

200837026A

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20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三森 国敏

平成21(2009)年 4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 (平成19年度追加分) 三森 国敏	----- 12
2. 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 (平成20年度分) 三森 国敏	----- 27
3. 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 (平成19年度追加分) 渋谷 淳	----- 42
4. 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 (平成20年度分) 渋谷 淳	----- 53
5. 動物用医薬品の発がん過程における酸化的ストレスの関与 梅村 隆志	----- 64
6. 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	----- 69
7. 動物用キロノン薬の安全性評価 古濱 和久	----- 74
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 76
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 76

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、動物用キロノン薬の安全性評価す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 (MLT) 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、ジエチルニトロソアミン(DEN)処理後、OXの混餌投与とともにメラトニンの飲水投与を10週間行ったところ、DEN-OX群で認められるラット肝前がん病変マーカーGST-P陽性巢数の増加がMLT併用投与で減少した。加えて、DEN-OX群から抽出した肝ミクロソーム分画を用いた *In vitro* reactive oxygen species (ROS)産生実験では、MLTの添加によりROS産生量の減少が認められた。更にDEN-OX投与群で発現上昇が認められる薬物代謝第一相酵素 *Cyp1a1*、*Cyp2b2*並びに解毒・抗酸化能に関与する *Afar*、*Me1*の遺伝子発現が、MLT併用投与により減少した。以上の結果から、OXにおけるラット肝発がんプロモーション過程には、その代謝過程で生じると考えられるROSによる酸化ストレスの関与が示唆された。またOXの二段階肝発がんモデルにおける28週間投与実験では、誘発させた腫瘍性病変及び周辺組織における遺伝子発現解析を実施し、酸化ストレス及び細胞増殖に関連する分子の発現動態を解析した。その結果、OXにより誘発された酸化ストレスは腫瘍性病変では回避されており、細胞増殖活性の亢進と共に腫瘍形成に重要な役割を果たしていることがmRNA及び免疫組織化学的解析結果から示唆された。

昆虫成長調節剤のジサイクラニル (DC) については、これまでマウス肝発がん機序に酸化ストレスによる、二次的DNA損傷、DNA修復及びアポトーシスが関与する可能性を明らかにしてきた。そこで昨年度に引き続きDCのマウス肝発がんにおけるプロモーション作用の閾値を検索するため、DEN処理を行った後、DCを0、187.5、375または750 ppmの濃度でマウス二段階発がん性試験を行った。その結果、750 ppmのDC投与群で、PCNA陽性細胞数がDEN単独群に比べ増加した。また遺伝子発現解析の結果、375 ppm以上の群で *Cyp1a1*の増加、全てのDC投与群で *Cyp1a2*の増加がみられた。さらに750 ppmの投与群については、DNA修復に関連する *OGG1*が増加した。これまでの知見でDC濃度が1500 ppmでマウスに肝細胞腫瘍を誘発することから、DCの肝発がんプロモーション作用の閾値は750 ppmと1500 ppmの間にあることが示唆された。さらに本年度、このDCのマウス肝前がん病変形成期におけるアポトーシスの関与の検証を行ったところ、高用量に移行するに従ってTUNEL INDEXの減少傾向は認められたが、有意差は認められなかった。一方、肝組織中のmRNA解析により、アポトーシス/細胞周期関連遺伝子である *Trail*の発現抑制がDCの750 ppm投与群で認められた。以上の結果、DCの肝前がん病変形成期では、アポトーシスは抑制傾向は認められるものの

その関与は軽微であり、発がん後期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アポトーシスが重要な役割を担っている可能性が推察された。

非遺伝毒性肝発がん物質である piperonyl butoxide (PBO) について、発がんプロモーション時期における非がん部のメチル化プロファイルの変動を、より高密度な CGI アレイ導入により網羅的に解析した。雄性 ICR マウスに 2/3 肝部分切除術を施し、その 24 時間後に肝発がん剤である DEN を 20 mg/kg の割合で腹腔内投与した。1 週間後より、PBO を 0 ないし 0.6 % の濃度で餌に混ぜ 26 週間投与した。投与終了後の肝臓について病理組織学的な増殖性病変の発現個数の解析とともに DNA メチル化のプロファイルを CpG promoter アレイにより検討した結果、PBO 群によるプロモーションで腫瘍を含む増殖性病変数が増加した。また PBO のプロモーションにより、非がん部において転写開始点に位置するプローブや転写開始点より上方に 100 bp の間でメチル化変動パターンに差の生じたプロモーター配列断片群を認め、PBO でメチル化程度が 1.5 倍以上増加したものが 31 個認められた。その中には、細胞周期促進に関与する *cdc34* や細胞増殖抑制に関与する *wdr6* 遺伝子のプロモーター配列が得られた。

PBO は従来の変異原性試験は陰性ながら、マウスの肝臓に高率に腫瘍を誘発することが知られている。これまで、その発がん機序に代謝過程で生じる酸化的ストレスの関与の可能性が報告されてきた。そこで今回レポーター遺伝子導入マウスに *p53* 遺伝子を欠損させた *p53* 欠損 *gpt delta* マウスとその野生型を用いて、PBO の *in vivo* 変異原性を検索し、PBO 発がん機序への DNA 傷害の関与の有無を検討した。また、肝プロモーター物質として知られるフェノバルビタール (PB) についても同様に検索した。その結果、肝 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベル、*gpt* 遺伝子変異頻度 (*gpt* assay) および *red/gam* 遺伝子変異頻度 (*Spi* assay) の何れも変化は観察されなかった。従って、PBO は発がん標的臓器 DNA に対して *in vivo* 変異原性を有していないことが明らかとなり、PBO 発がん機序への遺伝子障害の関与の可能性は低いと考えられた。

BSE (牛海綿状脳症) の特定危険部位である牛の背根神経節について、その完全除去がと畜場において可能か否かを検討するため、背根神経節の除去率の算定を試みた。同時に、牛の品種別、及び牝牝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 87% 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、及び牝牝別の除去率に差は認められなかった。

ニューキノロン系抗菌薬 gatifloxacin (GFLX) による血糖異常の機作を明らかにする目的で、正常 Wistar ラットと II 型糖尿モデル Goto-Kakizaki (GK) ラットに GFLX の 100 および 300 mg/kg/day を経口 15 日間投与し、臨床病理学および薬物動態学的に調べた。投与期間中、血糖測定、耐糖負荷試験、膵の病理検索および血清および膵 GFLX 濃度測定を行った。その結果、正常ラットでは血糖低下、GK ラットでは著しい血糖上昇と耐糖負荷試験で血清インスリンの減少が認められた。膵の組織検索では正常ラットでは 300 mg/kg/day、GK ラットでは 100 mg/kg/day より β 細胞の空胞化が観察された。膵中 GFLX 濃度は既存キノロン薬に比べ顕著に高かった。以上、GFLX による血糖値異常は膵への異常に高い分布が引き金となり、インスリン分泌に影響を与え血糖異常を誘発することが示唆された。

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
分担研究者 古濱 和久
岩手大学農学部獣医学課程教授

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
タを提供する事にある。

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、OX を反復投与し
たラット肝臓における解析から、肝発がん
機序における活性酸素種 (Reactive oxygen
species: ROS) 及びそれに伴う酸化ストレス
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。

昨年度の追加実験として、OX につい
ては、肝発がん機序における酸化ストレス
の関与について検索するため、抗酸化剤メ
ラトニン (MLT) との併用投与による肝前
がん病変の修飾作用に関する研究を行っ
た。DC については、非遺伝毒性発がん物
質であるが、閾値についての報告はないた
め、マウス肝発がんプロモーション閾値に
関する研究を行った。

さらに本年度、OX に関してはラット肝
二段階発がんモデル用い、投与期間を 26
週間に延長して腫瘍性病変を誘発した肝
臓について、酸化ストレス及び細胞増殖
に関連する分子の遺伝子発現解析を行い、
ラット肝発がん機序におけるこれらの分
子の関与を検証することを目的として実
験を行った。DC に関しては、先述の 19
年度追加の 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引き続
き、DC のマウス肝前がん病変形成期にお
けるアポトーシスの関与に関する情報を
得るための実験を行った。

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
から、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。通常この CGI は通常脱メチル化を

受けているが、メチル化が生ずることで、がん細胞でのがん抑制遺伝子の不活化に機能することも知られている。昨年度、マウス肝二段階発がんモデルを用いた、既知発がん物質である phenobarbital (PB) および 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f] quinoline (IQ) によるプロモーション過程で DNA メチル化のシグナル変動を検討したところ、16 週間のプロモーションによって非発がん物質の APAP と分離してメチル化の増加を示した CGI を 39 個見出し、この時期で発がん物質に特有な転写制御機転の働く遺伝子群の出現する可能性を示唆した。

本年度は、マウス肝二段階発がんモデルを用いて、動物用医薬品の非遺伝毒性肝発がん物質である piperonyl butoxide (PBO) による発がんプロモーション過程での DNA メチル化のプロファイルを、CGI を含むプロモーター領域が搭載された CpG Promoter アレイにより網羅的に検索する。

また PBO はげっ歯類の肝臓に高率に腫瘍を誘発する。しかしこれまで、*in vitro* 変異原性を示さず、いわゆる非遺伝毒性発がん物質と考えられてきた。一方、PBO はその投与により薬物代謝酵素 CYP1A1/2 が誘導されることから、代謝過程において生じる酸化ストレスの関与が示唆され、DNA 傷害を引き起こしている可能性がある。そこで PBO 発がん機序への DNA 傷害の関与の可能性を探る目的で、近年開発されたレポーター遺伝子導入系による、*p53* 欠損 *gpt delta* マウスならびにその野生型マウスを用いて、PBO 投与による *in vivo* 変異原性を検索した。また、肝プロモーター物質として知られ、PBO 同様、種々の肝薬物代謝酵素を誘導することが知られているフェノバルビタール (PB) について同様に検索し、比較検討した。

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、脊柱からの分離が困難なことから、本来安全な脊柱も背根神経節とともに廃棄されている。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、牛の脊柱を資

源として再活用をはかることを目的とした。

ニューキノロン系抗菌薬は広い抗菌スペクトラムと良好な体内挙動から、獣医療においても使用が増加している。一方ではその有害作用として class effect が注目されているが、血糖異常（低下あるいは上昇の相反する 2 つの事象）も重篤な病態に繋がることから近年問題視されている。そこで、新規キノロン剤 GFLX を取り上げ、ラットを用いて血糖異常を精査した。

B. 研究方法

OX と MET 併用投与による肝前がん病変の修飾作用に関する研究に関しては、5 週齢の雄性 F344 ラットに 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 ないし 500 ppm 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 100 ppm 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、DEN-OX 群：10 匹、DEN-メラトニン (MLT) 群：12 匹] については、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 発現解析及び *In vitro* ROS 産生実験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) 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、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、DEN-OX 群から単離した肝ミクロソーム分画を用いて、MLT を添加したときの NADPH 依存性の ROS 産生能の抑制効果を評価した。

OX の二段階肝発がんモデルにおける 28 週間投与実験では、二段階肝発がんモデルを用い、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 26 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 肝部分切除術を施した。得られた肝組織について免疫組織化学染色を含む病理組織学的検討を行うとともに、OX 投与により誘発された肝細胞線腫内における mRNA 発現変動について、周辺組織並びに対照群の正常組織と比較を行った。

DC のマウス肝発がんプロモーション閾値に関する研究については、雄性 ICR マウス 44 匹を 4 群に分けて 2/3 部分肝切除を施し、24 時間後に DEN 投与によるイニシエーション処置を施した。処置後 1 週間後から 3 群には 187.5、375 または 750 ppm の DC を 10 週間混餌投与した。得られた肝臓について、病理組織学的検索、GGT および PCNA 染色を行い、さらに DC の肝発がんメカニズムに関連すると考えられる分子については real-time RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析を行った。また、単離肝ミクロソームからの ROS 産生量を測定した。

さらに DC のマウス肝前がん病変形成期におけるアポトーシスの関与の実験に関して、先の 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で得られた肝臓を用いて、TUNEL 染色を行い、アポトーシスの評価を行った (TUNEL の評価に関しては、TUNEL 陽性細胞に部位的なバラツキが見られたことから、単位面積あたりの TUNEL 陽性細胞数を TUNEL INDEX として表した)。またアポトーシスの関与を分子レベルで明らかにするため、リアルタイム RT-PCR を用いて mRNA 発現解析を実施した(補正は内部標準遺伝子である β -actin を用いて

実施)。対象遺伝子は p53 の下流に存在する因子や既報を参考に、*Ccng1*, *Gadd45a*, *Cdkn1a*, *Cdkn1b*, *Tp53* 及び *Trail* とした。

PBO のメチル化解析は、6 週齢の雄性 ICR マウス (日本 SLC 株式会社) に 2/3 肝部分切除術を施した。その 24 時間後に DEN による、イニシエーション処置を施した。1 週間後より、PBO を 0 ないし 0.6% の割合で飼料に混じて 26 週間投与した。投与 26 週目に全生存動物 (DEN 単独群: 8 匹、DEN + PBO 群: 15 匹) をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取した。非がん部の組織を用いて、マイクロダイセクションを行った後、ゲノム DNA を回収、断片化を行い、さらにプローブ化を行った。その DNA を用いて、PBO プロモーションにより DEN 単独群と比較して、DNA メチル化変動を示したプロファイルを CpG promoter マイクロアレイにより求めた (n=5/群)。

統計解析としては、DEN 単独群と PBO 群との間で Student-t test を行い、有意水準 5 % 以下を有意差ありとした。マイクロアレイの結果に対しては今回統計解析を実施しなかった。

PBO の発がん過程における酸化ストレスの関与に関する研究については、雄の *p53* ホモ欠損 *gpt delta* (*p53*^{-/-}) マウスならびにその野生型 (*p53*^{+/+}) を実験に供した。雄 5 週令の *p53*^{+/+} とその同腹の *p53*^{-/-} マウスそれぞれ各群 5 匹に、PBO ならびに PB をそれぞれ 6000 ppm ならびに 500 ppm の濃度に混じた飼料を 13 週間自由に摂取させた。エーテル麻酔下で動物を解剖し、肝重量測定後、一部を液体窒素により凍結保存し、残りはホルマリン固定後、常法によりパラフィン切片を作製し、病理組織学的検索を実施した。凍結保存後の肝から DNA を抽出し、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、スファージにパッケージング後、Cre 組み換え酵素発現大腸菌ならびに P2 溶原

大腸菌にそれぞれ感染させ、導入遺伝子の *gpt* ならびに *red/gam* 遺伝子の変異頻度を検索した。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究について、牛の背根神経節は1頭当たり、頸椎部8対16個、胸椎部13対26個、腰椎部6対12個、及び仙骨部5対10個の計32対64個(枝肉[半頭分]では32個)存在する。ここでは第1頸神経から第5仙骨神経までの背根神経節の枝肉当たりの除去率を調べた。算出に用いた試料は2008年3月から2009年2月までの計358検体である。また、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。

動物用キノロン薬の安全性評価については、雄性 Wistar 系ラット(正常ラット)あるいは GK ラットに GFLX の 100 および 300 mg/kg/day を経口 15 日間反復投与し、血糖値測定(酵素電極法)、耐糖負荷試験(10%グルコース 5 mL/kg を静脈内単回投与し投与5分後に血清インスリン濃度を ELISA 法で測定)、血清および尿 GFLX 濃度測定(*B.subtilis* ATCC 6633 を検定菌とした bioassay 法)および尿の組織学的検索を行った。

(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虚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程、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い指針、岩手大学動物実験に関する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、動物実験ではなく、と畜場の協力を得て、作業過程で除去された牛の硬膜と背根神経節を研究材料として使用していることから、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 と MLT 併用投与による肝前がん病変の修飾作用に関する研究では、MLT 併用投与による肝重量への影響は認められなかったが、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-OX-MLT 群において、DEN-OX 群と比較し、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積ともに抑制効果が認められた。肝組織中の代謝及び酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現変動を解析した結果、DEN-OX 投与群で発現上昇が認められた薬物代謝第一相酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2b2* 並びに解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Afar*、*Me1* の発現に有意な抑制効果が認められた。DEN-OX 群の肝臓から単離したミクロソーム分画を用いて *In vitro* ROS 産生実験を行ったところ、MLT 添加により ROS 産生量の低下が観察された。また、CYP 蛋白の阻害剤である SKF-525A の添加により著しく減少した。

OX の二段階発がんモデルにおける 28 週間投与実験では、OX 投与により DEN 単独群と比較して前がん病変マーカーである GST-P 陽性巢の数・面積の増加並びに好酸性ないし明細胞性の変異細胞巢及び肝細胞腺腫の発生個数・発生頻度に有意な増加が確認された。これらの病変部位では細胞増殖活性マーカーである PCNA 陽性細胞数の増加が確認された。誘発された変異細胞巢及び肝細胞腺腫における免疫組織化学的解析の結果、周囲の正常組織と比較して薬物代謝第一相系酵素である CYP1A1 の染色性に低下が認められたのに対し、解毒・抗酸化に関する機能遺伝子である AFAR 及び GPX2 については染色性の増強が観察された。同時に、細胞周期を負に制御する因子の一つである p21 蛋白並びに p21 蛋白の安定化に関与する C/EBP α 蛋白に染色性の低下が観察された。これらの変化は mRNA レベルにおいても同様の傾向を示した。

DC 投与により肝重量、GGT 陽性細胞数に有意な増加は認められなかったが、750 ppm DC 群で、PCNA 陽性細胞数が DEN 単独群に比べ有意に増加した。遺伝子発現解析では、*Cyp1a1* が 375 ppm 以上の DC 群で、*Cyp1a2* が全ての群で有意に増加した。750 ppm DC 群において、DNA 修復に関連する *OGG1* は 750 ppm DC 群で DEN 単独群に比べ有意に増加した。ROS 産生量は、DC 投与群と DEN 単独群との間に有意な差はなかった。

DC の実験では、TUNEL 染色によりアポトーシス誘発細胞の定量評価を行った結果、高用量に移行するに従って減少傾向は認められたが、有意差は認められなかった。肝組織中のアポトーシス/細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現変動を解析した結果、Trail の発現抑制が DC の 750 ppm 投与群で認められた。一方、その他の遺伝子について有意差は認められなかった。

PBO のメチル化解析は、投与 26 週目の PBO 群では、DEN 単独群と比較して、体重の有意な低値が認められた。肝臓重量は、PBO 群で絶対値と相対値がそれぞれ DEN 単独群と比較して有意に高値を示し、肝細胞腺腫および肝細胞癌の増加がそれぞれ認められた。CpG promoter マイクロアレイによる DNA メチル化を検討した結果、DEN 単独群でメチル化が変動もしくは低下したプローブ配列断片と、PBO 群で 1.5 倍以上メチル化が増加したプローブ配列断片を比較したところ、31 個が認められた。逆に PBO 群でメチル化が変動もしくは低下したプローブ配列断片と、DEN 単独群で 1.5 倍以上メチル化が増加したプローブ配列断片を比較したところ、122 個が認められ、そのうち 100 bp 以内に mRNA 情報が含まれている 115 個であった。これらプローブ配列断片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、プローブ配列断片が高メチル化変動を示した遺伝子には、ユビキチン転移酵素ファミリーで細胞周期を促進することが知られている cell division cycle 34 (*cdc34*) や細胞増殖抑制に関与す

る WD repeat domain 6 (*wdr6*) 遺伝子が見出された。またプローブ配列断片が低メチル化変動を示した遺伝子には、線維芽細胞の増殖因子 (*fgf1*) が見出された。

PBO の発がん過程における酸化ストレスの関与に関する研究については、*p53*^{+/+} マウスでは、PBO 投与群において著しい体重増加抑制が認められた。肝重量は何れの投与群においても増加し、PBO 投与群の肝比重量ならびに PB 投与群の肝重量は有意の高値となった。また、*p53*^{-/-} マウスでは、PBO 投与群に同様の結果が得られた。また病理組織学的検査において、*p53*^{+/+} マウス PBO 投与群で小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。また、PB 投与群ではくもり硝子様変性を伴う小葉中心性肝細胞肥大が観察された。*p53*^{-/-} マウスでは、いずれの投与群においても、*p53*^{+/+} と同様の変化が認められた。肝 DNA 中の 8-OHdG レベルは *p53*^{+/+} マウスの PBO 投与群において、8-OHdG レベルの増加傾向が認められた。一方、PB 投与群では変化は認められなかった。*p53*^{-/-} では、PBO および PB の何れの投与群においても、8-OHdG 量の有意な変化は認められなかった。また *In vivo* 変異原性試験において、*p53*^{+/+} マウス及び *p53*^{-/-} マウスにおいても、PBO ならびに PB 投与による *gpt* 遺伝子突然変異頻度 (*gpt* assay)、*red/gam* 遺伝子突然変異頻度 (*Spi* assay) の上昇は観察されなかった。

牛脊柱からの背根神経節除去に関しては、2008 年 3 月から 2009 年 2 月までの計 358 検体行った結果、背根神経節の除去率は平均 87%であった。また、前年度と同様、第 11 胸神経、第 4~6 腰神経、及び第 1~3 仙骨神経の背根神経節の除去率の低さが顕著であった。上記以外の 25 部位は概ね 90%以上の除去率であった。第 1 頸神経~第 10 胸神経の背根神経節の除去率の高さは、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大きいことによると思われる。第 4 腰神経~第 3 仙骨神経の背根神経節の除去率の低さは、この領域の背根は脊柱管への連絡口から

斜めに走行しており、脊柱管側から硬膜とともに背根の先にある背根神経節を引きずり出すのは、より困難であることが考えられる。また、牛の品種別、及び牝牝別の除去率に差は認められなかった。

動物用キノロン薬の安全性評価については、正常ラットでは、100 mg/kg/day から血糖値の低下、300 mg/kg/day で膵β細胞の軽度空細化が観察された。GK ラットでは 100 mg/kg/day から血糖値の顕著な上昇、糖負荷試験で血清インスリンの低下（測定限界）、膵臓β細胞の空胞化、300 mg/kg/day では投与5日より体重減少と体温低下を示し、瀕死状態となったため全例切迫屠殺した。屠殺例の病理検索では肝に著しい脂肪沈着と膵β細胞の顕著な空胞化が観察された。薬物動態学的には、正常ラットおよび糖尿ラットの間では、見かけ上 C_{max} および $AUC_{0-8\text{ hr}}$ には大きな差は見られなかったが、糖尿ラットでは 100 mg/kg/day から高い血清濃度が投与8時間まで持続していた。膵内 GFLX 濃度は正常ラットの 300 mg/kg/day と糖尿ラットの 100 mg/kg/day ではほぼ同じ値 (56.7-58.5 μg/g) を示し、糖尿ラットの 300 mg/kg/day ではさらに異常な高値 (75.4 μg/g) がみられた。

D. 考察

OX の実験では、MLT の併用投与により、DEN-OX 群で認められた有意な GST-P 陽性巣の数の増加が DEN 単独群レベルにまで減少した。加えて、DEN-OX 群から抽出した肝ミクロソーム分画を用いた *In vitro* ROS 産生実験では、MLT の添加により ROS 産生量の有意な減少が認められた。これらの結果は MLT が ROS に対する抑制効果を有するという報告と一致し、さらにこの事実は OX の有する肝発がんプロモーション作用が ROS 産生の減少により抑制された可能性を強く示唆する。リアルタイム RT-PCR 解析では、DEN-OX 投与群で発現上昇が認められた薬物代謝第一相酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2b2* 並びに解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Afar*、

Me1 の発現が、MLT 併用投与により有意に低下した。これらの結果は、OX の代謝過程において産生される過剰な ROS あるいは親電子物質が減少したことを意味し、結果的にこれらの減少が OX の肝発がんプロモーション作用に対して抑制的に働いたものと推察された。以上の結果から、OX の肝発がんプロモーション作用には、OX の肝発がん過程に生じると考えられる活性酸素種産生の増加が関与していることが示唆された。

OX の二段階肝発がんモデルにおける 28 週間投与実験では、OX 投与により変異細胞巣及び肝細胞腺腫の有意な増加が観察された。これらの病変部位では、免疫組織化学的に CYP1A1 に対する染色性の低下と共に AFAR 及び GPX2 の染色性の増加が認められ、mRNA レベルにおいても同様の結果が確認された。一般に化学物質により誘発された肝腫瘍性病変では、CYP1A のような薬物代謝第一相系酵素の発現低下と共に、薬物代謝第二相系酵素の発現増加が認められることから、OX 投与により惹起された酸化ストレスは腫瘍性病変の形成過程において回避されている可能性が示唆された。また細胞増殖関連分子の発現変動については、誘発された変異細胞巣及び肝細胞腺腫では PCNA 陽性細胞数の有意な増加と共に、細胞周期を負に制御する因子の一つである p21 及び p21 蛋白の安定化に關与する C/EBP α 蛋白の染色性低下が観察され、これらの病変部位における細胞増殖活性の亢進を反映したものと推察された。

今回の実験条件下では、DC の肝発がんプロモーション作用の閾値が 750 ppm より高いことが示唆された。*Cyp1a1*、*Cyp1a2* は DC の毒性に対してもっとも感受性が高い分子マーカーであるが、750 ppm またはそれ以下の濃度の DC 投与群におけるこれらの発現増加は ROS の産生に不充分であることが推察された。

DC の実験では、アポトーシスの亢進に關与する *Trail* の有意な発現低下が高用量群 (750 ppm) で認められた。*Trail* は腫

瘍細胞をアポトーシスへ誘導する因子であるが、既報の研究において、DCにより誘発された腫瘍部において最も発現が低下しているものの、DCを短期投与したマウス肝臓におけるマイクロアレイを用いた解析実験では、*Trail*には発現変動が認められなかったとしている。既報の報告と本研究における結果を考慮すると、*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、比較的早期の前がん病変形成期においてはその関与は示唆されたものの、その効果は軽微である可能性が推察された。なお、この推察は、TUNEL免疫染色による定量評価においても確認された。以上の結果から、DCの肝前がん病変形成期では、アポトーシスの抑制傾向は認められるもののその関与は軽微であり、発がん後期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た。

PBOによる非がん部でメチル化プロファイル変動を検討したところ、PBOの26週間におよぶプロモーションにより、非がん部において特異的なメチル化変動パターンを示すプローブ配列断片群が31個認められた。このことをエピジェネティックな遺伝子発現制御の観点から考察すると、PBOによりメチル化制御機転の働く遺伝子群の出現する可能性が示唆された。言い換えるとPBOプロモーション過程において、特異的な分子機能の起動する可能性を示唆した。

この選出された31個のプローブ配列断片群の下流に位置する遺伝子には、ユビキチン転移酵素ファミリーであり、細胞周期を促進している*Cdc34*の高メチル化が認められた。また*WDR6*遺伝子は、Hela細胞においては、細胞周期のG1期を停止して細胞増殖に関わる遺伝子であり、この*WDR6*遺伝子は、発がん物質特異的に高メチル化変動する事をすでに昨年度報告している。またPBOプロモーションによっ

て低メチル化変動が認められた*Fgf1*遺伝子は、肝発がんの発生に関係している事が報告されている (Chow NH, et al., *Dig Dis Sci.* 43: 2261-6, 1998)。

また、その他にも機能が明らかにされていない遺伝子が選出されており、多くのがん関連因子がPBO投与により、高メチル化もしくは低メチル化が起こっていることが考えられた。

PBOを6000 ppmの濃度に混じた飼料を13週間、雄の*p53*ホモ欠損、その野生型*gpt delta*マウスに与えたところ、何れのマウスの肝DNA中の8-OHdGレベルも明らかな上昇は認められなかった。また、*p53*蛋白の有無に関わらず、マウス肝DNAの*gpt*遺伝子ならびに*Spi*変異頻度に変化は認められず、PBOが発がん標的臓器に対して*in vivo*変異原性を有していないことが明らかとなった。しかし、PBOの発がん実験条件下で実施した今回の中期投与試験では、顕著な体重増加抑制が認められ、肝臓の器質的傷害像は認められなかったものの、さらに長期の投与による肝毒性の誘発がその高い発がん性に寄与している可能性も考えられた。

2008年3月から2009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87%であり、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。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。

動物用キノロン薬の安全性評価については、GFLXを含むニューキノロン薬はモルモット膵β細胞cell line HIT-T15において、*K_{ATP}*チャネルを阻害しmedium中にインスリン遊離を増加させることが報告されている。したがって、GFLXによる血糖値異常は膵への異常に高い分布が引き金となったと考えられた。すなわち、正常

ラットではインスリン小胞に十分なインスリン貯蔵(合成)があるために、 K^{+}_{ATP} チャネル阻害により Ca^{2+} が β 細胞に流入し、インスリン分泌が亢進して低血糖が、GKラットではインスリン貯蔵が元々減少しているために、 Ca^{2+} 流入によりインスリン分泌が枯渇して持続的な高血糖になったと考えられた。以上より、膵インスリン貯蔵の予備能の違いが血糖低下と上昇の相反する病態に繋がったと考えられた。

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., Jin, M., Kawai, M., Saegusa, Y., Okamura, T., Umemura, T., Mitsumori, K.: Involvement of oxidative stress in hepatocellular tumor-promoting activity of oxfendazole in rats. *Arch. Toxicol.* In press.

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 tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Carcinogenesis*. 29(11): 2218-26, 2008.

Woo, G-H., Takahashi, M., Inoue, K., Fujimoto, H., Igarashi, K., Kanno, J., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Cellular distributions of molecules with altered expression specific to thyroid proliferative lesions developing in a rat thyroid carcinogenesis model. *Cancer Sci.* (in press).

Taniai, E., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada, T., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Takahashi, M.,

Mitsumori, K., Shibutani, M.: Crosstalk between PTEN/Akt2 and TGF β signaling involving EGF receptor downregulation during the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Cancer Sci.* (in press).

Umemura, T., Tasaki, M., Kijima, A., Okamura, T., Inoue, T., Ishii, Y., Masui, N., Nohmi, T., and Nishikawa, A.: A possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of gpt delta rats treated with potassium bromate. *Toxicology* 257:46-52. 2009.

2. 学会発表

Nishimura, J., Saegusa, Y., Dewa, Y., Jin, M., Kawai, M., Matsumoto, S., Harada, T., Hayashi, S., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Modifying effects of enzymatically modified isoquercitrin or melatonin on oxfendazole-induced liver tumor promotion in rats. 25th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology. Shizuoka, Japan, January, 2009.

Dewa, Y., Nishimura, J., Jin, M., Kawai, M., Saegusa, M., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Molecular pathological analysis at the late stage of tumor promotion by oxfendazole in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. 26th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Croatia, September, 2008

Kawai, M., Saegusa, Y., Jin, M., Nishimura, J., Dewa, Y., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Mechanistic study on hepatocarcinogenesis of piperonyl butoxide in mice. 47th Annual Meeting of Society of Toxicology (2008. 3. 16-20), Seattle, Washington, U.S.A., Program Description: Abstract # 113, P. 96.

川合正臣, 渋谷 淳, 禹 麻美, 高橋美和, 出羽康明, 西村次平, 三森国敏, 西川秋佳, 広瀬雅雄: マウス肝発がんプロモーション時期での DNA メチル化プロファイルの検討, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会, 期間: 2008 年 6 月 26 日~28 日, 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集 S154 ページ(P-083), 東京.

谷合枝里子, 渋谷 淳, 高橋美和, 出羽康明, 西村次平, 島 智美, 吾郷恭平, 三森国敏: ラットの肝発がん過程早期からの PI3K/Akt 経路関連分子の免疫組織学的局在. 第 146 回日本獣医学会学術集会, 日本獣医病理学会, 第 146 回日本獣医学会学術集会講演要旨集 B-08 (p.155), 宮崎, 24-26.09.2008

Masaomi Kawai, Makoto Shibutani, U Mami, Miwa Takahashi, Yasuaki Dewa, Jihei Nishimura, Kunitoshi Mitsumori, Akiyoshi Nishikawa, Masao Hirose: DNA methylation profiling during the promotion stage of mouse hepatocarcinogenesis. 45th Congress of the European Society of Toxicology, Poster Number: O08, Abstracts/Toxicology Letters 180S (2008) S122, O08, Rhodes, Greece, 2008.

渋谷 淳, 谷合枝里子, 出羽康明, 西村次平, 島 智美, 吾郷恭平, 高橋美和, 三森国敏: ラット肝発がんプロモーションにより生じる GST-P 陽性の変異肝細胞巣と腫瘍で特異的に発現変化を示す PTEN/Akt2 経路分子と TGF β 受容体. 第 25 回日本毒性病理学会学術集会, 浜松, 第 25 回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 63 (O-3), 1 月 27, 28 日, 2009

川合正臣, 三枝 由紀恵, 出羽康明, 金 美蘭, 西村 次平, 松本 明, 渋谷 淳, 三森国敏: マウス肝二段階発がんモデルを用いたピペロニル・ブトキサイドの肝発がん促進機序についての分子病理学的解析. 第 25 回日本毒性病理学会学術集会, 浜松, 第 25

回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 74 (P-13), 1 月 27, 28 日, 2009

田崎雅子, 井上知紀, 岡村俊也, 木島綾希, 鈴木裕太, 石井雄二, 児玉幸夫, 能美健彦, 梅村隆志, 西川秋佳: ピペロニルブトキサイドの *p53* 欠損 *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性, 第 25 回日本毒性病理学会, 2009 年 1 月, 浜松

古濱和久, 永井三紀子, 永田沙織, 佐藤洋: キロノン系抗菌剤 *gatifloxacin* の経口反復投与による正常及び II 型糖尿ラットの血糖異常の解析, 第 146 回日本獣医委学会学術集会, 2008 年 9 月, 宮崎

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

オクスフェンダゾールとメラトニン併用投与による肝前がん病変の修飾作用に関する研究：動物用医薬品オクスフェンダゾール（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（MLT）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500 ppmの濃度で10週間混餌投与を行うとともに、メラトニンの同時飲水投与を行った結果、以下の知見を得た。即ち、DEN・OX群に対するMLTの併用投与は、DEN・OX群で認められた有意なglutathione S-transferase, placental form (GST-P)陽性巢の数の増加をDEN単独群レベルにまで減少させた。加えて、DEN・OX群から抽出した肝ミクロソーム分画を用いた *In vitro* reactive oxygen species (ROS)産生実験では、MLTの添加によりROS産生量の有意な減少が認められた。更にDEN・OX投与群で発現上昇が認められた薬物代謝第一相酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2b2*並びに解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Afar*、*Me1*の発現が、MLT併用投与により有意に減少した。以上の結果から、OXにおけるラット肝発がんプロモーション過程には、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関与する可能性が示唆された。

ジサイクラニルのマウス肝発がんプロモーション閾値に関する研究：昆虫成長制御剤のジサイクラニル（DC）は、1500 ppmの混餌投与で、マウスに肝細胞腫瘍を誘発する非遺伝毒性発がん物質である。その発がん機序としては、活性酸素種（ROS）産生による酸化ストレスを介した二次的DNA損傷が関与するものと考えられているが、発がん性の閾値については報告がない。本研究では、DCによるマウス肝発がんプロモーション作用の閾値を検索するために以下の実験を行った。雄性ICRマウス44匹を4群に分けて2/3部分肝切除を施し、24時間後に *N*-diethylnitrosamine (DEN)投与によるイニシエーション処置を施した。処置後1週後から3群には187.5、375または750 ppmのDCを10週間混餌投与した。得られた肝臓について、病理組織学的検索、GGT、PCNA染色および分子病理学的解析を行った。また、単離肝ミクロソームからのROS産生量を測定した。DC投与により肝重量およびGGT陽性細胞数に有意な増加は認められなかったが、750 ppm DC群で、PCNA陽性細胞数がDEN単独群に比べ有意に増加した。遺伝子発現解析では、cytochrome P450 1A1 (*Cyp1a1*) が375 ppm以上のDC群で、*Cyp1a2*が全ての群で有意に増加した。さらに750 ppm DC群において、DNA修復に関連する8-oxoguanine DNA glycosylaseは750 ppm DC群でDEN単独群に比べ有意に増加した。ROS産生量は、DC投与群とDEN単独群との間に有意な差はなかった。これらの結果から、DCの肝発がんプロモーション作用の閾値は750 ppmと1500 ppmの間にあることが示唆された。

A. 研究目的

動物用駆虫薬として牛、豚、羊等の産業動物に用いられるオクスフェンダゾール

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、ラットやマウスの肝二段階発がんモデルにおいて OX や DC を投与し前がん病変巣を形成させた肝臓では、異物代謝・抗酸化に關する遺伝子群の発現上昇と共に、その代謝過程において生じると考えられるミクロソーム由来の活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)産生の増大や酸化的 DNA 損傷の増加が確認されており、その肝発がん機序の一部には、酸化的ストレスに起因した二次的 DNA 損傷が關する可能性を明らかにしてきた。

そこで昨年度に引き続き本年度も、OX と DC の肝発がん機序における酸化的ストレスの關与を詳細についてさらなる研究を進めるため、①OX の発がん機序におけるラット肝二段階発がんモデルを用いた、抗酸化剤メラトニン (MLT) の修飾作用の検証、②マウス肝二段階発がんモデルを用いた、DC の発がんにおける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

オクスフェンダゾールとメラトニン併用投与による肝前がん病変の修飾作用に関する研究：実験デザインを Fig. 1 に示す。5 週齢の雄性 F344 ラット(日本エスエルシー株式会社)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 500 ppm 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 100 ppm 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、DEN-OX 群：10 匹、DEN-メラトニン (MLT) 群：12 匹] については、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 発現解析及び *In vitro* ROS 産生実験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) 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、酸化的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、DEN-OX 群から単離した肝ミクロソーム分画を用いて、MLT を添加したときの NADPH 依存性の活性酸素種(ROS)産生能の抑制効果を評価した。

ジサイクラニルのマウス肝発がんプロモーション閾値に関する研究：実験デザインを Fig. 4 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)に肝細胞増殖活性を高めるための 2/3 肝部分切除を行い、処置 24 時間後にはイニシエーターである diethylnitrosamine (DEN) 30 mg/kg を腹腔内投与し、イニシエーション処置を施した。1 週間無処置で飼育後、DC の 0、187.5、375 または 750 ppm を 10 週間混餌投与した。投与終了後、全生存動物(DEN 単独群・DC187.5、375 および 750 ppm 投与群各 7、12、12 または 10 匹)についてエーテル深麻酔下

にて放血屠殺して肝臓を採取し、重量測定後、一部を 10 % 中性緩衝ホルマリン溶液で固定または凍結保存し、免疫組織化学的検索ないし mRNA 発現解析に用いた。

組織学的検索は、固定生検材料をパラフィン包埋及び薄切後にヘマトキシリン・エオシン染色ないし PCNA 抗体を用いた免疫組織学的染色を施し、光学顕微鏡下にて観察を行った。組織化学的検索は、凍結保存材料を用いてマウス前がん病変マーカーである GGT 染色を行った。mRNA 発現解析は、DEN 単独群と DC 投与群から各 6 例ずつ Total RNA を抽出し、代謝、酸化ストレス及び DNA 修復関連遺伝子の発現(補正は内部標準遺伝子である β -actin 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。

統計解析は、DEN 単独群と DC 投与群との間で one-way ANOVA 検定を行い、 $p < 0.05$ の場合は Dunnett's 検定を行った。有意水準は 5 % 以下とした。

(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

オクスフェンダゾールとメラトニン併用投与による肝前がん病変の修飾作用に関する研究：肝重量に関しては、MLT 併用投与による影響は認められなかった

(Table 1)。一方、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-OX-MLT 群において、DEN-OX 群と比較し、GST-P 陽性細胞巢の数及び面積ともに抑制効果が認められた(Fig. 2)。

肝組織中の代謝及び酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現変動を解析した結果、DEN-OX 投与群で発現上昇が認められた薬物代謝第一相酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2b2* 並びに解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Afar*、*Me1* の発現に有意な抑制効果が認められた(Table 2)。

DEN-OX 群の肝臓から単離したミクロソーム分画を用いて *In vitro* ROS 産生実験を行ったところ、MLT 添加により ROS 産生量の低下が観察された。また、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)。

ジサイクラニルのマウス肝発がんプロモーション閾値に関する研究：実験期間を通じて、DC 投与による体重及び摂餌量についても変化は観察されなかった(Fig. 5、Table 3)。

DC 投与群の肝臓では、DEN 単独群と比較して GGT 陽性細胞の数が増加傾向にあるものの、有意な差は見られなかった(Fig. 3)。また細胞増殖活性マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対して免疫組織化学的に陽性を示す細胞数の比率は、DEN 単独群と比較して 750 ppm DC 投与群でのみ有意な増加がみられた (Fig. 6)。

肝ミクロソーム由来の ROS 産生量の測定においては、DC 投与群で DEN 単独群に比べ増加傾向にはあるものの、有意な差は認められなかった (Fig. 7)。

DC のマウス肝発がん機序に関連する

と考えられる遺伝子の発現解析では、薬物代謝第一相系酵素である *Cyp1a1* と *Cyp1a2* が DEN 単独群に比べ、375ppm 以上の DC 投与群または全 DC 投与群において有意な発現増加が認められた。さらに、DNA 修復に関連する *OGG1* の mRNA も 750ppmDC 投与群において DEN 単独群に比べ有意に発現増加した。しかし、代謝・酸化ストレスまたは DNA タメージ/修復に関連する *Erc5*, *Por(NADPH)*, *Txnrd1*, *Sod1* および *Gpx2* については mRNA の発現増加が観察されなかった (Fig. 8)。

D. 考察

オクスフェンダゾールとメラトニン併用投与による肝前がん病変の修飾作用：DEN-OX 群に対する MLT の併用投与は、DEN-OX 群で認められた有意な GST-P 陽性巢の数の増加を DEN 単独群レベルにまで減少させた。この結果は DEN-OX 群における肝発がんプロモーション作用に対して、MLT が抑制的に修飾したことを示す。加えて、DEN-OX 群から抽出した肝ミクロソーム分画を用いた *In vitro* ROS 産生実験では、MLT の添加により ROS 産生量の有意な減少が認められた。この結果は MLT が ROS に対する抑制効果を有するという報告と一致し、さらにこの事実は OX の有する肝発がんプロモーション作用が ROS 産生の減少により抑制された可能性を強く示唆する。

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、DEN-OX 投与群で発現上昇が認められた薬物代謝第一相酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2b2* 並びに解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Afar*、*Me1* の発現が、MLT 投与により有意に低下し

た。CYP1A や 2B 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 誘導剤や Phenobarbital 等の CYP2B を誘導する薬剤では、それらの代謝過程において ROS の過剰産生に加えて、肝発がんを誘発することが知られている。更に、本研究では、CYP 酵素の活性化に必要な NADPH の供給にかかわる *Me1* の mRNA レベルが MLT 併用投与により低下した。加えて、解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Akr7a3* の発現も MLT 併用投与により低下した。CYP 分子種の発現低下に加えて、解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子の発現低下が見られたことは、OX の代謝過程において産生される過剰な ROS あるいは親電子物質が減少したことを意味し、結果的にこれらの減少が OX の肝発がんプロモーション作用に対して抑制的に働いたものと推察された。

以上の結果から、OX の肝発がんプロモーション作用には、OX の肝発がん過程に生じると考えられる活性酸素種産生の増加が関与していることが示唆された。ジサイクラニルのマウス肝発がんプロモーション閾値に関する研究：これまでの DC の肝二段階発がん性試験においては、1500 ppm DC 投与群で GGT 陽性細胞率の数と PCNA 陽性細胞率が対照群に比べ有意に増加が報告されていた (Motoら, *Toxicology*, 207, 419-436, 2005; Motoら, *Toxicol. Pathol.*, 34, 744-751, 2006)。しかし、本実験において、750 ppm DC 投与群では、DEN 単独投与群と比較して PCNA 陽性細胞率の有意な増加が観察されたが、GGT 陽性細胞数の有意な増加は見られなかった。これらの結果は、今回の実験条件下では、DC の肝発がんプロモ

ーション作用の閾値が 750 ppm より高いことが示唆された。

これまで、*Cyp1a1*, *Cyp1a2* が肝発がん早期過程において発現上昇し、さらにこれらはミクロソーム酸化の副産物として ROS を産生することが知られている (Guengerrich and Shimada, 1991, Puntarulo and Ceberbaum, 1998)。また *Cyp1a1*, *Cyp1a2* は他の CYP よりも ROS の産生に広く関わっていることが報告されている (Paolini ら, *J. Invest. Met.*, 44, 470-473, 1996; Putarulo and Cederbaum, *Free. Radical. Bio. Med.*, 24, 1324-1330, 1998; Valgimigli ら, *Free. Radical. Bio.*, 31, 708-716, 2001)。今回の実験では、*Cyp1a1* と *Cyp1a2* が DEN 単独群に比べ、375 ppm 以上の DC 投与群または全 DC 投与群において有意に発現増加していることが確認された。一方 OGG1 の mRNA の有意な発現増が 750 ppm DC 群において認められた。OGG1 は酸化 DNA タメージの指標であることがよく知られている (Nakae ら, *Cancer. Res.*, 57, 1281-1287, 1997; Yoshida ら, *Cancer. Lett.*, 141, 99-107, 1999; Kinoshita ら, *Carcinogenesis.*, 23, 341-349, 2002; Kinoshita ら, *Carcinogenesis.*, 24, 1389-1399, 2003)。さらに、以前の研究において、DC の投与により DNA 修復に関連する遺伝子の発現上昇が認められた (Moto ら, *Toxicology.*, 207, 419-436, 2005)。しかし、今回の実験では、DC 投与群の肝臓において、肝ミクロソーム由来の ROS 産生量が DEN 単独群に比べ増加傾向にはあるものの有意な差は認められなかった。さらに、代謝・酸化ストレスまたは DNA タメージ/修復に関連する *Txnrd1*, *Por*, *Aldh1a1*, *Sod1*, *Gpx2* や *Ercc5* なども DC

投与群において DEN 単独群に比べ有意に発現増加しなかった。これらの結果から、*Cyp1a1*, *Cyp1a2* は DC の毒性に対してもっとも感受性が高い分子マーカーであるが、750 ppm またはそれ以下の濃度の DC 投与群におけるこれらの発現増加は ROS の産生に不十分であることが推察された。

E. 結論

オクスフェンダゾールとメラトニン併用投与による肝前がん病変の修飾作用: OX を 500 ppm 含有する飼料を 10 週間ならびに抗酸化剤であるメラトニンをラット肝二段階発がんモデルに同時併用投与した結果、OX 誘発前がん病変の形成が抑制されたことから、OX の肝発がんプロモーション作用には活性酸素種産生の増加が関与していることが示唆された。

ジサイクラニルのマウス肝発がんプロモーション閾値に関する研究: 今回の実験において、PCNA 陽性細胞率と酸化ストレスまたは DNA 修復に関連する *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *OGG1* は 750 ppm DC 投与群で DEN 単独群に比べ有意に増加したが、GGT 陽性細胞数やミクロソーム由来の ROS の産生量は有意に増加しなかった。従って、今回の研究結果では、DC の発がんプロモーション作用の閾値は 750 ppm より高いことが示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Nishimura, J., Saegusa, Y., Dewa, Y., Jin, M., Kawai, M., Matsumoto, S., Harada, T., Hayashi, S., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Modifying effects of enzymatically modified isoquercitrin or melatonin on oxfendazole-induced liver tumor promotion in rats. 25th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology. Shizuoka, Japan, January, 2009.

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

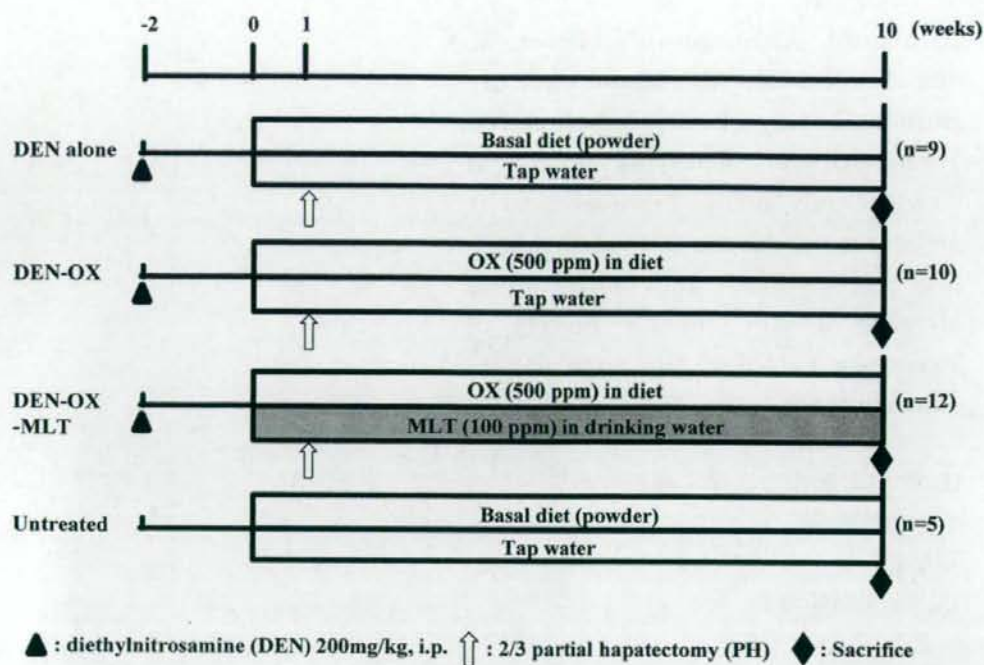


Figure 1 Experimental design