

Table 1. Body and liver weights of mice treated with PBO after DEN-initiation

	DEN-alone	DEN+PBO
No of animal	8	15
Final body weight (g)	51.43 ± 6.37 ^{a)}	46.38 ± 2.84*
Absolute liver weight (g)	2.91 ± 0.92	8.12 ± 2.52**
Relative liver weight (% body weight)	5.60 ± 1.54	17.42 ± 4.99**

a) mean ±SD, *, **, P<0.05, 0.01 vs. DEN-alone (Student's-t test)

Table 2. Incidences and multiplicities of proliferative lesions in the liver of mice treated with PBO after DEN-initiation

	DEN-alone		DEN+PBO	
	Incidence	Multiplicity	Incidence	Multiplicity
Foci of alteration	8 / 8	5.85 ± 3.71 ^{a)}	15 / 15	4.53 ± 2.06
Hepatocellular adenoma	3 / 8	1.53 ± 2.30	15 / 15	6.26 ± 2.23
Hepatocellular carcinoma	0 / 8	0 ± 0	6 / 15	0.45 ± 0.67

a) mean ±SD

Table 3. List of genes showing up-regulation of methylation status by promotion with PBO in a two-stage hepatocarcinogenesis model (ratio of PBO ≥ 1.5 fold and ratio of DEN ≤ 1 fold)

Probe No.	Genome Location	Downstream Gene Symbol	Description	Downstream MGI No.
CHR01FS122434416	chr1:122434416-122434465	En1	engrailed 1	MGI:95389
CHR02FS032434346	chr2:32434346-32434395	St6galnac6	ST6(alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6	MGI:1355316
CHR02FS118593175	chr2:118593175-118593224	Bahd1	bromo adjacent homology domain containing 1	MGI:2139371
CHR04FS106750569	chr4:106750569-106750618	Lrrc42	leucine rich repeat containing 42	MGI:1925059
CHR04FS131320681	chr4:131320681-131320730	Epb4.1	erythrocyte protein band 4.1	MGI:95401
CHR05FS031728995	chr5:31728995-31729044	Zfp512	Mus musculus zinc finger protein 512	
CHR05FS111079836	chr5:111079836-111079885	Hscb	HscB iron-sulfur cluster co-chaperone homolog(E. coli)	MGI:2141135
CHR06FS003448611	chr6:3448611-3448660	Ccdc132	coiled-coil domain containing 132	MGI:1920538
CHR07FS029435360	chr7:29435360-29435409	1700067C01Rik	RIKEN cDNA 1700067C01 gene	MGI:1923968
CHR07FS142278313	chr7:142278313-142278373	Lsp1	lymphocyte specific 1	MGI:96832
CHR07FS143426694	chr7:143426694-143426743	Tnfrsf26	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 26	MGI:2651928
CHR08FS013870120	chr8:13870120-13870176	Zfp828	zinc finger protein 828	
CHR08FS075169137	chr8:75169137-75169186	Ap1m1	adaptor-related protein complex AP-1, musubunit 1	MGI:102776
CHR08FS127118305	chr8:127118305-127118354	Galnt2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptideN-acetylgalactosaminyltransferase 2	MGI:894694
CHR09FS064609389	chr9:64609389-64609438	F730015K02Rik	Mus musculus RIKEN cDNA F730015K02 gene	
CHR09FS108436470	chr9:108436470-108436519	Wdr6	WD repeat domain 6	MGI:1930140
CHR09FS114580016	chr9:114580016-114580065	Cmtm6	CKLF-like MARVEL transmembrane domaincontaining 6	MGI:2447165
CHR10FS041499044	chr10:41499044-41499093	Sesn1	sestrin 1	MGI:2155278
CHR10FS079090972	chr10:79090972-79091021	Cdc34	cell division cycle 34 homolog (S.cerevisiae)	MGI:102657
CHR11FS114980153	chr11:114980153-114980202	Slc9a3r1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogenexchanger), isoform 3 regulator 1	MGI:1349482
CHR12FS071371758	chr12:71371758-71371807	Tmx1	thioredoxin-related transmembrane protein 1	MGI:1919986
CHR12FS102684134	chr12:102684134-102684183	Rin3	Ras and Rab interactor 3	MGI:2385708
CHR12FS104739680	chr12:104739680-104739729	Serpina3m	serine (or cysteine) peptidase inhibitor,clade A, member 3M	MGI:98378
CHR13FS095040997	chr13:95040997-95041056	Arsb	arylsulfatase B	MGI:88075
CHR16FS011167882	chr16:11167882-11167931	Gspt1	Mus musculus G1 to S phase transition 1 (Gspt1), transcript variant 1	
CHR17FS006095443	chr17:6095443-6095492	Tulp4	tubby like protein 4	MGI:1916092
CHR17FS024233973	chr17:24233973-24234022	Caskin1	CASK interacting protein 1	MGI:2442952
CHR17FS084177453	chr17:84177453-84177502	Thada	thyroid adenoma associated	MGI:3039623
CHR19FS025572722	chr19:25572722-25572771	Dmrt1	Mus musculus doublesex and mab-3 related transcription factor 1	MGI:1354733
CHRXFS146153853	chrX:146153853-146153902	Maged2	melanoma antigen, family D, 2	MGI:1933391
CHRYFS002115571	chrY:2115571-2115629	Rbmy1a1	RNA binding motif protein, Y chromosome, family 1, member A1	MGI:104732

MGI No.; Gene ID of Mouse Genome Informatics Database

Table 4. List of genes showing up-regulation of methylation status in the DEN-alone group in a two-stage hepatocarcinogenesis model (ratio of PBO ≤ 1 fold and ratio of DEN ≥ 1.5 fold).

Probe No.	Genome Location	Downstream Gene Symbol	Description	Downstream MGI No.
CHR01FS074884653	chr1:74884653-74884702	Ihh	Indian hedgehog	MGI:96533
CHR01FS094426839	chr1:94426839-94426888	Olfrl1411	Mus musculus olfactory receptor 1411 (Olfrl1411), mRNA	MGI:1345184
CHR01FS095167483	chr1:95167483-95167532	Pask	PAS domain containing serine/threonine kinase	MGI:2155936
CHR01FS133571875	chr1:133571875-133571924	Slc26a9	solute carrier family 26, member 9	MGI:2444594
CHR01FS154718339	chr1:154718339-154718388	Nmnat2	nicotinamide nucleotide adenyllyltransferase 2	MGI:2444155
CHR01FS169303357	chr1:169303357-169303406	Lrrc52	leucine rich repeat containing 52	MGI:1924118
CHR01FS174165641	chr1:174165641-174165690	Kcnj9	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9	MGI:108007
CHR01FS174318892	chr1:174318892-174318941	Igsf9	Mus musculus immunoglobulin superfamily, member 9	MGI:2135283
CHR01FS175372333	chr1:175372333-175372383	BC094916	cDNA sequence BC094916	MGI:3584522
CHR01FS175887051	chr1:175887051-175887100	Olfra432	olfactory receptor 432	MGI:3030266
CHR01FS180701274	chr1:180701274-180701332	Kif26b	kinesin family member 26B	MGI:2447076
CHR02FS018594687	chr2:18594687-18594736	Comm3	COMM domain containing 3	MGI:88218
CHR02FS025401053	chr2:25401053-25401102	Gm996	gene model 996, (NCBI)	MGI:2685842
CHR02FS032035919	chr2:32035919-32035968	5830434P21Rik	RIKEN cDNA 5830434P21 gene	MGI:1923304
CHR02FS090919021	chr2:90919021-90919070	Mybpc3	myosin binding protein C	MGI:102844
CHR02FS124759585	chr2:124759585-124759634	Slc24a5	solute carrier family 24, member 5	MGI:2677271
CHR02FS148087386	chr2:148087386-148087435	Sstr4	somatostatin receptor 4	MGI:105372
CHR02FS153635767	chr2:153635767-153635816	Gm1006	gene model 1006, (NCBI)	MGI:2685852
CHR02FS168626303	chr2:168626303-168626352	Zfp64	zinc finger protein 64	MGI:107342
CHR02FS172150622	chr2:172150622-172150680	2410001C21Rik	RIKEN cDNA 2410001C21 gene	MGI:1913654
CHR03FS088452136	chr3:88452136-88452185	Paqr6	progesterin and adipoQ receptor family member VI	MGI:1916207
CHR03FS089402303	chr3:89402303-89402352	Efn3	ephrin A3	MGI:106644
CHR03FS094864583	chr3:94864583-94864632	Cgn	cingulin	MGI:1927237
CHR03FS096081265	chr3:96081265-96081314	Plekho1	pleckstrin homology domain containing, family O member 1	MGI:1914470
CHR03FS102142038	chr3:102142038-102142087	Nhlh2	nescent helix loop helix 2	MGI:97324
CHR03FS108172863	chr3:108172863-108172912	Gstm4	Mus musculus glutathione S-transferase, mu 4	MGI:95862
CHR04FS122691107	chr4:122691107-122691156	Hpcal4	hippocalcin-like 4	MGI:2157521
CHR04FS125664952	chr4:125664952-125665001	1700029G01Rik	RIKEN cDNA 1700029G01 gene	MGI:1914188
CHR04FS136568411	chr4:136568411-136568460	Wnt4	wingless-related MMTV integration site	MGI:98957
CHR04FS138091192	chr4:138091192-138091241	Pla2g5	phospholipase A2, group V	MGI:101899
CHR04FS138346852	chr4:138346852-138346901	Htr6	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6	MGI:1196627
CHR04FS140750724	chr4:140750724-140750773	Spen	SPEN homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	MGI:1891706
CHR05FS097632432	chr5:97632432-97632481	C80008	expressed sequence C80008	MGI:2141314
CHR05FS137166978	chr5:137166978-137167027	Emid2	EMI domain containing 2	MGI:2155345
CHR05FS137252516	chr5:137252516-137252565	Cldn15	claudin 15	MGI:1913103
CHR05FS137273570	chr5:137273570-137273619	Plod3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	MGI:1347008
CHR05FS139659081	chr5:139646237-139646286	3110082I17Rik	RIKEN cDNA 3110082I17 gene	MGI:1920462
CHR05FS140776716	chr5:140776716-140776765	Chst12	carbohydrate sulfotransferase 12	MGI:1929064
CHR06FS054873953	chr6:54873953-54874002	Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	MGI:1341839
CHR06FS072479359	chr6:72479359-72479408	Capg	capping protein (actin filament), gelsolin-like	MGI:1098259
CHR06FS129741545	chr6:129741545-129741604	Gm156	Mus musculus gene model 156, (NCBI)	MGI:1098259

Table 4. Continued

Probe No.	Genome Location	Downstream Gene Symbol	Description	Downstream MGI No.
CHR07FS004529254	chr7:4529254-4529303	A430110N23Rik	RIKEN cDNA A430110N23 gene	MGI:3806211
CHR07FS005735465	chr7:5735465-5735514	Zfp787	zinc finger protein 787	MGI:1914359
CHR07FS024841137	chr7:24841137-24841186	Pou2f2	POU domain, class 2, transcription factor 2	MGI:101897
CHR07FS024934929	chr7:24934929-24934978	Zfp526	zinc finger protein 526	MGI:2445181
CHR07FS026544322	chr7:26544322-26544371	Cyp2a5	cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 5	MGI:88597
CHR07FS027035161	chr7:27035161-27035210	Ltbp4	latent transforming growth factor betabinding protein 4	MGI:1321395
CHR07FS044420509	chr7:44420509-44420558	Nr1h2	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	MGI:1352463
CHR07FS045106499	chr7:45106499-45106548	Cd37	CD37 antigen	MGI:88330
CHR07FS045195243	chr7:45195243-45195292	Trpm4	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4	MGI:1915917
CHR07FS101267533	chr7:101267533-101267582	Centd2	centaurin, delta 2	MGI:1916960
CHR07FS101980550	chr7:101980550-101980599	Art1	ADP-ribosyltransferase 1	MGI:107511
CHR07FS103820599	chr7:103820599-103820648	Olfir633	olfactory receptor 633	MGI:3030467
CHR07FS127235365	chr7:127235365-127235414	Zfp689	zinc finger protein 689	MGI:1918381
CHR07FS127921026	chr7:127921026-127921075	Itgax	integrin alpha X	MGI:96609
CHR07FS140053611	chr7:140053611-140053660	Olfir524	olfactory receptor 524	MGI:3030358
CHR07FS142253205	chr7:142253205-142253254	Tnni2	troponin I, skeletal, fast 2	MGI:105070
CHR07FS142301096	chr7:142286913-142286962	Lsp1	lymphocyte specific 1	MGI:96832
CHR07FS142704815	chr7:142704815-142704864	Th	tyrosine hydroxylase	MGI:98735
CHR07FS142850591	chr7:142850591-142850640	R74862	expressed sequence R74862	MGI:2142382
CHR07FS143203802	chr7:143128613-143128662	Kcnq1	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1	MGI:108083
CHR07FS143288403	chr7:143288403-143288452	Slc22a18	solute carrier family 22 (organic cation/transporter), member 18	MGI:1336884
CHR07FS143381706	chr7:143381706-143381755	Cars	cysteinyl-tRNA synthetase	MGI:1351477
CHR08FS027250459	chr8:27250459-27250508	Bag4	BCL2-associated athanogene 4	MGI:1914634
CHR08FS073843410	chr8:73843410-73843459	Mtap1s	microtubule-associated protein 1S	MGI:2443304
CHR08FS074606932	chr8:74606932-74606981	Insl3	Janus kinase 3	MGI:99928
CHR08FS122512155	chr8:122512155-122512204	Kcnq4	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 4	MGI:1913983
CHR09FS020778685	chr9:20778685-20778743	Icam1	intercellular adhesion molecule	MGI:96392
CHR09FS026780236	chr9:26780236-26780285	Ncapd3	non-SMC condensin II complex, subunit	MGI:2142989
CHR09FS057900034	chr9:57900034-57900083	4930535E21Rik	RIKEN cDNA 4930535E21 gene	MGI:1922464
CHR09FS107457343	chr9:107457343-107457392	Sema3b	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	MGI:107561
CHR09FS107909977	chr9:107909977-107910026	Rnf123	ring finger protein 123	MGI:2148796
CHR10FS005977662	chr10:5977662-5977711	Zbtb2	zinc finger and BTB domain containing 2	MGI:2685949
CHR10FS075818488	chr10:75818488-75818537	Pcnt	pericentrin (kendrin)	MGI:102722
CHR10FS079142355	chr10:79142355-79142404	Polrmt	polymerase (RNA) mitochondrial (DNA directed)	MGI:1915843
CHR10FS079538519	chr10:79538519-79538568	Dos	downstream of Stk11	MGI:1354170
CHR10FS080009499	chr10:80009499-80009548	Scamp4	secretory carrier membrane protein 4	MGI:1928947
CHR11FS035851671	chr11:35851671-35851720	Odz2	odd Oz/ten-m homolog 2	MGI:2685949
CHR11FS053478126	chr11:53478126-53478175	Il13	Mus musculus interleukin 13	MGI:102722
CHR11FS059387549	chr11:59387549-59387598	Olfir222	olfactory receptor 222	MGI:3030055
CHR11FS064336586	chr11:64336586-64336635	Hs3st3a1	heparan sulfate (glucosamine)3-O-sulfotransferase 3A1	MGI:1333861
CHR11FS075324993	chr11:75324993-75325042	Prpf8	pre-mRNA processing factor 8	MGI:2179381
CHR11FS076417696	chr11:76417696-76417745	Abr	active BCR-related gene	MGI:107771
CHR11FS078213996	chr11:78213996-78214045	Slc13a2	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 2	MGI:1276558
CHR11FS106165084	chr11:106165084-106165133	Scn4a	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha	MGI:98250
CHR12FS099090122	chr12:99090122-99090171	Ptpn21	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21	MGI:1344406
CHR12FS111747618	chr12:111747618-111747667	Cdc42bbp	Cdc42 binding protein kinase beta	MGI:2136459
CHR12FS113127430	chr12:113127430-113127479	EG382639	predicted gene, EG382639	MGI:3644133
CHR13FS030955247	chr13:30955247-30955296	Exoc2	exocyst complex component 2	MGI:1913732
CHR13FS050442342	chr13:50442342-50442391	Fbxw17	F-box and WD-40 domain protein 17	MGI:1923584
CHR13FS055006265	chr13:55006265-55006314	Unc5a	unc-5 homolog A (C. elegans)	MGI:894682

Table 4. Continued

Probe No.	Genome Location	Downstream Gene Symbol	Description	Downstream MGI No.
CHR14FS030005279	chr14:30005279-30005328	Nisch	nischarin	MGI:1928323
CHR14FS050957960	chr14:50957960-50958009	Olf221	olfactory receptor 221	MGI:303005
CHR14FS061952411	chr14:61952411-61952462	NP_001034214.1	defensin beta 41	MGI:3644478
CHR15FS010896986	chr15:10896986-10897035	C1qtnf3	Mus musculus C1q and tumor necrosis factor related protein 3	MGI:1932136
CHR15FS076033996	chr15:76033996-76034050	Plec1	plectin 1	MGI:1277961
CHR15FS084546977	chr15:84546977-84547026	3110043J09Rik	Rho GTPase activating protein 8	MGI:1924714
CHR15FS088895567	chr15:88895567-88895616	Panx2	pannexin 2	MGI:1890615
CHR15FS098284261	chr15:98284261-98284310	Olf281	Mus musculus olfactory receptor 281 (Olf281), mRNA	MGI:3030115
CHR15FS101630178	chr15:101630178-101630227	Krt73	keratin 73	MGI:3607712
CHR15FS103142419	chr15:103142419-103142468	Zfp385	zinc finger protein 385	MGI:1352495
CHR16FS088662690	chr16:88662690-88662739	2310057N15Rik	RIKEN cDNA 2310057N15 gene	MGI:1916946
CHR17FS023491207	chr17:23491207-23491256	Flywch1	FLYWCH-type zinc finger 1	MGI:2442638
CHR17FS025573640	chr17:25573640-25573689	3230401M21Rik	RIKEN cDNA 3230401M21 gene	MGI:1921267
CHR17FS032128598	chr17:32128598-32128647	A430107D22Rik	RIKEN cDNA A430107D22 gene	MGI:2444128
CHR17FS034764518	chr17:34764518-34764567	Bat2	HLA-B associated transcript 2	MGI:1915467
CHR17FS035114411	chr17:35114411-35114460	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	MGI:101893
CHR17FS036070382	chr17:36070382-36070438	H2-M10.4	histocompatibility 2, M region locus 10.4	MGI:1276527
CHR18FS039017348	chr18:39017348-39017397	Fgf1	fibroblast growth factor 1	MGI:95515
CHR18FS061089035	chr18:61089035-61089084	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinaseII alpha	MGI:88256
CHR19FS004868067	chr19:4868067-4868116	Actn3	actinin alpha 3	MGI:99678
CHR19FS007172220	chr19:7172220-7172269	D930010J01Rik	RIKEN cDNA D930010J01 gene	MGI:2147583
CHRXFS011285618	chrX:11285618-11285667	Bcor	Bcl6 interacting corepressor	MGI:1918708
CHRXFS034146197	chrX:34146197-34146246	Rhox9	reproductive homeobox 9	MGI:1890128

MGI No.; Gene ID of Mouse Genome Informatics Database

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）

分担研究報告書

動物用医薬品に関する畜水産食品の安全性確保に係る研究

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

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

研究要旨

ピレトリン系殺虫剤の共力剤のピペロニルブトキサイド（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。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、何れの投与群においても肝 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルに顕著な変化は認められず、*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。また、*p53* 欠損 *gpt delta* マウスにおいても同様に変化は観察されなかった。従って、PBO は PB 同様、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。

A. 研究目的

ピレトリン系殺虫剤の共力剤として作用することから、食品添加物や動物用医薬品として使用されているピペロニルブトキサイド（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* での復帰突然変異試験、染色体異常試験、不定期 DNA 合成試験の何れもが陰性を示し、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 が誘導されることが知られており、代謝過程において生じる酸化的ストレスの関与が示唆されている。また、DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析の結果、上述の代謝関連遺伝子に加えて、DNA 修復関連遺伝子の mRNA レベルの上昇が報告されている。これらの事実、PBO が酸化的傷害を含む DNA 傷害を引き起こして

いる可能性を示唆している。近年開発されたレポーター遺伝子導入マウスあるいはラットは、発がん性試験と同一プロトコールによる被験物質の投与が可能であり、標的臓器 DNA 中の遺伝子変異を解析できることから、*in vivo* 変異原性の検索さらには発がん機序解明に有用であると考えられている。そこで今回、レポーター遺伝子として *gpt* 遺伝子を導入した *gpt delta* マウスに、DNA 傷害に続く修復機構あるいはアポトーシスに深く関与することが知られている *p53* 遺伝子を欠損させた *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 発がん機序への DNA 傷害の関与の可能性を探る目的で、PBO のマウス肝発がん用量を投与して、*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。

B. 研究方法

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、*λ* 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。

(倫理面への配慮)

動物実験については、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い指針に基づいて実施された。

C. 研究結果

体重および肝重量の結果を Table 1 に示す。*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が、その程度は PBO 群で顕著であった。*p53*^{-/-} マウスでは、野生型同様、PBO 投与群で顕著な体重増加抑制が認められた。肝重量についても同様の変化を示し、PBO 投与群の

肝比重量は有意な高値となった。病理組織学的検査では、*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。その程度に遺伝子型による差異は認められなかった (Fig. 1)。肝 DNA 中の 8-OHdG レベルを Fig. 2 に示す。*p53*^{+/+} マウスの PBO 投与群において、対照群と比して 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、対照群と比して 8-OHdG 量の有意な変化は認められなかった。In vivo 変異原性試験結果を Tables 2~5 に示す。*p53*^{+/+} マウスでは、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。また、*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。

D. 考察

PBO はその投与により、マウス肝薬物代謝酵素の CYP1A1、2A5、2B9、2B10DC などを誘導することが知られている。また、PB も同様に、CYP2E1、2C1、3A4 などの種々の酵素を誘導する。従って、何れの投与群においても認められた肝重量の増加を伴う小葉中心性の肝肥大は、これら薬物代謝酵素誘導に起因した変化であると考えられた。8-OHdG レベルは *p53*^{+/+} PBO 投与群において上昇傾向は認められたものの有意な値とはならなかった。一方、*p53*^{-/-} では個体間のばらつきが大きく、平均値としては群間に差は認められなかった。我々はこ

れめで、F344系 *gpt delta* ラットにおいて、発がん用量のPBO投与による8-OHdGレベルの有意な上昇を報告しており、今回の結果は、PBO誘発の酸化的ストレスに対して、マウスはラットに比べて低感受性であることが示唆された。また、同様に薬物代謝酵素群を誘導するPBでは何れの遺伝子型においても対照群との間に差はなく、PBによる酸化的ストレスの誘発能は低いものと考えられた。本実験条件において、PBO投与による *in vivo* 変異原性は認められなかった。また、DNA傷害により誘導され、細胞周期をG1にとどめることで、DNA修復に関与し、また、重度の障害に対してはアポトーシスの引き金となるp53蛋白を欠損した *p53/gpt delta* マウスにおいても同様に変異原性は認められなかった。従って、PBOは発がん標的臓器DNAに対して遺伝子障害性を有していないことが強く示唆された。また、PBもp53蛋白の有無に関わらず *in vivo* 変異原性は陰性を示し、この実験結果は、核内受容体CARを介した細胞増殖誘導が大きく寄与していると考えられているPBの発がん機序を裏付けているものと考えられた。一方、PBOがPB同様、遺伝子障害性を有していないことを示す今回の結果は、PBOがPBに比して非常に高い肝腫瘍誘発性を示す長期投与試験結果を支持していない。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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

Table 1 Body, liver and relative liver weights of *gpt* delta mice given PBO or PB

	Control	PBO	PB
<i>p53</i> (+/+)			
Body weight (g)	31.20 ± 2.45	19.20 ± 1.29 **	32.40 ± 2.41
Liver weight (g)	1.40 ± 0.16	1.57 ± 0.26	1.89 ± 0.27 *
Relative liver weight (g%)	4.49 ± 0.16	8.19 ± 1.55 **	5.82 ± 0.50
<i>p53</i> (-/-)			
Body weight (g)	32.4 ± 4.00	21.98 ± 1.41 **	31.68 ± 2.93
Liver weight (g)	1.29 ± 0.33	1.77 ± 0.41	1.56 ± 0.47
Relative liver weight (g%)	3.96 ± 0.80	8.03 ± 1.46 **	4.88 ± 1.12

*, ** : P < 0.05, 0.01 vs. Control

Figure 1. Histopathological features in the livers of *p53*-deficient *gpt* delta mice given PBO or PB

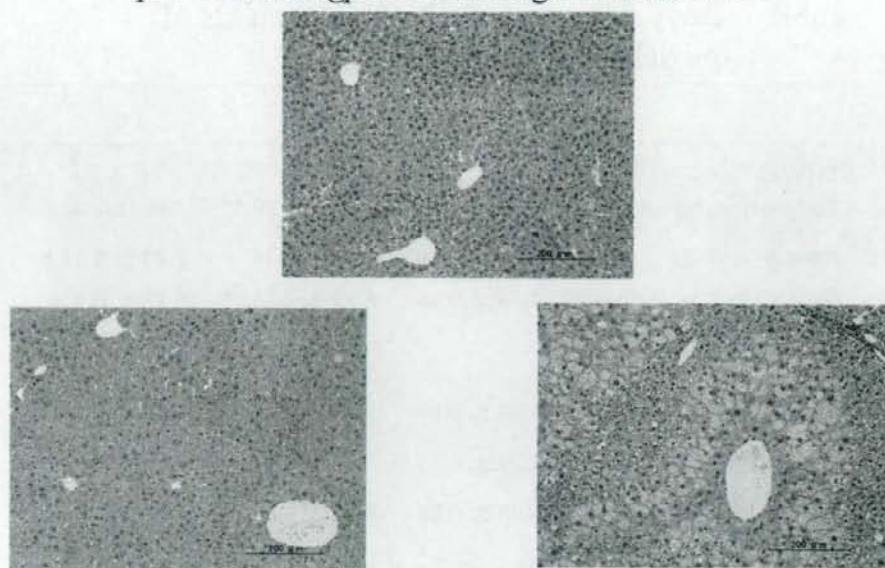
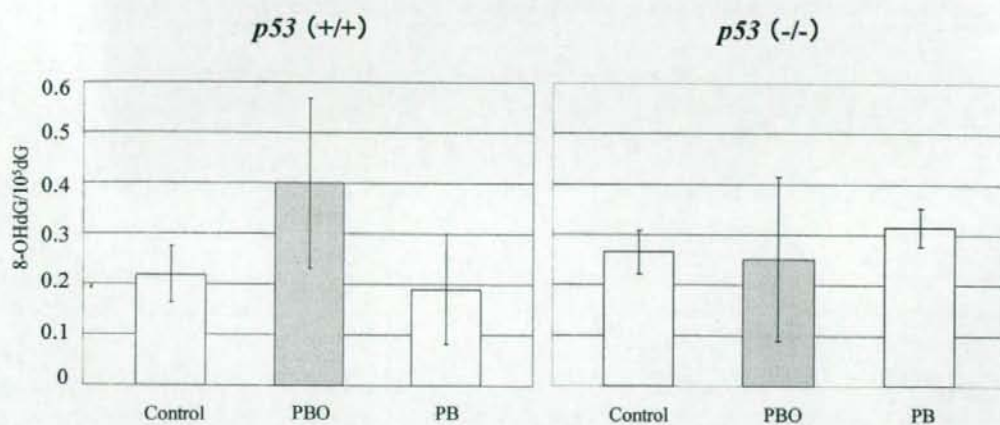


Figure 2. Changes in 8-OHdG levels in liver DNA of *gpt* delta mice given PBO or PB



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）
分担研究報告書

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
- 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究-

分担研究者 九郎丸 正道 東京大学 教授

研究要旨 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検討するため、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。

九郎丸 正道・東京大学 教授

A. 研究目的

BSEの特定危険部位である牛の背根（脊髄）神経節は脊柱内に位置し、脊柱からの分離が困難なことから、本来安全な脊柱も現在、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ている。具体的には、と畜場において脊髄除去後に脊柱に残る硬膜とこれに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特殊なナイフで引き剥がしたことから、背根神経節がどの程度硬膜側に残存しているかを算出することによって、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、及び牝牝別の除去率についても比較し、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

1. 牛の脊柱からの背根神経節の除去
牛の背根神経節は1頭あたり、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（背割り後の枝肉〔半頭分〕では32個）である（尾骨部はこれに含まれていない）。ここでは、第1頸神経から第5仙骨神経までの脊髄神経・背根神経節の、脊柱からのそれぞれの除去率を調べた。

硬膜周辺から脂肪を除去して、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、脊柱からの背根神経節の除去率を算出した。算出に用いた牛の硬膜は2008年3月から2009年2月までの計358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。背根神経節の大きさの判定は、目視によるから必ずしも厳密なものではなく、また、約1/3個分が除去率の百分率の1%分に相当する。したがって、除去率は小数点以下の数値に意味はないと考え、有

効数字は1の位までとした。

2. 牛の品種別、及び牝牝別の脊柱からの背根神経節の除去率

1. と同じ試料、方法を用いて、牛の品種別、及び牝牝別の除去率を比較検討した。牛の品種別、及び牝牝別では、「ホルスタイン去勢牝」、「和牛（黒毛、褐毛和種）去勢牝」、「交雑種（黒毛♂×ホルスタイン♀）牝」、及び「交雑種去勢牝」の4グループに区分した。

（倫理面への配慮）

本研究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る。

C. 研究結果と D. 考察

1. 牛の脊柱からの背根神経節の除去

月別の除去率は文末、及び付表1～12に示した。なお、付表1～12において、○は背根神経節の全体（1）が付随していたものを表し、□は背根神経節の大部分（2/3）が付随していたものを、△は背根神経節の半分程度（1/2）が付随していたものを、▲は背根神経節の一部（1/3）が付随していたものを、×は背根神経節が全く（0）付随していなかったものを表す。表の最も左の欄の数字は検体番号を示している。また、除去率の月別推移を図1に、各神経節毎の除去率を図2に、牛の品種別、及び牝牝別の除去率の月別推移を図3に、牛の品種別、及び牝牝別の年間を通しての除去率を図4に示した。

背根神経節の脊柱からの除去率は、2008年3月から2009年2月の間で平均8.7%であった（図1）。前年度と同様、

第4、5、6腰神経、及び第1、2、3仙骨神経の背根神経節の除去率の低さ（32～75%）が顕著であった。また、第11胸神経の背根神経節の除去率も他の部位と比べると低い値（75%）を示した（図2）。上記の7部位を除いた残りの25部位は概ね90%以上の除去率を示した。

第1頸神経から第10胸神経の背根神経節が除去されやすいのは、硬膜から背根神経節までの背根の長さが短いことと、背根神経節がある程度大きいことに起因すると思われる。

第4腰神経～第3仙骨神経の背根神経節が除去されにくい点について不明であるが、一つの可能性として、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、他部位と比べ、より困難であることが考えられる。

2. 牛の品種別、及び牝牝別の脊柱からの背根神経節の除去率

牛の品種別、及び牝牝別に脊柱からの背根神経節の除去率を調べた（図3、4）。「ホルスタイン去勢牝」、「和牛去勢牝」、「交雑種牝」、及び「交雑種去勢牝」のいずれの除去率も、85%から90%の間であり、わずかではあるが、交雑種牝の除去率が低いものの、明瞭な差は認められなかった。各グループ別の除去率は毎月にも調べたが、どのグループも概ね80%から95%の間で推移した。全体として、各グループ間で除去率に差は生じなかった。

E. 結論

1. では2008年3月から2009年2月までに得られた試料について、背根神経節の脊柱からの除去率を調べたとこ

ろ、平均87%であった。除去率の極端に低い第4腰神経～第3仙骨神経の背根神経節、それに次いで除去率の低い第11胸神経の背根神経節の除去率が向上しない限り、完全除去達成は困難である。

また、牛の品種別、及び牝牡別の脊柱からの背根神経節の除去率を比較検討したが、いずれも除去率に差は見られなかった。

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、さらなる除去技術の改良が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2008年3月 42検体

最小 73%

最大 98%

平均 88%

標準偏差6%

2008年4月 41検体

最小 76%

最大 99%

平均 89%

標準偏差 5%

2008年5月 29検体

最小 78%

最大 99%

平均 90%

標準偏差5%

2008年6月 27検体

最小 80%

最大 95%

平均 87%

標準偏差5%

2008年7月 33検体

最小 73%

最大 98%

平均 90%

標準偏差6%

2008年8月 40検体

最小 80%

最大 98%

平均 90%

標準偏差5%

2008年9月 28検体

最小 81%

最大 97%

平均 88%

標準偏差5%

2008年10月 27検体

最小 72%

最大 97%

平均 88%

標準偏差7%

2008年11月 21検体

最小 74%

最大 94%

平均 87%

標準偏差6%

2008年12月 18検体

最小 72%

最大 97%
平均 83%
標準偏差8%

2009年1月 26検体

最小 64%
最大 95%
平均 83%

標準偏差8%

2009年2月 26検体

最小 73%
最大 94%
平均 85%

標準偏差5%

2008年3月～2009年2月 358検体

最小 64%
最大 99%
平均 87%

図1 背根神経節の月別除去率の移動
(2008年3月～2009年2月)

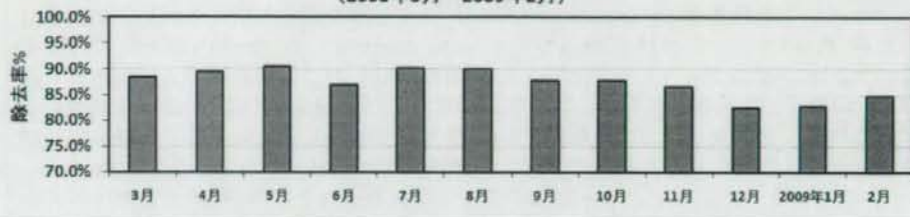


図2 背根神経節の部位除去率の推移
(2008年3月～2009年2月)

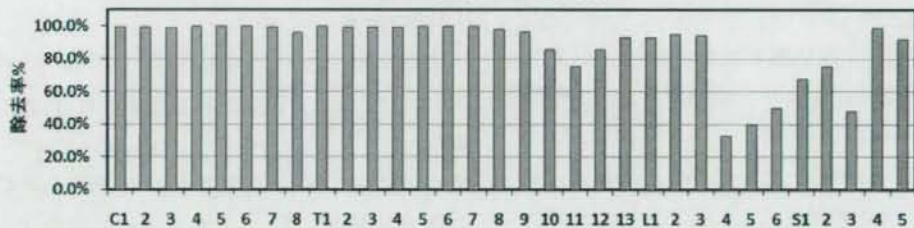


図3 牛の品種別の背根神経節除去率の推移
(2008年3月～2009年2月)

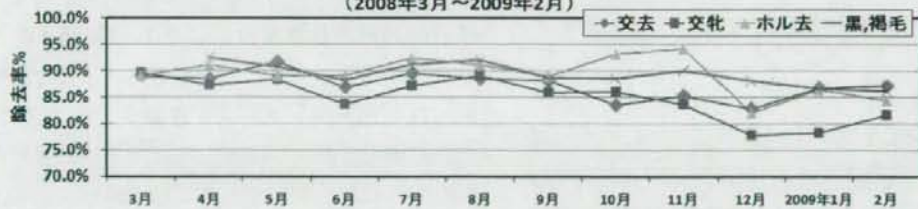
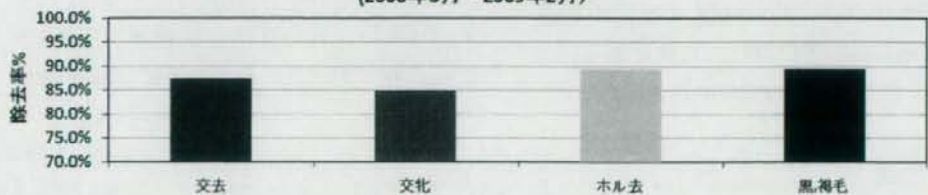


図4 牛品種別背根神経節除去率
(2008年3月～2009年2月)



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）
 分担研究報告書

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
 - 動物用キノロン薬の安全性評価 -

分担研究者 古濱 和久 岩手大学農学部獣医学課程教授

研究要旨

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。

A. 研究目的

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 G FLX 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

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）、血清および膵 GFLX 濃度測定（*B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とした bioassay 法）および膵の組織学的検索を行った。

（倫理面への配慮）

全ての試験は岩手大学動物実験に関する指針に従って実施した。

C. 研究結果

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 細胞の軽度空胞化が観察された。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 $\mu\text{g/g}$ ）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 $\mu\text{g/g}$ ）がみられた。

D. 考察

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} チャンネル阻害により 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。

E. 結論

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ると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

古濱和久、永井三紀子、永田沙織、佐藤洋：キノロン系抗菌剤 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

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	2009
Takahashi, M., <u>Shibutani, M.</u> , 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., <u>Shibutani, M.</u>	Cellular distributions of molecules with altered expression specific to thyroid proliferative lesions developing in a rat thyroid carcinogenesis model.	Cancer Sci.		in press	2009
Taniai, E., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Harada, T., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Takahashi, M., Mitsumori, K., <u>Shibutani, M.</u>	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	2009

Umemura, T., Tasaki, M., Kijima, A., Okamura, T., Inoue, T., Ishii, Y., Masui, N., Nohmi, T., 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
--	---	------------	-----	-------	------

Involvement of oxidative stress in hepatocellular tumor-promoting activity of oxfendazole in rats

Yasuaki Dewa · Jihei Nishimura · Masako Muguruma · Meilan Jin · Masaomi Kawai · Yukie Saegusa · Toshiya Okamura · Takashi Umemura · Kunitoshi Mitsumori

Received: 2 June 2008 / Accepted: 7 August 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The tumor-promoting effects of oxfendazole (OX), a benzimidazole anthelmintic, were investigated using a medium-term rat hepatocarcinogenesis model. Six-week-old male F344 rats received an intraperitoneal injection of *N*-diethylnitrosamine (DEN) and were given a powdered diet containing 0 or 500 ppm OX for 6 weeks from 2 weeks after DEN treatment. All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy 1 week after OX treatment. The numbers and areas of glutathione *S*-transferase placental form (GST-P)-positive foci were significantly increased in the livers of rats treated with OX, with concomitantly increased cell proliferation, compared with those in the livers of the DEN alone group. Quantitative real-time RT-PCR analysis revealed that OX induced not only mRNA expression of phase I enzymes *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, but also Nrf2-regulated phase II enzymes such as

Gpx2, *Nqo1*, *Yc2*, *Akr7a3* and *Gstm1*, presumably due to an adaptive response against OX-induced oxidative stress. Reactive oxygen species production increased in microsomes isolated from the livers of OX-treated rats. Furthermore, OX enhanced oxidative DNA damage (as assessed by 8-hydroxydeoxyguanosine; 8-OHdG) and lipid peroxidation (as assessed by thiobarbituric acid-reactive substances; TBARS). These results suggest that administration of OX at a high dose and for a long term enhances oxidative stress responses, which may contribute to its tumor-promoting potential in rats.

Keywords Oxfendazole · Reactive oxygen species · Oxidative stress · Tumor-promotion · Rat

Introduction

Fenbendazole [methyl 5-(phenylthio)-2-benzimidazolecarbamate] (FEN) and oxfendazole [methyl 5-(phenylsulfonyl)-2-benzimidazolecarbamate] (OX) are benzimidazole anthelmintics that have been widely used for the treatment and prevention of gastrointestinal parasites in livestock animals, including cattle, pigs, and sheep (Jacobs and Taylor 2001; Velik et al. 2004). The pharmacological effects of these chemicals depend on their inhibition of glucose uptake and tubulin polymerization in parasitic worms (Delatour and Parish 1986). FEN, which is first metabolized to its sulphoxide form (OX) in vivo, has been reported to cause a slight increase in the incidence of hepatocellular carcinomas in female rats treated orally with a high dose (WHO 1991). On the contrary, OX has not been found to elicit any carcinogenic response in rats or mice; however, the 38th meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) indicated that the lack of carcin-

Y. Dewa (✉) · J. Nishimura · M. Muguruma · M. Jin · M. Kawai · Y. Saegusa · K. Mitsumori
Laboratory of Veterinary Pathology,
Tokyo University of Agriculture and Technology,
3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183-8509, Japan
e-mail: dewa@cc.tuat.ac.jp

Y. Dewa · J. Nishimura · M. Kawai · Y. Saegusa · T. Okamura
Pathogenetic Veterinary Science,
United Graduate School of Veterinary Sciences,
Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu-shi, Gifu 501-1193, Japan

M. Jin
Department of Applied Biological Science,
United Graduate School of Agricultural Sciences,
Tokyo University of Agriculture and Technology,
3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183-8509, Japan

T. Okamura · T. Umemura
Division of Pathology, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan