

200636006A

別添 1

厚生労働科学研究研究費補助金

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三森 国敏

平成19（2007）年 3月

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解明に関する研究	-----	11
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	-----	20
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	-----	50
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	-----	59
九朗丸 正道		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	83
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	85

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院 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。2/3 肝部分切除の後に diethylnitrosamine (DEN)によるイニシエーション処置を施したマウスに DC を 20 週間混餌投与し、腫瘍形成期の肝臓及び腫瘍部位について解析を実施した。DEN 投与の非腫瘍部並びに DEN+DC 投与で腫瘍が認められた個体の腫瘍部及び非腫瘍部から、それぞれマイクロダイセクション法により採取した組織における遺伝子発現を比較した。その結果、*Cyp1a1* 及び *Txnrd1* は腫瘍組織で最も強く発現したが、*Ogg1* は腫瘍部における遺伝子発現上昇が認められず、*Trail* は非腫瘍組織に比べ腫瘍組織で有意な低下が認められた。以上の結果から、DC により誘発されたマウス肝腫瘍では、酸化ストレスに対する修復機能及びアポトーシス誘導能に対し抑制的な影響が生じている可能性が示唆された。

また、DC を 13 週間、雌雄の *gpt delta* マウスに混餌投与した結果、肝 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルは雌雄ともに上昇したが、肝細胞増殖活性並びに肝 *gpt* 遺伝子突然変異頻度は雌マウスでのみ上昇が認められた。その変異の主体は GC:TA トランスバージョン変異であった。雌雄 B6C3F1 マウスについて同様に DC を投与したところ、投与 4 週目における 8-OHdG レベルは雌マウスでのみ上昇が認められた。以上の結果から、DC 投与で生じる酸化ストレスは、雌マウス肝において投与初期から持続的な 8-OHdG の蓄積を招くとともに肝細胞増殖活性を亢進させ、結果として 8-OHdG を原因とした点突然変異を高率に引き起こすことが明らかとなった。

サルファ剤のサルファジメトキシシン(SDM)については、ラット甲状腺における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ため、マイクロダイセクション法を利用した病変部位特異的なマイクロアレイ解析を実施し、限局性濾胞上皮過形成(FFCH) + 腺腫、腺がん、FFCH + 腺腫及び腺がんに共通する発現変動遺伝子を同定した。さらに免疫染色解析の結果、SDM による甲状腺腫瘍の進展過程には、*cyclin B1* 及び *cdc2* の発現増加による増殖活性の増強、*Pvr13* の発現減少による細胞間接着の消失、*ceruloplasmin* の発現増加による細胞内ホメオスタシスの変動の関与が示唆された。また、ベンズイミダゾール系駆虫薬のフェンベンダゾール(FB)については、ラット肝二段階発がんモデルでのプロモーション過程早期(6 週目)において、典型的ラット肝発がんプロモーターである phenobarbital (PB) のプロファイルとの共通成分を探索し、さらに免疫染色解析を実施した結果、GST-P 陽性肝細胞巢の中に transferrin receptor、Nr0B2、TGF β RI の共発現・発現増強を示すものが見出され、前がん病変の多様性が示された。

BSE(牛海綿状脳症)の特定危険部位である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。同時に牛の品種別、牝牝別、月齢別における除去率の差も検討した。今年度の調査結果では、平均して全背根神経節の 87% がと畜場で除去可能であったが、100%の除去は現時点の技術では依然として困難であると言わざるを得ない。また、牛の品種別、牝牝別、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
究院 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以下の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、昆虫成長調節剤として羊に用いられている動物用医薬品であり、その母化合物及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。昨年度までの肝腫瘍形成過程の前腫瘍性病変における研究から、DC によるマウス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を強く示唆する知見が得られている。

また、甲状腺発がん物質であるサルファジメトキシシン (SDM) については、発がん過程早期 (4 週) に特異的な発現変動遺伝子のプロファイリング及び候補遺伝子産物の免疫組織学的検索結果から、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ており、これらが SDM による発がん過程早期の標的遺伝子である可能性を示唆する知見が得られている。

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) も非遺伝毒性肝発がん物質と評価されており、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シン 32 の発現低下が見出されているが、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、肝腫瘍形成期での肝臓並びに肝腫瘍部位について遺伝子発現解析を実施し、実際の腫瘍部位における酸化ストレス関連遺伝子を含む遺伝子群の発現について検討した。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* 変異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 DNA 損傷の関与への可能性を検索した。

SDM については、腫瘍性増殖形質の獲得に関与する遺伝子群の同定を行なうため、申請者らが既に確立している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を利用し、病変部位特異的なマイクロアレイ解析を実施した。さらに、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については、甲状腺増殖性病変における発現状況を解析し、発がん過程への関与の有無を検討した。

FB については、昨年度に引き続き FB による発がん性機序を探るため、ラット肝二段階発がんモデルを用いて、発がんプロモーション過程の早期(6 週目)に特異的に発現変動する遺伝子群を同定し、免疫組織化学的解析が可能な遺伝子産物についてはその発現局在解析を行った。

BSE の特定危険部位である牛の背根神経節は脊柱内にあり、その脊柱からの分離が困難なことから、これまで資源として有効活用されていた安全な脊柱までもが現在廃棄の対象となっている。もし、と畜場において背根神経節を脊柱から完全に分離する手法が確立できれば、経済的にも資源の活用という点からも、その効果は大きいと考えられる。本研究では、そのための基礎的データを蓄積することを目的として、一昨年より国内外初めての取り組みとして開始した。本年度は、昨年に引き続き、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する背根神経節を引き剥がした試料を用いて、背根神経節の除去率を算出し、と畜場においての背根神経節の完全除去の可能性を検討した。さらに、品種別、牝牝別、及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行なった。

B. 研究方法

DC の肝腫瘍形成期における検索については、エーテル麻酔下で 2/3 肝部分切除術を施した後、30 ないし 0 mg/kg の diethylnitrosamine (DEN) によるイニシエーション処置を施した 5 週齢の雄性 ICR マウスへ、処置 1 週間後より 1500 ないし 0 ppm の DC を 20 週間混餌投与した。混餌投与終了後に肝臓を採取し、その肝臓について組織学的検索を実施するとともに、マイクロアレイ並びにマイクロダイセクション法を用いた遺伝子発現解析を実施した。

遺伝子発現解析は、肝組織(各群 3 例)について cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施し、発現変動が認められた遺伝子を選抜した。選抜された遺伝子に加え、これまでの研究において検討してきた酸化ストレス関連遺伝子である 8-oxoguanine DNA glycosylase (*Ogg1*) 及び thioredoxin reductase 1 (*Txnrd1*) の発現をすべての動物についてリアルタイム RT-PCR 法にて確認し、組織学的検索による腫瘍性病変の有無により特徴な変動傾向を示した遺伝子を検索した。さらに、検索・選抜された遺伝子の発現比較は、腫瘍部と非腫瘍をレーザーマイクロダイセクションシステムにて各群 3 例の肝凍結標本より個体それぞれから採取し実施した。

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* 変異原性アッセイを実施した。すなわち、雌雄 8 週齢の B6C3F1 系統 *gpt* delta マウス各群 5 匹に DC を 0、0.15% の濃度に混じた飼料を 13 週間自由に摂取させた。肝臓の一部はホルマリン固定後、常法によりパラフィン切片を作成し、BrdU 免疫染色を施し、BrdU 陽性細胞率 (BrdU-LI) を算出した。残りの肝臓はホ

モジナイズ後、チオバルビツール酸反応物質 (TBARS) を測定し、また一部から DNA を抽出して 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。また、同様に DNA を抽出し、*gpt* アッセイ並びに *Spi*-アッセイを実施した。さらに、雌雄の B6C3F1 マウスに同様に DC を投与して、投与後 2 及び 4 週目の肝 8-OHdG レベルを測定した。

SDM については、DHPN を 2800 mg/kg 体重の割合で単回皮下注射後、一週後から SDM1000 ppm を飲水投与し 10 ないし 15 週後に摘出した甲状腺の頭側半分をホルマリン固定、尾側半分をメタカーン固定した。メタカーン固定材料について、パラフィン包埋切片を作製し、レーザーマイクロダイセクション法を用いて個体ごとに限局性濾胞上皮過形成 (FFCH)+腺腫 (10 週サンプル)、非がん部 (goiter : 10 週サンプル)、腺がん (15 週サンプル) に切り分けて採取した。次いで、非がん部、FFCH+腺腫、腺がんから total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析に用いた。マイクロアレイ解析により得られた代表的な発現増減遺伝子の発現変動については、real-time RT-PCR を用い、非がん部と FFCH+腺腫あるいは腺がんの間で比較した。

免疫組織化学的な発現局在の解析が可能な遺伝子産物については、SDM 投与 10 及び 15 週で採取したホルマリン固定材料を用いて評価を行った。

FB については、昨年度実施したラット二段階肝発がんモデルにおける無処置群、DEN 単独投与群、FB 単独投与群、DEN +FB400、1200、3600 ppm 群の 6 群について、網羅的遺伝子発現解析を行い、FB の発がんプロモーション過程に特異的に変動する遺伝子群の同定を試みた。また、

別プロジェクトにおいて同様のプロトコールにより検証した phenobarbital (PB) の発がんプロモーション過程に特異的な変動を示す遺伝子群と比較することにより、FB と PB に共通して変動する遺伝子群を得た。さらに本年度は、得られた遺伝子プロファイルに基づき、免疫組織化学的解析が可能な遺伝子産物について発現局在の解析を加えた。

牛脊柱からの背根神経節の除去については、2006 年 3 月から 2007 年 2 月までの計 708 検体について、脊柱から除去すべき背根神経節 (背割り後の枝肉 [半頭分] で、頸椎部 8 個、胸椎部 13 個、腰椎部 6 個及び仙骨部 5 個の総計 32 個) が、脊柱からどの程度除去されているか (除去率) を算出した。算出方法は、背根神経節の全体が付随しているものを 1 とし、大部分が付随しているものを 2/3、半分程度が付随しているものを 1/2、一部が付随しているものを 1/3、全く付随していないものを 0 として合計し、背根神経節の総数 32 に対する割合を求めた。同時に、牛の品種別、牝牝別及び月齢別の除去率も比較検討した。

(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た。また、動物飼育、管理に当たっては、国立大学法人 東京農工大学の実験動物取り扱い倫理規定、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い指針及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。

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た。

C. 研究結果

DC における病理組織学的検索では、DEN+DC 群において肝腫瘍が 5/14 例 (36%) に観察され、DC による肝腫瘍の有意な発生率の増加が認められた。遺伝子発現解析では、マイクロアレイによる解析により選抜された遺伝子に加え、*Ogg1* 及び *Txnrd1* の発現について解析した結果、群ごとの発現解析では、*Cyp1a1*、*Hmox1*、*Ogg1*、及び *Txnrd1* に有意な発現上昇が、*Trail* については有意な発現低下がそれぞれ認められた。個体別解析では、DEN+DC 群の組織学的検索において腫瘍ないし腫瘍性病変の形成が認められた個体において、*Trail*、*Ogg1* 及び *Txnrd1* が同群の平均発現値に比べ低値傾向を示した。腫瘍性病変の有無により特徴的な発現変動傾向を示した *Trail*、*Ogg1* 及び *Txnrd1* については、マイクロダイセクション法を用い、腫瘍部及び非腫瘍部における遺伝子発現解析を実施した。その結果、*Trail* については、DEN+DC 群の腫瘍部において有意な発現低下が認められた。*Ogg1* については、DEN+DC 群の非腫瘍部において有意な発現上昇が認められたが、腫瘍部における発現上昇は認められなかった。*Txnrd1* については、DEN+DC 群の腫瘍部、非腫瘍部でともに発現上昇が認められたものの、腫瘍-非腫瘍部間での明確な違いは認められなかった。なお、腫瘍性病変の有無による特徴的な変動を示さなかった *Cyp1a1* は、DEN 群の非腫瘍部に比べ、DEN+DC 群の腫瘍部、非腫瘍部でともに発現上昇が認められ、腫瘍部において最も高値を示

した。

また、DC を *gpt delta* マウスに 13 週間投与した結果、雌の投与群で肝重量及び比重量の有意な増加が観察され、BrdU-LI も有意な高値を示した。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に高い値となった。*In vivo* mutation assay の結果、雌の投与群で GC:TA トランスバージョン変異を主体とする *gpt* 遺伝子突然変異頻度が有意に上昇した。また、雌の B6C3F1 系マウスでは DC 投与 4 週目より 8-OHdG レベルが有意に上昇した。

SDM については、甲状腺増殖病変に特異的な変動遺伝子として得られたプロファイルの概要として、FFCH+腺腫では cyclin 関連遺伝子の発現増加が、腺がんでは G 蛋白関連シグナル分子の発現減少が比較的多く認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果を検証するために代表的な発現増減遺伝子について real-time RT-PCR により発現値の検討を行った結果、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。

次に免疫組織学的な局在解析が可能であった遺伝子産物について、増殖性病変部における発現状況を検討した。Ceruloplasmin の発現は非がん部では陰性であるのに対して、FFCH+腺腫及び腺がんではコロイドに面する細胞膜が強く陽性を示し、マイクロアレイ解析及び real-time RT-PCR 解析の結果と一致した傾向を示した。Cyclin B1 は細胞質ないし核が陽性を示し、マイクロアレイ解析の結果と同様に、腺腫を主体とする増殖性病変部において陽性細胞が集中して観察され、Cdc2 についても同様の結果が得られた。Pvr13 は非がん部では細胞膜に発

現が認められたが、FFCH+腺腫及び腺がんでは発現減少あるいは消失を示し、マイクロアレイ解析及び real-time RT-PCR 解析の結果と同様の傾向を示した。一方、細胞間に局在する decorin は、マイクロアレイ解析では腺がんにおいて発現減少を示したが、免疫染色では非がん部、FFCH+腺腫及び腺がんのいずれにおいても同程度の発現が観察され、増殖性病変部における発現減少は認められなかった。Id3 は核に陽性を示し、マイクロアレイ解析の結果と同様に、FFCH+腺腫及び腺がんでは発現減少傾向を示した。Thyroglobulin は非がん部、増殖性病変ともに種々の程度に細胞質が陽性を示し、マイクロアレイ解析では腺がんでは発現増加が認められたが、免疫染色では染色強度のばらつきが大きく、腺がんでは発現減少傾向を示した。

FB の網羅的遺伝子発現解析の結果、選出された遺伝子群の中には、細胞増殖抑制に関わる遺伝子が比較的多く見出された。免疫組織学的な局在解析の結果として、まず transferrin receptor は、肝細胞の細胞質を主体に陽性を示し、無処置群、DEN 単独投与群では肝小葉全体にわたりびまん性に弱く発現しているのに対して、DEN+FB3600 ppm 群では全体に染色性が増強した。また、一部の変異肝細胞巣においては、周囲組織と比較して強い発現を認めた。Nr0B2 は無処置群及び DEN 単独投与群では、ほぼ全ての肝細胞の細胞質が陽性を示したが、DEN+FB3600 ppm 群では発現減少を示す細胞が増加した。一方、変異肝細胞巣に一致して強い発現を示す肝細胞も観察された。PCNA と MCM6 はいずれも増殖細胞の核に陽性を示し、DEN+FB3600 ppm 群において、肝細胞再生部位を主体として陽性細胞が増加した。マイクロア

レイ解析では DEN+FB3600 ppm 群において MCM6 の発現増加が認められており、免疫染色の結果と一致した。マイクロアレイ解析において細胞増殖抑制に向かう発現変動が認められたため、細胞増殖抑制に関わる分子の一例として TGF β RI の免疫染色を実施した。その結果、TGF β RI は変異肝細胞巣に一致して細胞質に発現が認められ、TGF β RI 陽性巣の数は、DEN 単独投与群と比較して、DEN+FB3600 ppm 群で有意に増加した。連続切片で GST-P の発現と比較した結果、TGF β RI 陽性巣は全て GST-P 陽性を示した。また、GST-P 陽性巣のうち TGF β RI の共発現が認められたものは、DEN 単独投与群では 51%、DEN+FB3600 ppm 群では 80%であった。

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、2006年3月から2007年2月の間で平均約87%であった。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11胸神経の背根神経節の除去率も低い値を示した。同時に、牛の品種別、牝牝別、及び月齢別に脊柱からの背根神経節の除去率を調べたが、差は認められなかった。

D. 考察

DC による腫瘍形成期の肝組織における遺伝子発現解析では、代謝並びに酸化ストレス関連した遺伝子である *Cyp1a1* や *Hmox1* などに有意な発現上昇が認められた。加えて、酸化 DNA 損傷修復に関与する *Ogg1*、酸化還元調節に関与する *Txnrd1* にも発現上昇が認められた。また、アポトーシスの亢進に関与する *Trail* は有意な発現低下が認められた。今回得られた結果は、これまでの結果と一致するものであり、腫瘍形成期におい

ても酸化ストレスが生じている可能性が示唆された。また、組織学的検索結果を加味した個体別における発現解析では、腫瘍性病変を有した個体の *Trail*, *Ogg1*, *Txnrd1* 発現が、同群内において比較的低下を示す特徴的な傾向がみられた。さらに、腫瘍部と非腫瘍部位それぞれにおける遺伝子発現を比較した結果、非腫瘍部位に比べ、腫瘍部位における *Trail* 及び *Ogg1* の発現の低下が認められた。以上の結果から、DC により増強した肝腫瘍部では、酸化ストレス、酸化 DNA 損傷修復能並びにアポトーシス誘導能への抑制的な影響が生じている可能性が示唆された。また、これまでの研究結果を考慮すると、DC による肝腫瘍の形成には酸化ストレスが重要な役割を果たしているものと考えられた。

また、DC 投与により、発がん性が報告されている雌マウス肝の 8-OHdG レベルが投与早期より上昇し、細胞増殖活性並びに GC:TA トランスバージョン変異を主体とする *gpt* 遺伝子変異頻度が上昇した。従って、DC 投与により標的臓器 DNA 中に 8-OHdG が蓄積し、同時に細胞増殖活性が上昇することにより、酸化 DNA 損傷を原因とする点突然変異が高頻度に生じ、最終的に腫瘍形成に至る可能性が示された。今回の結果は、非遺伝毒性発がん物質として考えられていた DC の遺伝子障害性、さらにその発がん機序を示唆する結果を明らかにしたものであり、当該動物用医薬品の安全性再評価にとって重要な情報を提供するものと考えられた。

SDM における甲状腺増殖性病変部位特異的なマイクロアレイ解析の結果、選別された代表的な発現増減遺伝子は、real-time RT-PCR により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。

免疫組織化学的な局在解析を行った遺伝子産物のうち、ceruloplasmin、cyclin B1、Cdc2、Pvrl3、Id3 については、マイクロアレイや real-time RT-PCR の結果を反映した所見が得られた。一方、decorin、thyroglobulin については、マイクロアレイ結果と一致せず、転写後での発現制御の関与が推察された。

Cyclin B1 の発現については、我々は既に SDM 投与初期 (4 週) から濾胞上皮の限局性過形成に発現増加し、発がん過程早期の標的遺伝子である可能性を見出している。Cyclin B1 は cdc2 と共に M 期促進因子を形成するが、今回のマイクロアレイ解析では FFCH+腺腫において両遺伝子の発現増加を認め、免疫染色でも増殖性病変に集中して陽性細胞が観察されたため、これらの腫瘍の進展への関与も示唆された。Pvrl3 は上皮細胞のカドヘリンを介した細胞接着結合に関与するが、FFCH+腺腫及び腺がんが発現減少あるいは消失が認められた。同じファミリー分子である Pvrl1/nectin-1 で既に報告のある様に、その発現減少に伴う細胞接着消失の腫瘍進展への関与が示唆された。Ceruloplasmin は銅原子を持つ糖蛋白質で、血清中の銅の運搬等に機能し、ヒト甲状腺では濾胞状腺がん及び乳頭状腺がんにおいて ceruloplasmin の発現が報告されている。

FB と典型的なラット肝発がんプロモーターである PB とを比較し選別された遺伝子群の中に細胞増殖抑制に関わる遺伝子が比較的多く見出されたことは、プロモーション過程の早期では、イニシエートされていない肝細胞を主体とする肝臓全体の変化を反映したものと考えられた。

免疫組織化学的解析の結果、GST-P 陽性細胞巢の中に transferrin receptor、

Nr0B2、TGF β RI の共発現を示すものが認められ、GST-P 陽性肝細胞巢の形質の多様性が確認され、その一部のみが腫瘍に進展すると考えられた。Transferrin receptor は細胞内への鉄取り込みに関与し、肝前がん病変での発現増加が報告されている。Nr0B2 は核内オーファン受容体で、Cyp7a1 や G6Pase の遺伝子発現の抑制が知られており、肝細胞巢では G6Pase の減少を示すため、この分子の前がん病変形成への寄与が示唆された。TGF β は肝細胞の増殖抑制を示すが、その受容体の突然変異や発現減少は、腫瘍形成に促進的に作用することが報告されている。今回の検索では、GST-P 陽性肝細胞巢の一部に認められた TGF β RI 陰性巢の出現が腫瘍へ進展する可能性が示唆された。

牛脊柱からの背根神経節除去について、第1頸神経から第10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た。また第4腰神経～第3仙骨神経の背根神経節、それに次いで除去率の低い第11胸神経の背根神経節において、何故除去が難しいのか、その理由は不明である。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。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 20 週間、二段階肝発がんモデルマウスに与え、形成された肝腫瘍部における酸化ストレス関連遺伝子の発現解析を実施した結

果、肝腫瘍部では酸化ストレス、酸化 DNA 損傷修復能並びにアポトーシス誘導能への抑制的な影響が生じている可能性が示唆された。また、DC を発がん用量である 0.15% の濃度に混じた飼料を投与したところ、発がん性を示した雌においてのみ、肝 DNA 中の 8-OHdG レベルが早期より上昇し、肝細胞の細胞増殖活性も上昇した。さらに GC:TA トランスポバージョン変異を主体とした *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。

SDM の甲状腺増殖性病変部位に特異的なマイクロアレイ解析から、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を選別し、さらに免疫染色による発現局在解析を行った。その結果、SDM による甲状腺腫瘍の進展過程には cyclin B1 及び *cdc2* の発現増加による増殖活性の増強、*Pvrl3* の発現減少による細胞間接着の消失、*ceruloplasmin* の発現増加による細胞内ホメオスタシスの変動が関与することが示唆された。

FB による肝発がんプロモーション過程の早期における遺伝子発現プロファイリングさらに免疫染色の結果から、GST-P 陽性肝細胞巢の中に transferrin receptor、Nr0B2、TGF β RI の共発現・発現増強を示すものが見出されたが、このような前がん病変の多様性が腫瘍への進展過程に関与する可能性が推察された。

背根神経節の脊柱からの除去率について、2006年3月から2007年2月までに得られた試料について調べたところ、平均除去率は87%であった。また、牛の品種別、牝牝別、及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見られなかった。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 80: 533-539, 2006.

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. 80: 694-702, 2006.

Moto, M., Okamura, M., Muguruma, M., Ito, T., Jin, M., Kashida, Y., Mitsumori, K.: Gene expression analysis on the dicyclanil-induced hepatocellular tumors in mice. Toxicol. Pathol. 34: 744-751, 2006.

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.

Shibutani, M., Lee, K-Y, Igarashi, K., Woo, G-H., Inoue, K., Nishimura, T., Hirose, M.: Hypothalamus region-specific global gene expression profiling in early stages of central endocrine

disruption in rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide. Dev. Neurobiol. 67(3): 253-269, 2007.

Kuroiwa, Y., Umemura, T., Nishikawa, A., Kanki, K., Ishii, Y., Kodama, Y., Masumura, K., Nohmi, T., Hirose, M.: Lack of *in vivo* mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of *gpt* delta mice. Arch. Toxicol. 81:63-69. 2007.

Umemura, T., Kanki, K., Kuroiwa, Y., Ishii, Y., Okano, K., Nohmi, T., Nishikawa, A., Hirose, M.: *In vivo* mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate. Cancer Sci. 97:829-835. 2006.

2. 学会発表

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

本光喜、高橋美和、六車雅子、金美蘭、伊藤格、三森国敏：N-tert-butyl- α -phenylnitron の diethylnitrosoamine と dicyclanil による二段階肝発がんモデルマウスにおける肝増殖性病変の修飾作用、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、名古屋、2006 年 7 月

井上薫、渋谷淳、禹桂炯、禹麻美、富士本仁、高橋美和、菅野純、五十嵐勝秀、広瀬雅雄：Kojic acid (KA)によるラット甲状腺発がん過程に特異的な発現遺伝子のプロファイリング、第 65 回日本癌学会

学術総会、横浜、2006年9月

高橋美和、渋谷淳、禹桂炯、井上薫、禹麻美、富士本仁、広瀬雅雄：Sulfadimethoxine(SDM)によるラット甲状腺発がんプロモーション過程で発生した腫瘍特異的な発現変動遺伝子のプロファイリング、第65回日本癌学会学術総会、横浜、2006年9月

高橋美和、渋谷淳、禹桂炯、井上薫、禹麻美、富士本仁、広瀬雅雄：ラット肝発がん促進過程に特異的な遺伝子発現プロファイルの免疫組織化学的検討、第23回日本毒性病理学会学術集会、東京、2007年1月

梅村隆志、黒岩有一、神吉けい太、児玉幸夫、増村健一、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄：Dicyclanil 投与による *gpt* delta マウス肝の酸化的DNA損傷及び *in vivo* 変異原性、第33回日本トキシコロジー学会、名古屋、2006年7月

梅村隆志、黒岩有一、田崎雅子、児玉幸夫、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄：マウス肝発癌剤 dicyclanil が誘発する *gpt* delta マウス肝の酸化的DNA損傷及び *in vivo* 変異原性、第65回日本癌学会、横浜、2006年9月

岡村俊也、梅村隆志、黒岩有一、田崎雅子、児玉幸夫、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄：マウス肝発がん剤 dicyclanil による *in vivo* 変異原性誘発への酸化的DNA損傷及び修復酵素の関与について、第23回日本毒性病理学会、東京、2007年1月

Umemura, T., Kuroiwa, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Kodama, Y., Nohmi, T., Nishikawa, A., Hirose, M.: Oxidative DNA damage and *in vivo* mutagenicity in the livers of *gpt* delta mice given dicyclanil. Society of Toxicology, 46th Annual Meeting, Charlotte, March, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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院 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。

2/3 肝部分切除の後に diethylnitrosamine (DEN)によるイニシエーション処置を施したマウスへ、1500ないし0 ppmのDCを20週間混餌投与し、腫瘍形成期での肝臓並びに腫瘍部位について病理組織学的検索を行うとともに遺伝子発現解析を実施した。DEN+DC群では、肝腫瘍が5/14例(35.7%)で観察された。肝の一部の組織より抽出したRNAを用いたマイクロアレイ及びリアルタイム RT-PCRでは、酸化的ストレス関連遺伝子である *Cyp1a1*、*Txnrd1*、*Ogg1*の有意な発現上昇に加え、抗腫瘍性アポトーシス誘導リガンドの遺伝子 *Trail*の有意な発現低下が認められた。マイクロダイセクション法によりDEN群の非腫瘍部、DEN+DC群で腫瘍が認められた個体の腫瘍部、及び非腫瘍部から採取した組織でのこれら遺伝子の発現を比較した結果、*Cyp1a1*及び*Txnrd1*は腫瘍組織で最も強く発現したが、*Ogg1*には腫瘍部における遺伝子発現上昇が認められず、*Trail*は非腫瘍組織に比べ腫瘍組織で有意な低下が認められた。以上の結果から、DCにより誘発されたマウス肝腫瘍では酸化的ストレスに対する修復機能及びアポトーシス誘導能に対し抑制的な影響が生じてい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、その母化合物及び代謝物が、微量ながら体内に残留する事が報告されている。我々の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、代謝及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、発がんへの関与が注目されている。

昨年度までの研究では、DCによるマウス肝発がんへの酸化ストレスの関与を明確にすることを目的として、マウス二段階肝発がんモデルへの DC の 13 及び 26 週間混餌投与実験を行い、肝の前腫瘍性病変について解析し、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。そこで本年度は、DC 処理による肝腫瘍形成期での肝臓並びに肝腫瘍部位について遺伝子発現解析を実施し、実際の腫瘍部位における酸化ストレス関連遺伝子を含む遺伝子群の発現について検討した。

B. 研究方法

実験デザインを Fig. 1 に示す。5 週齢の雄性 ICR マウス(日本エスエルシー株式会社)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 肝部分切除術を施し、その 12 時間後にイニシエーターである diethylnitrosamine (DEN) の 30 ないし 0 mg/kg を腹腔内投与しイニシエーション処置を施した。処置 1 週間後より発がん用量である 1500 ないし 0 ppm の DC を 20 週間混餌投与した。混餌投与終了後に全生存動物をエーテル深麻酔下にて放血屠殺した。採取した肝臓は、その一部は 10 %中性緩衝ホルマリン溶液で固定し組織学的検索用に、一部は凍結組織包埋用剤 OTC コンパウンドに包埋して組織化学染色用並びに遺伝子発現解析用に、一部(組織片)は液体窒素に凍結させ total 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及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。また、クリオスタットにて作製した凍結薄切標本は、マウス肝の前腫瘍性病変に陽性を示す gamma-glutamyltransferase (GGT) の組織化学染色による観察も実施した。

遺伝子発現解析は、まず凍結肝組織(各群 3 例)より total RNA 抽出キット (RNeasy Mini kit, QIAGEN)にて抽出した total RNA を用い、2 種類の cDNA マイクロアレイ (Stress & Toxicity PathwayFinder GEArray , Signal Transduction in Cancer GEarray , SuperArray Bioscience)による網羅的遺伝子発現解析を実施し、対照群(DEN 群)の各遺伝子の発現平均値と比較し 2 倍以上の発現変動(補正は内部標準遺伝子である β -actin を用いて実施)が認められた遺伝子を選抜した。選抜された遺伝子に加え、これまでの研究において検討してきた酸化ストレスに関与する遺伝子である 8-oxoguanine DNA glycosylase (*Ogg1*) 及び thioredoxin reductase 1 (*Txnrd1*)について、すべての動物より抽出した total RNA を用いリアルタイム RT-PCR 法 (ABI Prism 7000, Applied Biosystems)によりその発現を確認し、組織学的検索による腫瘍性病変の有無により特徴な変動傾向を示した遺伝子を検索した。

さらに、検索・選抜された遺伝子については、腫瘍部と非腫瘍における発現変動比較を実施した。レーザーマイクロダイセクションシステム (Leica Microsystems)を用い、各群 3 例の肝凍結標本より腫瘍部と非腫瘍部を個体それぞれから採取した。上記と同様の方法にて total RNA 抽出及びリアルタイム RT

—PCR 法による遺伝子発現解析を実施した。

統計解析は、組織学的検索については Wilcoxon の順位和検定を、遺伝子発現解析においては各対照群と DC 投与群との間の Student-*t* 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、国立大学法人 東京農工大学の実験動物取り扱い倫理規定及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

病理組織学的検索では、DEN 単独投与群において変異肝細胞巣の形成が 3/8 例 (38%) に認められたが、肝腫瘍は認められなかった。一方、DEN+DC 群では、変異肝細胞巣の形成が 6/14 例 (43%) に観察されるとともに、肝腫瘍も 5/14 例 (36%, 腺腫: 3 例, 腺腫と腺癌: 1 例, 腺癌: 1 例) に観察され、DC 処理による肝腫瘍の有意な発生率の増加が認められた。なお、これら変異肝細胞巣及び肝腫瘍は、GGT 染色においても陽性を示した (Table 1, Fig. 2)。

遺伝子発現解析では、肝組織を用いた 2 種のマイクロアレイによる解析により、DEN+DC 群で Glutathione peroxidase 2 (*Gpx2*)、*Cyp1a1*、*Cyp1a2*、Heme oxygenase 1 (*Hmox1*) など酸化ストレス関連遺伝子に有意な発現上昇が認められた。また、エストロゲン関連遺伝子である Progesterone receptor (*Pgr*) も有意な発現上昇が認められた。一方、アポト

ーシスに関与した遺伝子である Tumor necrosis factor subfamily number10 (*Trail*) は、2 種のアレイでともに有意な発現低下を示した (Table 2)。

これら遺伝子のうち、いくつかの代表的遺伝子と、*Ogg1* 及び *Txnrd1* の発現について、個体ごとの組織学的評価と併せ比較・解析した。群ごとの発現解析では、DEN+DC 群で *Pgr* を除く遺伝子に有意な変動を示し、*Cyp1a1*、*Hmox1*、*Ogg1*、及び *Txnrd1* に発現上昇が、*Trail* については発現低下がそれぞれ認められた。また、個別解析では、DEN+DC 群の組織学的検索において腫瘍ないし腫瘍性病変の形成が認められた個体では、*Trail*、*Ogg1* 及び *Txnrd1* が同群の平均発現値に比べ低値傾向を示した (Fig. 3)。

腫瘍性病変の有無により特徴的な発現変動傾向を示した *Trail*、*Ogg1* 及び *Txnrd1* について、マイクロダイセクション法を用い、腫瘍部及び非腫瘍部における遺伝子発現解析を実施した結果、*Trail* については、非腫瘍部に比べ腫瘍部において有意な発現低下が認められた。*Ogg1* については、DEN 群の非腫瘍部に比べ DEN+DC 群の非腫瘍部に有意な発現上昇が認められたが、腫瘍部における発現は DEN 群の非腫瘍部とほぼ同等であった。*Txnrd1* については、DEN 群の非腫瘍部に比べ、DEN+DC 群の腫瘍部、非腫瘍部でともに発現上昇が認められたものの、腫瘍—非腫瘍部間での明確な違いは認められなかった。なお、腫瘍性病変の有無による特徴的な変動を示さなかった *Cyp1a1* は、DEN 群の非腫瘍部に比べ、DEN+DC 群の腫瘍部、非腫瘍部でともに発現上昇が認められ、腫瘍部においてもっとも高値を示した (Fig. 4)。

D. 考察

WHO による報告では、DC は遺伝毒性を有さないものの、マウス肝における肝腫瘍の形成を増加させることが報告されている。本研究における組織学的検索において、DC の投与により肝腫瘍形成の有意な増加が認められ、本結果は WHO の報告を支持し得る結果となった。

DC による腫瘍形成期の肝組織における遺伝子発現解析では、代謝並びに酸化ストレスに関連した遺伝子である *Cyp1a1* や *Hmox1* などに有意な発現上昇が認められた。加えて、酸化 DNA 損傷修復に関与する *Ogg1*、酸化還元調節に関与する *Txnrd1* にも発現上昇が認められた。また、アポトーシスの亢進へ関与する *Trail* には有意な発現低下が認められた。昨年度までの研究において、*in vitro* ではあるものの、DC は肝での代謝過程において活性酸素種の産生を濃度依存的に増強すること、DC 投与によりマウス肝において代謝及び酸化ストレス関連した遺伝子群に変動がみられることなど、DC 投与によりマウス肝において酸化ストレスが生じている可能性を示す知見を得ている。よって、今回得られた結果は、これまでの結果と一致するものであり、腫瘍形成期においても酸化ストレスが生じている可能性が示唆された。

組織学的検索結果を加味した個体別における発現解析では、腫瘍性病変を有した個体の *Trail*、*Ogg1*、*Txnrd1* 発現が、同群内において比較的低値を示す特徴的な傾向がみられた。本結果を基に、これら遺伝子について腫瘍部と非腫瘍部位それぞれでの遺伝子発現を比較した結果、非腫瘍部位に比べ、腫瘍部位における *Trail* 及び *Ogg1* の発現の低下が認められた。*Ogg1* は、酸化 DNA 損傷の指標の一つである 8-hydroxydeoxyguanosine

(8-OHdG) の修復遺伝子であるが、昨年までの研究において、同用量の DC を長期投与することによりマウス肝組織 DNA 中の 8-OHdG レベルが増加することが明らかとなっている。加えて、本研究における酸化ストレスのマーカー遺伝子のひとつである *Cyp1a1* や *Txnrd1* が腫瘍部において最も発現上昇していることを考慮すると、腫瘍部ではより高度な酸化ストレスに暴露されている可能性が推察される。しかしながら、今回の結果では、腫瘍部位では *Ogg1* の発現上昇が抑制されていることより、腫瘍部では酸化 DNA 損傷の修復が滞っている可能性があるものと推測される。

Trail については、腫瘍部において最も発現が低下していた。*Trail* は tumor necrosis factor family の一つであり、腫瘍細胞をアポトーシスへ誘導する機能の一部を担っている。よって本結果は、腫瘍部ではアポトーシス誘導に支障をきたしている可能性が推察される。以前、我々は DC を 2 週間及び 7 週間投与したマウス肝臓について、同マイクロアレイを用いた解析実験を実施したが、*Trail* には発現変動が認められなかった。この結果を考慮すると、*Trail* は DC により増強したマウス肝腫瘍における腫瘍形成期間のプロモーションあるいはプログレッション期において重要な役割を担っている可能性が推察される。

以上の結果から、DC により増強した肝腫瘍部では、酸化ストレス、酸化 DNA 損傷修復能並びにアポトーシス誘導能への抑制的な影響が生じている可能性が示唆された。また、これまでの研究結果を考慮すると、DC による肝腫瘍の形成には酸化ストレスが重要な役割を果たしているものと考えられる。

E. 結論

DC を 1500 ppm 含有する飼料を 20 週間、二段階肝発がんモデルマウスに与え、形成された肝腫瘍部における酸化ストレス関連遺伝子の発現解析を実施した結果、肝腫瘍部では酸化ストレス、酸化的 DNA 損傷修復能並びにアポトーシス誘導能への抑制的な影響が生じている可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 80: 533-539, 2006.

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. 80: 694-702, 2006

Moto, M., Okamura, M., Muguruma, M., Ito, T., Jin, M., Kashida, Y. and Mitsumori, K.: Gene expression analysis on the dicyclanil-induced hepatocellular tumors in mice. Toxicol. Pathol. 34: 744-751, 2006

2. 学会発表

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

本光喜、高橋美和、六車雅子、金美蘭、伊藤格、三森国敏：N-tert-butyl- α -phenylnitrone の diethylnitrosoamine と dicyclanil による二段階肝発がんモデルマウスにおける肝増殖性病変の修飾作用、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、名古屋、2006 年 7 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

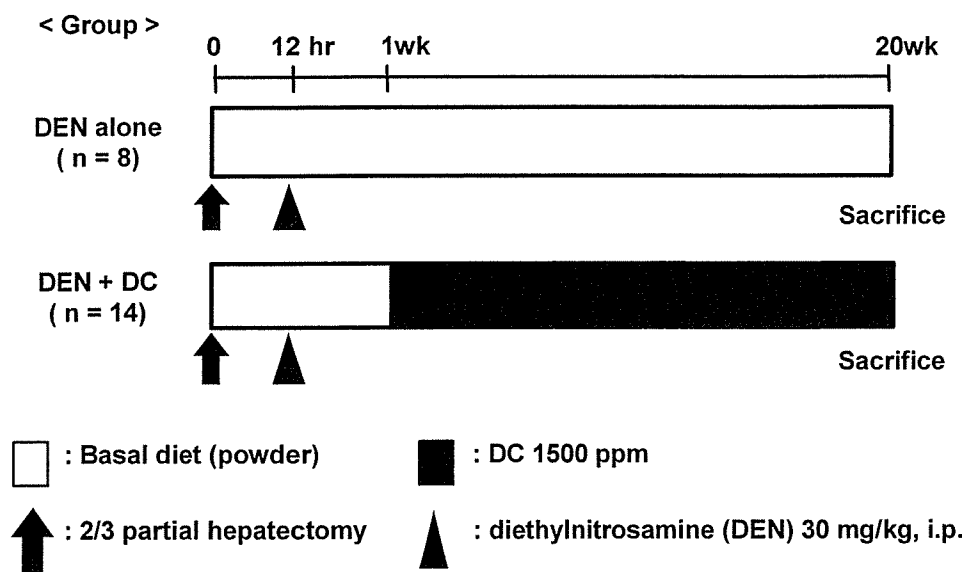


Fig. 1. Experimental design

Table 1. Incidences (percentages) of proliferative lesions in the liver of mice treated with DC after DEN initiation

Group	Number of mice tested	Altered foci	Tumors	Adenoma	Carcinoma
DEN alone	8	3 ^{a)} (38)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
DEN + DC	14	6 (43)	5 (36) **	4 (29)	2 (14)

a) Number of mice observed

** : Significantly different from the DEN group at $p < 0.01$ (Wilcoxon test)

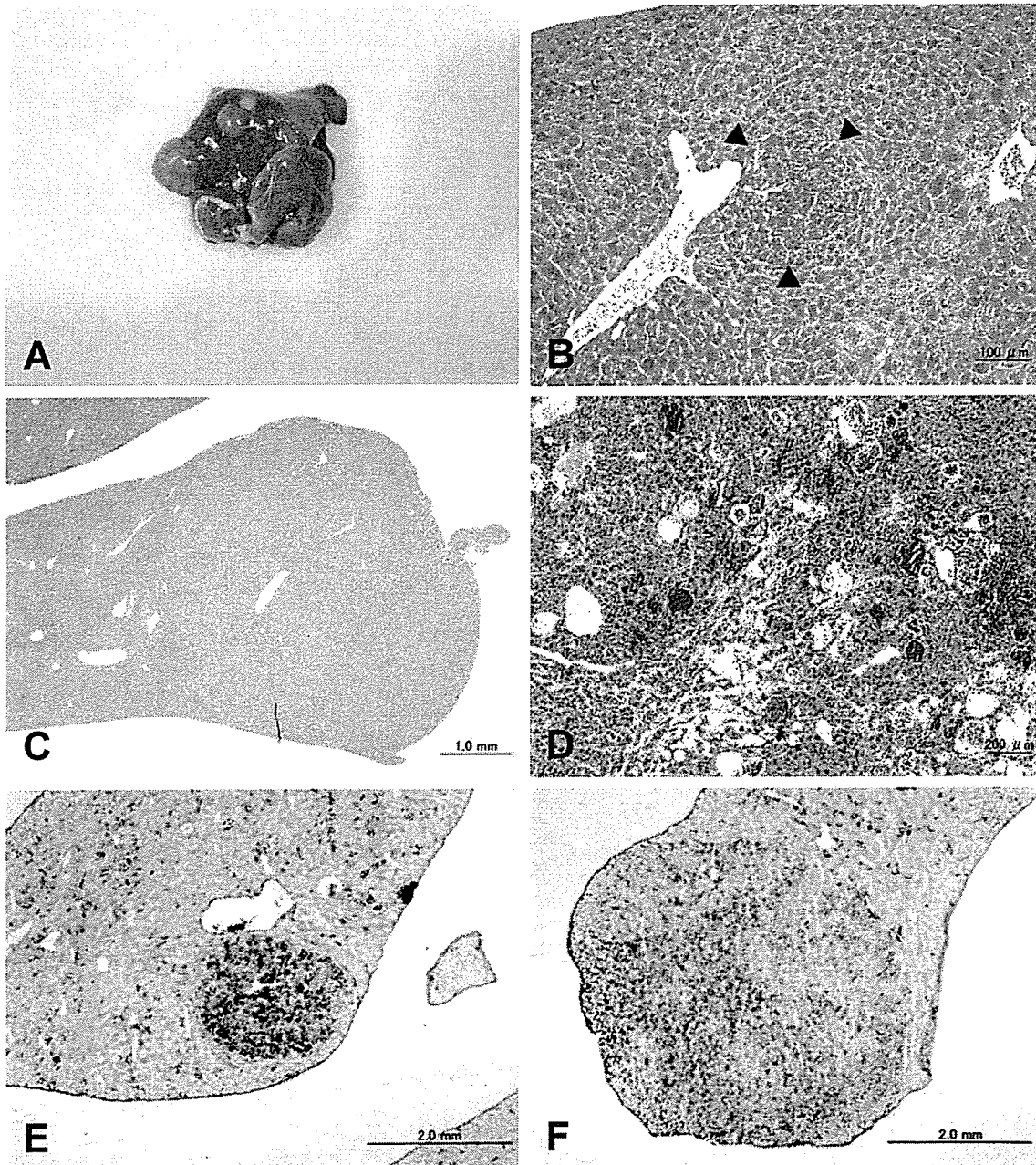


Fig. 2. Proliferative lesions in the livers of mice treated with DC after DEN initiation. (A) Macroscopic findings of the liver tumors in mice in the DEN + DC group. (B) Hepatocellular altered focus of a basophilic cell type (enclosed by closed triangles). (C) Hepatocellular carcinoma. Low magnification. (D) Hepatocellular carcinoma that is different from that shown in Fig. 3C. Higher magnification. (E and F) Histochemical staining of GGT. GGT-positive reactions are observed in an altered focus (E) and in hepatocellular carcinoma (F).

Table 2. cDNA Microarray analysis of the gene expressions in the liver tissues of mice treated with DC after DEN initiation

Gene bank Accession No.	Description	Symbol	DEN alone (n=3)		DEN+DC (n=3)		Classification ^{a)}
			ratio	S.D.	ratio	S.D.	
□ Stress & Toxicity Pathway							
<u>UP</u>							
NM_030677	Glutathione peroxidase 2	<i>Gpx2</i>	1.00	0.31	24.09	15.94	Oxidative & Metabolic stress
NM_009992	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	<i>Cyp1a1</i>	1.00	0.48	16.97	5.48 **	Oxidative & Metabolic stress
NM_010442	Heme oxygenase (decycling) 1	<i>Hmox1</i>	1.00	0.73	4.14	1.49 **	Oxidative & Metabolic stress
NM_010231	Flavin containing monooxygenase 1	<i>Fmo1</i>	1.00	0.36	2.85	1.51	Oxidative & Metabolic stress
NM_009993	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	<i>Cyp1a2</i>	1.00	0.32	2.32	0.52 *	Oxidative & Metabolic stress
<u>Down</u>							
NM_009425	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	<i>Trail</i>	1.00	0.94	0.04	0.13 *	Apoptosis signaling
NM_007836	Growth arrest and DNA-damage-inducible-45 alpha	<i>Gadd45a</i>	1.00	0.24	0.48	0.33	Growth arrest and senescence
□ Signal Transduction in Cancer							
<u>Up</u>							
NM_007742	Procollagen, type I, alpha 1	<i>Coll1a1</i>	1.00	0.34	3.14	1.49	MAP kinase pathway
NM_008829	Progesterone receptor	<i>Pgr</i>	1.00	0.28	2.94	0.21 **	Estrogen pathway
NM_010442	Heme oxygenase (decycling) 1	<i>Hmox1</i>	1.00	0.74	2.79	1.72	Hypoxia pathway
NM_009743	RIKEN cDNA A630035D09 gene	<i>Bcl2l1</i>	1.00	0.35	2.16	1.11	STAT pathway
<u>Down</u>							
NM_009425	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	<i>Trail</i>	1.00	0.28	0.41	0.03 *	PI3 / AKT pathway
NM_021283	Interleukin 4	<i>Il4</i>	1.00	0.69	0.49	0.12	STAT pathway

a) Classification is based on the microarray instructions.
 **, ** ' represent significant differences from the DEN alone group at p<0.05, 0.01, respectively (t-test).