

Figure 2 The effect of coadministration of EMIQ or MLT on the area and number of GST-P positive foci in the liver of rats given OX after DEN initiation. Values are expressed as mean \pm SD of rats of DEN alone group (n=9), DEN-OX group (n=10), DEN-OX-EMIQ group (n=11) and DEN-OX-MLT group (n=12). *p < 0.05, significantly different from the DEN alone group, as determined by Student's *t*-test or Aspin-welch *t*-test. ##p < 0.01, significantly different from the DEN-OX group, as determined by Duunett's rank or d-test.

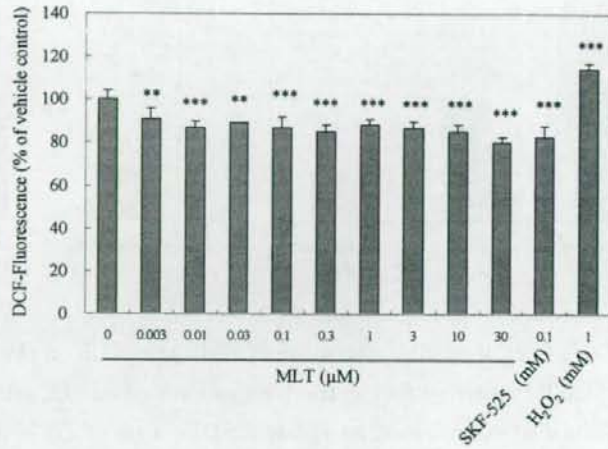


Figure 3 The effect of addition of EMIQ (A) or MLT (B) on hepatic microsomal ROS production of rats given OX after DEN initiation. The formation of DCF as a reactive marker of ROS was measured at an excitation of 485 nm/emission of 528 nm. Columns represent the relative value of fluorescent strength estimated at 100% in the absence of OX (vehicle control: 0 mM). The *in vitro* addition of SKF-525A or H₂O₂ significantly suppressed or increased ROS production in microsomes isolated from rats treated with OX, respectively. Values are expressed as mean \pm SD. ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$, significantly different from the vehicle control values, as determined by Dunnett's rank or d-test.

Table 1 The effect of coadministration of EMIQ or MLT on body weight, food intake, water intake and liver weight of rats given OX after DEN initiation

Groups	DEN alone	DEN-OX	DEN-OX-MLT	Untreated
Number of rats	9	10	12	5
Final body weight (g)	276.8±21.2 ^a	283.4±23.3	255.1±22.6 [#]	303.2±16.5
Food intake (g) ^b	16.9±1.0	17.9±1.4	16.8±2.2	17.8±2.5
OX exposure (mg/kg BW/day)		38.2±9.0	38.7±8.4	
Water intake (mL) ^b	19.1±2.1	21.2±2.3	20.8±3.6	15.2±4.5
Antioxidant exposure (mg/kg BW/day)			9.6±2.4	
Absolute liver weight (g)	6.94±0.56	8.46±0.97 ^{**}	7.67±0.80	8.12±0.79
Relative liver weight (g)	2.51±0.09	2.98±0.10 ^{***}	3.01±0.13 ^{***}	2.69±0.38

^aValues are expressed as mean ± S.D.

^bCalculated from the weekly monitoring data.

^{**}p < 0.01 or ^{***}p < 0.001, significantly different from the DEN alone group, as determined by Dunnett's rank or d-test.

[#]p < 0.05, significantly different from the DEN-OX group, as determined by Dunnett's rank or d-test.

Table 2 The effect of coadministration of EMIQ or MLT on mRNA expression levels in the livers of rats given OX after DEN initiation

Group Gene name	DEN alone 5 ^a	DEN+OX 5	DEN+OX+MLT 5	Untreated 5
<i>Cyp1a1</i>	1.07±0.46 ^b	15.51±2.95 ^{***}	9.59±2.72 ^{**, #}	0.94±0.55
<i>Cyp1a2</i>	1.00±0.11	4.10±0.67 ^{***}	3.12±0.85 ^{***}	1.26±0.20
<i>Cyp2b2</i>	1.03±0.29	3.51±0.70 ^{***}	2.36±0.84 ^{*, #}	1.85±0.58
<i>Afar</i>	1.00±0.08	2.59±0.55 ^{***}	1.68±0.27 ^{*, #}	1.20±0.27
<i>Me1</i>	1.01±0.16	2.50±0.41 ^{***}	1.65±0.26 ^{*, ##}	1.19±0.38
<i>Nqo1</i>	1.01±0.17	2.53±0.31 [*]	2.30±0.85 [*]	0.63±0.10
<i>Gpx2</i>	1.07±0.48	3.51±0.48 ^{**}	4.42±2.78 ^{**}	0.71±0.42
<i>Gstm1</i>	1.06±0.38	4.74±0.33 ^{***}	4.73±1.70 ^{***}	0.93±0.46
<i>Yc2</i>	1.06±0.41	2.80±1.08	3.95±1.86 [*]	0.55±0.30

^aNumber of rats examined

^bValues of mRNA expression levels (normalized by *Hprt*) are expressed as mean ± S.D.

The mRNA expression levels are calculated according to the 2-ddCt method and normalized by *Hprt* as an endogenous control.

*p < 0.05, **p < 0.01 or ***p < 0.001, significantly different from the DEN alone group, as determined by Duunett's rank or d-test.

p < 0.05 or ## p < 0.01, significantly different from the DEN-OX group, as determined by Duunett's rank or d-test.

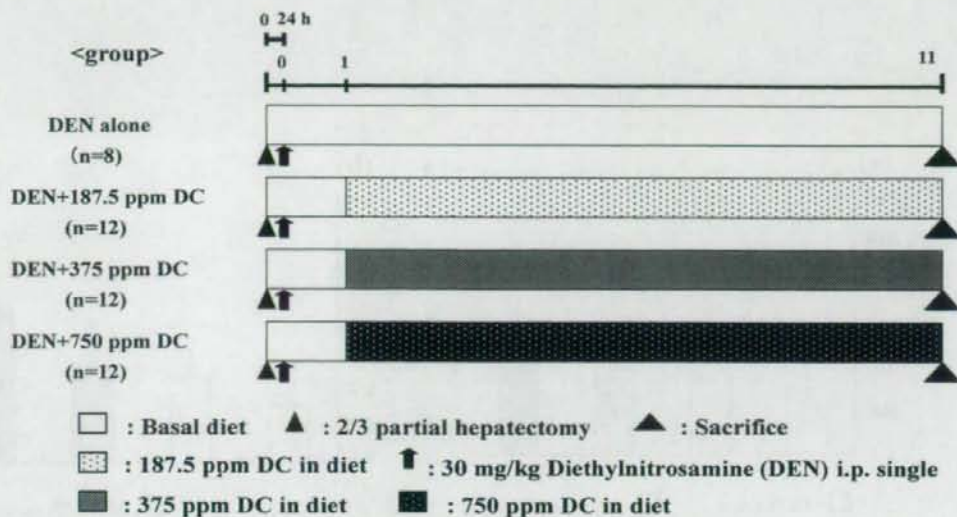


Fig. 4 Experimental design

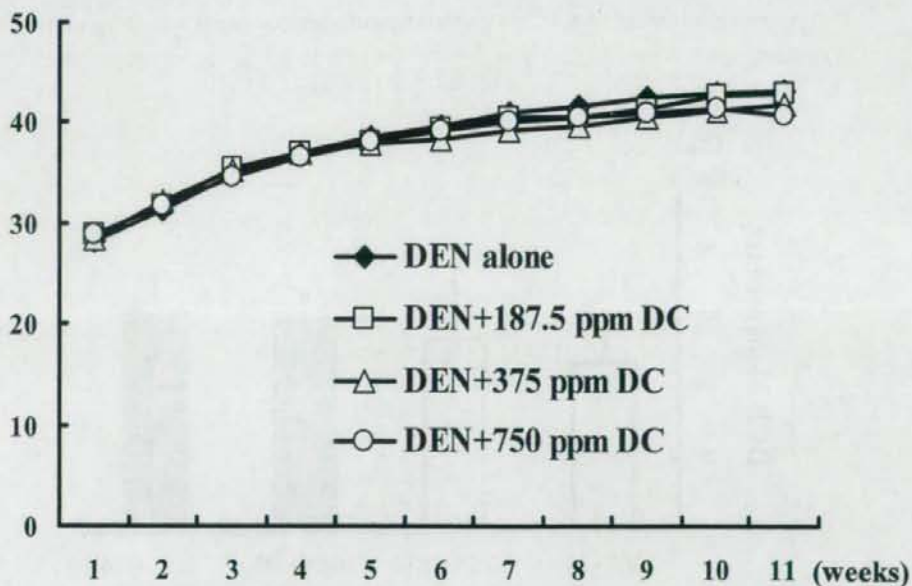


Fig. 5. Body weight changes of mice given DC for 10 weeks after DEN initiation

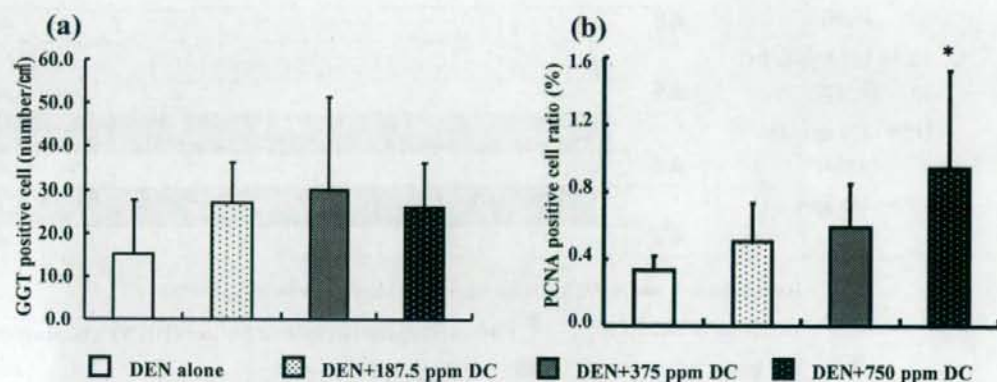


Fig. 6. The number of GGT positive cells and the PCNA positive ratio in mice given DC for 10 weeks after DMN initiation. Each graph shows the number of GGT-positive cells (a) and the PCNA-positive cell ratio (b) in the livers of mice given DC for 10 weeks after DEN initiation. Column represents means \pm SD. *Significantly different from the 0 ppm DC group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).

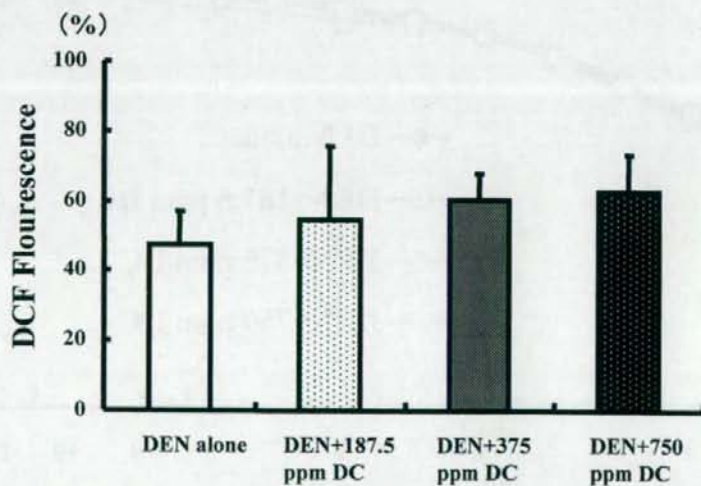


Fig. 7. Effect of DC on hepatic microsomal ROS production. Column represents mean \pm SD.

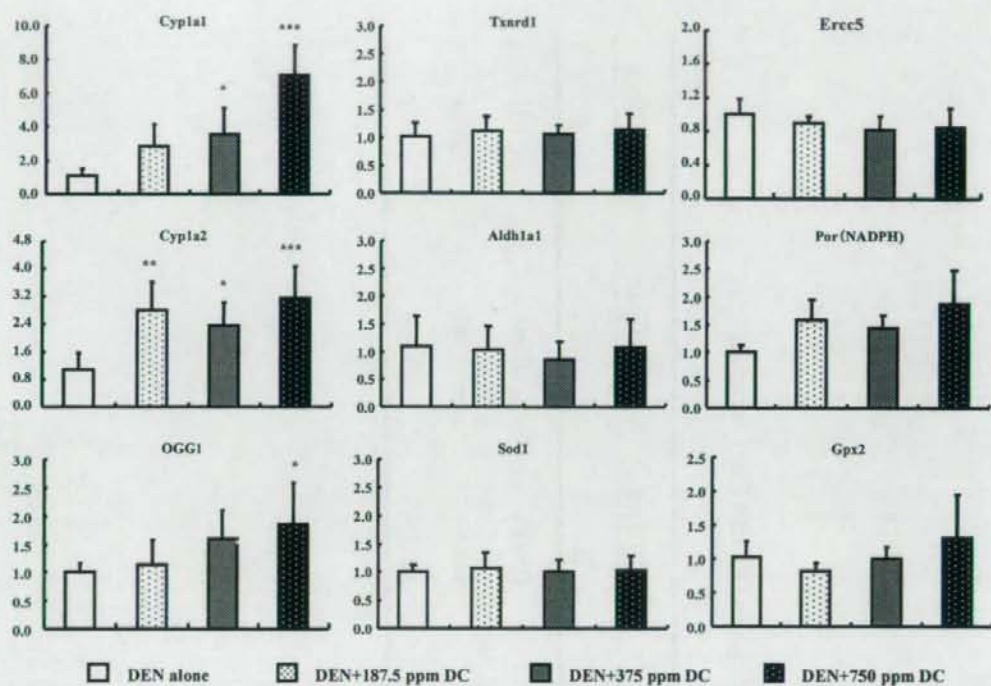


Fig. 8. Real time RT-PCR analysis of mRNA expression in the livers of rats given DC for 10 weeks after DEN initiation. The expression of target genes was normalized by β -actin. Values are expressed as the group mean fold change over control. Columns represents means \pm SD. *, ** and *** significantly different from the 0 ppm DC group at $p < 0.05$, $p < 0.01$ or $p < 0.001$, respectively (Dunnett's test).

Table 3. Body and liver weights of mice given DC after DEN initiation

Group	DEN alone	DEN+DC 187.5 ppm	DEN+DC 375 ppm	DEN+DC 750 ppm
Animal No.	7	12	12	10
Body weight (g)	43.8±6.5 ^{a)}	43.5±4.0	42.2±4.0	41.4±3.2
Absolute liver weight (g)	2.0±0.2	2.2±0.9	1.9±0.2	2.0±0.4
Relative liver weight (%)	4.7±0.2	5.0±1.7	4.7±0.5	4.8±0.8

a): Mean±S.D.

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

オックスフェンダゾールの二段階発がんモデルにおける 28 週間投与実験：非遺伝毒性発がん物質と評価されている動物用医薬品オッ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により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。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26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。すなわち、OX投与により腺腫の増加が認められた肝臓では、異物代謝・抗酸化酵素である *Cyp1a1*、*Afar*、*Gpx2* の各 mRNA 発現に増加が認められ、OXを投与した肝臓における酸化ストレスの亢進が示唆された。一方、誘発された肝細胞腺腫では、周辺組織と比較して *Cyp1a1* mRNA の発現低下とともに *Afar* 及び *Gpx2* mRNA の発現増加が確認された。これらの変化は免疫組織化学的解析からも確認され、腫瘍性病変では酸化ストレスに対する防御機構が働いていることが示唆された。また腫瘍性病変では、細胞増殖に関与する PCNA 蛋白に陽性を示す細胞数の増加と共に、細胞増殖抑制に関与する p21 及び C/EBP α 蛋白の発現低下が免疫組織化学的に確認された。以上の結果から、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示唆された。

ジサイクラニル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：昆虫成長調節剤のジサイクラニル (DC) の肝発がん機序における酸化ストレスの関与を蛋白レベルで明らかにするため、二段階肝発がんモデルから得られた雄マウス肝臓を用いて、既上昇が報告されている酸化ストレス応答関連因子の蛋白発現及びその強度を免疫染色にて確認することとしていたが、それを示唆する有益な情報が得られなかった。そのため、平成 19 年度追加研究分の実験である「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」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。その結果、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 解析で、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。

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ックスフェンダゾール(OX)や昆虫成長調整剤として羊に用

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・抗酸化に関与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 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、酸化ストレスに起因した二次的 DNA 損傷が関与する可能性を明らかにしてきた。さらに、DC により増強した肝腫瘍部においては、酸化ストレスばかりでなく、酸化 DNA 損傷修復能並びにアポトーシス誘導能への抑制的な影響が生じている可能性が示唆された。

そこで本年度も OX と DC の肝発がん機序についてのさら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おける、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の解析、②DC 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を明らかにするための実験を行った。

B. 研究方法

オックスフェンダゾールの二段階発がんモデルにおける 28 週間投与実験：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) にイニシエーターである diethylnitrosamine (DEN) を 200 mg/kg で腹腔内投与し、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 26 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・OX 0.05% 投与群各 9 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ないしメタカン溶液で固定し、それぞれ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免疫組織化学染色を施し、光学顕微鏡下にて観察を行った。免疫組織化学的検索で用いた抗体並びに抗原賦活化処理を施したものについてはその条件を Table 1 に記載した。mRNA 発現解析については、メタカン溶液で固定後パラフィン包埋した肝細胞腺腫及びその周辺組織並びに DEN 単独群の正常組織について各 4 例ずつ mRNA を抽出し、酸化ストレス及び細胞増殖関連遺伝子の発現 (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。解析に用いた各プライマーを Table 2 に示した。

ジサイクラニル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：平成 19 年度追加研究分の実験である「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」にて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、*Cyclin G1* (*Ccng1*)、Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (*Gadd45a*)、Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*Cdkn1a*)、Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (*Cdkn1b*)、Tumor protein p53 (*Tp53*)、Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand 10 (*Trail*) とした。

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た。また変異細胞巣及び肝細胞腺腫の発生個数及び発生頻度については Wilcoxon 検定を実施した。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

オックスフェンダゾールの二段階発がんモデルにおける 28 週間投与実験: 実験期間を通じて、OX 投与による体重及び摂餌量に変化は観察されなかった (Fig. 2、Table 3)。

OX 投与群の肝臓では、DEN 単独群と比較して前がん病変マーカーである glutathione S-transferase, placental

form (GST-P) 陽性巣の数・面積の増加と共に、好酸性ないし明細胞性の変異細胞巣並びに肝細胞腺腫の発生個数及び発生頻度に有意な増加が確認された (Fig. 3、Table 4)。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は、DEN 単独群と比較して OX 投与群で有意な増加がみられたが、OX により誘発された変異細胞巣及び肝細胞腺腫ではさらに増加していることが確認された (Fig. 3、Table 5)。

OX 投与により誘発された変異細胞巣及び肝細胞腺腫における酸化ストレス・細胞増殖関連分子の免疫組織学的解析結果を Fig. 4・5 に、DEN 単独群、OX 投与群の正常組織及び肝細胞腺腫における酸化ストレス・細胞増殖関連分子の mRNA 発現解析結果を Fig. 6 にそれぞれ示した。

酸化ストレス関連分子に対する発現解析の結果、OX 投与により誘発された変異細胞巣及び肝細胞腺腫の細胞質では、周辺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て、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 (Fig. 4)。これらの変化は mRNA レベルにおいても確認され、*Cyp1a1* mRNA については、OX を投与した肝臓では DEN 単独群と比較して有意な増加が認められたが、一方肝細胞腺腫ではその周辺組織と比較して発現レベルは有意に減少した。また *Afar* 及び *Gpx2* の mRNA は DEN 単独群 < OX 投与群の周辺組織 < 肝細胞腺腫の順に発現レベルの増加が確認された (Fig. 6)。

細胞増殖関連分子に対する発現解析の

結果、OX 投与により誘発された変異細胞巢及び肝細胞腺腫の細胞質では、それらの周辺組織と比較して、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(Fig. 5)。これらの変化は、有意差は認められなかったものの mRNA レベルにおいても減少する傾向が観察された(Fig. 6)。

ジサイクラニル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 (西村): 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 (Figure 7)。

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 (Figure 8)。

D. 考察

オックスフェンダゾールの二段階発がんモデルにおける 28 週間投与実験: OX 投与群では、DEN 単独投与群と比較して GST-P 陽性巢の数・面積と共に変異細胞巢及び肝細胞腺腫の有意な増加が観察され、OX の肝発がんプロモーション作用が確認された。

前年度の申請者における研究から、OX の発がんプロモーション早期では OX の代謝過程に起因すると考えられる活性酸素種(ROS)産生量の増加に加え、過酸化脂質や酸化 DNA 損傷(8-hydroxydeoxyguanosine; 8-OHdG)レベルの上昇が確認されており、OX 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。同様に PCNA 陽性細胞数の増加が確認されているが、これらの腫瘍形成への関与は明らかではない。そこで今回、OX の投与期間を通常のラット肝二段階発がんモデルにおいて用いられる 6 週間から 26 週間に延長することで誘発された腫瘍性病変について、免疫組織化学的解析に加え部位特異的 real-time RT-PCR 解析を行い、酸化的ストレス及び細胞増殖関連分子の遺伝子発現動態を解析した。

その結果、OX 投与により誘発された変異細胞巢及び肝細胞腺腫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 レベルで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は発現が低下するのに対して、薬物代謝第二相系酵素は発現が増加することが知られている (Farber et al., *Biochem. Pharmacol.*, 39, 1837-46, 1990)。またラットヘパトーマ細胞株 (H4IIEC3) の分化型亜種では、TCDD のような典型的な芳香族炭化水素による CYP1A 酵素誘導が起きないことが報告されている (Gudas and Hankinson, *Somat. Cell Mol. Genet.* 13, 513-28, 1987)。従って、今回確認された結果は、OX 投与により惹起された酸化的ストレスが腫瘍性病変の形成過程において回避されている可能性を示唆するものと考えられた。今回の研究では、DEN でイニシエートされた前がん病変細胞が OX 投与によりどのようなメカニズムで腫瘍へと進展していくのか、その分子メカニズムの詳細は不明であったが、肝発がんプロモーターの一つである TCDD では、その持続暴露により何らかの選択淘汰が作用し、変異細胞がより増殖

しやすい環境を作り出しているといった作業仮説が提唱されている(Hines et al., Drug Metab. Dispos. 29, 623-33, 2001; Bock and Köhle, Biochem. Pharmacol. 72, 393-404, 2006)。従って、OXのようなCYP1A誘導剤は、プロモーション期における持続的な暴露により酸化ストレスを含む選択淘汰を促進させており、その結果の一つとして酸化ストレスからの回避機構が存在する可能性が推察された。

細胞増殖関連分子についても同様の解析を行った結果、OX投与により誘発された変異細胞巣及び肝細胞腺腫では周辺組織と比較して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C/EBP α 蛋白の染色性低下が観察された。C/EBP α は転写因子として種々の遺伝子発現制御に関与するが、転写後修飾作用の一つとしてp21蛋白の安定化を介してPCNA活性を抑制することが示唆されている(Timchenko et al., Genes Dev. 10., 804-15, 1996)。またC/EBP α ノックインマウスでは、DENでイニシエートした肝臓における発がん感受性が低下することが報告されている(Tan et al., Cancer Res. 65, 10330-7, 2005)。従って、変異肝細胞巣及び肝細胞腺腫で確認された細胞増殖関連分子の発現動態は、これらの病変において細胞増殖活性が亢進していることを反映したものであると推察された。

以上の結果から、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示唆された。

ジサイクラニル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: WHO

による報告では、DCは遺伝毒性を有さないものの、マウス肝における肝腫瘍の形成を増加させることが報告されている。本研究における分子病理学的解析から、DCの肝前がん病変形成期におけるアポトーシスの関与は軽微であることが示唆された。

DCによる肝前がん病変形成期の肝組織における遺伝子発現解析では、アポトーシスの亢進に関与する*Trail*の有意な発現低下が高用量群(750 ppm)で認められた。*Trail*はtumor necrosis factor familyの一つであり、腫瘍細胞をアポトーシスへ誘導する機能の一部を担っている因子であるが、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る。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。

E. 結論

オックスフェンダゾールの二段階発がんモデルにおける 28 週間投与実験 : OX を 0.05%含有する飼料を 26 週間、ラット肝二段階発がんモデルにおいて与え、誘発された腫瘍性病変における遺伝子発現解析を実施した結果、OX による肝腫瘍誘発機序の一部には、酸化ストレスからの回避及び細胞増殖亢進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前がん病変形成期におけるアポトーシスの関与 (西村) : 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を検討した結果、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。

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.

2. 学会発表

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

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

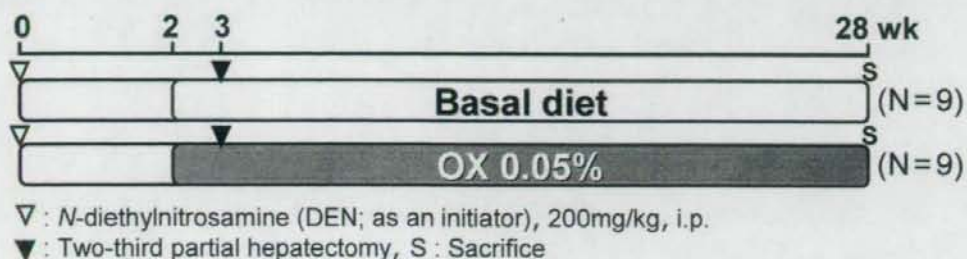


Fig. 1. Experimental design

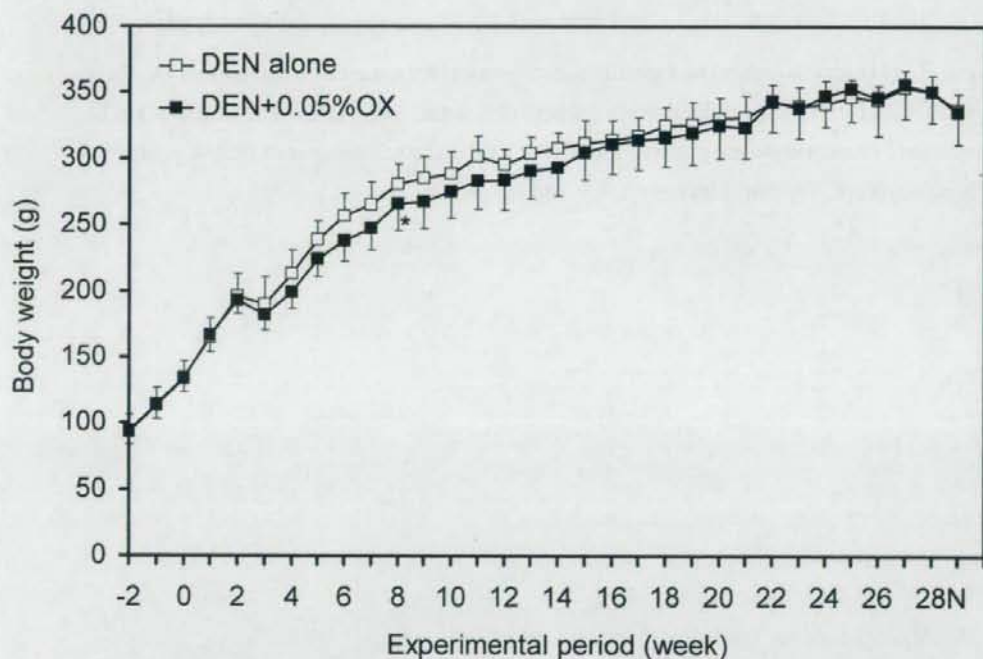


Fig. 2. Effect of OX on body weight changes in rats given 0% (white square) or 0.05% (black square) of OX after DEN initiation. * indicates significant differences from DEN alone ($p < 0.05$, Student's *t*-test). N: necropsy.

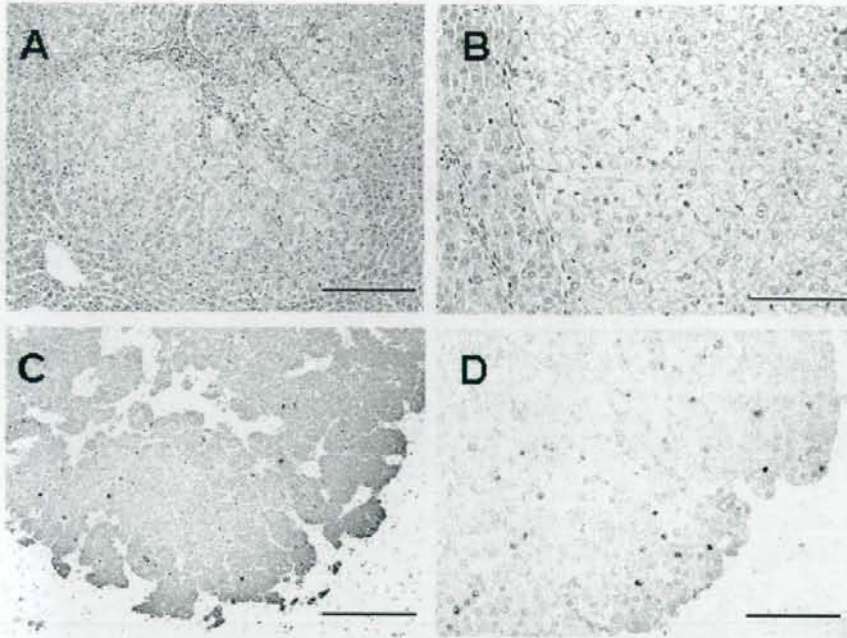


Fig. 3. Histopathological and immunohistochemical appearance of altered foci (A, C) and HCAs (B, D). Representative photographs of altered foci (A) and HCAs (B) of H&E staining. These lesions are positive for GST-P with increased number of PCNA-positive hepatocytes (C, D). Bar: 200 μm (A, C); 500 μm (B, D).

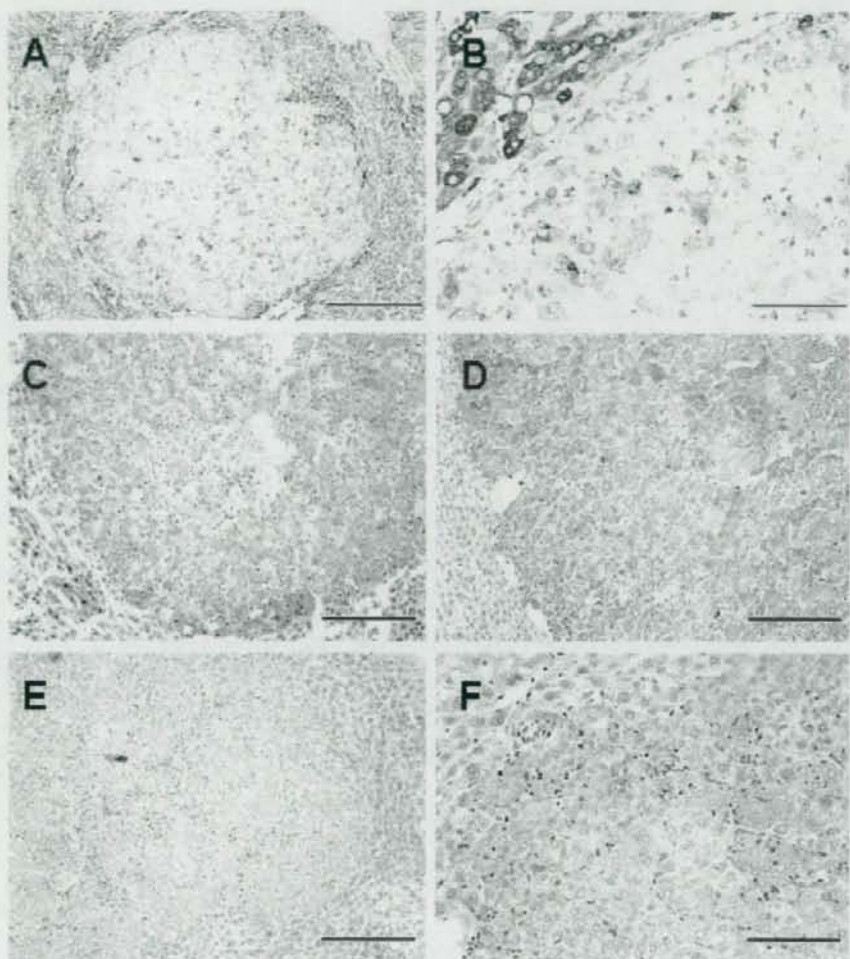


Fig. 4. Immunohistochemical staining of altered foci (A, C, E) and HCAs (B, D, F). These lesions are mostly negative for CYP1A1 (A, B) and positive for AFAR (C, D) and GPX2 (E, F) in the cytoplasm. Bar: 200 μ m (A, C, E); 500 μ m (B, D, F).

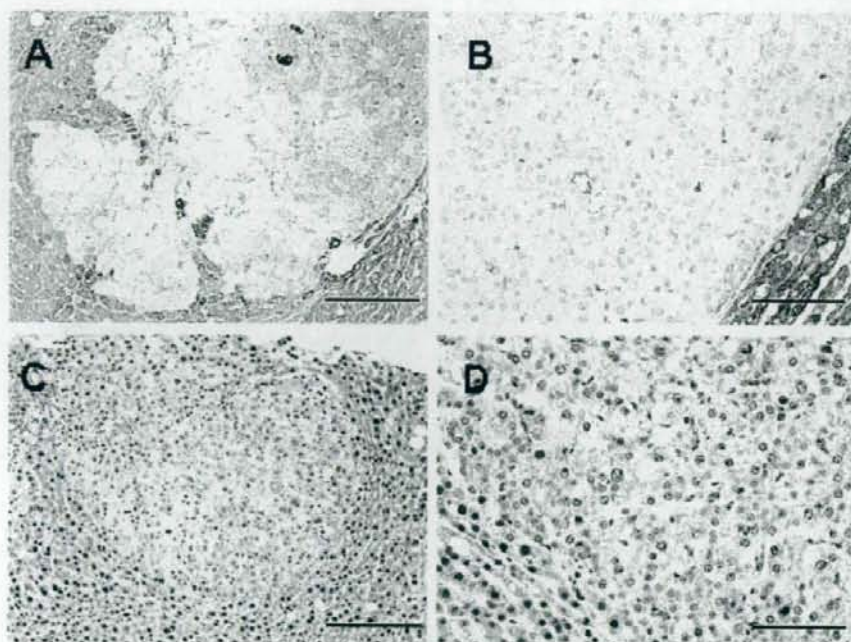


Fig. 5. Immunohistochemical staining of altered foci (A, C) and HCAs (B, D). These lesions are mostly negative for p21 (A, B), C/EBP α in the nuclei. Bar: 200 μ m (A, C); 500 μ m (B, D).

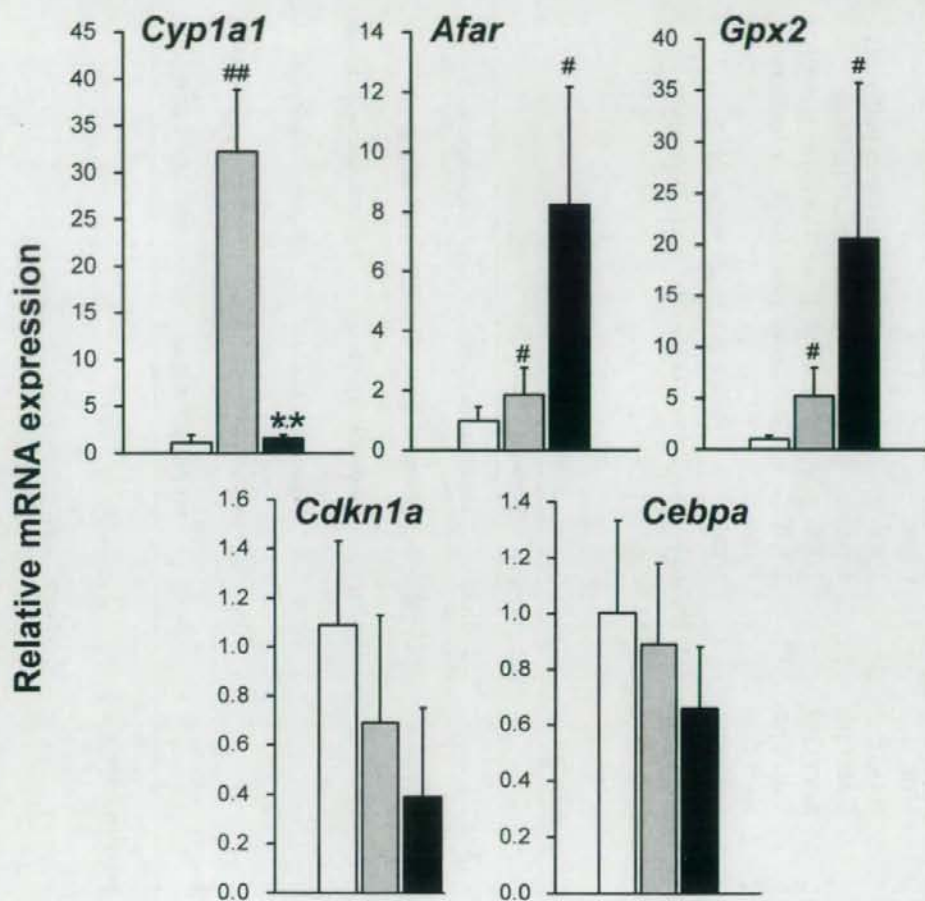


Fig. 6. Region-specific mRNA expressions of *Cyp1a1*, *Afar*, *Gpx2*, *Cdkn1a* and *Cebpa*. Each column represents the mean + S.D. of the relative mRNA expression levels in normal appearance livers (white column) in four DEN control animals, and HCAs (black column) or the surrounding tissues (gray column) in each of 4 rats given 0.05% OX after DEN initiation. #, ##, ** indicate significant differences from normal appearance livers in DEN controls or OX-treated animals (#, ## $p < 0.05$, 0.01 , ** $p < 0.01$, respectively; Aspin-Welch's t-test).

Table 1 Immunohistochemical methods for analysis of OX-induced liver lesions

Antigen	Type of Antibody	Manufacturer	Dilution	HIER ^a conditions
GST-P	Rabbit polyclonal (JM-3997-3)	MBL ^b	1/2000	—
PCNA	Mouse monoclonal (M0879)	DAKO ^c	1/400	Microwave oven with citrate buffer (pH 6.0)
p21	Rabbit polyclonal (sc-397)	Santa Cruz ^d	1/100	Boiled with citrate buffer (pH 6.0)
C/EBP α	Rabbit polyclonal (sc-61)	Santa Cruz	1/200	Boiled with Tris-EDTA buffer (pH 9.0)
CYP1A1	Rabbit polyclonal (sc-20772)	Santa Cruz	1/100	Microwave oven with citrate buffer (pH 6.0)
AKR7 (AFAR)	Rabbit polyclonal (sc-32944)	Santa Cruz	1/100	—
GPX2	Goat polyclonal (ab36140)	Abcam ^e	1/100	Boiled with citrate buffer (pH 6.0)

^aHeat-induced epitope retrieval; ^bMedical and Biological Laboratories Co. Ltd., (MBL; Nagoya, Japan); ^cDAKO (Glostrup, Denmark);

^dSanta Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA); ^eAbcam Inc. (Cambridge, MA).

Table 2 Sequence of primers using real-time RT-PCR analysis

Accession No.	Gene description	Gene symbol	Forward	Reverse
NM_080782	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)	<i>Cdkn1a</i>	cagccacaggcaccatgct	cagacgacggcactactgtct
NM_012524	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	<i>Cebpa</i>	ggcgggaacgcaaca	tctccacgttgccgtgttt
X00469	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	<i>Cyp1a1</i>	gccttcacatcagccacaga	ttgtgactctaaccaccagaatc
NM_013215	Aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase, <i>Akr7a3</i>)	<i>Afar</i>	ccgctttctgggaatccat	ggcgatgccattgaagtgt
NM_183403	Glutathione peroxidase 2	<i>Gpx2</i>	accgatcccaagctcatca	tctcaaagttccaggacacatctg
NM_012583	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase ^a	<i>Hprt</i>	gccgaccggttctgcat	tcataacctggtcatcatcactaatc

^aControl gene for normalization of relative mRNA expression level