

200734040A

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

動物用医薬品等に関する畜水産食品の安全性確保に係る研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三森 国敏

平成20（2008）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
動物用医薬品等に関する畜水産食品の安全性確保に係る研究 三森 国敏	----- 1
II. 分担研究報告	
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 三森 国敏	----- 10
2. DNAメチル化を指標とした発がん関連遺伝子の網羅的解析 渋谷 淳	----- 27
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 梅村 隆志	----- 35
4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 九郎丸 正道	----- 39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 44
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 45

動物用医薬品等に関する畜水産食品の安全性確保に係る研究

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安全性評価における重要なデータを提供すること、DNAメチル化を指標とした *in vivo* 短期肝発がん指標遺伝子を探索すること、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を確立し牛の脊柱という資源の活用をはかることを目的として以下の研究を行った。

動物用駆虫薬のオクスフェンダゾール(OX)については、その発がん機序への酸化ストレスの関与を明らかにするため、ラット肝二段階発がんモデルを用いてOXを0ないし0.05%の濃度で6週間投与した。その結果、前がん病変である glutathione *S*-transferase, placental form(GST-P)陽性細胞巢の増加、細胞増殖活性の上昇とともに酸化損傷マーカーに有意な増加が認められた。OXの発がん機序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示唆された。OXについては、同モデルを用いた10週間投与実験における抗酸化剤メラトニンの修飾作用を検討中である。また、昆虫成長調節剤のジサイクラニル(DC)については、マウス肝二段階発がんモデルを用いたDCの発がんプロモーション作用に酸化ストレスが関与するか否かを確認するため、抗酸化剤羅漢果抽出物(SGE)を併用投与した。その結果、DC投与群と比較し、SGE投与群で、前癌病変マーカーである gamma-glutamyltransferase (GGT)陽性細胞率の減少、脂質過酸化のマーカーであるチオバルビタール酸反応物(TBARS)レベルの減少、加えて *Cyp1a1* mRNA 発現の低下が認められた。更に *Cyp1a1* の誘導に関与する Ahr 活性化が SGE 投与により抑制されるか否かを明らかにするため、Ahr 高感受性 C57BL/6J マウスと低感受性 DBA/2J マウスを用いた短期の実験を行ったところ、DC 投与により発現上昇した *Cyp1a1* が Ahr 高親和性マウスの SGE 投与群では減少したのに対し、Ahr 低親和性マウスでは差は認められなかった。以上より、DC の *Cyp1a1* に起因した ROS 産生が SGE 投与により抑制され、更には前癌病変の形成が抑制されたことには、SGE の Ahr 活性化の抑制が関与している可能性が推察された。DC については、同モデルを用いた発がんプロモーション作用の閾値を検索中である。更に、DC が引き起こす酸化ストレスに対する生体防御機構に転写因子 Nrf2 の関与の可能性を探る目的で、DC を 13 週間、0.075 あるいは 0.15% の濃度で雌の Nrf2 欠損マウスに混餌投与した。その結果、何れの投与群においても肝 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)レベルの有意な上昇が認められたが、その程度は Nrf2 蛋白量依存的であり、DC 誘発の酸化ストレスに対する生体内防御機構に Nrf2 の関与が示唆された。一方、glutathione(GSH)量および glutamate-cysteine ligase(GCL)活性は DC 投与により上昇したが、遺伝子型間で差異は認められず、Nrf2 欠損マウスが示した高感受性の原因にはその他の Nrf2 関連酵素の関与が考えられた。

DNAメチル化を指標とした *in vivo* 短期肝発がん指標遺伝子の探索を目的として、CpGアイランド(CGI)マイクロアレイを用いて、代表的な非発がん性肝毒物質である acetaminophen (APAP)、非遺伝毒性肝発がん物質である phenobarbital (PB)、遺伝毒性肝発がん物質である 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)によるマウス肝発がんプロモーション過程でのゲノムのメチル化プロファイルの網羅的解析を行った。B6C3F1 マウスに DEN (90 mg/kg, i.p.) によるイニシエーション処置を施し、その2週

後から APAP (10,000 ppm)、PB (500 ppm) 及び IQ (100, 300 ppm) を各々混餌投与し、投与 8 及び 16 週間後の肝臓での DNA メチル化のプロファイルを CGI アレイにより検討した。なお、PB と IQ については 24 週間投与を継続し、肝変異細胞巢数を測定した。PB と IQ 群の肝変異細胞巢数は、DEN 単独群と比較していずれも増加したので、PB は 500 ppm、IQ は 100 ppm 投与群のメチル化プロファイルを APAP 群及び DEN 単独群と比較した。8 週目では APAP 群と PB、IQ 群を区別しえるグローバルなメチル化変動パターンは明らかではなかった。一方、16 週目では APAP 群と PB ないし IQ 群との間でメチル化パターンに明らかに差のある CGI 群を認め、APAP でメチル化が変動しない、もしくは減少した CGI のうち、PB と IQ で増加したものが 39 個認められた。その中には、がん抑制遺伝子 *peg3* や細胞増殖抑制に関与する *WDR6* 遺伝子上流に位置するものがみられた。以上より、今回プロモーション時期での 16 週間に及ぶ投与により、肝発がん物質と非発がん物質でメチル化パターンに分離の生じる CGI 群の出現する可能性が見出された。

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、その完全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。今年度の調査結果では、平均して全背根神経節の 88% の除去がと畜場で可能となっているが、100% の除去は現時点の技術では依然として困難であるといわざるを得ない。と畜場での背根神経節の完全除去を達成するためには、今後さらなる技術の改良が必要である。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
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 准教授

分担研究者 梅村 隆志
国立医薬品食品衛生研究所 病理部
室長

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にある。

駆虫薬として牛、豚、羊等の産業動物に用いられるオクスフェンダゾール (OX) や昆虫成長調節剤として羊に用いられるジサイクラニル (DC) は、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。申請者のこれまでの研究では、OX を反復投与したラット肝臓におけるマイクロアレイ解析から、代謝・酸化的ストレスに関連し

た遺伝子群の発現変動が確認されており、その肝発がん機序における酸化ストレスの関与が示唆されている。DC については、マウス肝発がん機序解析実験により、その肝発がん機序の一部に酸化ストレスを介した二次的 DNA 損傷が関与する可能性を明らかにしてきているが、詳細は明らかになっておらず、また、DC 誘発酸化ストレスに対する生体防御機構も不明である。

また、最近、マイクロアレイ法を利用したメチル化 CpG アイランド(CGI)の網羅的解析が可能となり、これによりヒトのがんの進展に重要な役割を果たすがん抑制遺伝子が多数見出されてきている。網羅的解析手法を利用することによりクラスター分類が可能となるため、化学物質を動物に投与した時の標的臓器における各種の生物作用の予測に利用できる可能性がでてきた。発がんに向かう分子制御機構の破綻に関して、エピジェネティックなサイレンシングの役割を明らかにし、その網羅的パターンから発がん物質の分類が可能となれば、*in vivo* 突然変異評価系と組み合わせ、機能遺伝子の突然変異/サイレンシングを基盤とした化学物質発がんのリスク評価上の新たな重み付けが可能となる。

本年度、OX については、肝発がん機序における酸化ストレス及び酸化 DNA 損傷の関与について検索した。DC については、肝発がん機序における酸化ストレスの関与を検討するため抗酸化剤である羅漢果抽出物(SGE)の併用投与実験を、また DC 発がんプロモーション作用の閾値を検索した。更に、DC 誘発酸化ストレスに対する生体防御機構に転写因子 Nrf2 が関与するか否かを検索した。

メチル化 DNA の網羅的解析については、マウスを用いて、代表的な遺伝毒性及び非遺伝毒性肝発がん物質による発がんプロモーション過程における DNA メチル化のプロファイルを CGI マイクロアレイにより網羅的に検索した。非発がん物質投与例でのメチル化変動遺伝子のプロファイルとの比較により、発がん物質特異的なメチ

ル化遺伝子のクラスターを分類した。

牛の背根(脊髄)神経節が BSE の特定危険部位に指定されて以来、背根神経節が脊柱内にあり、その脊柱からの分離が困難なことから、本来安全な脊柱も同時に廃棄されているのが現状である。本研究では、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を確立し、牛の脊柱という資源の活用をはかることを目的としている。と畜場において脊髄除去後に脊柱に残る硬膜と付随する脊髄神経を、背根神経節ができるだけ脊柱に残らないようにナイフで引き剥がしたものから、背根神経節がどの程度硬膜に残存しているかを計測することによって、脊柱から背根神経節がどの程度除去されているか(除去率)を調べた。さらに、品種別、牝牝別、及び月齢別の除去率について比較し、除去率に差があるか否かについて検討を加えた。

B. 研究方法

OX の肝発がん機序における酸化ストレスの検索については、二段階発がんモデルを用い、diethylnitrosamine (DEN) によるイニシエーション処置を施した6週齢の雄性 F344 ラットに、処置2週間後から6週間、0 ないし 0.05% の OX を混餌投与し、さらに OX 投与1週間後には 2/3 部分肝切除を施して肝前がん病変を作出した。得られた肝組織について病理組織学的検索、代謝・酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現解析、肝ミクロソームにおける活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)産生量並びに酸化損傷マーカーの測定を行い、OX の発がん過程における酸化ストレスの関与について評価を行った。更に、ラット肝二段階発がんモデルを用い、OX を 0 ないし 0.05% の濃度で 10 週間混餌投与を行うと共に、メラトニンの同時飲水投与を行った。現在、解析中である。

また DC については、マウス肝二段階発がんモデルを用い、DC を 0 ないし 0.15 % の濃度で 9 週間混餌投与、SGE を 0.25 % の濃度で投与 2 週間前より計 11 週間飲水

投与を行った。得られた肝臓について、*gamma*-glutamyltransferase(GGT) 免疫組織化学的染色、過酸化脂質レベルの測定、代謝・酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現解析を行った。更に、Aryl hydrocarbon receptor(Ahr) 高感受性 C57BL/6J マウス 或いは低感受性 DBA/2J マウスに DC を 2 週間投与した際の肝 *Cyp1a1* mRNA 発現量を測定した。現在、同モデルを用いた発がんプロモーション作用の閾値を検索中である。

また、雌 6 週令の Nrf2 ホモ欠損、ヘテロ欠損、その同腹の野生型マウスそれぞれ各群 5 匹に、DC を 0、0.075、0.15 % の濃度に混じた飼料を 13 週間自由に摂取させ、発がん標的臓器の肝臓について、酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG レベル、GSH 量ならびに GSH 合成の律速酵素でその発現が Nrf2 に制御されている GCL 活性レベルを検索した。

メチル化 DNA の網羅的解析では、DNA メチル化を指標とした *in vivo* 短期肝発がん指標遺伝子の探索を目的として、CGI マイクロアレイを用いて、代表的な非発がん性肝毒性物質である acetaminophen (APAP)、非遺伝毒性肝発がん物質である phenobarbital (PB)、遺伝毒性肝発がん物質である 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) によるマウス肝発がんプロモーション過程でのゲノムのメチル化プロファイルの網羅的解析を行った。5 週齢の雄性 B6C3F1 マウスに DEN の 90 mg/kg を腹腔内投与してイニシエーション処置を施した。2 週間後、APAP 10,000 ppm、PB 500 ppm 及び IQ 100、300 ppm を 8 及び 16 週間暴露し、各群 5 匹解剖した。また投与 24 週目では、全生存動物をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取した。得られた肝臓を用いて、病理組織学的検査、mRNA 発現解析を行った。ゲノムのメチル化プロファイル解析については、投与 24 週目の肝変異細胞数のカウント結果から、変異細胞数の上昇がみられた DEN + PB 500 ppm、DEN + IQ 100 ppm

及び 300 ppm 群について、プロモーション時期 (8 及び 16 週) での DNA メチル化変動プロファイルを CGI マイクロアレイにより求め、それぞれ APAP 10,000 ppm 群及び DEN 単独群と比較した。

牛の脊柱からの背根神経節の除去については、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の、脊柱からの除去率を調べた。硬膜周辺から脂肪を取り除いて、付随する背根神経節を明らかにし、頸椎部(C)、胸椎部(T)、腰椎部(L)、及び仙骨部(S)について、脊柱からの除去率を算出した。算出に用いた牛の硬膜は 2007 年 3 月から 2008 年 2 月までの計 270 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、背根神経節の大部分が付随しているものを 2/3、背根神経節の半分程度が付随しているものを 1/2、背根神経節の一部が付随しているものを 1/3、背根神経節が全く付随していないものを 0 として合計し、C1 から S5 までの背根神経節の数 32(枝肉当たり : 半頭分)に対する割合を求めた。また、同時に、牛の品種別、牝牡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

OX のラット肝二段階発がんモデルを用いた実験では、病理組織学的検査において、軽度の肝細胞肥大及び肝細胞空胞変性が認められた。また、ラット肝前がん病変マーカーである glutathione S-transferase, placental form (GST-P) 陽性巢の数・面積とともに、細胞増殖活性について DEN 単独群と比較して有意な増加が認められた。代謝・酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現は、第 I 相薬物代謝酵素である *Cyp1a1*、*Cyp1a2* に加え、解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Gpx2*、*Nqo1*、*Yc2*、*Afar*、*Gstm1*、*Me1* の発現に有意な増加が認められた。さらに OX 投与肝組織では、酸化 DNA 損傷 (8-OHdG) ・脂質過酸化 (TBARS) レベル並びに単離肝ミクロソーム分画における ROS 産生量にそれぞれ有意な増加が観察された。OX のラット肝二段階発がんモデル用いた発がんプロモーション作用に対する抗酸化剤メラトニンの効果に関する実験については、現在、解析中である。

DC のマウス肝二段階発がんモデルを用いた抗酸化剤羅漢果抽出物 (SGE) 併用投与実験では、病理組織学的検査において、空胞化を伴う小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞変性巢や単細胞壊死像が DC 群及び SGE 併用群で認められた。また、マウス前がん病変マーカーである GGT に対する陽性細胞率は DC 群と比較し、SGE 併用群で有意な減少が認められたが、PCNA 陽性細胞率については差は認められなかった。一方、過酸化脂質の指標である TBARS レベルは、SGE 併用群で有意に減少した。Real time RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析では、第 I 相解毒酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2a5*、第 II 相解毒酵素である *Gst μ 2*、酸化ストレス誘導蛋白である *HO-1*、抗酸化酵素である *Gpx2* が、DC 群に比し、SGE 併用群で有意に減少した。更に、追加実験では、*Cyp1a1* 発現量が、C57BL/6J マウスでは、DC 群に比し SGE 併用群で有意に減少したのに対し、DBA/2J マウスでは DC 群と SGE 併用群の間に差は認められなかった。

Nrf2 欠損マウスを用いた実験では、何れの遺伝子型の DC 投与群においても体重減少が認められ、統計学的にはホモ欠損ならびに野生型マウスで有意な減少となった。また、肝比重量は用量相関性に増加し、何れの投与群においてもそれぞれの対照群に比して有意な変化となったが、遺伝子型間に差異は認められなかった。酸化 DNA 損傷の指標である肝 DNA 中の 8-OHdG レベルは何れの遺伝子型においても、DC 投与量依存的に上昇し、最高用量において有意の高値となった。また、対照群も含めた全ての群で Nrf2 蛋白量依存的に 8-OHdG 量は増加し、特にホモ欠損マウスの投与群の値は野生型の各投与群と比較して有意に高い値となった。GSH ならびに GCL の測定は野生型とホモ欠損マウスについて実施した。GSH レベルは両遺伝子型の高用量群で有意な増加が観察されたが、遺伝子型間では差異は認められなかった。GCL 活性についても DC 投与群で上昇が認められ、ホモ欠損の高用量群で有意な高値となったが、その傾向に遺伝子型間で差異は認められなかった。

メチル化 DNA の網羅的解析に関する研究では、投与 24 週目の肝臓の病理組織学的検査において、DEN + PB 500 ppm 群で肝細胞の変異増殖巣及び腺腫の数の増加が認められ、また IQ は用量依存的に、変異増殖巣の数が増加した。次に、投与 8 週目の CGI マイクロアレイによる DNA メチル化を検討した結果、DEN + APAP 群と DEN + PB、DEN + IQ 群を区別しうるグローバルなメチル化の変動パターンは明らかではなかった。一方、投与 16 週目では、DEN 単独群と比較して、APAP 群の DNA メチル化が変動しない、もしくは減少した CGI が 657 個認められた。逆に、PB と IQ で DEN 単独群と比較して DNA メチル化が 1.5 倍以上増加した CGI はそれぞれ 145 と 130 個認められた。これらのうち、DEN 単独群と比較してシグナル強度が APAP 投与により変動しないか減少し、PB と IQ に共通して増加を示した CGI は 39 個であった。これらの CGI の下流に位

置する遺伝子について、発がんとの関連での報告の有無について文献検索したところ、がん抑制遺伝子 *paternally expressed 3 (peg3)* や細胞増殖抑制に關与する *WD repeat domain 6 (WDR6)* 遺伝子が見出された。

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、2007年3月から2008年2月の間で平均88%であった。また、第11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(77%)を示した。上記の7部位を除いた残りの25部位は90%以上の除去率を示した。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

OXのラット肝二段階発がんモデルを用いた実験では、GST-P陽性巢の数・面積とともに細胞増殖活性指標であるPCNA陽性細胞数の増加が認められ、当概濃度におけるOXの肝発がんプロモーション作用が確認された。また、OX投与により薬物代謝第I相酵素である*Cyp1a1*のmRNA・蛋白発現の増加が認められ、さらにOXを投与した肝臓から単離したミクロソームではROS産生量の亢進が確認された。これらの結果から、OX投与肝ではCYP1A1誘導とともにその代謝過程において過剰なROS産生が惹起されていることが示唆された。同時に、薬物代謝第二相系酵素を中心とした解毒・抗酸化能に關する機能遺伝子である*Gpx2*、*Nqo1*、*Yc2*、*Afar*、*Gstm1*、*Me1*のmRNA発現増加が観察された。これらの遺伝子は、酸化的ストレスより活性化される転写因子Nrf2によって発現誘導されることが知られており、OX投与群ではその代謝過程において産生された過剰なROSあるいは親電子物質の解毒・消去のための防御系が作動していることが推察された。さらに、OX投与群の肝臓では酸化的DNA損傷(8-OHdG量)及び過酸化脂質量(TBARS)の有意な増加が認められ、ROS産生による酸化的ストレスの亢進が

生体分子に損傷を与えていることが示唆された。特に8-OHdGについては、遺伝子変異を介した発がんとの関連が報告されており、OXの肝発がん過程における酸化的DNA損傷の關与が示唆された。OXについては、同モデルを用いた10週間投与実験における抗酸化剤メラトニンの併用効果を検討中である。

DCのマウス肝二段階発がんモデルを用いた抗酸化剤羅漢果抽出物(SGE)併用投与実験では、DC投与により増加したGGT陽性細胞率やTBARSレベルが、SGE併用投与により有意に減少した。Real time RT-PCR解析により、SGE併用投与群の*Cyp1a1*の発現が有意に低下していたことから、*Cyp1a1*に起因したROS産生がSGE投与により抑制され、それに伴い、前がん病変の形成も抑制された可能性が推察された。その他の代謝・抗酸化關連遺伝子としては、薬物代謝第二相系酵素を中心とした解毒・抗酸化能に關する機能遺伝子である*Gpx2*、*Gst μ 2*、*HO-1*の各遺伝子のmRNA発現上昇がSGE投与により減少した。これらの遺伝子は、酸化的ストレスによって活性化される転写因子Nrf2により発現誘導されることが知られている遺伝子群であることから、SGE投与群ではその代謝過程において産生された*Cyp1a1*を介した過剰なROSあるいは親電子物質が減少することにより、防御系因子の機能も低下しているものと推察された。この結果に基づき、*Cyp1a1*の誘導に關与するAhr活性化がSGE投与により抑制されるか否かを明らかにするため、Ahr高親和性のC57BL/6Jマウスと低親和性のDBA/2Jマウスを用いた短期の実験を行った。その結果、*Cyp1a1*発現量がC57BL/6Jマウスでは、SGE併用群がDC群に比べて有意に減少したのに対し、DBA/2JマウスではDC群とSGE併用群との間に差が認められなかったことから、SGEの*Cyp1a1*抑制作用機序は、*Cyp1a1*の発現を調節するAhrの活性化を抑制することによって生じる可能性が示唆された。以上の結果から、DCの肝発がん過程では、その代謝過程に

生じる活性酸素種産が関与し、その要因としてAhrの活性化に伴うCyp1a1の発現上昇が関与していることが示唆された。抗酸化剤であるSGEはAhrの作用を抑制することにより、Cyp1a1の発現を抑制し、DCの肝発がんプロモーション作用を抑制している可能性が示唆された。DCについては、同モデルを用いた発がんプロモーション作用の閾値を検索中である。

Nrf2欠損マウスを用いた実験では、何れの投与群においても肝DNA中の8-OHdGレベルの有意な上昇が認められたが、その程度はNrf2蛋白量依存的であり、DCが引き起こす酸化ストレスに対する生体内防御機構にNrf2の関与が示唆された。一方、Nrf2の制御を受けているGCL、その触媒により生成されるGSH量はDC投与により増加したが、遺伝子型間で差異は認められなかった。従って、Nrf2欠損マウスで認められたDC誘発の酸化ストレスに対する高感受性の原因にはその他のNrf2関連酵素群の関与が考えられた。

メチル化DNAの網羅的解析に関する研究では、8週間のプロモーションでは、肝発がん物質に特異的な変動パターンを示すCGIを見出せなかったが、16週間では非発がん物質のAPAPと分離して発がん物質であるPB及びIQでメチル化の増加したCGIを39個見出した。この選出された39CGIのなかには、プロアポプトティックな制御分子であるBAXのミトコンドリアへのトランスロケーションを制御する*peg3*の上流に位置するものがあり、その高メチル化が認められた。この遺伝子は、がん抑制遺伝子として知られており、ヒトやマウスの腫瘍において高メチル化の状態であることがすでに報告されている。同様に高メチル化が見出されたGGIの下流に位置するWDR6は、セリン/スレオニンキナーゼLBK1と共発現をして、細胞周期のG1期の停止に関与する遺伝子としてすでに報告されている。今後は、これら選出された39CGIについて、メチル化変動の検証をメチル化特異的PCR等により行い、発現調節を受けると考えられる遺伝子の

転写レベルをreal-time PCRにより検討すると共に、免疫染色による解析が可能なものについては、変異細胞巢での発現との関与について検討を加える予定である。

背根神経節の脊柱からの除去率について、2007年3月から2008年2月までの試料について、背根神経節の除去率を調べたところ平均88%であり、除去率はわずかではあるが向上したが、除去率の極端に低い第4腰神経-第3仙骨神経、及び第11胸神経の除去率が向上しない限り、完全除去達成は困難であるものと考えられた。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、現在までのところ、除去率はその状況には達していない。今後、さらなる技術改良が必要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Matsumoto, S., Takahashi, M., Jin, M., Mitsumori, K.: Gene expression analysis of the liver in rats treated with oxfendazole. Arch. Toxicol. 81: 647-654, 2007

Umemura, T., Kuroiwa, Y., Tasaki, M., Okamura, T., Ishii, Y., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Nishikawa, A., and Hirose, M.: Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and in vivo mutagenicity induced by dicyclanil, a nongenotoxic carcinogen, using gpt delta mice. Mutat. Res.. 63:46-54. 2007.

Takahashi M., Shibutani M., Woo G-H., Inoue K., Fujimoto H., Igarashi K., Kanno J., Hirose M., Nishikawa A. Cellular distributions of molecules with altered expression specific to the early stage of tumor promotion in a rat

two-stage hepatocarcinogenesis model.
Carcinogenesis (submitted).

2. 学会発表

出羽康明、西村次平、六車雅子、松本明、高橋美和、金美蘭、三森国敏：Oxfendazoleのラット肝発がんメカニズムに関する研究：予備的検討、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

出羽康明、西村次平、六車雅子、金美蘭、三枝由紀恵、高島正義、松本明、安野弘修、田崎雅子、岡村俊也、梅村隆志、三森国敏：ラット肝二段階発がんモデルを用いたOxfendazoleの肝発がん促進作用における酸化ストレスの関与について、第34回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2007年6月

出羽康明、西村次平、六車雅子、金美蘭、三枝由紀恵、川合正臣、田崎雅子、岡村俊也、梅村隆志、渋谷淳、三森国敏：酵素誘導を示すラット非遺伝毒性肝発癌物質の発癌機序における酸化ストレスの関与について、第22回発癌病理研究会、箱根、2007年8月

出羽康明、西村次平、六車雅子、金美蘭、三枝由紀恵、田崎雅子、岡村俊也、梅村隆志、三森国敏：Oxfendazoleのラット肝発がんメカニズムにおける酸化ストレスの関与について、第140回日本獣医学会学術集会、札幌、2007年9月

Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Saegusa, Y., Yokouchi, Y., Kenmochi, Y., Kono, T., Yasuno, H., Matsumoto, S., Takabatake, M., Tasaki, M., Umemura, T., Mitsumori, M.: Involvement of oxidative stress in AhR-dependent and independent CYP1A inducers induced tumor promotion in a rat hepatocarcinogenesis model. 44th Congress of the European Societies of Toxicology. Amsterdam, September, 2007

松本明、金美蘭、出羽康明、西村次平、本光喜、村田雄二、渋谷淳、三森国敏：Dicyclanilの Maus 肝発がんに対する羅漢果抽出物の抑制作用について、第140回日本獣医学会学術集会、札幌、2007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：Maus 肝発がん剤 dicyclanil による in vivo 変異原性誘発への酸化 DNA 損傷および修復酵素の関与について、東京、第23回日本毒性病理学会、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.

渋谷 淳：組織部位特異的な発現解析手法を利用した腫瘍形質のプロファイリング。シンポジウム II：毒性病理学における網羅的解析の展開。第23回日本毒性病理学会学術集会、東京、第23回日本毒性病理学会、2007年1月

禹 麻美、渋谷 淳、高橋美和、井上 薫、禹 桂炯、掛谷知志、富士本仁、広瀬雅雄：Maus に対する肝発がん物質の28日間投与に反応する DNA メチル化プロファイルの網羅的解析（続報）。第23回日本毒性病理学会学術集会、東京、第23回日本毒性病理学会、2007年1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、第23回日本毒性病理学会、2007年1月

渋谷 淳、井上 薫、禹 桂炯、高橋美和、

広瀬雅雄：マイクロアレイ法を基盤とした発がん過程に寄与する分子の探索. 日本獣医病理学会シンポジウム. 形態学から分子病理学への展開. 第 143 回日本獣医学会総会, つくば, 第 143 回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 2007 年 4 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

動物用医薬品等に関する畜水産食品の安全性確保に係る研究

—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

OX のラット肝二段階発がんモデルを用いた実験：動物用医薬品オクスフェンダゾール(OX)の発がんメカニズム解明の一環として、OXの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。ラット肝二段階発がんモデルを用い、OXを0ないし0.05%の濃度で6週間混餌投与を行なった肝臓について解析を行った結果、以下の知見を得た。即ち、OX投与によりラット肝前がん病変マーカーである glutathione *S*-transferase, placental form(GST-P)陽性巢の数・面積の増加とともに、細胞増殖活性(PCNA 陽性細胞数)の亢進が確認された。さらに、代謝・酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現、酸化 DNA 損傷(8-hydroxydeoxy-guanosine ; 8-OHdG)・脂質過酸化(TBARS)レベルについても有意な増加が認められるとともに、単離肝ミクロソーム由来の活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)産生量の亢進が観察された。以上の結果から、OXによるラット肝発がん過程では、その代謝過程で生じると考えられる ROS に伴う酸化ストレスが亢進しており、その一部は、二次的な酸化 DNA 損傷に関与する可能性が示唆された。

OX のラット肝二段階発がんモデル用いた発がんプロモーション作用に対する抗酸化剤メラトニンの効果に関する実験：OXの発がん過程における酸化ストレスの関与を明らかにするため、抗酸化剤であるメラトニンの修飾作用を検討した。ラット肝二段階発がんモデルを用い、OXを0ないし0.05%の濃度で10週間混餌投与を行うと共に、メラトニンの同時飲水投与を行った。現在、解析中である。

DC のマウス肝二段階発がんモデルを用いた抗酸化剤羅漢果抽出物(SGE)併用投与実験：昆虫成長制御剤のジサイクラニル(DC)の肝発がんプロモーション機序における酸化ストレスの関与を明らかにするため、抗酸化剤である羅漢果抽出物(SGE)の修飾作用を検討した。マウス肝二段階発がんモデルを用い、DCを0ないし0.15%の濃度で9週間混餌投与、SGEをDC投与2週間前より計11週間飲水投与を行った。SGE投与により、GGT 陽性細胞率、TBARS レベルは有意に減少した。遺伝子発現解析では、第I相解毒酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2a5*、第II相解毒酵素である *Gst μ 2*、酸化ストレス誘導蛋白である *HO-1*、抗酸化酵素である *Gpx2*がSGE投与により有意に減少した。以上のことから、SGEは *Cyp1a1*の発現・誘導を抑制することで、代謝過程の活性酸素種の発生を抑制する可能性が示唆された。また追加実験では、Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) 高感受性の C57BL/6J マウスにDCを2週間投与した際の肝 *Cyp1a1*の mRNA 発現量が、SGE投与により有意に減少したのに対し、Ahr 低感受性 DBA/2J マウスでは影響が認められなかった。以上のことから、SGEはAhrの作用を抑制することにより、*Cyp1a1*の誘導を抑制する可能性が示唆された。SGEはDCの肝発がんプロモーション作用に対し、Ahrの抑制を介して、*Cyp1a1*の作用を減弱させている可能性が示唆された。

DC のマウス肝二段階発がんプロモーション作用の閾値の検索に関する実験：DCの肝発がんプロモーション作用の閾値を検索するため、マウス肝二段階発がんモデルを用い、DCを0ないし0.01875、0.0375、0.075%の濃度で10週間混餌投与を行なった。現在、解析中である。

A. 研究目的

駆虫薬として牛、豚、羊等の産業動物に用いられるオクスフェンダゾール(OX)や昆虫成長調節剤として羊に用いられるジサイクラニル(DC)は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。これまでの研究から、OXを反復投与したラット肝臓において、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析から代謝解毒・酸化ストレスに關与する遺伝子群の発現変動が確認されており、OXのラット肝発がん機序におけ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。さらに、DCのマウス肝発がん機序解析では、その肝発がん機序の一部に酸化ストレスを介した二次的 DNA 損傷が關与する可能性を明らかにしてきている。

そこで本年度は、OXとDCの肝発がん機序の更なる研究を進めるため、①ラット肝二段階発がんモデル用い、OXのラット肝発がん機序における酸化ストレスの關与の検証、②ラット肝二段階発がんモデル用いたOXの発がんプロモーション作用に対する抗酸化剤メラトニンの併用効果、③マウス肝二段階発がんモデル用いたDCの発がんプロモーション作用に対する抗酸化剤羅漢果抽出物(SGE)の効果、④DCのマウス肝二段階発がんプロモーション作用の閾値の検索に関する実験を行った。

B. 研究方法

OXのラット肝二段階発がんモデルを用いた実験：実験デザインを Fig. 1 に示す。5 週齡の雄性 F344 ラット(日本エスエルシー株式会社)にイニシエーターである diethylnitrosamine(DEN)の 200 mg/kg を腹腔内投与し、イニシエーション処置を施した。2 週間無処置で飼育後、OXの

0、0.05 ないし 0.1 %を 6 週間混餌投与するとともに、OXの投与開始 1 週間後には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た。投与終了後、全生存動物(DEN 単独群：9 匹、OXの0.05%投与群 6 匹、OXの0.1%投与群については、部分肝切除 1 週間後に全例が死亡したため、試験から除外した)をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取し、肝組織の一部を 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 RNAlater 中に浸漬させて mRNA 抽出用に、残りは液体窒素に凍結させ DNA、タンパク抽出用及び生化学的解析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。さらに、ラット肝前がん病変に陽性を示す glutathione S-transferase, placental form(GST-P)並びに細胞増殖活性マーカーである proliferating cell nuclear antigen(PCNA)の免疫組織化学染色による観察を実施した。

遺伝子発現解析は、各群 5 例ずつ抽出した mRNA について、酸化ストレス及び薬物代謝関連遺伝子の発現(補正は内部標準遺伝子である HPRT を用いて実施)をリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量解析した。また、肝 DNA については、HPLC-ECD 法により酸化 DNA 損傷指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)レベルを測定した。肝臓から抽出したタンパクについては、脂質過酸化レベルの指標であるチオバルビタール酸反応物質(TBARS)を測定するとともに、一部はミクロソーム分画まで単離した後、NADPH 依存性の活性酸素種(reactive

oxygen species ; ROS)産生能を測定するとともにチトクロム P450 (CYP) 1A1、2E1 の発現をウェスタンブロット法にて確認した。

OX のラット肝二段階発がんモデル用いた発がんプロモーション作用に対する抗酸化剤メラトニンの効果に関する実験：

実験デザインを Fig. 4 に示す。5 週齢の雄性 F344 ラットに DEN の 200 mg/kg を腹腔内投与し、イニシエーション処置を施した。2 週間無処置で飼育後、OX の 0 ないし 0.05 % を 10 週間混餌投与するとともに、OX の投与開始 1 週間後には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た。なお、抗酸化剤メラトニンは OX 投与開始時より 0.01% の濃度で飲水投与を行った。投与終了後、全生存動物(DEN 単独群：9 匹、OX 投与群 10 匹、メラトニン併用投与群 2 匹については、部分肝切除時或いは切除後 1 週間以内に死亡したため、試験から除外した)をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取し、肝組織の一部を 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、一部は液体窒素にて凍結させて mRNA、DNA、タンパク抽出用及び生化学的解析用にそれぞれ保存した。現在、動物実験が終了し、解析実施中である。

DC のマウス肝二段階発がんモデルを用いた抗酸化剤羅漢果抽出物(SGE)併用投与；実験①；実験デザインを Fig. 5 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 DEN の 30mg/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 0.15 % (DEN+DC 群) ないし 0 % (DEN alone 群) の DC を 9 週間混餌投与した。なお、DEN+DN+SGE 投与群については、DEN 処置 1 週間前から飲水を開始し、計 11 週間飲水投与を行った。投与終了後、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 4% パラホルムアルデヒド溶液で 24 時間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免疫組織化学的染色用に、一部(組織片)は液体窒素に凍結させ total RNA 抽出や生化学的検査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 1 例)より抽出した total RNA を用い、2 種類の cDNA マイクロアレイ(Mouse Stress and Toxicity Pathway Finder Gene Array, Mouse Drug Metabolism Gene Array: 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。更に、酸化ストレス関連遺伝子の転写制御に関わる分子を加えて、合計 8 遺伝子の mRNA 発現を、4 匹の動物(cDNA マイクロアレイに用いた動物を含む)より抽出した total RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR 法 (ABI Prism 7000, Applied Biosystems)により確認した。肝臓の生化学

学的標本については、脂質過酸化レベルの指標であるチオバルビタール酸反応物質(TBARS)を測定した。

実験②；実験デザインを Fig. 9A に示す。追加実験として、Aryl hydrocarbon receptor(Ahr)高親和性の 7 週齢の雄性 C57BL/6J マウスと低親和性の DBA/2J マウスを用いて、SGE の Ahr への作用を検討した。無処置群(各 3 匹)、DC 単独群(各 3 匹)、DC+SGE 群(各 4 匹)をそれぞれの系統で設け、0.15 %の DC を 2 週間混餌投与した。なお、DC+SGE 群については、0.25 %の SGE を DC 投与 1 週間前より飲水投与を開始し、計 3 週間投与した。得られた肝臓について real time RT-PCR にて *Cyp1a1* の定量解析を行った。

DC のマウス肝二段階発がんプロモーション作用の閾値の検索に関する実験：

実験デザインを Fig. 11 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 DEN の 30mg/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 0.075, 0.0375, 0.01875 ないし 0 %の DC を 10 週間混餌投与した。投与終了後、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 4%パラホルムアルデヒド溶液で 24 時間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免疫組織化学的染色用に、一部(組織片)は液体窒素に凍結させ total RNA 抽出や生化学的検査用にそれぞれ保存した。現在、動物実験が終了し、解析実施中である。

統計解析は、対照群と OX 投与群との

間で F 検定を行い、等分散の場合は Student *t* 検定を、不等分散の場合は Aspin-Welch *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

OX のラット肝二段階発がんモデルを用いた実験： 標的臓器である肝臓の病理組織学的検索では、軽度の肝細胞肥大及び肝細胞空胞変性が OX 投与群の全例で認められた。また、ラット肝前がん病変マーカーである GST-P 免疫組織化学的染色では、DEN 単独群と比較して OX 投与群において GST-P 陽性細胞巢の数・面積ともに有意な増加が認められた(Table 1)。

肝組織中の代謝及び酸化的ストレス関連遺伝子の mRNA 発現変動を解析した結果、OX 投与群において、薬物代謝第一相酵素である *Cyp1a1*、*Cyp1a2* 並びに解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Gpx2*、*Nqo1*、*Yc2*、*Afar*、*Gstm1*、*Me1* の発現に有意な増加が認められた(Fig. 2)。

肝組織から抽出した DNA 中 8-OHdG レベル、抽出タンパク中の脂質過酸化レベル(TBARS)ともに、OX 投与群において有意な上昇が認められた(Table 1)。また、単離した肝ミクロソーム分画では、酵素誘導に起因した CYP1A1 蛋白発現の増加が認められ、同時に ROS 産生量の増加が観察された。さらに、増加した ROS 産生

レベルは、P450 蛋白の阻害剤である SKF-525A の添加により著しく減少した (Fig. 3)。

OX のラット肝二段階発がんモデル用いた発がんプロモーション作用に対する抗酸化剤メラトニンの効果に関する実験：現在、解析中である。

DC のマウス肝二段階発がんモデルを用いた抗酸化剤羅漢果抽出物(SGE)併用投与実験実験①；標的臓器である肝臓の病理組織学的検索では、空胞化を伴う小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞変性巣や単細胞壊死像が DEN+DC 群及び DEN+DC+SGE 群で認められた。また、マウス前がん病変マーカーである GGT に対する陽性細胞率は DEN+DC 群と比較し、DEN+DC+SGE 群で有意な減少が認められたが、PCNA 陽性細胞率については差は認められなかった (Fig. 6&7)。一方、過酸化脂質の指標である TBARS レベルについては、DEN+DC 群と比較し、DEN+DC+SGE 群で有意な減少が認められた (Fig. 9)。

網羅的遺伝子発現解析の結果、Mouse Stress and Toxicity Pathway Finder Gene Array では 19/96 遺伝子が、Mouse Drug Metabolism Gene Array では 22/96 遺伝子が、DEN+DC 群(1匹)と比較し、DEN+DC+SGE 群(1匹)で発現減少が認められた。

Real time RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析では、第 I 相解毒酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2a5*、第 II 相解毒酵素である *Gst μ 2*、酸化ストレス誘導蛋白である HO-1、抗酸化酵素である *Gpx2* が、DEN+DC 群と比較し、DEN+DC+SGE 群で有意に減少した (Fig. 8)。

実験②；SGE 投与により、*Cyp1a1* 発現

量が C57BL/6J マウスでは、DC+SGE 群は DC 単独群に比べて有意に減少したのに対し、DBA/2J マウスでは DC 単独群と DC+SGE 群間における差は認められなかった (Fig. 10B)。

DC のマウス肝二段階発がんプロモーション作用の閾値の検索に関する実験：現在、解析中である。

D. 考察

OX のラット肝二段階発がんモデルを用いた実験：OX 投与群では、GST-P 陽性巣の数・面積ともに DEN 単独投与群と比較して有意な増加が確認された。また、細胞増殖活性マーカーの一つである PCNA 陽性細胞数においても有意な増加が認められ、当概濃度における OX の肝発がんプロモーション作用が確認された。

リアルタイム RT-PCR 法を用いて異物代謝・抗酸化関連遺伝子の mRNA 発現を解析した結果、OX 投与により *Cyp1a1*、*Cyp1a2* 遺伝子の有意な発現増加が確認された。CYP1A 分子種の発現誘導は酸化的ストレスの誘発に関与することが知られており、TCDD や PCB といった代表的な CYP1A 誘導剤では、それらの代謝過程において ROS が過剰産生されると考えられている。そこで、単離肝ミクロソームを用いて、NADPH 依存的な ROS 産生能を解析した結果、OX を投与した肝臓から単離したミクロソームでは、CYP1A1 蛋白の発現誘導とともに、ROS 産生の増加が確認された。さらにこの増加は、CYP 阻害剤である SKF-525A により抑制されたことから、OX 投与肝では CYP1A1 が誘導されるとともにその代謝過程において過剰な ROS 産生が惹起されていることが示唆された。なお、同じく ROS 産生への関与が報告されている CYP2E1 蛋白

については、OX 投与による変動は認められなかった。

リアルタイム RT-PCR 法を用いて検索した他の代謝・抗酸化関連遺伝子については、薬物代謝第二相系酵素を中心とした解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Gpx2*, *Nqo1*, *Yc2*, *Afar*, *Gstm1*, *Me1* の各遺伝子の mRNA 発現が有意に増加していることが確認された。これらの遺伝子は、酸化ストレスによって活性化される転写因子 Nrf2 により発現誘導されることが知られている遺伝子群であることから、OX 投与群ではその代謝過程において産生された過剰な ROS あるいは親電子物質の解毒・消去のための防御系が作動していることが推察された。

さらに、ROS 産生による酸化ストレスの亢進が生体分子に与える影響を検討するため、酸化 DNA 損傷マーカーである 8-OHdG 量及び脂質過酸化指標である TBARS 量を測定した結果、いずれも OX 投与群の肝臓において有意な増加が認められた。特に 8-OHdG については、GC → TA トランスバージョンによる遺伝子変異の原因として発がんに関連することが報告されており、我々が以前検討した DC のマウス肝発がん過程においても増加することを確認している。

以上の結果から、OX の肝発がん過程では、その代謝過程において生じると考えられる活性酸素種産生の増加に起因した酸化ストレスが亢進しており、その一部は、酸化 DNA 損傷として発がん機序に関与していることが示唆された。

DC のマウス肝二段階発がんモデルを用いた抗酸化剤羅漢果抽出物(SGE)併用投与実験 : DC 投与により増加した GGT 陽性細胞率が、SGE 併用投与により有意に減少した。また、脂質過酸化のマーカーである TBARS レベルもまた、SGE と

の併用投与により有意に減少した。Real time RT-PCR 解析により、SGE 併用投与群の *Cyp1a1* の発現が有意に低下していたことから、*Cyp1a1* に起因した ROS 産生が SGE 投与により抑制され、それに伴い、前がん病変の形成も抑制された可能性が推察された。

リアルタイム RT-PCR 法を用いて検索した他の代謝・抗酸化関連遺伝子については、薬物代謝第二相系酵素を中心とした解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Gpx2*, *Gstμ2*, *HO-1* の各遺伝子の mRNA 発現上昇が SGE 投与により減少した。これらの遺伝子は、酸化ストレスによって活性化される転写因子 Nrf2 により発現誘導されることが知られている遺伝子群であることから、SGE 投与群ではその代謝過程において産生された *Cyp1a1* を介した過剰な ROS あるいは親電子物質が減少することにより、防御因子の機能も低下しているものと推察された。この結果に基づき、*Cyp1a1* の誘導に関与する Ahr 活性化が SGE 投与により抑制されるか否かを明らかにするため、Ahr 高親和性の C57BL/6J マウスと低親和性の DBA/2J マウスを用いた短期の実験②を行った。その結果、*Cyp1a1* 発現量が C57BL/6J マウスでは、DC+SGE 群は DC 単独群に比べて有意に減少したのに対し、DBA/2J マウスでは DC 単独群と DC+SGE 群間における差は認められなかったことから、SGE の *Cyp1a1* 抑制作用機序は、*Cyp1a1* の発現を調節する Ahr の活性化を抑制することによって生じる可能性が示唆された。

以上の結果から、DC の肝発がん過程では、その代謝過程に生じると考えられる Ahr の活性化を伴う活性酸素種産生の増加に起因した酸化ストレスが関与しており、抗酸化剤である SGE は Ahr の作

用を抑制することにより、Cyp1a1 の誘導を抑制し、DC の肝発がんプロモーション作用を抑制している可能性が示唆された。

E. 結論

OX を 0.05% 含有する飼料を 6 週間、ラット肝二段階発がんモデルに与え、肝組織における遺伝子発現解析ならびに酸化損傷マーカーを測定した結果、OX の肝発がん増強作用機序の一部には、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示唆された。

更に、DC を 0.15% 含有する飼料を 9 週間、マウス肝二段階発がんモデルに与え、肝組織における遺伝子発現解析ならびに酸化損傷マーカーを測定した結果、DC の肝発がん増強作用機序に Ahr を介した Cyp1a1 の発現誘導に伴う酸化ストレスが関与す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

Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Matsumoto, S., Takahashi, M., Jin, M., Mitsumori, K.: Gene expression analysis of the liver in rats treated with oxfendazole. *Arch. Toxicol.* 81: 647-654, 2007

2. 学会発表

出羽康明、西村次平、六車雅子、松本明、高橋美和、金美蘭、三森国敏：Oxfendazole のラット肝発がんメカニズムに関する研究：予備的検討、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

出羽康明、西村次平、六車雅子、金美蘭、三枝由紀恵、高島正義、松本明、安野弘修、田崎雅子、岡村俊也、梅村隆志、三森国敏：ラット肝二段階発がんモデルを用いた Oxfendazole の肝発がん促進作用における酸化ストレスの関与について、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、東京、2007 年 6 月

出羽康明、西村次平、六車雅子、金美蘭、三枝由紀恵、川合正臣、田崎雅子、岡村俊也、梅村隆志、渋谷淳、三森国敏：酵素誘導を示すラット非遺伝毒性肝発癌物質の発癌機序における酸化ストレスの関与について、第 22 回発癌病理研究会、箱根、2007 年 8 月

出羽康明、西村次平、六車雅子、金美蘭、三枝由紀恵、田崎雅子、岡村俊也、梅村隆志、三森国敏：Oxfendazole のラット肝発がんメカニズムにおける酸化ストレスの関与について、第 140 回日本獣医学会学術集会、札幌、2007 年 9 月

Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Saegusa, Y., Yokouchi, Y., Kenmochi, Y., Kono, T., Yasuno, H., Matsumoto, S., Takabatake, M., Tasaki, M., Umemura, T., Mitsumori, M.: Involvement of oxidative stress in AhR-dependent and independent CYP1A inducers induced tumor promotion in a rat hepatocarcinogenesis model. 44th Congress of the European Societies of Toxicology. Amsterdam, September, 2007

松本明、金美蘭、出羽康明、西村次平、

本光喜、村田雄二、渋谷淳、三森国敏：
Dicyclanil のマウス肝発がんに対する羅
漢果抽出物の抑制作用について、第 140
回日本獣医学会学術集会、札幌、2007 年
9 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

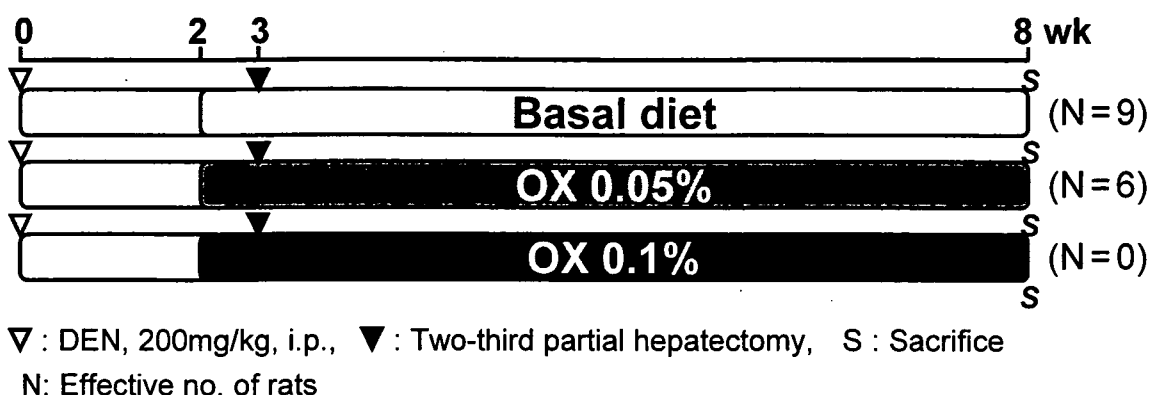


Fig. 1. Experimental design of OX study in a two-stage liver carcinogenesis model for 6 weeks

Table 1

Changes in parameters for body weight, liver weight, GST-P positive foci, oxidative damage and cell proliferation

Group	DEN + Basal diet	DEN + 0.05% OX
No. of rats examined	9	6
Final body weight (g)	253.3 ± 13.4	255.1 ± 14.4
Absolute liver weight (g)	6.2 ± 0.5	8.3 ± 0.6**
Relative liver weight (g/100 g body weight)	2.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1**
GST-P positive foci (≥0.2 mm)		
Numbers (Number/cm ²)	4.02 ± 1.94	12.74 ± 5.66*
Areas (mm ² /cm ²)	0.11 ± 0.07	0.21 ± 0.10*
8-OHdG (8-OHdG/10 ⁵ dG)	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02*
TBARS (nmol MDA/mg protein)	0.95 ± 0.06	1.14 ± 0.09*
PCNA-positive cells (%)	1.42 ± 0.32	4.18 ± 1.04**

Each quantitative data represents mean ± S.D.

*, **: Significantly different from DEN control ($p < 0.05$, 0.01 , respectively; Aspin-Welch's t -test).