

以上の処理を施した試料は、精製水で洗浄した後、50mM トリス緩衝生理食塩水 (TBS) で洗浄し、内因性の蛋白による非特異結合を防ぐため、Protein Block Serum-Free 試薬 (ダコ) によるブロッキング処理を行なった。一次抗体は、ウサギ抗ラット GST-P ポリクローナル抗体 (株式会社 医学生物学研究所)・抗 8-OHdG モノクローナル抗体 (日本老化制御研究所)・マウス抗 PCNA モノクローナル抗体 (ダコ)・マウス抗 TUNEL モノクローナル抗体 (ロッシュ)・マウス抗 MT モノクローナル抗体 (ダコ) を、ウシ血清アルブミンを 0.1% の濃度で加えた TBS で希釈したものを用い、湿潤箱中 (室温) で 1 時間反応させた。ただし、8-OHdG 染色の場合は、4℃ で 18 時間反応させた。一次抗体との反応の後には、試料を TBS で 5 分間 2 回洗浄し、ABC キット (ベクター) で反応させた後、3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB, メルク) により可視化させヘマトキシリンによる核染色を行った。

さらに、肝における GST-P, MT 及び銅の局在の関係性を明らかにするため、GST-P・銅二重染色、GST-P・MT 二重染色及び GST-P・MT・銅三重染色を実施した。銅染色は、薄切標本を脱パラフィン後に精製水にて湿潤して、5% 酢酸ナトリウム水溶液 100ml に *p*-dimethylaminobenzylidenerhodanine (和光純薬) の飽和アルコール溶液 3ml を加えたものを混じた染色液中で室温にて 12-24 時間反応させた。この時、GST-P 及び MT の発色には、アルカリフォスファターゼキット (赤, 青) (ベクター) を用いた。

標本は光学顕微鏡的に観察し、GST-P 陽性肝細胞巢の個数・総面積・1 個あたりの平均面積 (面積/巢), GST-P 陽性単細胞数, 8-OHdG・PCNA・TUNEL 陽性細胞数の測定は IPAP 画像解析装置 (住化テクノス) を用いて算出した。なお、GST-P 陽性細胞巢は、面積が 0.01 mm² 以上のものを計測した。

[遺伝子発現解析]

肝凍結保存標本は、Isogen (ニッポンジーン)

を用いて、ポリトロンホモジナイザー (キネマテイク) により組織を破碎後に total RNA を抽出し、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インヴィトロゲン) により cDNA を作製した。得られた cDNA は、7200 リアルタイム PCR システム (アプライドバイシステムズ) により、TaqMan Gene Expression Assays (アプライドバイシステムズ) 及び TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイシステムズ) を用いて増幅し、mRNA 発現を解析した。mRNA 発現解析は、methalothionein 1A (Mtl1a)・transferrin receptor (Trfc)・tumor necrosis factor α (TNF α)・p21・p53・interleukin 1 α (IL1 α)・nitric oxide synthase 2 (NOS2)・c-fos・ceruloplasmin (Cp)・superoxide dismutase 1 (SOD1)・oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1)・cyclin D1 (CD1) 及び 18S rRNA (ハウスキーピング遺伝子) について実施した。mRNA 発現率の測定は、18S 発現量で補正後、対照群の mRNA 発現量の平均値を 1 とする場合の投与群の mRNA 発現率を算出した。なお、対照群の発現量が 0 の場合は、発現量を算出いた。

5. 統計学的解析

体重、摂餌量、肝臓重量、銅濃度及び免疫組織化学的検索結果については、ANOVA による解析を行い、群間に有意差が認められた場合に、Dunnett の方法で対照群と各検体投与群の間で検定を行った。検定は、DEN 処置群内あるいは無処置群内それぞれで行い、必要に応じて別途検定方法を選択して行った。

6. 倫理面への配慮

本研究においては、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等並びに試験実施施設の規定に準拠し、適切な倫理面への配慮を行った。

C. 試験結果

1. 体重, 臓器重量, 摂餌量, 飲水量, グルコン酸銅及びカテキン摂取量

中期肝発がん性試験での実験期間中の体重推移については, 図 1 に示す. 試験期間中に死亡例が認められたが, これらは, いずれも検体投与の影響によるものでなく, 肝切除術の予後の悪化によるものであった. 最終体重は, DEN 処置のグルコン酸銅 6000 ppm 群及び併用群で有意に減少した. 絶対肝重量は, DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅 6000 ppm 群及び併用群で有意に減少したが, 相対肝重量に著変を認めなかった. 摂餌量は, DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群及び併用群で有意に低下した. また飲水量は, カテキン群及び併用群で有意に低下した. DEN 処置群のグルコン酸銅摂取量は, グルコン酸銅 10, 300, 6000 ppm 群でそれぞれ, 0.86, 25.90, 497.75 mg/kg/day (銅換算 0.12, 3.63, 69.69 mg/kg/day) であり, 併用群で 463.86 mg/kg/day (銅換算 64.95 mg/kg/day), DEN 無処置のグルコン酸銅 6000ppm 群で 442.81mg/kg/day (銅換算 62.00mg/kg/day) であった. DEN 処置群のカテキン摂取量は, 325.74 (単独群) 及び 282.88 (併用群) mg/kg/day であった (表 2).

2 週間反復投与試験では, 試験期間中に死亡例が発生しなかった. 最終体重は, 併用群で有意に減少した. 絶対肝重量は併用群で有意に減少し, 相対肝重量ではカテキン群及び併用群で僅かに減少した. 摂餌量は併用群で有意な低下が散見され, 飲水量は併用群で有意に低下した. グルコン酸銅摂取量は, グルコン酸銅 10, 300, 6000ppm 群でそれぞれ 0.82, 25.24, 476.92mg/kg/day (銅換算 0.11, 3.53, 66.78mg/kg/day) であり, 併用群で 470.62 mg/kg/day (銅換算 65.90mg/kg/day) であった. またカテキン摂取量は, 550.57 (単独群) 及び 469.39 (併用群) mg/kg/day であった.

3. 病理組織学的・免疫組織化学的検査

肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生個数は, DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群及び併用群で有意に増加した. 一方, グルコン酸銅 10・300ppm 及びカテキン単独群での GST-P 陽性細胞巢への影響はなかった. DEN 無処置群では, GST-P 陽性細胞巢は認められなかった.

DEN 処置群の GST-P 陽性細胞巢の総面積は群間に明らかな変化を認めなかったが, 1 個あたりの平均面積はグルコン酸銅・カテキン併用で有意に減少した (表 3).

肝臓の GST-P 陽性単細胞数は, DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅 6000ppm 群及びそのカテキン併用群で有意に増加した (表 4).

肝臓の 8-OHdG・PCNA・TUNEL 陽性細胞数は, DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅 6000ppm 群及びそのカテキン併用群で有意に増加した (表 5).

GST-P-銅二重染色においては, DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅 6000ppm 群及びそのカテキン併用群で銅陽性細胞が認められた. DEN 処置群では, 多くの場合 GST-P 陽性細胞巢に銅陽性所見を認めなかった.

GST-P-MT 二重染色においては, DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅 300ppm 以上群及びカテキン併用群で MT 陽性細胞が認められた. DEN 処置群では, GST-P と MT はそれぞれ単独で発現していたが, 一部の GST-P 陽性細胞巢に MT 共発現を認めた.

GST-P-MT-銅三重染色においては, DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群において, 多くの場合, 銅の発現が GST-P 及び MT の発現のいずれとも一致せず, 一部の GST-P 陽性細胞巢に MT 共発現を認めた.

4. 遺伝子発現解析

中期肝発がん性試験及び 2 週間反復投与試験の肝臓を用いては, real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction

(RT-PCR)による遺伝子発現解析を行った(表 6, 7).

金属代謝関連遺伝子である *Mt1a* と *Trfc* の発現は、両試験においてグルコン酸銅 6000ppm 及びそのカテキン併用群で増強した。さらに *Mt1a* 発現は、2 週間反復投与試験のカテキン群でも増強し、グルコン酸銅・カテキン併用群でそれぞれの単独群よりも増強した。アポトーシス関連遺伝子である $TNF\alpha$ ・*p21*・*p53* の発現は、それぞれ変動が認められた。 $TNF\alpha$ 発現は、中期肝発がん性試験のグルコン酸銅・カテキン併用群及び DEN 無処置群のグルコン酸銅 6000ppm で増強した。*p21* 発現は、中期肝発がん性試験のグルコン酸銅・カテキン併用群及び DEN 無処置群のグルコン酸銅 6000ppm で増強し、2 週間反復投与試験でもグルコン酸銅 6000ppm 群・カテキン群・グルコン酸銅・カテキン併用群において増強した。*p53* は、中期肝発がん性試験の全投与群で増強あるいは増強傾向が認められたが、2 週間反復投与試験で変動しなかった。炎症関連遺伝子 (*IL1 α*)・酸化ストレス関連遺伝子 (*NOS2*)、癌遺伝子 (*c-fos*) の発現は、中期肝発がん性試験の DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅 6000ppm 群並びにグルコン酸銅・カテキン併用群で増強あるいは増強傾向を示したが、2 週間反復投与試験で変動しなかった。一方、*Cp*・*SOD1*・*OGG1*・*CD1* は、いずれの試験においても変動しなかった。

D. 考察

中期肝発がん性試験においては、最終体重が、DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群及びそのカテキン併用群で有意に減少したが、両群で認められた摂餌量の低下に起因していると考えられた。また、両群で認められた絶対肝重量の低下は、体重の低値によるものと考えられた。また飲水量は、カテキン群及びグルコン酸銅・カテキン併用群で有意に低下したが、味の変化による飲用忌避の影響と推察された。グルコン酸銅 10 ppm 群の銅摂取量は、基礎飼料中の銅濃度(約 10 ppm)と合わ

せると、約 14 mg/day/ヒトであり、許容上限摂取量 (UL) 9 mg/day より若干多い程度に相当する。一方、カテキン 5000ppm 群のカテキン摂取量は、約 20 g/day/ヒトであり、一般的なカテキン含有の健康食品に表示される摂取目安 500~1000 mg/day (濃度 0.1~0.2%) の約 20-40 倍、濃度換算では 2.5~5 倍に相当する。

2 週間反復投与試験では、最終体重がグルコン酸銅・カテキン併用群で有意に減少したが、摂餌量の低下に起因するものと考えられた。また、絶対肝重量は、グルコン酸銅・カテキン併用群で有意に減少したが、相対肝重量の低下が僅かであったことから、体重減少が要因であると考えられた。

中期肝発がん性試験の病理組織学的・免疫組織化学的検索の結果、肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生個数は、DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群及びそのカテキン併用群で有意に増加した。一方、グルコン酸銅 10, 300ppm 群及びカテキン単独群では、GST-P 陽性細胞巢の発生個数に変化がなかった。これらのことから、グルコン酸銅は、ヒトが摂取すると考えられる用量では影響を示さないが、それよりも明らかに高い用量を与えた場合、肝臓において増殖性病変誘発促進作用を有し、発がんリスクを増加させる可能性が示唆された。また昨年度実施の中期多臓器発がん試験では、グルコン酸銅 300ppm でも GST-P 陽性細胞巢の発生個数を有意に増加させたが、この用量での発がん促進作用が弱いため、比較的長期間の投与によってはじめて検出できるものと推察された。一方、カテキンは、昨年度実施の中期多臓器発がん試験と同様に単独でリスクを示さなかったが、同試験でみられたグルコン酸銅の肝発がん性に対する抑制作用が、中期肝発がん性試験で明らかでなかった。この差は、同様に、実験期間の差に基くものである可能性が高いものと推察された。

中期肝発がん性試験の DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅 6000ppm 群並びにグルコン酸銅・カテ

キン併用群では、肝臓の GST-P 陽性単細胞数が有意に増加した。その背景機構は、詳細が不明であるが、昨年度実施の中期多臓器発がん性試験における同濃度のグルコン酸銅投与群の GST-P 陽性単細胞個数が対照群値と差がなかったことから、長期間投与で消失する可逆的な変化であるものと考えられた。

中期肝発がん性試験における肝臓の 8-OHdG・PCNA・TUNEL 染色の結果から、グルコン酸銅の高用量での発がん機序には、生体内に過剰に存在する銅による酸化ストレスの誘導と、それに基く細胞増殖活性亢進・アポトーシス誘発が関与するものと示唆された。

中期肝発がん性試験においては、GST-P・MT・銅の二重あるいは三重染色の結果から、DEN 投与のグルコン酸銅 300ppm 以上群で MT 発現、6000ppm 群で銅蓄積が認められた。さらに、GST-P 陽性細胞巣には、銅蓄積が認められず、その一部に MT の共発現が認められた。これらのことから、MT は銅負荷への反応として比較的低用量から発現し、GST-P 陽性細胞巣の構成細胞は MT 発現やそのほかの機序による銅蓄積の阻止により銅による毒性を回避した細胞環境を持つものと推察された。

遺伝子発現解析の結果では、中期肝発がん性試験及び 2 週間反復投与試験双方の肝臓において、各種遺伝子の発現が変動した。変動したほとんどの遺伝子は、グルコン酸銅 6000ppm 及びグルコン酸銅・カテキン併用群で発現が増強したことから、グルコン酸銅による作用が概ね 6000ppm の用量で発現することが推察された。また一部の遺伝子の発現変動は、グルコン酸銅による毒性作用あるいは増殖性病変誘発促進作用の背景機構に関与するものと考えられた。Mtl1a 及び Trfc は、2 週間投与時ですでに発現増強が認められ、比較的短期間に銅代謝の恒常性維持のための変化であるものと推察された。一方 IL1 α ・NOS2・c-fos は、2 週間投与で変動せず、中期発がん試験で DEN の有無に関わらず発現増強が認められた。これらの遺

伝子の発現変動は、グルコン酸銅の比較的長期間の暴露により生じた炎症あるいは酸化ストレスに対する反応と考えられた。実際、一昨年度実施の予備試験においては、グルコン酸銅 6000ppm 以上群において肝に肉芽腫性病変の発生が認められている。癌遺伝子である c-fos の発現増強は、グルコン酸銅の有する肝発がん促進作用と何らかの関連性があるものと考えられた。また、アポトーシス関連遺伝子である TNF α ・p21・p53 は、TUNEL 陽性細胞率の増加とある程度の相関性を示す発現増強を来した。しかし、p21 の発現増強は 2 週間投与時から認められたのに対し、TNF α 及び p53 のそれは比較的長期間の暴露が必要であった。また、p53 の発現は、グルコン酸銅 10ppm 以上あるいはカテキン単独投与により増強したが、その意義についてなお検討を要する。

一方、カテキン単独投与は 2 週間投与で Mtl1a 発現を増強し、グルコン酸銅・カテキン併用投与でそれぞれの単独投与よりも Mtl1a 発現がさらに増強した。昨年度実施の中期多臓器発がん試験においては、グルコン酸銅単独投与群よりもグルコン酸銅・カテキン併用群の方が高い銅濃度を示し、カテキン投与により銅蓄積が促進することが明らかとなっている。したがって、グルコン酸銅・カテキン併用投与による Mtl1a 発現増強は、その条件下での過剰な銅蓄積とカテキンそのものによる誘導の相加的作用であるものと考えられた。

以上のことから、グルコン酸銅は、高用量で肝発がんリスクを有するが、低用量でそのリスクを有しないことが示された。グルコン酸銅の高用量での肝発がん機序には、酸化ストレスの増加に基づく、細胞増殖活性亢進とアポトーシスの誘導が関与するものと示唆された。一方、カテキンは、単独でリスクを示さず、グルコン酸銅との併用投与で、銅代謝遺伝子の発現増強を亢進したが、中期肝発がん性試験の条件下で明瞭な発がん修飾作用を示さなかった。

E. 結論

グルコン酸銅は、酸化性ストレスに基づき肝を標的とする増殖性病変誘発促進作用を有し、高用量で発がんリスクを増加させる恐れがあるが、使用基準範囲においてその可能性が低いものと判明した。一方、カテキンは、中期肝発がん性試験の条件下で、単独投与で増殖性病変誘発になんらの影響も与えず、併用投与によってグルコン酸銅の肝発がん性に明瞭な抑制効果を示さないことが、明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Abe M, Suzuki N, Yoshida M, Igarashi M, Usuda K, Furukawa S, Maekawa A, Juneja LR, Okubo T and Nakae D, Preliminary evaluation of toxicologic and carcinogenic risks of copper gluconate in rats given multiple carcinogens. J Toxicol Pathol, 2006, 19: 129-135.

2. 学会発表

- (1) 中江 大, 吉田 緑, 前川 昭彦. カテキンとグルコン酸銅の単独および複合安全性に

関するラット中期多臓器発がん性試験法を用いた検索. 第95回日本病理学会総会(東京, 2006).

- (2) 阿部 正義, 鈴木 紀子, 吉田 緑, 五十嵐 麻希, 臼田 浩二, 古川 賢, 植松 史行, 高橋 正一, 前川 明彦, 中江 大. カテキン及びグルコン酸銅を用いたラット中期多臓器発がん性試験法による検討. 第33回日本トキシコロジー学会学術集会(名古屋, 2006).
- (3) 阿部 正義, 吉田 緑, 五十嵐 麻希, Juneja L, 中江 大. ラット中期多臓器発がん性試験法を用いたカテキン及びグルコン酸銅の発がんリスクの評価. 第65回日本癌学会学術総会(横浜, 2006).
- (4) 阿部 正義, 臼田 浩二, 古川 賢, Raj JL, 大久保 勉, 中江 大. ラット中期肝発がん性試験法を用いたカテキン及びグルコン酸銅の発がんリスクの評価. 第23回日本毒性病理学会年次学術集会(東京, 2007).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1. 体重の推移

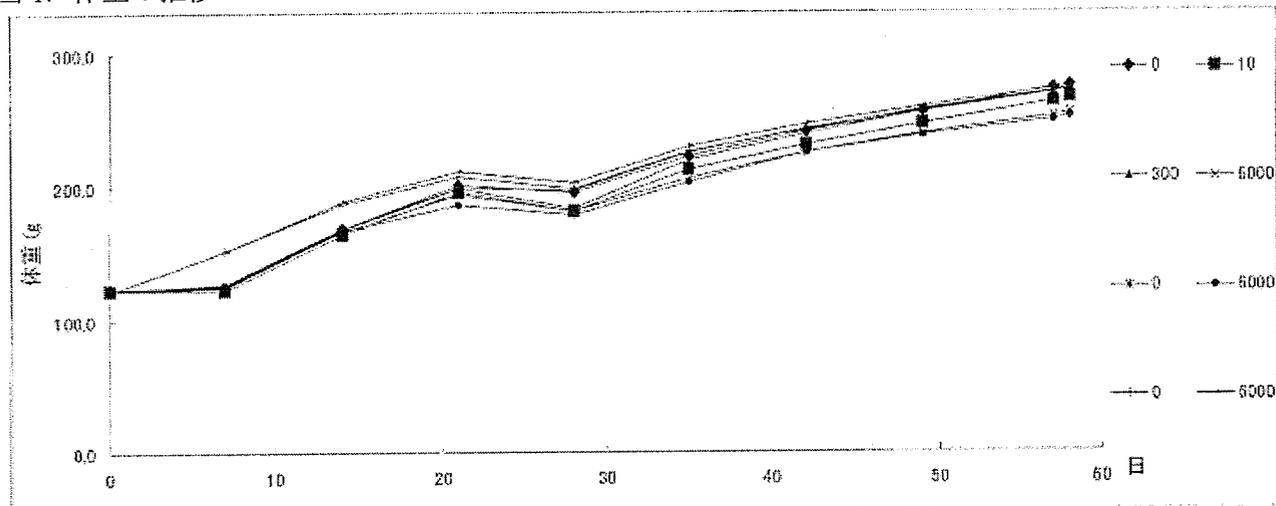


表 1. 最終体重及び肝臓重量

| 群 | DEN | グルコン酸銅 (ppm) | カテキン (ppm) | 有効 動物数 | 体重 (g) | 肝臓重量 | |
|---|-----|-----------------|---------------|-----------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| | | | | | | 絶対 (g) | 相対 (g/100g body wt) |
| 1 | + | 0 | 0 | 8 | 275 ± 10 ^a | 8.85 ± 0.53 | 3.21 ± 0.11 |
| 2 | + | 10 | 0 | 11 | 266 ± 18 | 8.79 ± 0.69 | 3.31 ± 0.31 |
| 3 | + | 300 | 0 | 10 | 273 ± 16 | 8.66 ± 0.52 | 3.17 ± 0.14 |
| 4 | + | 6000 | 0 | 10 | 255 ± 11 ^{**} | 8.09 ± 0.42 ^{**} | 3.17 ± 0.12 |
| 5 | + | 0 | 5000 | 10 | 273 ± 15 | 8.66 ± 0.59 | 3.17 ± 0.14 |
| 6 | + | 6000 | 5000 | 9 | 252 ± 16 ^{**} | 7.84 ± 0.71 ^{**} | 3.11 ± 0.17 |
| 7 | - | 0 | 0 | 8 | 278 ± 10 | 8.64 ± 0.45 | 3.11 ± 0.14 |
| 8 | - | 6000 | 0 | 7 | 270 ± 7 | 8.18 ± 0.44 [#] | 3.03 ± 0.16 |

^a: 平均値 ± SD.

^{**}: 1群に対し有意差あり (p<0.01).

[#]: 7群に対し有意差あり (p<0.05).

表 2. 摂餌量, 飲水量及び検体摂取量

| 群 | DEN | グルコン酸銅 (ppm) | カテキン (ppm) | 有効 動物数 | 摂餌量 (g) | 飲水量 (g) | グルコン酸銅 摂取量 (mg/kg/day) | 銅 摂取量 (mg/kg/day) | カテキン 摂取量 (mg/kg/day) |
|---|-----|-----------------|---------------|-----------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 1 | + | 0 | 0 | 8 | 14.0 ± 0.6 ^a | 16.0 ± 1.3 | NE | NE | NE |
| 2 | + | 10 | 0 | 11 | 13.7 ± 0.9 | NE | 0.86 ± 0.02 | 0.12 ± 0.00 | NE |
| 3 | + | 300 | 0 | 10 | 14.1 ± 0.7 | NE | 25.90 ± 1.06 | 3.63 ± 0.15 | NE |
| 4 | + | 6000 | 0 | 10 | 13.1 ± 0.6 ^{**} | 15.6 ± 1.1 | 497.75 ± 19.28 | 89.69 ± 2.70 | NE |
| 5 | + | 0 | 5000 | 10 | 13.7 ± 0.9 | 14.9 ± 1.1 ^{**} | NE | NE | 325.74 ± 28.17 |
| 6 | + | 6000 | 5000 | 9 | 12.2 ± 0.8 ^{**} | 12.1 ± 0.6 ^{**} | 463.86 ± 17.53 | 64.95 ± 2.51 | 282.88 ± 16.58 |
| 7 | - | 0 | 0 | 8 | 13.6 ± 0.5 | NE | NE | NE | NE |
| 8 | - | 6000 | 0 | 7 | 13.2 ± 0.5 | NE | 442.81 ± 11.95 | 62.00 ± 1.67 | NE |

^a: 平均値 ± SD.

^{**}: 1群に対し有意差あり (p<0.01).

表 3. 肝臓における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析

| 群 | DEN | グルコン酸銅 (ppm) | カテキン (ppm) | 有効 動物数 | GST-P陽性細胞巢 ^b | | |
|---|-----|-----------------|---------------|-----------|-----------------------------|--|----------------------------|
| | | | | | 数 (No./cm ²) | 総面積 (mm ² /cm ²) | 面積/巢 (mm ²) |
| 1 | + | 0 | 0 | 8 | 15.3 ± 3.8 ^a | 0.879 ± 0.406 | 0.058 ± 0.020 |
| 2 | + | 10 | 0 | 11 | 15.9 ± 6.3 | 1.081 ± 0.917 | 0.059 ± 0.027 |
| 3 | + | 300 | 0 | 10 | 14.1 ± 5.1 | 0.918 ± 0.547 | 0.064 ± 0.017 |
| 4 | + | 6000 | 0 | 10 | 19.9 ± 4.8 ^{**} | 0.993 ± 0.310 | 0.050 ± 0.008 |
| 5 | + | 0 | 5000 | 10 | 13.9 ± 2.1 | 0.889 ± 0.116 | 0.065 ± 0.011 |
| 6 | + | 6000 | 5000 | 9 | 20.6 ± 3.7 ^{**} | 0.876 ± 0.107 | 0.043 ± 0.006 [*] |
| 7 | - | 0 | 0 | 8 | 0.0 ± 0.0 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 8 | - | 6000 | 0 | 7 | 0.0 ± 0.0 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |

^a: 平均値 ± SD.

^b: GST-P陽性細胞巢は面積が0.01mm²以上を計測した.

^{*}, ^{**}: 1群に対し有意差あり (p<0.05, 0.01).

表 4. 肝臓における GST-P 陽性単細胞数の定量的解析

| 群 | DEN | グルコン酸銅 (ppm) | カテキン (ppm) | 有効 動物数 | GST-P陽性細胞巢 ^b | | |
|---|-----|-----------------|---------------|-----------|-----------------------------|--|----------------------------|
| | | | | | 数 (No./cm ²) | 総面積 (mm ² /cm ²) | 面積/巢 (mm ²) |
| 1 | + | 0 | 0 | 8 | 15.3 ± 3.8 ^a | 0.879 ± 0.406 | 0.058 ± 0.020 |
| 2 | + | 10 | 0 | 11 | 15.9 ± 6.3 | 1.081 ± 0.917 | 0.059 ± 0.027 |
| 3 | + | 300 | 0 | 10 | 14.1 ± 5.1 | 0.918 ± 0.547 | 0.064 ± 0.017 |
| 4 | + | 6000 | 0 | 10 | 19.9 ± 4.8 ^{**} | 0.993 ± 0.310 | 0.050 ± 0.008 |
| 5 | + | 0 | 5000 | 10 | 13.9 ± 2.1 | 0.889 ± 0.116 | 0.065 ± 0.011 |
| 6 | + | 6000 | 5000 | 9 | 20.6 ± 3.7 ^{**} | 0.876 ± 0.107 | 0.043 ± 0.006 [*] |
| 7 | - | 0 | 0 | 8 | 0.0 ± 0.0 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |
| 8 | - | 6000 | 0 | 7 | 0.0 ± 0.0 | 0.000 ± 0.000 | 0.000 ± 0.000 |

^a: 平均値 ± SD.

^b: GST-P陽性細胞巢は面積が0.01mm²以上を計測した.

^{*}, ^{**}: 1群に対し有意差あり (p<0.05, 0.01).

表 5. 8-OHdG, PCNA 及び TUNEL の定量的解析

| 群 | DEN | グルコン酸銅 (ppm) | カテキン (ppm) | 有効 動物数 | 8-OHdG | PCNA | TUNEL |
|---|-----|-----------------|---------------|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | | | (%) | (%) | (%) |
| 1 | + | 0 | 0 | 5 | 0.0 ± 0.0 ^a | 2.2 ± 1.0 | 0.13 ± 0.08 |
| 2 | + | 10 | 0 | 5 | 0.0 ± 0.0 | 2.6 ± 1.1 | 0.11 ± 0.08 |
| 3 | + | 300 | 0 | 5 | 0.0 ± 0.0 | 2.5 ± 0.5 | 0.14 ± 0.04 |
| 4 | + | 6000 | 0 | 5 | 55.0 ± 9.9 ^{**} | 10.8 ± 4.2 ^{**} | 1.31 ± 0.52 ^{**} |
| 5 | + | 0 | 5000 | 5 | 0.0 ± 0.0 | 2.1 ± 0.3 | 0.12 ± 0.09 |
| 6 | + | 6000 | 5000 | 5 | 60.5 ± 17.1 ^{**} | 9.4 ± 4.5 ^{**} | 0.94 ± 0.59 ^{**} |
| 7 | - | 0 | 0 | 5 | 0.0 ± 0.0 | 1.3 ± 0.2 | 0.12 ± 0.10 |
| 8 | - | 6000 | 0 | 5 | 63.9 ± 12.5 ^{##} | 22.2 ± 11.3 ^{##} | 0.89 ± 0.43 ^{##} |

^a: 平均値 ± SD.

^{**}: 1群に対し有意差あり (p<0.01).

^{##}: 7群に対し有意差あり (p<0.01).

表 6. 遺伝子発現解析 (中期肝発がん性試験)

| 群 | DEN | グルコン酸銅 (ppm) | カテキン (ppm) | 有効 動物数 | Mt1a (p) | Tfro (p) | TNF α (p) | p21 (p) | p53 (p) | IL1 α (p) | NOS2 ^b (p) | c-fos (p) |
|---|-----|-----------------|---------------|-----------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | + | 0 | 0 | 5 | 1.0 ± 0.8 ^a | 1.0 ± 0.3 | 1.0 ± 0.4 | 1.0 ± 0.2 | 1.0 ± 0.3 | 1.0 ± 0.2 | 0.7 ± 1.2 | 1.0 ± 0.6 |
| 2 | + | 10 | 0 | 5 | 1.1 ± 0.4 | 1.4 ± 0.2 | 1.1 ± 0.7 | 1.2 ± 0.3 | 1.7 ± 0.4 ^a | 1.2 ± 0.1 | 0.5 ± 0.4 | 1.4 ± 0.6 |
| 3 | + | 300 | 0 | 5 | 1.2 ± 0.4 | 1.1 ± 0.2 | 0.9 ± 0.5 | 1.3 ± 0.3 | 1.5 ± 0.3 | 1.0 ± 0.2 | 0.1 ± 0.2 | 0.7 ± 0.5 |
| 4 | + | 6000 | 0 | 5 | 2.6 ± 1.2 | 5.8 ± 1.4 ^{**} | 2.9 ± 1.0 | 1.8 ± 0.7 | 2.2 ± 0.6 ^{**} | 1.9 ± 0.7 ^{**} | 3.5 ± 2.1 | 4.0 ± 1.7 ^{**} |
| 5 | + | 0 | 5000 | 5 | 2.1 ± 1.2 | 1.8 ± 0.5 | 1.3 ± 1.0 | 1.3 ± 0.4 | 2.3 ± 1.2 ^{**} | 1.3 ± 0.5 | 0.5 ± 0.5 | 1.0 ± 0.2 |
| 6 | + | 6000 | 5000 | 5 | 11.0 ± 1.9 ^{**} | 6.5 ± 1.4 ^{**} | 4.9 ± 3.1 ^{**} | 2.7 ± 0.5 ^{**} | 2.6 ± 0.5 ^{**} | 1.9 ± 0.5 ^{**} | 5.2 ± 5.8 ^{**} | 4.9 ± 1.9 ^{**} |
| 7 | - | 0 | 0 | 5 | 0.8 ± 0.4 | 1.8 ± 0.2 | 0.9 ± 0.6 | 1.8 ± 0.1 | 2.2 ± 0.3 ^{**} | 1.3 ± 0.2 | 1.3 ± 1.4 | 0.9 ± 0.6 |
| 8 | - | 6000 | 0 | 5 | 2.3 ± 0.7 | 6.3 ± 1.6 ^{**} | 5.7 ± 2.6 ^{**} | 3.0 ± 1.0 ^{**} | 3.4 ± 0.6 ^{**} | 2.3 ± 0.6 ^{**} | 5.4 ± 4.7 ^b | 5.0 ± 3.1 ^{**} |

^a: 値は1群に対する発現比を示す。平均値 ± SD。

^b: 値は発現量を示す。

^{*}, ^{**}: 1群に対し有意差あり (p<0.05, 0.01)。

^a, ^{**}: 7群に対し有意差あり (p<0.05, 0.01)。

表 7. 遺伝子発現解析 (2週間反復投与試験)

| 群 | グルコン酸銅 (ppm) | カテキン (ppm) | 有効 動物数 | Mt1a (p) | Tfro (p) | TNF α (p) | p21 (p) | p53 (p) | IL1 α (p) | NOS2 ^b (p) | c-fos (p) |
|---|-----------------|---------------|-----------|--------------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|------------|--------------|--------------------------|--------------|
| 1 | 0 | 0 | 5 | 1.0 ± 0.5 ^a | 1.0 ± 0.2 | 1.0 ± 0.6 | 1.0 ± 0.2 | 1.0 ± 0.2 | 1.0 ± 0.2 | 0.0 ± 0.0 | 1.0 ± 0.6 |
| 2 | 10 | 0 | 5 | 2.5 ± 1.2 | 1.2 ± 0.2 | 0.7 ± 0.4 | 1.2 ± 0.1 | 1.1 ± 0.2 | 0.9 ± 0.2 | 0.2 ± 0.2 | 0.5 ± 0.3 |
| 3 | 300 | 0 | 5 | 1.4 ± 0.7 | 1.1 ± 0.3 | 1.9 ± 1.2 | 1.5 ± 0.4 | 1.9 ± 0.3 | 0.8 ± 0.1 | 0.1 ± 0.1 | 0.7 ± 0.3 |
| 4 | 6000 | 0 | 5 | 8.6 ± 3.8 ^{**} | 2.7 ± 1.6 ^{**} | 2.6 ± 1.6 | 2.0 ± 0.6 ^{**} | 0.8 ± 0.3 | 0.8 ± 0.2 | 0.1 ± 0.1 | 0.8 ± 0.3 |
| 5 | 0 | 5000 | 5 | 4.3 ± 2.0 ^{**} | 1.2 ± 0.2 | 1.5 ± 0.7 | 2.0 ± 0.4 ^{**} | 1.2 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 0.5 ± 0.1 |
| 6 | 6000 | 5000 | 5 | 16.2 ± 4.0 ^{**} | 2.4 ± 0.6 ^{**} | 2.2 ± 1.3 | 3.5 ± 1.2 ^{**} | 1.0 ± 0.3 | 0.8 ± 0.3 | 0.6 ± 0.6 | 0.8 ± 0.4 |

^a: 値は1群に対する発現比を示す。平均値 ± SD。

^b: 値は発現量を示す。

^{*}, ^{**}: 1群に対し有意差あり (p<0.05, 0.01)。

発がん物質等の代謝活性化に影響を及ぼす食品中化学物質の検索

分担研究者 山添 康 東北大学大学院薬学研究科

研究要旨 ヒトの主要な異物代謝酵素である CYP3A4 は、医薬品や食品成分など様々な化学物質の暴露により酵素誘導を受ける。したがって、CYP3A4 で代謝される化学物質を、CYP3A4 誘導作用を示す化学物質と同時に摂取した場合、単独摂取の場合とは異なる薬理効果や毒性を示す可能性があり、ヒトに用いられる化学物質の CYP3A4 誘導性を事前に把握しておくことは非常に重要である。本研究では、前年度までに作成した CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞と CYP3A4 レポーター発現アデノウイルスを用いて、20 種類の農薬の CYP3A4 誘導性を評価し、pyributicarb が代表的な CYP3A4 誘導剤である rifampicin よりも強力な CYP3A4 誘導性を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

ヒトの主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 は、臨床で用いられている多くの医薬品の代謝だけでなく、食品添加物や農薬をはじめとする環境由来の化学物質の代謝にも関与している。また、CYP3A4 はある種の化学物質によりその酵素活性が阻害されること、また酵素含量の増加（酵素誘導）を受けることが知られている。したがって、CYP3A4 で代謝される化学物質を、CYP3A4 酵素阻害作用あるいは誘導作用を示す化学物質と同時に摂取した場合には、単独で摂取した場合とは体内動態が異なると考えられ、そのため予期せぬ薬理効果や毒性を示す可能性がある。農薬をはじめとする化学物質のヒトに対す

る影響は、実験動物を用いた成果から予測されることが多いが、実際には、ヒトと実験動物の間には薬物代謝酵素やその発現調節に関わる因子に種差が存在するため、実験動物で得られたデータをヒトへ外挿することは困難である。そこで本研究課題では、この問題を克服する手段の1つとして、in vitro および in vivo において化学物質のヒト CYP3A4 誘導能を予測可能な実験系の構築を目指している。今年度は、昨年までに作成した CYP3A4 レポーター安定発現培養細胞を用いて、農薬の CYP3A4 誘導能を、典型的な CYP3A4 誘導物質である rifampicin と比較検討し、さらに、農薬による CYP3A4 誘導において、CYP3A4 誘導の調節因子の1つである核内

受容体 pregnane X receptor (PXR) の寄与を解析した。また、マウス個体を用いて農薬のヒト CYP3A4 誘導能の評価を試みた。

B. 研究方法

農薬の CYP3A4 誘導能の評価: CYP3A4 レポーターを安定的に発現するヒト肝癌細胞 HepG2 由来細胞株 (クローン 3-1-10) を 24 穴プレートに播種し、農薬あるいは rifampicin を 0.3-30 μM の濃度で培地に添加して 48 時間培養した。細胞を回収後、可溶性画分を調製してそのレポーター (ルシフェラーゼ) 活性を測定した。また、一部の農薬については、HepG2 細胞にレポータープラスミドを一過性に導入した後、上記と同様の実験を行なった。

CYP3A4 誘導における PXR の寄与: 3-1-10 細胞にヒト PXR の siRNA 発現アデノウイルスを感染させ、その 3 日後に薬物を培地中に添加して上記と同様にレポーター活性を測定した。また、HepG2 細胞にヒト PXR の siRNA 発現アデノウイルスおよび CYP3A4 レポーター発現アデノウイルスを感染させた後、3 日後に薬物を培地中に添加し、さらに 2 日後に総 RNA を調製して CYP3A4 mRNA レベルを定量的逆転写 PCR 法により測定した。

マウス個体における CYP3A4 誘導能の評価: マウスにヒト PXR 発現アデノウイルスおよび CYP3A4 レポーター発現アデノウイルスを投与し、2 日後から薬物を 2 日間連続経口投与した。最終投与 1 日後に

マウスを屠殺し、肝臓の可溶性画分を調製してレポーター活性を測定した。

C. 研究成果

農薬の CYP3A4 誘導能の評価: 3-1-10 細胞株を用いて、20 種の農薬の CYP3A4 レポーター遺伝子の転写活性化能を測定したところ、いくつかの化合物は強い誘導活性を示した。代表的な結果を図 1 に示した。このうち、pyributicarb は 1 μM 以下の濃度では強力な CYP3A4 誘導物質である rifampicin よりも強い誘導能を示した。この pyributicarb の強い CYP3A4 誘導能は HepG2 細胞を用いた一過性発現系のレポーターアッセイによっても確認された (データ示さず)。また、HepG2 細胞における CYP3A4 mRNA レベルは、3 μM pyributicarb、10 μM isoxathion および 10 μM *o*-ethyl *o*-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate (EPN) 処理により、10 μM rifampicin 処理と同程度まで増加した (データ示さず)。

CYP3A4 誘導における PXR の寄与: CYP3A4 分子種の誘導には PXR をはじめとする核内受容体が中心的な役割を果たしている。そこで次に、ヒト PXR の siRNA を発現するアデノウイルスを用いて、pyributicarb、isoxathion および EPN による CYP3A4 誘導における PXR の関与を解析した。図 2 に示すように、いずれの農薬においても PXR 発現量の抑制の程度に応じて CYP3A4 レポーター活性が低下した。さらに、HepG2 細胞における農薬添加に伴

う CYP3A4 mRNA レベルの増加は、ヒト PXR の siRNA 発現アデノウイルスの感染によりほぼ消失した（データ示さず）。以上の結果より、これら農薬による CYP3A4 の誘導は PXR を介していることが示唆された。マウス個体における CYP3A4 誘導能の評価：培養細胞では CYP などの薬物代謝酵素の発現レベルが著しく低いため、培養細胞において誘導能を示した化合物でも in vivo においては代謝を受けて不活性化され誘導能を示さない可能性がある。そこで、次に、マウスに CYP3A4 レポーターを発現するアデノウイルスをマウスに摂取し、in vivo レポーターアッセイを行なった。なお、CYP と同様に PXR のリガンド選択性には著しい種差が認められるため、本実験ではヒト PXR 発現アデノウイルスを同時に摂取させた。図 3 に示すように、ヒト PXR 非発現時には、pyributicarb 投与による CYP3A4 レポーター活性の上昇は認められなかったが、ヒト PXR を発現させた場合には約 4 倍のレポーター活性の上昇が認められた。この結果は、pyributicarb はマウス PXR をほとんど活性化せずにヒト PXR を選択的に活性化することを示唆しており、そして、本 in vivo レポーターアッセイを用いることで、そのようなヒト PXR 選択的な CYP3A4 誘導物質の検出も可能となることを示している。

D. 考察および展望：本研究により、CYP3A4

レポーター安定発現培養細胞を用いた in vitro レポーターアッセイとマウス個体を用いた in vivo レポーターアッセイを組み合わせることで、ヒト CYP3A4 誘導性を示す化合物のスクリーニングシステムを確立することができた。また、このシステムに PXR の siRNA 発現アデノウイルスを応用することで、これら化学物質による CYP3A4 誘導における PXR の寄与の解析も可能であることが示唆された。近年、PXR は CYP3A4 だけではなく、CYP2A や CYP2B、CYP2C サブファミリーの他の CYP 分子種の発現調節にも関わっていることが示されており、本研究で同定された PXR 活性化作用を有する農薬はヒトにおいて複数の CYP 分子種を誘導する可能性が考えられる。

CYP3A4 誘導の評価に加えて、我々は既に、CYP1A1 および CYP1A2 遺伝子の転写活性化能を同時に評価可能なシステムを構築している。これまで、CYP1A1/1A2 遺伝子の化学物質による発現亢進には aryl hydrocarbon receptor (AhR) が中心的に働いていると考えられてきたが、我々は本評価システムを用いて、ある種の化学物質は核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) を介して CYP1A2 遺伝子を転写活性化することを示唆する結果を得ている。したがって、今後は各種農薬による CYP1A 分子種の誘導能についてスクリーニングを行い、その誘導における AhR や CAR の寄与についても解析を進める予定である。

E. 結論

CYP3A4 レポーター安定発現培養細胞を用いた *in vitro* レポーターアッセイとマウス個体を用いた *in vivo* レポーターアッセイを使用する、ヒト CYP3A4 誘導性を示す化合物のスクリーニングシステムを確立した。

G. 研究発表

1. 論文発表

T Matsubara, W Noracharttiyapot, T Toriyabe, K Yoshinari, K Nagata, and Y Yamazoe: Assessment of human pregnane X receptor-involvement

pesticide-mediated activation of CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* (2007) 35, 728-33.

2. 学会発表

T Matsubara, T Toriyabe, K Yoshinari, K Nagata, and Y Yamazoe: A herbicide pyributicarb is more potent inducer of CYP3A4 expression interacting with pregnane X receptor than rifampicin. 第21回日本薬物動態学会年会 2006年11月29日(東京)

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

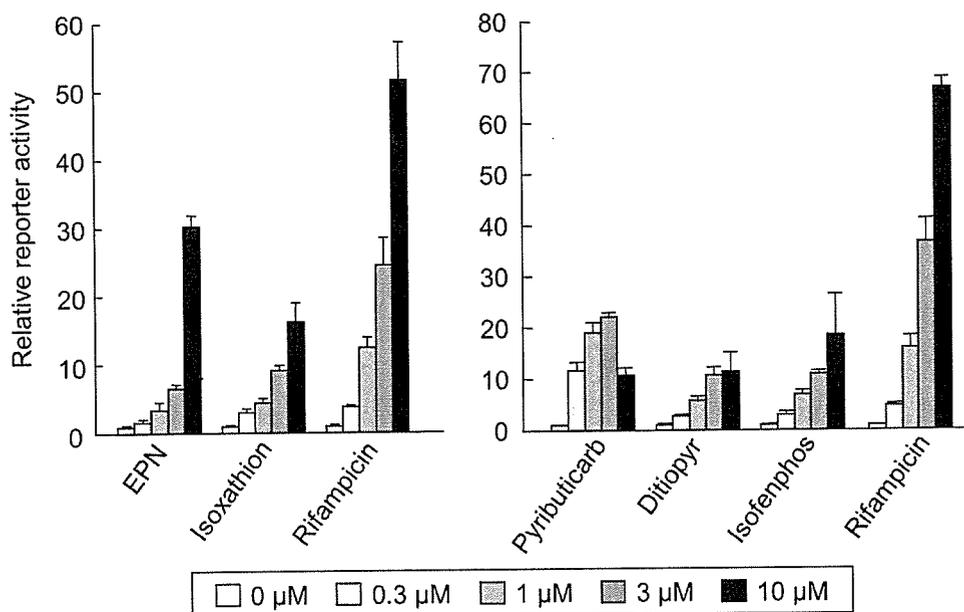


図1. CYP3A4 レポーター安定発現細胞を用いた農薬の CYP3A4 誘導能の評価

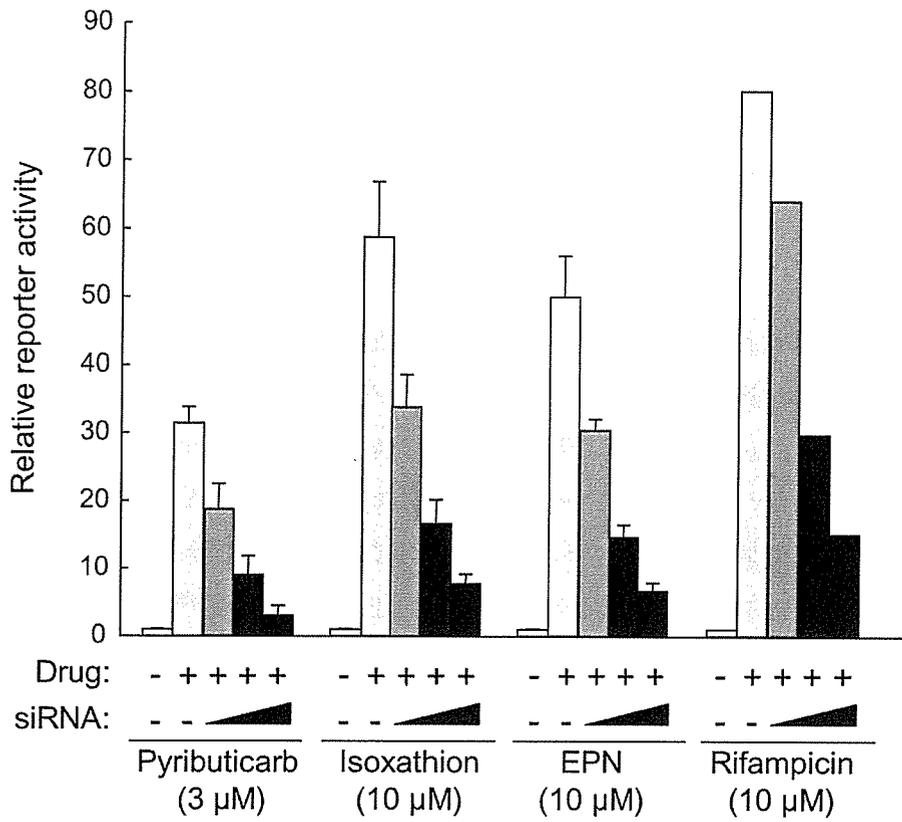


図2. 農薬の CYP3A4 誘導における PXR の寄与の解析

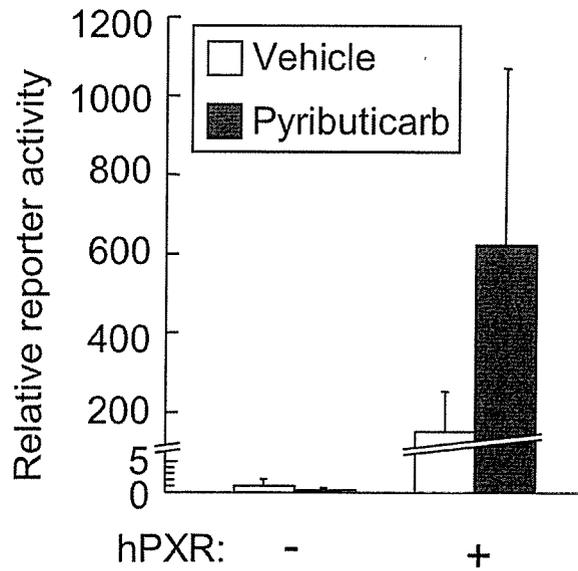


図3. マウス個体を用いた pyributicarb の CYP3A4 誘導能の評価

食品中化学物質相互の酵素誘導を介した発がんリスクに関する実験的研究

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨

前年度に、我々は食品中の発がん物質である MeIQx とその代謝活性化酵素である CYP1A1/1A2 を誘導する作用のある α -および β -naphthoflavone (ANF, BNF) を複合投与して検討したところ、CYP は明らかに誘導されたが、MeIQx 肝発がん促進作用は見られなかった。そこで今年度は、酵素誘導と前がん病変の発生の肝小葉を単位とする領域特異性に着目し、CYP1A1/2 の免疫染色を行い、MeIQx, ANF, BNF の単独およびそれぞれの複合投与した際の CYP1A1/2 の発現強度の領域特異性を検索した。その結果、MeIQx, ANF, BNF 投与により誘導された CYP1A1/2 の発現強度は小葉の領域により異なり、MeIQx 単独投与では Zone 3 で上昇し、ANF と BNF では Zone 1 が上昇した。複合投与ではその発現強度の部位特異性に変化はみられず、前がん病変の発生の Zone 2 に多く見られたが、Zone 3 での前がん病変の発生の酵素誘導には一定の相関が見られた。前がん病変では CYP1A1/2 の発現は高度に減少しており、いったん発生した前癌病変に対しては酵素誘導による発がん物質の活性化は、病変内できわめて起きにくいことが明らかとなった。

A. 研究目的

化学物質の代謝には、肝臓の領域 (Zone) 特異性が存在し、発がん物質の代謝活性化も領域によって異なる可能性が示唆される。一方、これまでに行った Western blot 法による P450 の発現解析は、肝全体での蛋白発現量を反映しており、実際に発がん物質の代謝に関わる肝の特定の領域における代謝酵素発現量を反映しない可能性がある。そこで、前回用いた肝中期発がん性試験法の肝組織標本に CYP1A1/2 の免疫染色を行い、MeIQx, ANF, BNF の単独およびそれぞれの複合とした際の CYP1A1/2 の発現量の変化を検索した。また前癌病変および周囲肝組織の CYP1A1/2 の発現量の違いも併せて検討した。

B. 研究方法

DEN と肝部分切除を応用したラット中期肝発がん試験法を用い、MeIQx (300ppm) と α -naphthoflavone (0.02%) あるいは β -naphthoflavone (0.02%) を単独あるいは複合で 6 週間投与し、前癌病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の単位面積当たりの個数と面積を測定した。さらに CYP1A1/2 抗体を用いて免疫染色を行い、画像解析装置を用いてグリソン鞘周囲 (Zone 1)、中心静脈周辺 (Zone 3) および両者の中間である Zone 2 における CYP1A1/2 の陽性領域および染色強度と吸光度で測定し、MeIQx, ANF, BNF の単独およびそれぞれの複合とした際の Zone ごとの

CYP1A1/2 の発現量の変化を検討した。さらに GST-P および CYP1A1/2 染色の連続切片を作成し、前がん病変である GST-P 陽性細胞巢と GST-P 陰性である正常肝組織における CYP1A1/2 の発現強度の差異も検索した。

(倫理面への配慮)

実験は、動物愛護の精神を十分に尊重して行った。

C. 研究結果

肝全体の CYP1A1/2 の発現強度は、MeIQx 単独投与群に比較して、ANF および BNF の単独投与群および MeIQx との複合投与群のいずれにも発現強度が上昇しており、western blotting の結果と相関していた。CYP の発現強度は、MeIQx 単独投与群では、Zone3 優位、ANF、BNF 単独投与群では、Zone1 優位であった (図 1)。Zone 1 における CYP の発現強度は、MeIQx と ANF および BNF との複合投与群で、MeIQx 単独投与と比較して発現強度は有意に上昇した (図 1, 図 2)。また Zone 3 における CYP の発現強度は、MeIQx 単独投与群と比較して、ANF、BNF との複合投与によっても発現強度の上昇はみられなかったが、CYP1A1/2 の Zone 3 における発現強度と前癌病変の発生は、良い相関が見られた (図 3, 4)。いずれの群でも GST-P 陽性細胞巢における CYP1A1/2 の発現強度は陰性部位に比べて低下していた (図 5)。

D. 考察

代謝活性化酵素の誘導あるいは阻害を介してヘテロサイクリックアミンによる発がん性修飾作用を検討したが、発がん物質の第 1 相代謝酵素である CYP1A 1/2 の肝における変動と発がん修飾作用の結果は相関しなかった。化学物質の代謝には肝臓の領域特異性が存在し、発がん物質の代謝活性化も領域によって異なる可能性が示唆される

ため、免疫染色による酵素発現の部位特異性と腫瘍発生との関連性を領域ごとに検索したところ、発がん物質により CYP1A1/2 の発現部位および強度は異なることが示された。このように本研究の成果は、発がん性に関与する発がん物質の代謝活性化機構は単純なものではないことを示唆しており、今後、発がん物質の活性化機構の部位特異性とその発がん機構との関連について追究する必要がある。

E. 結論

発がん物質の第 1 相代謝酵素である CYP1A1/2 は、発がん物質によってその発現部位および強度が異なることが示された。今後、発がん物質の活性化機構の部位特異性とその発癌機構との関連について追究する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kuribayashi, M., Asamoto, M., Suzuki, S., Hokaiwado, N., Ogawa, K. and Shirai, T. Lack of modification of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) rat hepatocarcinogenesis by caffeine, a CYP1A2 inducer, points to complex counteracting influences. *Cancer Lett.* 232; 289-299, 2006.

2. 学会発表

難波江恭子、土井悠子、中島弘尚、市原敏夫、竹下健太郎、朝元誠人、白井智之 MeIQx と α -および β -naphthofalvone 同時投与による肝発がん修飾作用の検討 第 23 回日本毒性病理学会、東京、2007 年 1 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

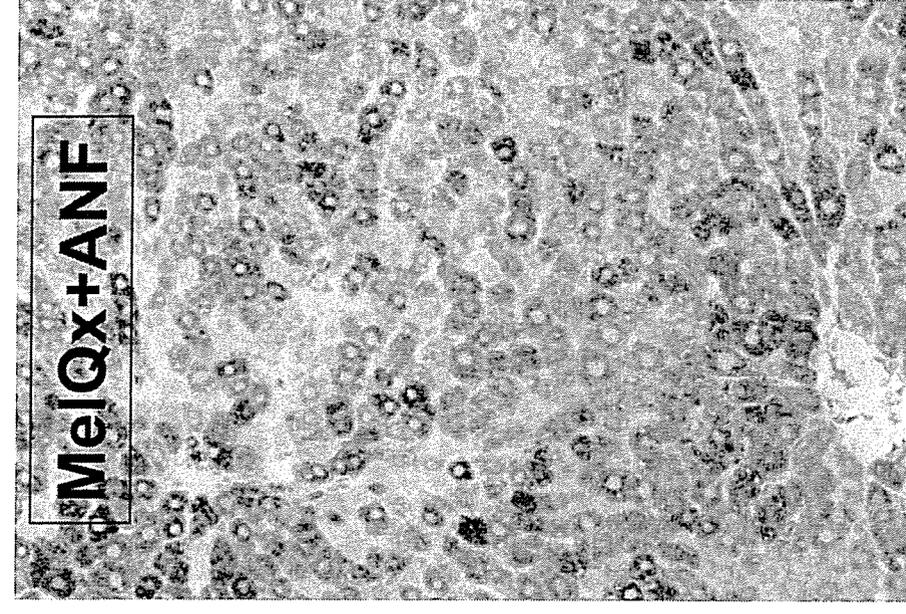
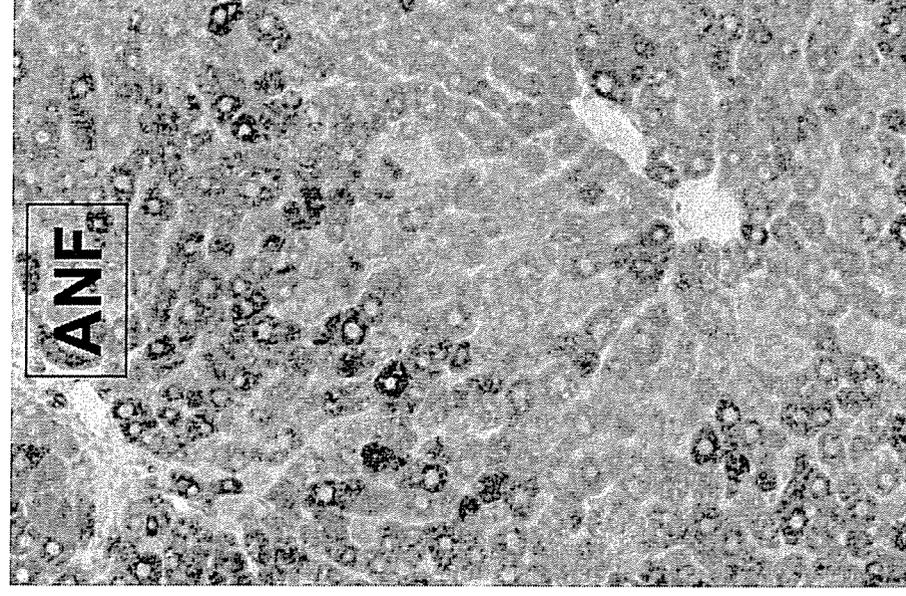
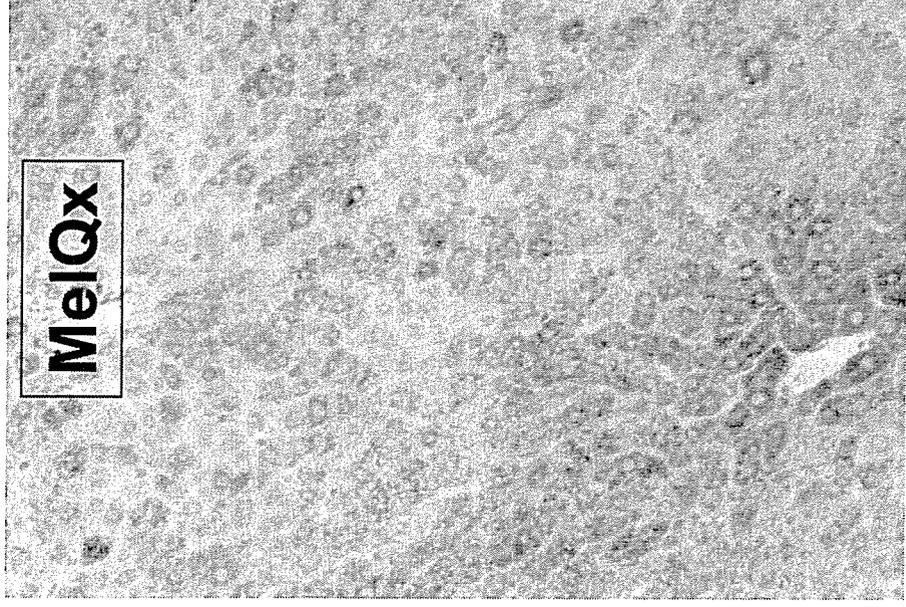
該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

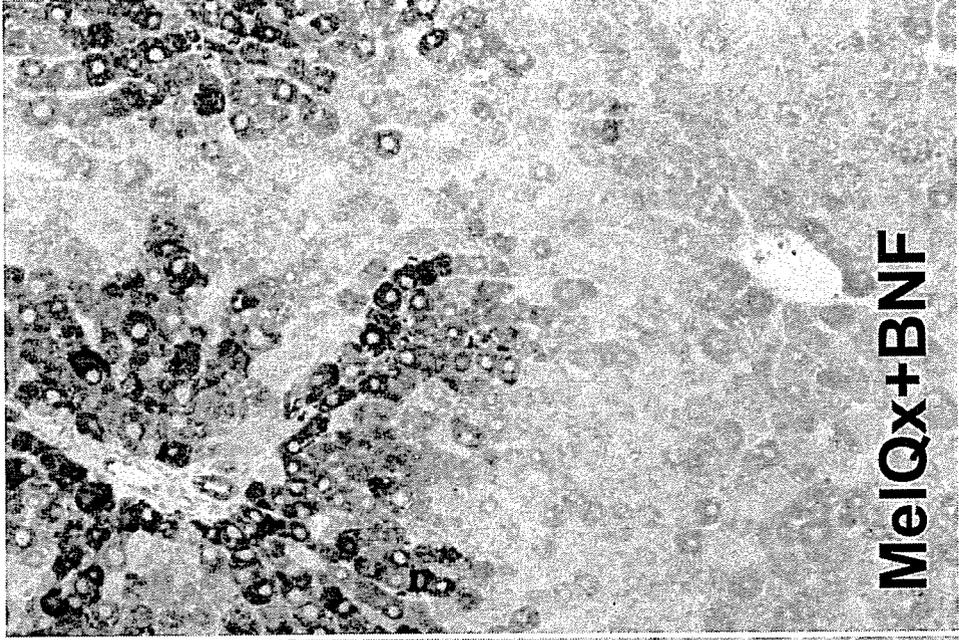
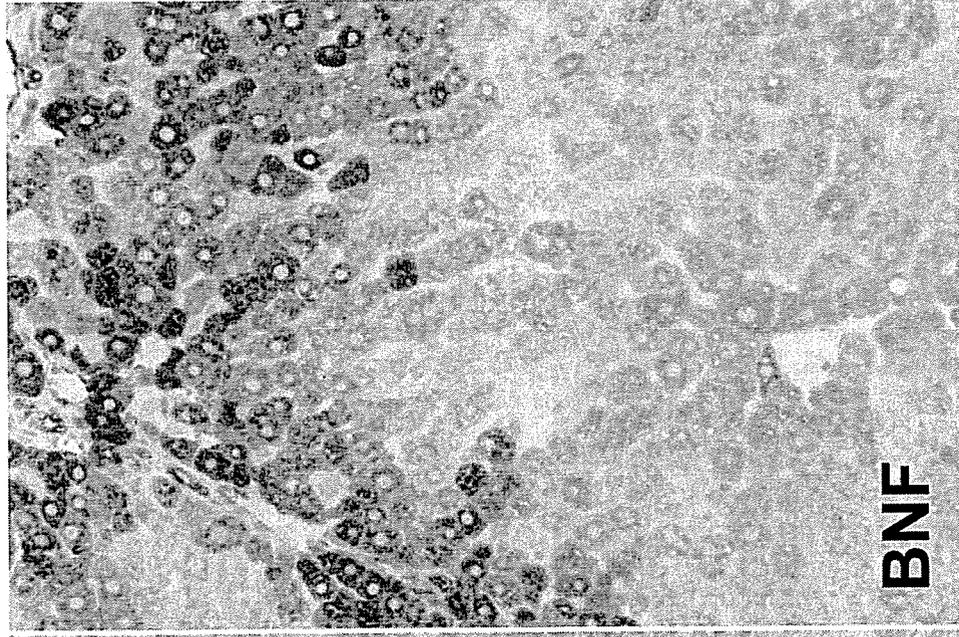
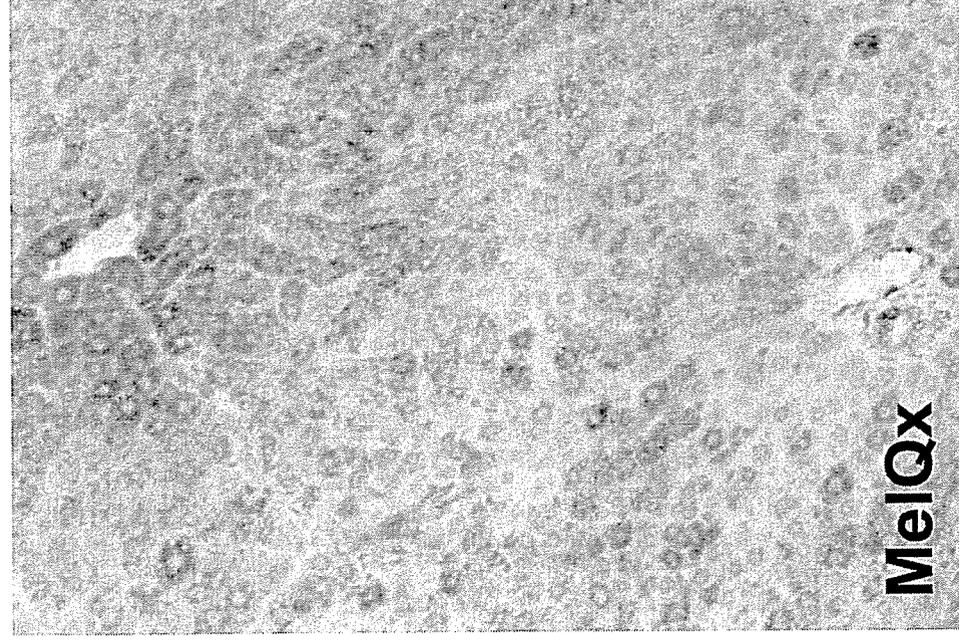
3. その他

該当なし



MeIQx単独群では、小葉中心性(zone 3)に染色濃度が高かった。
ANFでは、グリソン鞘周囲(zone 1)に染色濃度が高かった。
MeIQx+ANF複合投与では、ANF優位な染色性を示した。

図1. α -NF投与によるCYP1A1/2 発現のZone特異性



MeIQx単独群では、小葉中心性(zone 3)に染色濃度が高かった。
BNFでは、グリソン鞘周囲(zone 1)に染色濃度が高かった。
MeIQx+BNF複合投与では、BNF優位な染色性を示した。

図2. β -BNF投与した肝のCYP1A1/2 発現とZone特異性

**Quantitative analysis of
GST-P positive foci**

**CYP1A1/2
expression**

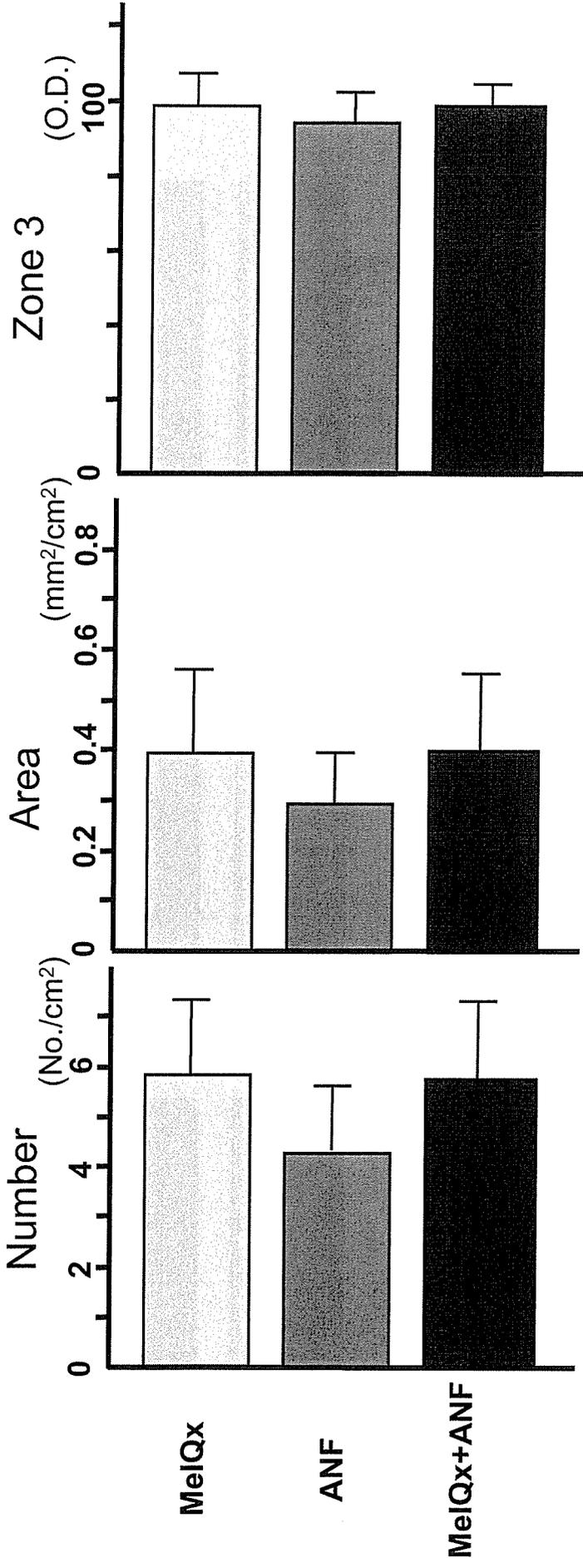


図3. α -NF投与した肝のZone 3におけるGST-P 細胞巢の出現とCYPの発現との関係

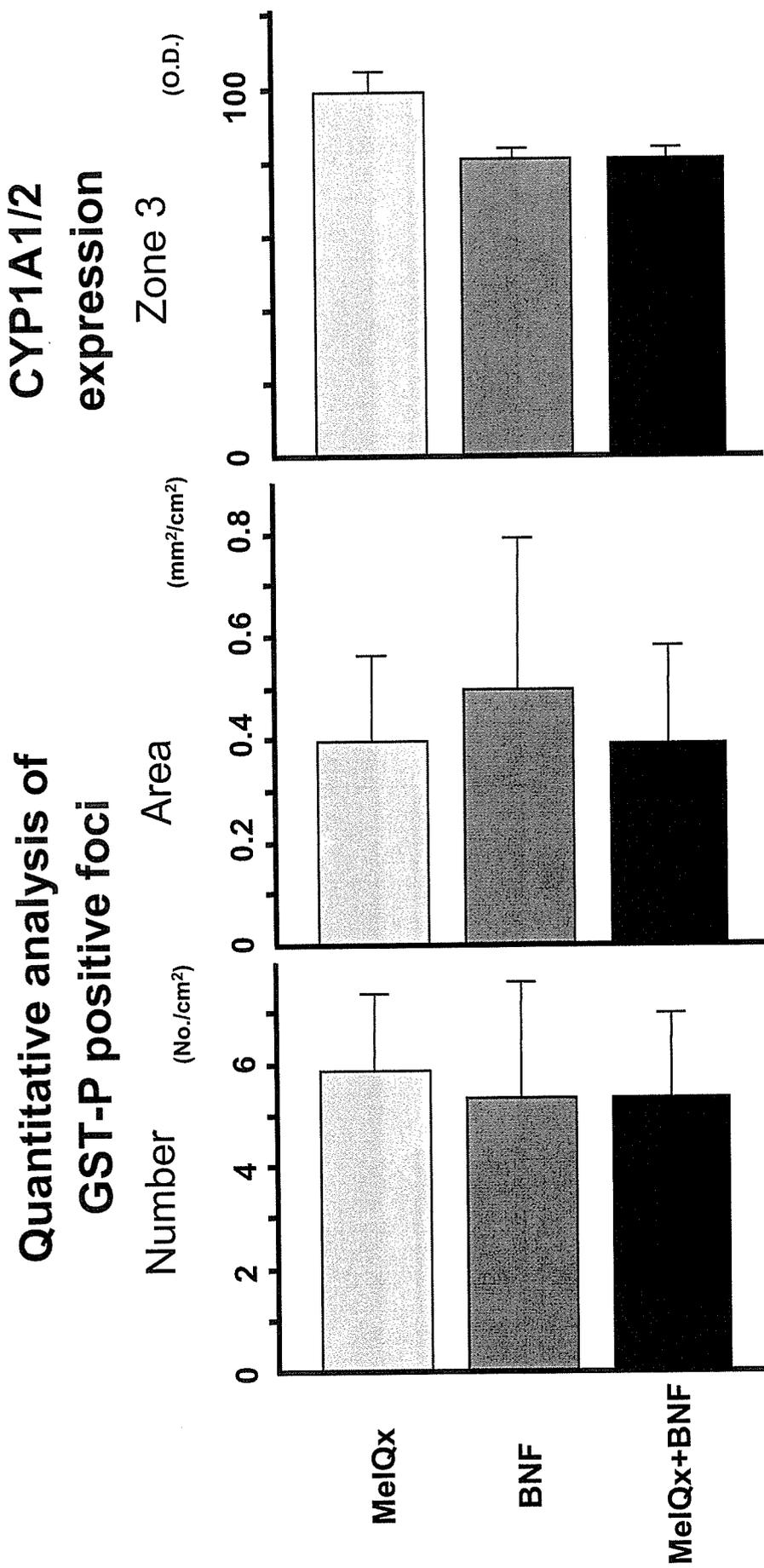


図4. β -NF投与した肝のZone 3におけるGST-P細胞巢の出現とCYPの発現との関係