アポトーシス制御の破綻する現象が生じることが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 投稿論文

Shibutani, M. and Uneyama, C.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells. In: Murray, G.I., Curran, S. (Eds). Laser capture microdissection and its applications. Methods Mol Biol., Totowa: Humana Press, 11-25, 2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Kato, N., Fujita, H., Lee, K-Y., Takigami, S., Mitsumori, K. and Hirose, M.: Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. J Histochem Cytochem., 52, 903-913, 2004.

2. 学会発表

渋谷淳、井上弘子、高木広憲、加藤奈津美、李京烈、有村卓朗、畝山智香子、瀧上周、