

200636006B

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16年度～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 三森 国敏

平成19（2007）年 3月

目 次

I. 総合研究報告書		
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16

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並びに BSE(牛海面状脳症)の特定危険部位である牛背根神経節の完全除去の可能性を検討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、正常マウス並びに dimethylnitrosamine (DMN) によるイニシエーション処置後、2/3 肝部分切除を施した二段階肝発がんモデルマウスに DC を 13 及び 26 週間混餌投与し、肝の前腫瘍性病変における酸化ストレスの関与について解析した。その結果、DC の投与期間に依存した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) レベルの増加が認められ、*in vitro* 実験では、DC の濃度依存性にマウス肝ミクロソーム由来の活性酸素種 (ROS) が増加することが明らかとなった。次いで、2/3 肝部分切除後に diethylnitrosamine (DEN) によるイニシエーション処置を施したマウスへ DC を 20 週間混餌投与して肝腫瘍を形成させ、肝腫瘍形成期における肝臓並びに腫瘍部位について解析を実施した。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遺伝子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* 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が強く示唆され、また、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の低下及びアポトーシス誘導の抑制が生じている可能性が示唆された。

スルファジメトキシシン (SDM) のラット甲状腺における発がん機序の解析では、マイクロアレイ法を用いた発がん関連遺伝子の解析を行った。SDM により誘発され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発がん過程早期に特異的な発現変動遺伝子群を同定・選別した結果、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ることが示唆された。これらの発現レベルの検証の他、免疫染色による発現局在を検討した結果、マイクロアレイで発現増加した 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) に陽性像が集中したことから、発がん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 bone morphogenic protein 4、vitamin D receptor も FFCH に陽性像が集中し、転写後の発現制御の関与が考えられた。また、フェンベンダゾール (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を用いて同様の検索を行い、発現増加は 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、発現減少は Wnt シグナリングに制御される細胞増殖に関与するものが見出され、プロモーション過程の早期では変異肝細胞の割合は少ないことの反映と考えられた。さらに、FB による肝発がん過程早期の遺伝子発現プロファイルと、代表的な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、さらに免疫染色による発現局在を検討した。その結果、GST-P 陽性肝細胞巢の中には 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。また、SDM による甲状腺発がん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て増殖性病変特異的な解析を行った結果、SDM による甲状腺腫瘍の進展過程には、cyclin B1 および 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。

さらに、フルメキン (FL) 及び DC の発がん機序を検索する目的で、それぞれの発がん用量を雌雄の *gpt delta* マウスに投与し、*in vivo* mutation assay と共に、酸化ストレスマーカー並びに細胞増殖活性を測定した。FL の投与により肝 DNA 中の 8-OHdG レベルは変化しなかったが、細胞増殖活性が雌雄のマウスで増加した。また、レポーター遺伝子の変異頻度も群間で差は認められず、FL の発がん機序にはプロモーター作用が重要な役割を演じていることが示唆された。一方、DC を投与すると、発がん性が報告されている雌マウスの肝臓において投与初期より 8-OHdG が蓄積し、同時に細胞増殖活性も上昇した。その結果、GC:TA トランスバージョン変異を主体とした *gpt* 変異頻度が上昇し、DC 発がん機序には酸化的 DNA 損傷を起因とした点突然変異の関与が考えられた。以上の結果から、レポーター遺伝子導入マウスを用いた *in vivo* mutation assay と発がん過程に関与すると考えられる種々のパラメーターの同時検索は非遺伝毒性発がん物質の発がん機序検索に有用な手段であり、この種の動物用医薬品の安全性再評価に役立つデータを提供できるものと考えられた。

BSE (牛海綿状脳症) の特定危険部位である牛の背根神経節除去に関する研究では、その除去が、と畜場において可能かどうかを除去率の算定により 3 年間に亘って検討した。また同時に、牛の品種別、牝牝別、及び月齢別に除去率に差があるか否かも検討した。その結果、平成 16 年度 82%、平成 17 年度 84%、平成 18 年度 87% と除去率は徐々に向上してきたが、100% の完全除去は現時点の技術では依然として困難であった。また、牛の品種別、牝牝別、及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 九郎丸 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

がん物質と判定され、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。DC の発がんメカニズムに関するこれまでの研究において、発がん性試験で陽性が認められた用量の DC を短期間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、代謝及び酸化ストレスに關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ストレスの關与を示唆するデータが得られている。酸化ストレスは、酸化 DNA 損傷を引き起こすことが報告されており、発がんへの關与が注目されている。そこで DC によるマウス肝発がんメカニズムへの酸化ストレスの關与をさらに明確にすることを目的として、DC による肝腫瘍形成過程及び腫瘍形成期それぞれにおける肝臓ないし肝腫瘍について分子病理学的解析を実施した。

鶏コクシジウム症等に用いられるサルファ剤であるスルファジメトキシシン (SDM) や、同様の構造を有する物質 (スルファモノメトキシシン等) は、抗甲状腺作用を示し、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 SDM 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では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る。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が、発がん過程の分子機序はほとんど解明されていない。また、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) 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 の発現低下が見出されている、具体的な発がんメカニズムは不明なままである。

そこでこれらの発がん機序を解明する目的で、ラット二段階発がんモデルを用いて、SDM による甲状腺発がん及び FB による肝発がんの発がんプロモーション過程早期に特異的に発現変動する遺伝子を同定し、さらに免疫組織学的解析が可能な遺伝子産物について、その発現局在についても検討を加えた。また、このよう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關与する遺伝子群の同定を目的として、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を実施した。本研究では SDM で誘発された腫瘍性病変において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行った。

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て、非遺伝毒性発がん物質に分類されている動物用医薬品の *in vivo* mutation assay を実施するとともに、これらの肝発がん機序への酸化 DNA 損傷の關与の可能性を探り、この種の動物用医薬品の安全性再評価のための重要なデータを提供することを目的として、フルメキン (FL) 及び DC の肝発がん機序を検索した。

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、本来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。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3年間に亘り、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。

B. 研究方法

DCについては、肝腫瘍形成過程における酸化ストレスの関与を検討するため、平成16年度において正常マウス及びDMNによりイニシエーション処理後に2/3肝部分切除したマウスへDCを13及び26週間混餌投与し、投与13週間目に解剖した動物の肝について、病理組織学的検索及び抽出したRNAを用いたリアルタイムRT-PCR法による代謝・酸化ストレス関連遺伝子の発現解析、及びHPLC-ECD法による肝組織DNA中の8-OHdGレベルの定量測定を実施した。平成17年度には、引き続き26週間目に解剖した動物について同様の解析とともに、マウス肝ミクロソームを用いた*in vitro*実験を実施し、DCによるROS産生について検討した。平成18年度では、腫瘍形成期における解析を実施するため、2/3肝部分切除した後にDENによるイニシエーション処理を施したマウスへDCを20週間混餌投与して肝腫瘍を形成させ、腫瘍形成期での肝並びに肝腫瘍部位における遺伝子発現解析を実施した。

SDMについては、平成16年度にまず

雄性F344ラットを用い、DHPN単独投与群と二段階発がんモデル群にはDHPN、無処置群とSDM単独投与群には生理食塩水をそれぞれ単回皮下注射した。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1000ppm(SDM単独投与群)、62.5、250、1000ppm(DHPN+SDM群)の用量で飲水投与した。SDM投与4週後に両側の甲状腺を採取し、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array(Affymetrix)を用いたマイクロアレイを実施し、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。

平成17年度には、マイクロアレイ解析で得られた発現量を検証するため、代表的な発現増減遺伝子についてreal-time RT-PCRを実施した。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、各群の甲状腺(病変)における発現状況を検討した。

腫瘍性病変でのマイクロアレイ解析には、サテライトグループとしてDHPN+1000ppmSDM群の動物を準備し、SDM投与10ないし15週後に甲状腺をメタカーン固定後、パラフィン切片を作製した。マイクロダイセクションにより限局性濾胞上皮過形成(FFCH)+腺腫、非がん部、がんを採取し、マイクロアレイ解析を行った。

平成18年度には、マイクロアレイ法により得られた発現量を検証するため、代表的な発現増減遺伝子についてreal-time RT-PCR解析を行った。免疫組織化学的な発現局在解析も実施した。

FBについては、平成17年度にまず雄性F344ラットを用い、DENを投与する全群にはDEN、無処置群とFB単独投与群には生理食塩水を単回腹腔内注射した。DEN投与2週後、FB単独投与群と二段

階発がんモデル群には FB を各々3600 ppm (FB 単独投与群)、400、1200、3600 ppm (DEN+FB 群) の用量で混餌投与した。DEN あるいは FB 単独投与群、DEN+FB 投与各群は、実験開始3週目に2/3部分肝切除を実施した。FB 投与6週後に肝臓を採取して GST-P 陽性細胞巢の免疫組織染色を行い、陽性巢の数・面積の定量解析を行った。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を用いて実施した。また、マイクロアレイ法により得られた発現量を検証するため、real-time RT-PCR を実施した。

平成18年度には、別プロジェクトにおいて同様のプロトコールにより phenobarbital (PB) による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を同定したので、FB と PB に共通して変動する遺伝子群を得た。FB 及び PB で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。

FL あるいは DC の発がん用量を雌雄の *gpt delta* マウスに投与して、肝臓中の TBARS、8-OHdG レベル並びに肝細胞の BrdU 標識率 (BrdU-LI) を測定すると共に、*gpt* アッセイ並びに Spi アッセイを実施した。DC については B6C3F1 マウスに同様に投与して投与初期での 8-OHdG レベルの変化も併せて検討した。

背根神経節の除去率算定は以下の様に実施した。すなわち、脊柱から除去すべき背根神経節は、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個の計32個である。頸椎部、胸椎部、腰椎部、及び仙骨部に関して、脊柱からどの程度除去されているか (除去率) を算出した。算出に用いた牛硬膜は2004年4月から2007年2月ま

での計2953検体である。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

H16~17年度にかけての DC 誘発肝腫瘍形成過程における解析では、マウス肝における gamma-glutamyl-transferase (GGT) 陽性を示す前腫瘍性病変の検索により、DMN+DC 群で投与13及び26週目に GGT 陽性巢の形成が認められ、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週目に陽性巢の形成が認められた。酸化的ストレス関連遺伝子の発現解析では、酸化的スト

レス関連遺伝子である *Cyp1a1*、P450 oxidoreductase 1 (*Por*)、thioredoxin reductase 1 (*Txnrd1*)、superoxide dismutase 1 (*Sod1*)、及び 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (*Ogg1*) が、DC 群及び DMN+DC 群でそれぞれ有意な発現上昇を示し、DMN+DC 群で最も高値を示した。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 中の 8-OHdG レベルは、DMN+DC 群では投与 13 及び 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、0.3 mM 以上で有意な増加が認められた。

H18 年度に実施した肝腫瘍形成期における解析では、病理組織学的検索の結果を加味した遺伝子発現解析により、腫瘍ないし腫瘍性病変形成個体では *Trail*、*Ogg1* 及び *Txnrd1* が同群の平均発現値に比べ低値を示す特徴的な傾向がみられた。次いで、マイクロダイセクション法を用いて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、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、非腫瘍部で共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。

SDM については、平成 16 年度に実施した甲状腺の病理組織学的検索の結果、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、発生

個数は用量とともに増加した。

マイクロアレイ解析では、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した遺伝子のうち、遺伝子名が同定できたものは、発現増加遺伝子で dopa/tyrosine sulfotransferase、ephrin receptor A7、aurora kinase B、kinesin family member C1、glucagon、cyclin B1、発現減少遺伝子で lymphocyte cytosolic protein 2、vitamin D receptor、bone morphogenic protein 4、protocadherin alpha の合計 10 遺伝子であった。

平成 17 年度には、これらの遺伝子発現について real-time RT-PCR 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。

免疫組織学的な局在解析では、マイクロアレイにおいて、SDM による発がん過程で発現増加を示した aurora kinase B と cyclin B1 は FFCH の細胞核に陽性像が集中した。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、マイクロアレイ解析結果とは逆の染色態度を示した。

平成 18 年度の解析の結果、甲状腺増殖病変に特異的な変動遺伝子が同定された。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。免疫組織学的な局在解析の結果、ceruloplasmin、cyclin B1、Cdc2、Pvrl3、Id3 はマイクロアレイ解析の結果と一致した。一方、decorin は、免疫染色では増殖性病変部における発現減少は認められなかった。Thyroglobulin はマイクロアレイ結果とは逆に、腺がんで発現減少傾向を示した。

FB については、平成 17 年度には、GST-P 陽性細胞巢の形態計測の結果、数、

面積とも 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。

FB の用量に関連し、肝臓における発現が増加した遺伝子を同定し、その中で機能既知であった遺伝子は *seine protease inhibitor, kazal type 1 (Spink1)*; *TGF- β masking protein large unit (Ltbp1)*; *pregnancy-induced growth inhibitor (Ok138)*; *mini chromosome maintenance deficient 6 (Mcmd6)*; *alcohol dehydrogenase 1 (Adh1)*; *Axin 2* であった。一方、FB の用量に関連して発現減少を示した遺伝子の中で機能既知のものは *nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (Nr0b2)*; *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (Mafb)*; *Secreted frizzled-related protein 4 (Sfrp4)* であった。また、代表的遺伝子については real-time RT-PCR による発現レベルの検証を行った。

平成 18 年度の解析の結果、FB および PB で共通の発現変動を示した遺伝子の中には、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、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。

FL を雌雄の *gpt delta* マウスに投与したところ、肝臓の TBARS、8-OHdG 並びに *gpt* 及び Spi-変異頻度に変化は認められなかった。しかし、肝細胞の BrdU-LI は雌雄の投与群で有意に増加した。一方、DC を同様に投与したところ、TBARS に変化は認められなかったが、8-OHdG レベルは雌雄の投与群で有意に上昇した。しかし、BrdU-LI の上昇は雌にのみ認められた。また、Spi-変異頻度に変化は認められなかったが、GC:TA トランスバージ

ョン変異を主体とする *gpt* 変異頻度の上昇が雌マウスで観察された。さらに、B6C3F1 マウスに DC を投与すると、投与後 4 週目で雌マウスの 8-OHdG レベルが有意に上昇した。

背根神経節の脊柱からの除去率は、平成 16 年度 82%、平成 17 年度 84%、平成 18 年度 87% と徐々に向上したが、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 11 胸神経の背根神経節の除去率も低い値を示した。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 による肝腫瘍形成過程の肝臓では、遺伝子レベルの解析において代謝及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 レベルにも経時的かつ有意な上昇が認められた。さらに、*in vitro* において 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 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示された。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、8-OHdG 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。

腫瘍形成期の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* の発現が、同群内において比較的 low 値を示す特徴的な傾向がみられ、さらに、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* の発現低下が認められた。本結果は、DC により増強した肝腫瘍部では、酸化ストレスが生じているにもかかわらず酸化的 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を示唆するものと考えられた。

以上の研究結果より、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。

SDM による甲状腺発がんについては、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に関連した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を検索した結果、発がん抑制作用を示す遺伝子の発現が減弱し、発がん過程を進展させる可能性が示唆された。また、アポトーシスを抑制することによる発がん過程への寄与が考えられた。

免疫組織学的な局在解析が可能であった 4 つの遺伝子産物についてその分布状況を検討した結果、まずマイクロアレイで SDM による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、特に前がん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 *VDR* は、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。

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、既に SDM 発がん過程早期の標的遺伝子の可能性を見出しているが、この因子は *cdc2* と共に M 期促進因子を形成し、今回の解析では FFCH+腺腫において両遺伝子の発現増加を認めため、腫瘍の進展への関与も示唆された。*Pvrl3* は上皮細胞の細胞接着結合に関与するが、今回増殖性病変で発現減少あるいは消失が認められ、*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、ヒト甲状腺癌において *ceruloplasmin* の発現が報告されている。

FB による肝発がんについては、FB の肝臓に対する発がんプロモーション作用は 1200 ppm 以上で認められ、用量依存性の観点から選別された発現増加遺伝子の機能解析の結果、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。

平成 18 年度には、FB と PB との共通成分として 33 遺伝子が見出され、その中に細胞増殖抑制に関わるものが比較的多く見出され、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。

牛の背根神経節の除去に関しては、平成 16 年度 82%、平成 17 年度 84%、平成 18 年度 87%と除去率は徐々に向上した。除去成績の極端に低い第 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。その原因究明による除去率の向上が今後の課題である。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、差は見られなかったことから、除去の容易な特定の品種、月齢はないものと考えられる。

E. 結論

DC のマウス肝における発がんメカニズムについて、肝腫瘍形成過程及び肝腫瘍形成期において検索した結果、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 損傷が生じ、形成された腫瘍部では酸化 DNA 損傷に対する修復能に対する抑制的な影響が生じている可能性が示唆された。以上の結果から、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。

SDM のラット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示唆された。また、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の可能性が示唆された。さらに、甲状腺増殖性病変部位特異的な解析により、甲状腺腫瘍の進展過程には、cyclin B1 および 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の関与が示唆された。

FB による肝発がんプロモーション過程早期には、TGF β ないし Wnt シグナリングに制御される細胞増殖抑制が見出され、プロモーション過程早期では変異肝細胞の割合は少ないことの反映と考えられた。また、PB のプロファイルとの共通成分を探索した結果、GST-P 陽性肝細胞巢中に 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。

レポーター遺伝子導入マウスを用いて、*in vivo* mutation assay と共に発がんに寄与すると考えられる種々のパラメーターを検索する本研究結果は、非遺伝毒性発がん物質に分類される動物用医薬品である FL 及び DC の発がん機序解明に貴重なデータとなり、当該物質の安全性再評価に有用な情報となった。

背根神経節の脊柱からの除去に関する研究では、2004 年 4 月から 2007 年 2 月までに得られた試料における背根神経節の除去率を調べたところ、平成 16 年度 82%、平成 17 年度 84%、平成 18 年度 87%と除去率は徐々に向上したことから、今後調査を継続すれば、さらなる除去率の向上が見込まれる。但し、第 4 腰神経～第 3 仙骨神経、及び第 11 胸神経の背根神経節の除去率が向上しない限り、完全除去は難しいと思われる。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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., 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

Shibutani, M., 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, pp. 11-25,

2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Kato, N., Fujita, H., Lee, K-Y., Takigami, S., Mitsumori, K., Hirose, M.: Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. *J Histochem Cytochem.* 52(7): 903-913, 2004.

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., and 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., and 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.

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.

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

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、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、檜田陽子、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、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

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

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

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、広瀬雅雄：非遺伝子傷害性肝発がん物質を長期間投与したラット肝臓での発現変動遺伝子のプロファイリング、文

部科学省特定領域研究「発がん防御」
蓼科「個体レベル」若手ワークショップ、
長野、2004年、1月

Shibutani, M., Lee, K-Y, Takagi, H.,
Kato, N., Takigami S., Hirose, M.:
Methacarn, a versatile fixation tool for
quantitative mRNA expression analysis
in microdissected paraffin-embedded
tissues using real-time RT-PCR and
microarray systems. IFSTP-JSTP Joint
Meeting. Kobe, February, 2004

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

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

Shibutani, M., Inoue, K., Woo, G-H.,
Igarashi, K., Kanno, J., Hirose, M.:
Gene expression profiling specific to
the tumor promotion process of rat
thyroid carcinogenesis induced by
sulfadimethoxine or kojic acid. Society
of Toxicology, 45th Annual Meeting,
San Diego, California, 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

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、横浜、第65回日本癌学会学術総会記事、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. and 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.

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、東京、2005年6月

G. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Shibutani, M.</u> , Uneyama, C.	Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells.	Murray, G.I., Curran, S.	Laser Capture Microdissection and its Applications. Methods Mol. Biol. Vol. 293	Humana Press	Totowa	2005	11-25

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Moto, M., Okamura, M., Muto, T., Kashida, Y., Machida, N., <u>Mitsumori, K.</u>	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., <u>Mitsumori, K.</u>	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 <u>Mitsumori, K.</u>	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., <u>Mitsumori, K.</u>	Gene expression analysis on the dicyclanil-induced hepatocellular tumors in mice.	Toxicol. Pathol.	34	744-751	2006
Takagi, H., <u>Shibutani, M.</u> , Kato, N., Fujita, H., Lee, K-Y., Takigami, S., Mitsumori, K., Hirose, M.	Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR.	J. Histochem. Cytochem.	52(7)	903-913	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lee, K-Y, <u>Shibutani, M.</u> , 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
<u>Shibutani, M.</u> , 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
Kanki, K., Nishikawa, A., Masumura, K., <u>Umemura, T.</u> , Kitamura, Y., Nohmi, T., Hirose, M.	In vivo mutation analysis of liver DNA in gpt delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitro sopyrrolidine, 2-amino-3- methylimidazo[4,5-f]quinol ine and di(2-ethylhexyl)phtalate.	Mol. Carcinog.	42	9-17	2005
<u>Umemura, T.</u> , Kanki, K., Kuroiwa, Y., Ishii, Y., Okano, K., Nohmi, T., Nishikawa, A., Hirose, M.	<i>In vivo</i> mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate.	Cancer Sci.	97	829-835	2006
Kuroiwa, Y., <u>Umemura, T.</u> , Nishikawa, A., Kanki, K., Ishii, Y., Kodama, Y., Masumura, K., Nohmi, T., Hirose, M.	Lack of <i>in vivo</i> mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of <i>gpt</i> delta mice.	Arch. Toxicol.	81	63-69	2007
木村政治、平松竜司、 松井利康、金井克晃、 <u>九郎丸正道</u>	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

Methacarn Fixation for Genomic DNA Analysis in Microdissected Cells

Makoto Shibutani and Chikako Uneyama

Summary

We have found methacarn, a non-crosslinking protein-precipitating fixative, to be useful for the analysis of DNA from microdissected specimens of wax-embedded tissue. In this chapter, we present the procedure regarding genomic DNA analysis in methacarn-fixed wax-embedded microdissected rat tissue. Using nested polymerase chain reaction (PCR), and a rapid extraction procedure, fragments of DNA up to 2.8 kb in size can be amplified from a 1×1 mm area of a 10- μ m-thick tissue section. Target fragments of about 500 bp can be amplified from a single cell, but 10–20 cells are necessary for practical detection by nested PCR. Although tissue staining with hematoxylin and eosin inhibits the PCR, amplification of about 500-bp fragments is successful with 150–270 cells by single-step PCR. Immunostaining results in a substantial decrease of yield and degradation of extracted DNA. However, even after immunostaining, fragments of about 180 bp can be amplified with 150–270 cells by single-step PCR. These features demonstrate the suitability of methacarn-fixed wax-embedded tissue for practical genomic DNA analysis in terms of tissue handling, extraction efficiency, and satisfactory PCR results.

Key Words: DNA analysis; methacarn; microdissection; PCR; wax-embedded tissue.

1. Introduction

Tissue fixation and subsequent wax embedding are routinely employed for histological assessment because of the ease of handling tissues and subsequent staining as well as the good morphological preservation. Usually, formaldehyde-based fixatives are used for this purpose. However, with such crosslinking agents, there is limited performance in terms of the efficiency of extraction and quality of extracted RNA (1–3), protein (4,5), and genomic DNA (6–9), with consequent difficulty in the analysis of microdissected, histologically defined tissue areas.

From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 293: *Laser Capture Microdissection: Methods and Protocols*
Edited by: G. I. Murray and S. Curran © Humana Press Inc., Totowa, NJ

Extraction efficiency and integrity of DNA are critical for the molecular analysis of microdissected cells. Recently, we have found that methacarn, a non-crosslinking protein-precipitating fixative (10,11), meets critical criteria for analysis of RNA and proteins in wax-embedded tissue sections (5). In the case of DNA extraction from formalin-fixed wax-embedded tissues, the extraction protocol usually requires proteinase K treatment with extended incubation periods (12–14). On the other hand, we found that methacarn fixation allows high yields and amplification of long genomic DNA segments in wax-embedded tissue sections by a simple extraction procedure (9,15).

Tissue staining is essential for cellular identification in practical molecular analysis using microdissection techniques (13,16–21); therefore it is important to assess the effect of tissue staining on the performance of molecular analysis (13,17,20). Furthermore, analysis of gene expression or mutation in immunophenotypically defined cells would be a versatile research technique (19).

In this chapter, we detail the procedures for genomic DNA analysis in methacarn-fixed wax-embedded microdissected tissue specimens (15), and illustrate its suitability in terms of target fragment size and the number of microdissected cells required for DNA analysis using cresyl-violet-stained sections. We also assess the effects of tissue staining with hematoxylin and eosin (H&E) or immunohistochemical stains on subsequent analysis of genomic DNA.

2. Materials

1. Methacarn, consisting of 60% (v/v) absolute methanol, 30% chloroform, and 10% glacial acetic acid.
2. Ethanol, 99.5% (v/v).
3. Shaker for tissue agitation.
4. Xylene, reagent-grade.
5. Tissue cassettes (Tissue-Tek® Cassette series; Sakura Finetek Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan).
6. Tissue-embedding console system (Tissue-Tek® TEC™ 5; Sakura Finetek Japan).
7. Embedding molds (Base Molds for Tissue-Tek® Embedding Rings; Sakura Finetek Japan).
8. Embedding rings (Sakura Finetek Japan).
9. Wax (Sakura Finetek Japan).
10. Microtome.
11. Hematoxylin (Tissue-Tek® Hematoxylin 3G; Sakura Finetek Japan).
12. Eosin (Tissue-Tek® Eosin; Sakura Finetek Japan).
13. 0.1% Cresyl violet solution.
14. Primary antibodies for immunohistochemistry.
15. 1% Periodic acid solution.
16. Immunostaining kit (Vectastain Elite kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

17. 3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB; Dojindo Laboratories; Kumamoto, Japan).
18. Hydrogen peroxide, 30% (w/w).
19. Casein (Merck, Darmstadt, Germany).
20. Microdissector (PALM Robot-MicroBeam equipment; Carl Zeiss Co., Ltd., Tokyo, Japan).
21. Polyethylene film for microdissection, 1.35 μm thick (PALM GmbH; Wolfraatshausen, Germany).
22. Nail polish.
23. TaKaRa DEXPAT™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japan).
24. Hoechst 33258 (Molecular Probe, Eugene, OR).
25. Fluorescence spectrophotometer.
26. Thermal cycler.
27. Oligonucleotide primers.
28. PCR buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂.
29. PLATINUM *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA).
30. Agarose gel electrophoresis equipment.
31. Ethidium bromide (10 mg/mL; Invitrogen).
32. Agarose and DNA sequencing equipment.
33. Autoclaved ultrapure water for preparation of solutions.

3. Methods

The methods described below outline (1) the preparation of methacarn-fixed wax-embedded tissue specimens, (2) tissue staining, (3) microdissection, (4) DNA extraction from microdissected cells, and (5) polymerase chain reaction (PCR).

3.1. Preparation of Methacarn-Fixed Wax-Embedded Tissue Specimens

Methacarn solution, which is easily prepared, should be freshly made and stored at 4°C before fixation (22) (*see Note 1*).

3.1.1. Fixation and Tissue Embedding

1. Trim tissues/organs to 3 mm in thickness if possible.
2. If necessary, each tissue can be placed on a piece of filter paper or into a tissue cassette (Sakura Finetek Japan) to support tissue shape.
3. Fix tissues with methacarn for 2 h at 4°C with gentle agitation using a shaker.
4. Dehydrate tissues three times for 1 h in fresh 99.5% ethanol at 4°C with agitation.
5. Trim tissues for embedding during **step 4** if necessary.
6. Immerse tissue in xylene for 1 h and then three times for 30 min at room temperature.
7. Immerse tissues in hot wax (60°C) three successive 1-h periods.
8. Embed tissue specimens in fresh wax using a tissue-embedding console system (Sakura Finetek Japan).
9. Store wax-embedded tissue blocks at 4°C until sectioning.