

200501029A

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三森 国敏

平成18(2006)年 3月

別添 2

目 次

I. 総括研究報告書		
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. 非遺伝毒性発がん物質の発がんメカニズムに関する研究	-----	10
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	-----	17
渋谷 淳		
3. 動物用医薬品の発がん過程における酸化的ストレスの関与	-----	40
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	-----	47
九朗丸 正道		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	82
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	84

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

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ことを目的として、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、昨年度に引き続き、発がんメカニズムへの酸化ストレスの関与について解析を進めた。DC を正常マウスおよび二段階肝発がんモデルマウスに 13 および 26 週間混餌投与し、その肝について解析した結果、DC は投与期間に依存して肝の前腫瘍性病変の発生、酸化 DNA 損傷マーカーである 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを増加させた。また、*in vitro* の実験において DC はマウス肝ミクロソーム由来の活性酸素種（ROS）を濃度依存的に産生させることが明らかとなった。以上の結果から、DC によるマウスにおける肝発がん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。

また、DC を 13 週間、レポーター遺伝子導入マウスである *gpt delta* マウスの雌雄に混餌投与し、*in vivo* 変原性アッセイを実施した。その結果、雌雄マウス肝 DNA 中の 8-OHdG レベルが上昇し、雌マウス肝 *gpt* 遺伝子突然変異頻度が上昇した。今回実施した *in vivo* 変原性試験結果は発がん性試験結果と一致したことから、ジサイクラニルに誘発される点突然変異がその発がん機序に関与している可能性が示唆された。また、酸化 DNA 損傷と変原性との関連については今後の研究課題となった。

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、16 年度に二段階発がんモデルでの甲状腺発がん過程早期に特異的な発現変動遺伝子群をマイクロアレイ法により同定し、17 年度は代表的な遺伝子について、発現レベルの検証、および抗体による検索が可能な遺伝子産物の発現局在を検討した。その結果、*cyclin B1*、および *aurora kinase B* は、前がん病変である限局性濾胞上皮過形成に陽性像が集中しており、SDM による甲状腺発がんの早期の標的遺伝子と考えられた。さらに、部位特異的な網羅的発現解析により、SDM 発がんの腫瘍性増殖形質獲得に関与すると考えられる遺伝子群の同定に成功した。

ベンズイミダゾール系駆虫薬であるフェンベンダゾール（FB）による肝臓発がんについては、ラット二段階発がんモデルでの肝発がん過程早期特異的な発現変動遺伝子群のプロファイリングを実施し、発現増加遺伝子の中には TGF β シグナリングないし Wnt 経路を介した細胞増殖抑制に関する遺伝子、発現減少遺伝子には Wnt シグナリングに制御される細胞増殖に関与する secreted frizzled-related protein 4 が見出され、プロモーション 6 週目の時点では、イニシエートされた肝細胞は肝臓のごく一部を構成し、残りの大多数が細胞増殖活性の低い肝細胞からなることを反映した結果と考えられた。

新たに特定危険部位に指定された牛の背根神経節について、その除去がと畜場において可能か否かを除去率の算定により検討した。さらに、牛の品種別、牝牝別、および月齢別に除去率に差があるか否かを検討した。現状として、と畜場における全背根神経節の平均除去率は約 84% のであり、100% の除去は現時点の技術では困難であるといわざるを得ない。また、牛の品種別、牝牝別、および月齢別の除去率に差は認められなかった。

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 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
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

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) 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。その発がん機序に関する申請者の今
までの研究では、DC による発がん過程
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
的ストレスは酸化的 DNA 損傷を引き起
す可能性があり、発がんへの関与が注目さ
れている。また、非遺伝毒性発がん物質と
評価されているサルファジメトキシ
(SDM) もラットないしマウスの甲状腺に
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。ま
た、フェンベンダゾール (FB) も非遺伝
毒性肝発がん物質と評価されているが、申
請者らの研究によりラット肝臓において
CYP1A2 を誘導し、肝二段階発がんモデル
ではコネキシン 32 の発現低下が見出され
たものの、具体的な発がんメカニズムは不
明なままである。

本年度、DC については、前年度に引き
続き、マウス肝における肝発がん機序への
酸化ストレスおよび酸化的 DNA 損傷の
関与の可能性について解析を進めると共
に、酸化ストレスが生じる原因のひとつ
と考えられている活性酸素種 (ROS) を
DC が肝において生じさせるか否かにつ
いて *in vitro* にて検索した。また、近年開
発されたレポーター遺伝子導入マウスを用
いた *in vivo* 変原性アッセイを実施する
ことにより、DC の肝発がん機序への酸化
的 DNA 損傷の関与の可能性を検索した。
SDM については、昨年度にこの分子機
序解明を目的として、マイクロアレイを用
いた網羅的解析を行い、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、細胞増殖
抑制制御や抗アポトーシス制御の破綻が
生じていることを示唆する発現プロファイル
を得ている。今年度は引き続き、候補遺
伝子の遺伝子発現の検証と共に抗体による
局在解析が可能な遺伝子産物の甲状腺病
変での分布を解析し、発がん過程への関
与の有無を検討した。FB については、
昨年度実施した SDM での解析と同様に、
FB による発がん機序を解明するため肝
二段階発がんモデルを用いて発がん過程
の早期に特異的に発現変動する遺伝子
群の同定

を行った。

一方、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。申請者らは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、前年度に引き続き、脊柱の有効利用のため、と畜場において脊髄を取り除いた後に脊柱に残る硬膜とそこに付随している脊髄神経を、背根神経節ができるだけ脊柱に残らないように引き剥がしたものをを用いて、背根神経節がどの程度硬膜に付随しているか、すなわち脊柱から背根神経節がどの程度除去されているかを調べ、と畜場において技術的な向上がなされているかを検討した。さらに、今年度は品種別、牝牝別、および月齢別の除去率についても比較し、除去率に差があるか否かについても検討を加えた。

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、ジメチルニトロソアミン(DMN)によるイニシエーション処置を施したマウスを用いた二段階肝発がんモデルに13および26週間DCを混餌投与し、その標的臓器である肝について、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DNA損傷マーカーである8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)の測定を行った。ROS産生については、マウス肝より精製したマイクロソーム画分と

各濃度のDCを37°Cで反応させ、ROS反応性蛍光指示薬によりROS産生量を測定した。

また、DCについては、レポーター遺伝子導入した遺伝子改変マウスを用いた*in vivo*変原性アッセイを実施した。すなわち、雌雄の*gpt delta*マウスにDCの0、0.15%の濃度に混じた飼料を13週間自由に摂取させ、その肝について、チオバルビツール酸反応物質(TBARS)および8-OHdGレベルを測定した。さらに、肝より抽出したDNAを用いた*gpt*アッセイならびにSp-アッセイを実施した。

SDMについては、前年度前における遺伝子発現解析により同定された5つの代表的な発現増減遺伝子(発現増加：*aurora kinase B*、*cyclin B1*、*glucagon*；発現減少：*bone morphogenic protein-4*、*vitamin D receptor*)についてreal-time RT-PCR解析を実施した。また、標的臓器である甲状腺(病変)における発現局在の免疫組織化学的解析が可能な遺伝子産物の候補として、*Aurora kinase B*、*Cyclin B1*および*Vitamin D receptor*について検索した。さらに、マイクロダイセクション法と組み合わせたマイクロアレイ解析を、限局性濾胞上皮過形成(FFCH)+腺腫部、がん部、および非がん部について実施した。

FBについては、ジエチルニトロソアミン(DEN)によるイニシエーション処置を施したラットを用いた二段階肝発がんモデルに、FBを各々3600 ppm (FB単独投与群)、400、1200、3600 ppm (DEN+FB群)の用量で6週間混餌投与し、標的臓器である肝について、病理組織学的検索および遺伝子発現解析を実施した。

牛脊柱からの背根神経節の除去については、2005年1月から2006年2月までの計1385検体について、第1頸神経から第5仙骨神経までの脊髄神経の背根神経節(背割り後の枝肉[半頭分]では総計32個)が、どの程度脊柱から除去されているかを調べた。また、牛の品種別、牝牝別および月齢別について、「ホルスタイン去勢牛」、「和牛(黒毛和種)牝」、「和牛去勢牛」、

「交雑種（黒毛♂×ホルスタイン♀）牝」および「交雑種去勢牛」の5グループに区分、月齢としては「～19ヶ月齢」、「20～24ヶ月齢」、「25～29ヶ月齢」および「30ヶ月齢以上」に区分してそれぞれ比較した。（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ている。

C. 研究結果

DC については、マウス肝における gamma-glutamyltransferase 陽性を示す前腫瘍性病変の検索により、DMN+DC+部分間切除 (PH) 群で投与 13 および 26 週目に GGT 陽性巣の形成が認められ、その陽性面積には経時的な増加が認められた。また、DC 単独群では投与 26 週目に陽性巣の形成が認められた。酸化ストレス関連遺伝子の発現解析では、酸化ストレス関連遺伝子である cytochrome P450 1A1、P450 oxidoreductase 1、thioredoxin reductase 1、superoxide dismutase 1、および 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 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。しかしながら、これらの変化には明らかな経時的変化は認められなかった。肝組織から抽出した DNA 中 8-OHdG レベルは DMN+DC+PH 群では投与 13 および 26 週目で、DC 群では投与 26 週目でそれぞれ顕著で有意な上昇が認められた。

また、これらの変化は投与 13 週目に比べ投与 26 週目では約 2 倍に増加していた。ROS 産生量の測定では、ROS 産生量が DC の濃度依存的に増加し、0.3mM 以上で有意な増加が認められた。

DC についての遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 変原性アッセイでは、雌の DC 投与群で肝重量および比重量の有意な増加が観察された。TBARS レベルは全ての群間で変化は認められなかったが、肝 DNA 中の 8-OHdG レベルは雌雄共に対照群に比して有意の高い値となった。*In vivo* mutation assay の結果、雌の投与群で *gpt* 遺伝子突然変異頻度が有意に上昇した。一方、雄の *gpt* 遺伝子ならびに雌雄の *red/gam* 遺伝子突然変異 (Sp-) 頻度は対照群との間に有意の増加は観察されなかった。

SDM については、5 つの代表的な発現増減遺伝子(発現増加: *aurora kinase B*、*cyclin B1*、*glucagon*; 発現減少: *bone morphogenic protein-4*、*vitamin D receptor*) について real-time RT-PCR により発現値の検討を行った結果、一部統計学的有意差はつかなかったものの、いずれの転写産物においても概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示した。4 つの遺伝子産物についての免疫組織学的手法による発現局在解析では、マイクロアレイで発現増加を示した *aurora kinase B* は濾胞上皮の核および有糸分裂像、SDM により肥大した濾胞上皮、および FFCH の細胞核に陽性を示した。*Cyclin B1* は、濾胞上皮の細胞質ないし核、SDM により肥大した濾胞上皮、および濾胞上皮過形成細胞の細胞質に陽性像が見出された。一方、マイクロアレイで発現減少を示した *BMP-4* と *vitamin D receptor* は、いずれも SDM により肥大した濾胞上皮の細胞核にびまん性の陽性を示し、その陽性の程度は SDM 濃度に比例していた。さらに、FFCH の核にもびまん性に陽性を示し、マイクロアレイ解析結果とは逆の染色態度を示した。マイクロダイセクション法を利用して、がん部、および FFCH+腺腫部に特異的な発現変動を示す遺伝子を非がん

部との比較で行ったところ、まだ解析途上であるが、発現増加・減少とも複数の遺伝子がそれぞれ、限局性過形成病変＋腺腫部、がん部、およびこれら全てに共通するものとして得られた。

FB については、二段階発がん実験群間での GST-P 陽性細胞巢の形態計測の結果、1200 ppm 以上で有意な増加を示し、いずれも用量依存的であった。肝臓において発現の増減する遺伝子について解析した結果、FB の用量に依存した発現増加遺伝子は 400 ppm 以上で 5 個、1200 ppm 以上で 10 個認められ、その中で機能既知の遺伝子は *seine protease inhibitor*, *kazal type 1 (Spink1)*; *TGF-β masking protein large unit (Ltbp1)*; *pregnancy-induced growth inhibitor (Okl38)*; *mini chromosome maintenance deficient 6 (Mcmd6)*; *alcohol dehydrogenase 1 (Adh1)*; *Axin 2* の 6 つであった。一方、FB の用量に依存した発現減少遺伝子は 400 ppm 以上で 1 個、1200 ppm 以上で 5 個認められ、その中で機能既知の遺伝子は *nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (Nr0b2)*; *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (Mafb)*; *Secreted frizzled-related protein 4 (Sfrp4)* の 3 つであった。これら発現の増減した 6 つの代表的遺伝子(発現増加:*Okl38*, *Spink1*, *Ltbp1*, *Axin2*; 発現減少:*Nr0b2*, *Mafb*) について *real-time RT-PCR* により発現レベルの検証を行った結果、一部統計学的有意差はつかなかったものの、いずれの転写産物においても概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示した。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関しては、背根神経節の脊柱からの除去率は、2005年1月から2006年2月の間で平均約84%であった。前年度と比べ、第4、第5仙骨神経の背根神経節の除去率が著しく向上したが、依然として第4腰神経～第3仙骨神経の背根神経節の除去率の低さが顕著であった。また、第10～第12胸神経の背根神経節の除去率も他の部位と比べ

ると低い値を示した。その他、牛の品種別、牝牝別、および月齢別に脊柱からの背根神経節の除去率を調べた結果、いずれの観点からの解析においてもその除去率には有意差は認められなかった。

D. 考察

DC については、二段階肝発がんモデルにおいて 1500 ppm 投与により、GGT 陽性巢の数/面積の有意な増加が認められ、遺伝子レベルの解析においても、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、8-OHdG レベルにも経時的で有意な上昇が認められた。さらに、投与26週目では、イニシエーション処置を施していない DC 単独群においても GGT 陽性巢の形成、および 8-OHdG レベルの有意な上昇が認められ、*in vitro* において DC がその代謝過程で ROS を産生する事が明らかとなった。これらの結果から、DC はマウス肝に対し腫瘍誘発を増強する可能性が強く示唆され、DC により増強される発がん過程において酸化ストレスが生じていることが明らかとなった。また、酸化ストレス関連遺伝群の発現変化には経時的変化がみられなかったものの、8OH-dG レベルが経時的に増加していたことから、本濃度の DC の長期投与により生じた酸化ストレスが高度なレベルで継続し、この蓄積性の変化が二次的に酸化 DNA 損傷を増加させた可能性が推察された。

また、遺伝子改変マウスを用いた DC の肝発がん機序への酸化 DNA 損傷の関与の検索では、発がん性が報告されている雌マウス肝の *gpt* 遺伝子変異頻度が上昇したことから、ジサイクラニルの発がん機序に点突然変異が深く関与している可能性が示唆された。一方、酸化 DNA 損傷は雌雄マウスのいずれにおいても有意の上昇が観察され、*in vivo* 変異原性との関連性については今後の研究が必要である。

SDM については、マイクロアレイ解析より選別された5つの代表的な発現増減遺

伝子は概ねマイクロアレイデータと同等の発現変動を示し、データは検証されたものと考えられた。また、免疫組織学的な局在解析の結果、マイクロアレイにより発がん過程で発現増加を示した **aurora kinase B** と **cyclin B1** の陽性所見はマイクロアレイデータを反映するものと考えられ、特に前腫瘍性病変である濾胞上皮の過形成に発現が集中してみられたことから、発がん過程早期の標的遺伝子である可能性が示唆された。一方、マイクロアレイで発現減少を示した **BMP-4** と **vitamin D receptor** は、いずれも **SDM** により肥大した濾胞上皮の細胞核にびまん性の陽性を示し、**FFCH** の核にもびまん性に陽性を示す結果となり、マイクロアレイ結果と一致しなかったことから、これらの分子の機能発現に転写後の発現制御の関与が考えられた。また、マイクロダイセクション法を利用して、がん病変部、および **FFCH**+腺腫部に特異的な発現変動を示す遺伝子を非がん部との比較で行ったところ、増加・減少遺伝子ともがん病変で変動する遺伝子が多く、**FFCH**+腺腫部とがん病変部で共通に発現変化を示す遺伝子も多数認められた。詳細については現在解析中であるが、今後は遺伝子の機能解析も含め、**SDM** による腫瘍性増殖形質の獲得とその進展を促進する細胞内経路の特定を中心に解析を進める。

FB については、肝臓に対する発がんプロモーション作用が **1200 ppm** 以上で認められ、用量依存性の観点から発がん過程特異的に発現変動した遺伝子を選別したところ、発現増加遺伝子のうち機能既知のものは **Spink1**、**Ltbp1**、**Okl38**、**Mcmd6**、**Adh1**、**Axin 2** の 7 つであった。**Spink1** は膵臓のトリプシノーゲンの過剰な活性化に対して保護的に作用することが知られ、先天性膵炎や、一部の膵がんの標的遺伝子として知られている。**Ltbp1** は **TGF β** シグナリングの下流で細胞増殖抑制に作用することが報告されている。**Okl38** は妊娠時の乳腺上皮の増殖制御と分化に機

能することが知られ、乳腺発がんへの関与も指摘されている。**Mcmd6** は DNA 複製の際の DNA をほどく **helicase** であり、ヒトのリンパ腫などで生存率を規定する悪性化の指標としての利用が考えられており、他の **isoform** は悪性甲状腺腫瘍に強く発現することが報告されている。**Adh1** は **alcohol** の代謝酵素で、細胞増殖などの関連での報告はない。**Axin2** は β カテニンの分解を促進することで **Wnt** 経路のシグナリングを抑制することが知られている。一方、発現減少遺伝子のうち、機能既知のものは **Nr0b2**、**Mafb**、**Sfrp4** で 3 つのみであった。**Nr0b2** は **nuclear orphan receptor** のひとつで機能は不明な部分が多いが、日本人の肥満に関与することが報告されている。**Maf** にはいくつかの **isoform** が存在し、細胞の **terminal differentiation** に関与するが、細胞の状況に応じて、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子として機能することが考えられている。**Sfrp4** は **Wnt** シグナル経路の抑制制御因子であるが、ヒト慢性リンパ球性白血病で、この遺伝子のメチレーションとサイレンシングが報告されている。以上の検索結果から、**FB** による肝発がんの早期過程では、細胞増殖に関して、正負、両方向に進行する細胞機能が推定される遺伝子発現プロファイルが得られ、その中には **Wnt** 経路や **TGF β** シグナリングを介するものがあつた。これは、ラット肝中期発がん性試験法のエンドポイントとして設定されている 8 週目では、増殖活性の高いイニシエートされた細胞は肝臓の一部分を構成するのみで、比較的増殖活性の低い肝細胞が大部分を占めていることに起因する可能性が推察された。

牛脊柱からの背根神経節除去については、第 1 頸神経から第 9 胸神経の背根神経節が除去されやすいのは、硬膜から背根神経節までの背根の長さが短いことと、背根神経節がある程度大きいことに起因すると思われる。第 4 腰神経～第 3 仙骨神経及び第 10～第 12 胸神経の背根神経節が除去

されにくい点については不明である。なお、牛の品種別、牝牝別、および月齢別の観点から除去率を比較したが差は認められなかったが、各グループ間で除去率に差がない以上、月齢による除去率の差が生じないのも当然である。牛の脊柱をゼラチンや牛エキスの原材料として利用するためには、と畜場において背根神経節が完全に脊柱から分離されなければならないが、これまでのところその状況には達していないため、今後、さらなる除去技術の改良が必要である。

E. 結論

DC を 1500 ppm 含有する飼料を 13 および 26 週間、二段階肝発がんモデルマウスに与え、肝発がん過程における酸化ストレスの関与について検索した結果、DC は投与期間に依存して肝の前腫瘍性病変の発生、肝 DNA 中の酸化 DNA 損傷、ならびに肝ミクロソーム由来の ROS 産生を増強させることが明らかとなり、DC によるマウスにおける肝発がん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。

DC を 0.15% の濃度に混じた飼料を雌雄の *gpt delta* マウスへ 13 週間与えたところ、雌雄マウス肝 DNA 中の 8-OHdG レベルが上昇し、雌マウス肝 *gpt* 遺伝子突然変異頻度が上昇したことから、DC 投与により誘発される点突然変異がその発がん機序に深く関与している可能性が示唆された。

ラット二段階甲状腺発がんモデルを用い、SDM による発がん過程特異的な発現変動遺伝子のプロファイリング結果を基に、候補遺伝子産物の免疫組織学的検索を行った結果、発がん過程の早期より、細胞回転、細胞分裂に関与する遺伝子産物が前がん病変に集中して発現し、その発がん過程早期の標的遺伝子である可能性が示唆された。また、組織部位特異的な発現解析から、腫瘍性増殖形質の獲得に関与すると考えられる遺伝子群の取り出しに成功し、

現在、機能を含めて解析を進めている。

FB による肝発がん過程の早期での遺伝子発現プロファイルを求めたところ、細胞増殖に関して正負、両方向に進行する細胞機能が推定される遺伝子発現プロファイルが得られ、その中には Wnt 経路や TGF β シグナリングを介するものが得られた。

背根神経節の脊柱からの除去率 2005 年 1 月から 2006 年 2 月までに得られた試料について調べたところ、平均除去率が約 84% であり、2004 年 3 月に 80% を超えてから大きくは向上していない。また、牛の品種別、牝牝別および月齢別の脊柱からの背根神経節の除去率を比較検討したが、いずれも除去率に差はみられなかった。

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., Mitsumori, K.: Molecular pathological analysis on the mechanism of liver carcinogenesis in dicyclanil-treated mice. *Toxicology*, 207: 419-436, 2005.

Kashida, Y., Takahashi, A., Moto, M., Okamura, M., Muguruma, M., Jin, M., Arai, K., Mitsumori, K.: Gene expression analysis in mice liver on hepatocarcinogenesis by flumequine. *Arch. Toxicol.* in press.

Moto, M., Umemura, T., Okamura, M., Muguruma, M., Ito, T., Jin, M., Kashida, Y., Mitsumori, K.: Possible involvement of oxidative stress in dicyclanil-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Arch. Toxicol.* in press.

Lee, K-Y, Shibutani, M., Inoue, K., Kuroiwa, K., U, M., Woo, G-H., Hirose, M.: Methacarn fixation - Effects of tissue processing and storage conditions on detection of mRNAs and proteins in paraffin-embedded tissues. *Anal.*

Biochem. 351: 36-43, 2006.

Umemura, T., Kuroiwa, Y., Kitamura, Y., Ishii, Y., Kanki, K., Kodama, Y., Itoh, K., Yamamoto, M., Nishikawa, A., Hirose, M.: A crucial role of Nrf2 in *in vivo* defense against oxidative damage by an environmental pollutant, pentachlorophenol. *Toxicol. Sci.* 90: 111-119, 2006.

Ishii, Y., Umemura, T., Kanki, K., Kuroiwa, Y., Nishikawa, A., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H., Hirose, M.: Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 447: 127-135, 2006.

木村政治、平松竜司、松井利康、金井克晃、九郎丸正道：牛の脊柱からの背根神経節の除去に関する研究、*獣医生化学*、42：13-17, 2005

2. 学会発表

本光喜、梅村隆志、岡村美和、六車雅子、檜田陽子、町田登、三森国敏：Dicyclanilのマウス肝発がん機序に関する研究：酸化ストレスの関与、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2005年6月

本光喜、岡村美和、六車雅子、三森国敏：Dicyclanil誘発マウス肝腫瘍における遺伝子発現解析、第22回日本毒性病理学会学術年会、鹿児島、2006年1月

渋谷淳、井上薫、禹桂炯、禹麻美、黒岩敬子、五十嵐勝秀、広瀬雅雄：Sulfadimethoxineによるラット甲状腺発がん促進過程特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第64回日本癌学会学術総会、札幌、2005年9月

井上薫、渋谷淳、禹桂炯、禹麻美、黒岩敬子、菅野純、五十嵐勝秀、広瀬雅雄：Kojic

acidによるラット甲状腺発がん促進過程特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第64回日本癌学会学術総会、札幌、2005年9月

禹桂炯、渋谷淳、井上薫、禹麻美、黒岩敬子、五十嵐勝秀、富士本仁、広瀬雅雄：Gene expression profiling specific to the tumor promotion process of rat hepatocarcinogenesis induced by fenbendazole、第22回日本毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006年1月

渋谷淳、禹桂炯、井上薫、禹麻美、五十嵐勝秀、富士本仁、広瀬雅雄：肝中期発がん性試験法を用いたphenobarbitalによるラット肝発がん促進過程特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第22回日本毒性病理学会学術集会、鹿児島、2006年1月

Makoto, Shibutani., Kaoru, Inoue., Gye-Hyeong, Woo., Katsuhide, Igarashi., Jun, Kanno., Masao, Hirose.: Gene expression profiling specific to the tumor promotion process of rat thyroid carcinogenesis induced by sulfadimethoxine or kojic acid. 45th Annual Meeting of Society of Toxicology, San Diego, California, U.S.A., May, 2006

渋谷淳、井上薫、禹桂炯、富士本仁、禹麻美、五十嵐勝秀、菅野純、広瀬雅雄：甲状腺機能低下に起因する甲状腺発がんプロモーション過程早期に特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第141回日本獣医学会総会、つくば、2006年3月

禹桂炯、渋谷淳、井上薫、禹麻美、五十嵐勝秀、富士本仁、広瀬雅雄：Gene expression profiling specific to the tumor promotion process of rat hepatocarcinogenesis induced by fenbendazole or phenobarbital、第141回日本獣医学会総会、つくば、2006年3月

黒岩有一、梅村隆志、増村健一、神吉けい太、石井雄二、児玉幸夫、能美健彦、西川

秋佳、広瀬雅雄：gpt delta マウスにおけるフルメキン投与による酸化的 DNA 損傷と *in vivo* 変異頻度の解析、第 32 回日本トキシコロジー学会、2005 年 6 月、東京

梅村隆志、神吉けい太、黒岩有一、石井雄二、岡野圭太、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄：ラット腎発がん剤臭素酸カリウムによる酸化的 DNA 損傷、*in vivo* 変異原性およびイニシエーション活性、第 64 回日本癌学会、2005 年 9 月、札幌

黒岩有一、梅村隆志、北村泰樹、神吉けい太、児玉幸夫、伊東健、山本雅之、西川秋佳、広瀬雅雄：肝発がん物質ペンタクロロフェノールに対する Nrf2 欠損マウスの感受性、第 64 回日本癌学会、2005 年 9 月、札幌

Umemura, T., Keita, K., Kuroiwa, Y.,

Ishii, Y., Okano, K., Nohmi, T., Nishikawa, A., Hirose, M.: *In vivo* mutagenicity and initiation activity following overexpression of OGG1 and increase of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in the kidney of rats given potassium bromate. Society of Toxicology, 45th Annual Meeting, San Diego, March, 2006.

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

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

昨年度に引き続き、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への酸化的ストレスの関与について解析を進めた。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）マウスへ13および26週間混餌投与し、その肝について、病理組織学的検索、関連遺伝子の発現変動解析および酸化的損傷マーカーの測定を行った。その結果、DCは投与期間に依存して肝の前腫瘍性病変の発生および肝DNA中の酸化的DNA損傷を増加させ、*in vitro*実験において肝ミクロソーム由来の活性酸素種の産生を増強させることが明らかとなり、DCによるマウスにおける肝発がん機序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強く示唆された。

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を短期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、発がんへの関与が注目されている。

そこで昨年度は、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、マウス二段階肝発がんモデルへのDCの13および26週間混餌投与実験を行い、13週間投与実験について解析を実施した。本年度は、

昨年度に引き続き 26 週間投与実験について解析を実施した。また、DC がマウス肝において酸化ストレスを生じさせる原因を検索するため、酸化ストレスを生じる原因の一つと考えられている活性酸素種 (ROS) の産生について、マウス肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験系で測定した。

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 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 および 26 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 および RNA 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評価した。肝の一部から抽出した RNA 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 法により酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを測定した。

ROS 産生については、マウス肝より精製したミクロソーム画分と各濃度の DC を 37°C で反応させ、ROS 反応性蛍光指示薬 DCFH-DA により ROS 産生量を測定した。

統計解析は、各対照群と DC 投与群との間の Student-*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

標的臓器であるマウス肝における GGT の組織化学染色による前腫瘍性病変の検索では、DEN+DC+PH 群で投与 13 および 26 週目に GGT 陽性巣の形成が認められ、その陽性面積には経時的な増加が認められた。また、DC 群では投与 13 週目には陽性巣が認められなかったが投与 26 週目には陽性巣の形成が認められた。(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、その補酵素であ

る P450 oxidoreductase 1、代謝第二相酵素で還元酵素である thioredoxin reductase 1、ラジカル消去酵素である superoxide dismutase 1、および酸化 DNA 損傷の一つである 8-OHdG の修復酵素 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 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。しかしながら、これらの変化には明らかな経時的変化は認められなかった。

肝組織から抽出した DNA 中 8-OHdG レベルの測定結果を Fig. 3 に示す。8-OHdG レベルは DC 群では投与 26 週目で、DMN+DC+PH 群では投与 13 および 26 週目にそれぞれ顕著で有意な上昇が認められた。また、これらの変化は投与 13 週目に比べ投与 26 週目では約 2 倍に増加していた。

ROS 産生量の測定結果を Fig. 4 に示す。DC 存在下での ROS 産生量は、DC の濃度依存的に増加し、0.3mM 以上で有意な増加が認められた。

D. 考察

組織学的な前腫瘍性病変マーカーによる評価では、二段階肝発がんモデルにおいて、DC の 1500 ppm 投与により、GGT 陽性巣の数/面積の有意な増加が認められ、遺伝子レベルの解析においても、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、肝組織 DNA 中の 8-OHdG レベルにも経時的で有意な上昇が認められた。さらに、投与 26 週目ではイニシエーション処置を施していない DC 単独群においても GGT 陽性巣の形成、および 8-OHdG レベルの有意な上昇が認められた。In vitro での実験では、DC がその代謝過程で ROS を産生することが

明らかとなった。これらの結果から、DC はマウス肝に対し腫瘍誘発を増強する可能性が強く示唆され、DC により増強される発がん過程において酸化ストレスが生じていることが明らかとなった。また、酸化ストレス関連遺伝群の発現変化、特に 8-OHdG の修復遺伝子である 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 には経時的変化がみられなかったものの、8OH-dG レベルが経時的に増加していたことから、本濃度の DC の長期投与により生じた酸化ストレスが高度なレベルで継続し、この蓄積性の変化により酸化 DNA 損傷が増加させた可能性が推察された。

8-OHdG については、これまでに塩基配列中で GC:TA トランスバージョン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。DC については、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* 遺伝毒性アッセイにおいても、8-OHdG レベルの増加が認められており、現在その変異が固定されるか否かについては検討中である。

以上の結果から、DC によるマウスにおける肝発がん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。しかしながら、これまでの解析は肝発がん過程における解析であり、実際の肝腫瘍組織における解析はなされていない。よって、DC による肝発がんへの酸化ストレスおよび酸化 DNA 損傷の関与を更に明らかにするため、DC により誘発した肝腫瘍の形成時期における更なる解析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 および 26 週間、二段階肝発がんモデルマウスに与え、肝発がん過程における酸化ストレスの関与について検索した結果、DC は投与期間に依存して肝の前腫瘍性病変の発生、肝 DNA 中の酸化 DNA 損傷、ならびに肝ミクロソーム由来の ROS 産生を増強させることが明らかとなり、DC によるマウスにおける肝発がん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。

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.

Kashida, Y., Takahashi, A., Moto, M., Okamura, M., Muguruma, M., Jin, M., Arai, K. and Mitsumori, K.: Gene expression analysis in mice liver on hepatocarcinogenesis by flumequine. *Arch. Toxicol.* in press.

Moto, M., Umemura, T., Okamura, M., Muguruma, M., Ito, T., Jin, M., Kashida, Y. and Mitsumori, K.: Possible involvement of oxidative stress in dicyclanil-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Arch. Toxicol.* in press.

2. 学会発表

本光喜、梅村隆志、岡村美和、六車雅子、檉田陽子、町田登、三森国敏：Dicyclanil のマウス肝発がん機序に関する研究：酸化ストレスの関与、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2005 年 6 月

本光喜、岡村美和、六車雅子、三森国敏：Dicyclanil 誘発マウス肝腫瘍における遺伝子発現解析、第 22 回日本毒性病理学会学術年会、鹿児島、2006 年 1 月

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

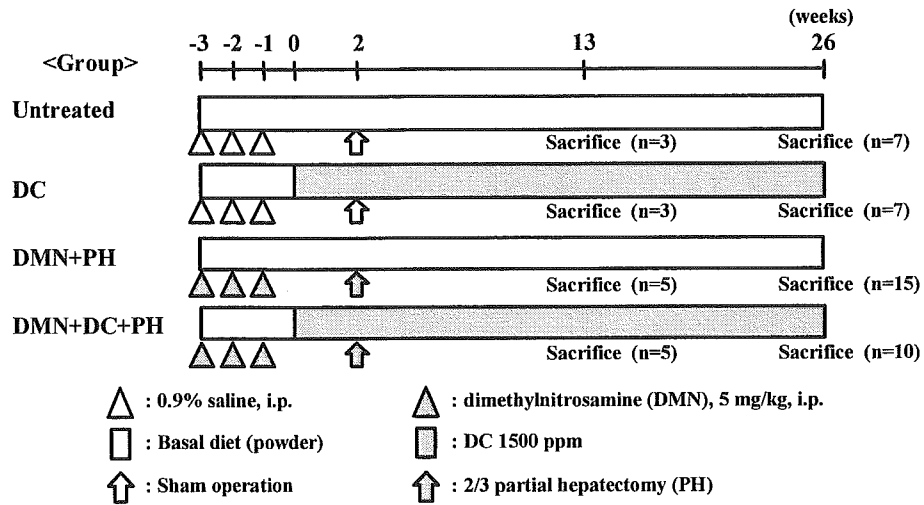


Fig. 1. Experimental design

Table 1

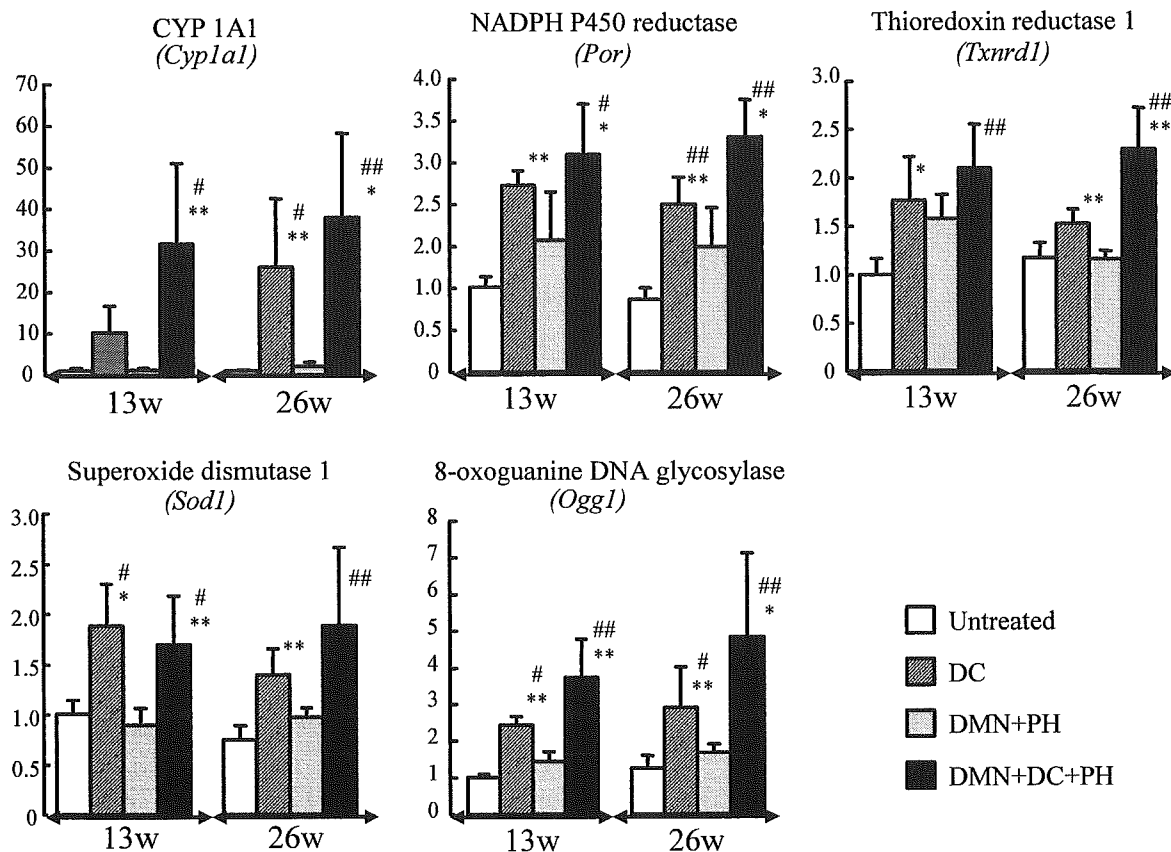
Quantitative data of GGT positive cells and foci in the liver of hepatectomized mice treated with DC for 13 and 26 weeks after DMN initiation.

Group	Number of Animals	GGT Positive focus (>0.05 mm)	
		Number (No./cm ²)	Total area (mm ² /cm ²)
13 w			
Untreated	3	0 ^{a)}	0
DC	3	0	0
DMN+PH	5	0	0
DMN+DC+PH	5	13.89 ± 11.22	0.072 ± 0.059
26 w			
Untreated	7	0	0
DC	7	1.19 ± 3.15	0.004 ± 0.012
DMN+PH	15	0	0
DMN+DC+PH	10	7.32 ± 13.41	0.234 ± 0.640

a) Data are mean ± S.D.

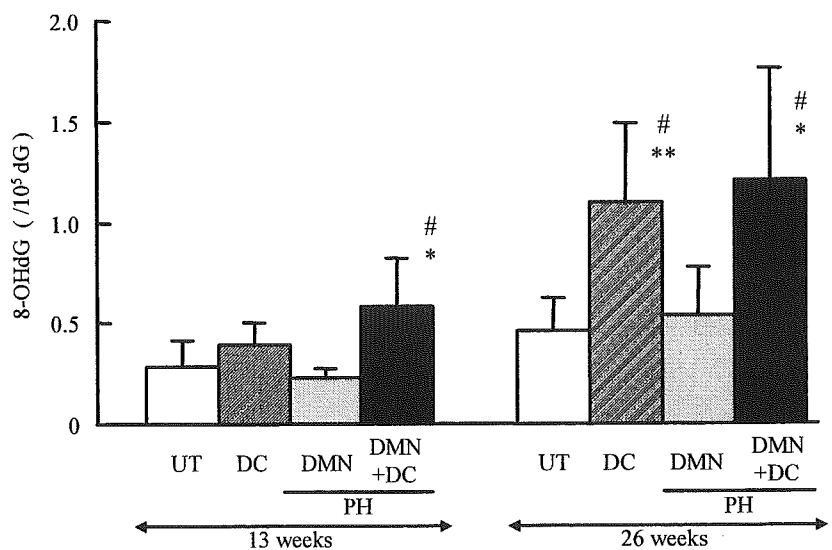
*; Significantly different from the DMN+PH group at $p < 0.05$ (t -test).

†; Significantly different from the untreated group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).



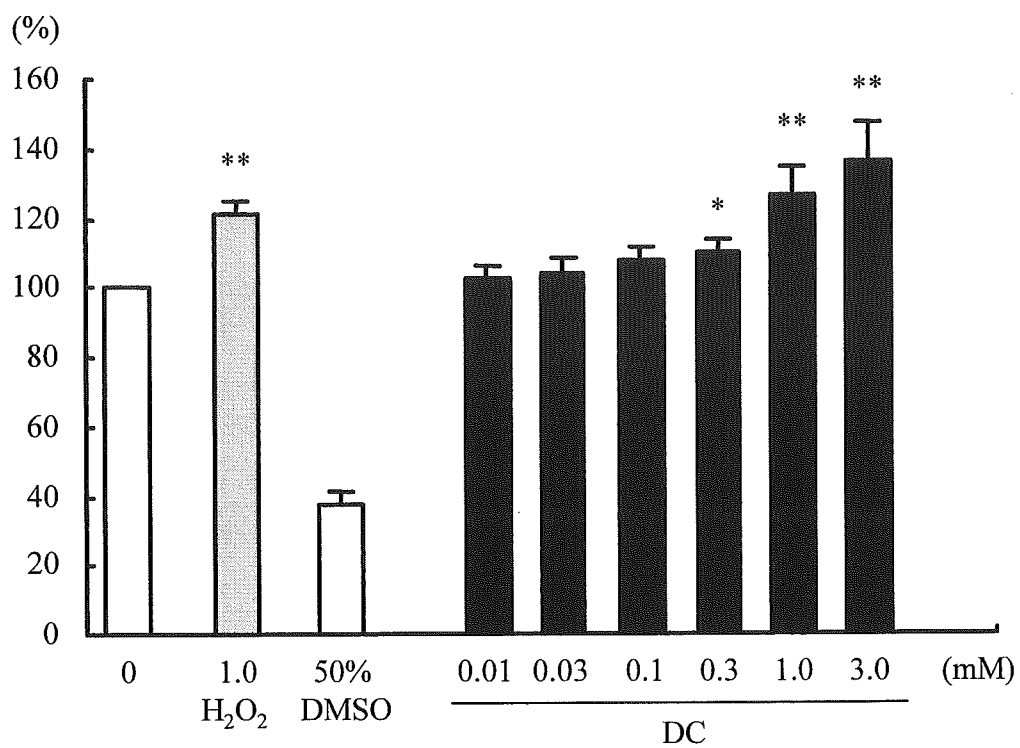
【 Unit : ratio】 (Gene Symbol) mean + S.D. (13w, n=3 to 5; 26w, n=7 to 15)
 *, ** ; p<0.05, 0.01 vs Untreated or DNMT+PH group (t-test/ANOVA)
 #, ## ; p<0.05, 0.01 vs Untreated group (Dunnett's test)

Fig. 2. Gene expression in the liver of hepatectomized mice treated with DC for 13 and 26 weeks after DMN initiation.



*, **; Significantly different from the each control (Untreated or DNMT+PH) group at p<0.05 or 0.01 (t-test).
 #; Significantly different from the untreated group at p<0.05 (Dunnett's test).

Fig. 3. Levels of 8-OHdG in the liver DNA of hepatectomized mice treated with DC for 13 and 26 weeks after DMN initiation.



*, **; Significantly different from the vehicle (0 mM) at $p < 0.05$ or 0.01 , respectively (Dunnett's-test).

Fig. 4. Effects of DC on hepatic-microsomal ROS production.

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った。16年度は、sulfadimethoxine (SDM) によるラット甲状腺発がんについて、二段階発がんモデルでの甲状腺発がん過程の早期に特異的な発現変動遺伝子群をマイクロアレイ法により同定した。17年度は、用量依存性の観点から選別された遺伝子のうち、aurora kinase B、cyclin B1、glucagon、bone morphogenic protein 4 (BMP4)、vitamin D receptor (VDR)の5つについて real-time RT-PCR による発現レベルの検証を行った結果、同等の発現が確認された。さらに、抗体による検索が可能な遺伝子産物について、本実験で誘発された甲状腺病変での発現局在を検討した結果、マイクロアレイで発現増加を示した cyclin B1、aurora kinase B は前がん病変である限局性濾胞上皮過形成 (FFCH) に陽性像が集中し、SDM による甲状腺発がんの早期の標的遺伝子と考えられた。一方、マイクロアレイで発現減少した BMP4、VDR も FFCH に陽性像が集中し、マイクロアレイ結果と一致せず、転写後の発現制御の関与が考えられた。さらに、SDM による発がんプロモーション過程（10 週ないし 15 週目）で発生した FFCH+腺腫、がん病変をマイクロダイセクション法により採取し、現在解析途中であるが、マイクロアレイ解析により非がん部に比べて発現の増減を示した遺伝子を求めた結果、いずれもがんで変動するものが多く、FFCH+腺腫とがん病変で共通の発現変動遺伝子も多数認められた。また、17年度は、fenbendazole (FB) による肝臓発がんについて、ラット二段階発がんモデルでの肝発がん過程早期特異的な発現変動遺伝子群のプロファイリングを実施した。実験は、雄性 F344 ラットに DEN 単回投与によるイニシエーション処置後、2 週目より FB を 400、1200 ないし 3600 ppm の割合で混餌投与し、途中(3 週目)で肝部分切除を行った。DHPN、および FB (3600 ppm) の単独投与群も設定し、FB の投与開始後 6 週を経過した時点で実験を終了した。肝発がん指標である GSTP 陽性細胞巢の定量解析の結果、1200 ppm 以上でプロモーション作用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した遺伝子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、400 ppm 以上の群でそれぞれ 5、1 遺伝子、1200 ppm 以上の群でそれぞれ 10、5 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 9 遺伝子で、発現増加したものには TGF β シグナリングないし Wnt 経路を介した細胞増殖抑制に関する遺伝子(それぞれ TGF β -masking protein large unit、axin 2)、発現減少を示した遺伝子には、Wnt シグナリングに制御される細胞増殖に関与する secreted frizzled-related protein 4 が見出され、プロモーション 6 週目の時点では、イニシエートされた肝細胞は肝臓のごく一部を構成し、残りの大多数が細胞増殖活性の低い肝細胞からなることを反映したものと考えられた。

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について、非遺伝毒性発癌物質と判定して許容一日摂取量 (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。

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。対象となるのは、鶏コクシジウム症等に用いられるサルファ剤である sulfadimethoxine (SDM)による甲状腺発がん、ベンズイミダゾール系駆虫薬の fenbendazole (FB)による肝臓発がんである。

SDM やそれ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。昨年の本分担研究では、この分子機序解明を目的として、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行い、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が生じていることを示唆する発現プロファイルを得た。今年度は、引き続き、候補遺伝子の mRNA 発現の検証

と共に、抗体による局在解析が可能な遺伝子産物の甲状腺病変での分布を解析し、発がん過程への関与の有無を検討した。

FB は、非遺伝毒性肝発がん物質と評価されているが、本研究課題の主任研究者らの研究によりラット肝臓において CYP1A2 を誘導し、肝二段階発がんモデルではコネキシン 32 の発現低下を見出されたものの、具体的な発がんメカニズムは不明なままである。そこで本研究では、昨年度 SDM 誘発甲状腺発がんを実施した解析と同様に、FB による発がん性機序を解明するために、肝二段階発がんモデルを用いて、発がん過程の早期(投与 6 週目)に特異的に発現変動する遺伝子群の同定を行ったので報告する。

本研究ではまた、この様な非遺伝毒性機序により発生する腫瘍の、腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を行うが、それにはマイクロダイセクション法を組み合わせた病変部位特異的なマイクロアレイ解析が必須である。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 real-time 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、今年度は SDM で誘発された腫瘍性病変で周囲細胞に比べて特異的に発現変動する遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

SDM 実験：

動物は、5 週齢の雄性 F344 ラット (日本 SLC) 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。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)