

200939010A

厚生労働科学研究研究費補助金

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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三森 国敏

平成22(2010)年 3月

別添 1

厚生労働科学研究研究費補助金

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 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 三森 国敏

平成 22 (2010) 年 3 月

別添2

目次

I. 総括研究報告書		
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	-----	1
三森国敏		
II. 分担研究報告書		
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	-----	7
三森 国敏		
2. 網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析	-----	18
渋谷 淳		
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	-----	34
梅村 隆志		
4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究	-----	37
九郎丸 正道		
5. 各種動物にける腎糸球体濾過量（GFR）測定の基礎検討	-----	46
古濱 和久		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	48
IV. 研究成果の刊行物・別刷		

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）
総括研究報告書（平成 21 年度研究）

畜水産食品中の残留動物用医薬品の安全性に関する研究

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
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 病理部部长
分担研究者 九郎丸 正道 東京大学 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

研究要旨

ピレスロイド系農薬の共力剤ピペロニルブトキサイド (PBO) の肝腫瘍形成過程における酸化ストレスの関与について検索した。その結果、PBO によるマウス肝発がん機序は、ラットと異なり、ROS の産生に伴う二次的な DNA 損傷は関与しないことが示唆された。さらに、PBO により過剰な ROS が産生されることで、細胞増殖機構に変調を来し、結果的に PBO が肝腫瘍プロモーターとなる可能性が考えられた。

マウス肝二段階発がんモデルにおいて、25 週間に及ぶピペロニルブトキサイド (PBO) の発がん促進により、非がん部で DNA メチル化パターンに変動の生じるプロモーター配列断片群が見出された。殊に、メチル化亢進しているプロモーター配列を有する遺伝子の中に、細胞増殖性や発がんとの関連が示唆されているものが見いだされ、WDR6 は発がん促進によって非がん部の肝細胞の G₁ 停止の維持に機能し、前がん病変や腫瘍細胞の選択的な増殖に寄与していることが示唆された。Serpina3m は好中球の反応性を反映し、PBO による発がん促進に好中球による炎症と組織破壊の関与が示唆された。CMTM6 は、今後発がんとの関連で機能解析の必要な分子と考えられた。

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、マウスの肝臓に腫瘍を誘発することが知られている。今回、抗酸化酵素群の転写因子として知られる *nrf2* 遺伝子を欠損させた *nrf2* 欠損マウスとその野生型を用いて、PBO が引き起こす酸化ストレスに対する生体内防御機構への Nrf2 蛋白の関与を検討した。その結果、肝 DNA 中の 8-OHdG レベルは *nrf2* 欠損マウスで低用量より有意な上昇が認められたが、高用量群間で比較すると野生型でむしろ高値を示し、遺伝子型間で明らかな差異は認められなかった。Nrf2 制御下酵素である *NQO1* の mRNA レベルを含め種々のパラメーターでも差異は認められなかったことから、PBO が誘発するマウス肝における酸化ストレスに対する生体内防御機構への Nrf2 蛋白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 85% 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。

造影剤 iodixanol を用いて、ラット、ウサギ、ネコ、ウシおよびウマの GFR を血中濃度推移から算出し、単回静注・1回採血法の妥当性を検証した。

A. 研究目的

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)

非遺伝毒性発がん物質とされているピペロニルブトキサイド (PBO) は、ラットやマウスに肝発がん性を示すことが知られており、その発がんメカニズムには活性酸素 (ROS) の産生とそれに伴う二次的な DNA 損傷が関与することがラットにおいて示されているが、マウスについては明らかにされていない。本研究では、PBO のマウス肝発がんメカニズムを分子病理学的に解析することを目的とする。

2. 網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析 (渋谷)

動物用医薬品等の発がん性に関して、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、ピペロニルブトキサイド (PBO) を用いて、マウス肝発がん促進時期での発がんの基礎環境となる非がん部での、メチル化の亢進を示す遺伝子プロファイルをマイクロアレイにより検索した。

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)

PBO は従来の変異原性試験は陰性ながら、マウスの肝臓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ストレスの関与の可能性が報告されてきた。今回、種々の抗酸化酵素群の転写因子と知られる *nr2* 遺伝子欠損マウス (ICR 系) を用いて、PBO の標的臓器肝臓の酸化ストレスに対する生体防御機構への Nrf2 蛋白の関与の可能性について検討した。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

BSE の特定危険部位である牛の背根神経節 (以下、神経節) は、脊柱からの分離が困難なことから、本来安全な脊柱も神経節とともに廃

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。

5. 各種動物における腎糸球体濾過量 (GFR) 測定の基礎検討 (古濱)

GFR は腎疾患の診断だけでなく、腎排泄型薬物の体内挙動に大きく関与することから、臨床薬理学上重要な指標である。そこで、各種動物の GFR を簡便に測定することを目的に、tracer として iodixanol を取り上げ、基礎検討を行った。

B. 研究方法

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)

雄 ICR マウスに肝部分切除術を施し、12 時間後に diethylnitrosamine (DEN) を 1 回腹腔内投与し、肝部分切除 1 週間後から 0 ないし 0.6 % の PBO を 25 週間混餌投与した。投与終了後、肝臓について病理組織学的検索、免疫組織化学的解析 (cytokeratin 8/18 : CK8/18)、肝ミクロソームを用いた ROS 測定、8-OHdG 測定と real-time RT-PCR 解析を行った。

(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。

2. 網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析 (渋谷)

マウス二段階肝発がんモデルを用いて、PBO を 25 週間投与し、肝の非がん部について NimbleGen Mouse Oligo Nucleotide プロモーター

アレイを用いて DNA メチル化の網羅的解析を実施した。次いで、メチル化変動が認められたプロモーター領域の下流遺伝子の mRNA 発現解析及び免疫組織化学的な発現局在解析を行った。

(倫理面への配慮)

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、東京農工大学の利用規定およ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。

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)

PBO を *myf2* 欠損マウスならびにその野生型マウスに投与した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験ガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施した。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理基準に充分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

牛の神経節は枝肉 (半頭分) 当たり、頸椎部 8 個、胸椎部 13 個、腰椎部 6 個、及び仙骨部 5 個の計 32 個存在する。ここでは、神経節の枝肉当たりの除去率を調べた。

(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。

5. 各種動物における腎糸球体濾過量 (GFR)

測定の基本検討 (古濱)

5 種動物を用いて、iodixanol の投与量、採血時間、血中濃度推移および分布容積と腎疾患モデルの解析から、単回静注・1 回採血法による GFR 測定の妥当性を調べた。

(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

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)

PBO を投与した肝臓において、好酸性細胞質を伴う瀰漫性肝細胞肥大ならびに好酸性、明細胞性ないし好塩基性肝細胞から構成される変異肝細胞巣、肝細胞腺腫および肝細胞癌が認められた。免疫組織染色の結果、CK8/18 陽性の変異肝細胞巣および肝細胞腺腫の発生率の有意に増加した。また、PCNA 陽性細胞数は、DEN+PBO 群の非がん部、変異肝細胞巣および肝細胞腺腫において、DEN 単独群と比較して有意な発生率の増加が認められた。

細胞内における ROS 産生能を測定した結果、ROS 産生量は、DEN+PBO 群において有意に増加した。しかし、DNA 損傷指標である 8-OHdG 量は、DEN+PBO 群の肝臓において変化は認められなかった。

定量的遺伝解析の結果、薬物代謝第 I 相系酵素 (*Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b10*, *Por*, *Nqo*)、初期応答遺伝子 (*c-Myc*)、細胞周期 G1/S 期関連遺伝子 (*Ccnd1*, *E2f1*) は DEN 単独群と比較して DEN+PBO 投与群において有意に増加した。一方、DNA 修復関連遺伝子 (*Ogg1*) は、DEN+PBO 投与群において有意に低下した。

2. 網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析 (渋谷)

候補遺伝子のうち、PBO の 25 週間の発がん促進によって、*Serpina3m* は非がん部のみならず、増殖性病変でも更に発現低下を示し、*WDR6* と *CMTM6* は PBO による発がん促進により非が

ん部で発現低下を示した。また、WDR6 及び CMTM6 は、PBO による発がん促進 8 週目においても、前がん病変と非がん部で 25 週目と同様の発現パターンを示した。

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)

野生型マウスでは高用量群のみ有意な 8-OHdG レベルの上昇が認められたが、*nrf2* 欠損マウスでは低用量を含む投与群すべてで有意な上昇が認められた。一方、肝薬物代謝酵素 *Cyp1A1* の mRNA レベルに群間ならびに遺伝子型間で差異は認められなかったが、*Cyp1A2* レベルは何れの遺伝子型においても高用量群で有意な上昇が認められた。*Nrf2* の転写調節を受けている NAD (P): quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) の mRNA レベルにはいずれの投与群においても変化は認められなかった。その他、肝重量、肝障害を示唆する血清生化学的検査マーカーに遺伝子型間で差異は認められなかった。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

算出に用いた試料は 2009 年 3 月から 2010 年 2 月までの計 222 検体で、除去率は平均 85% であった。また、前年度と同様、第 11 胸神経及び第 4 腰神経～第 3 仙骨神経の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 80% 以上の除去率であった。

5. 各種動物における腎糸球体濾過量 (GFR) 測定の基礎検討 (古濱)

本法 (単回静注・1 回採血法) と標準 insulin 法あるいは iodixanol 単回静注・3 回採血法の間に良好な相関関係がみられた。

D. 考察

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)

DEN+PBO 群において腫瘍を含む増殖性病変数および CK8/18 陽性細胞巢・腫瘍数と面積が有意に増加した。定量的遺伝子発現解析では、PBO は薬物代謝第 I 相系および

第 II 相系酵素 (*Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b10*, *Por*, *Nqo1*) の発現を増加させ、酸化ストレスに対して産生系と消去系両方の制御が働くことが示唆された。ラットとは異なり、8-OHdG や DNA 修復関連遺伝子 (*Xrcc5*, *Ogg1*) の増加はみられず、DNA レベルの障害は誘発されないことが示唆された。さらに初期応答遺伝子 *c-Myc* や細胞増殖関連遺伝子 (*Ccnd1*, *E2f1*) の発現変動が認められ、PBO 投与により細胞増殖が亢進していることが示唆された。

2. 網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析 (渋谷)

Serpina3m の非がん部・増殖性病変での発現低下により、好中球の活性化による発がん促進作用への関与が示唆された。WDR6 は発がん促進過程での非がん部の肝細胞の G₁ 停止の維持に機能し、非がん部で発現低下は前がん病変や腫瘍細胞の選択的な増殖への寄与が示唆された。分子機能の不明な CMTM6 は、今後発がんとの関連で機能解析が必要な分子と考えられた。また WDR6 及び CMTM6 は発がん促進初期過程からの関与が示唆された。

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)

Nrf2 欠損マウスで PBO 投与による 8-OHdG 生成に対する感受性が高い傾向が認められたが、高用量群での比較ではむしろ *nrf2* 欠損マウスで低く、その他のパラメーターに遺伝子型間で差異は認められなかったことから、PBO が引き起こす酸化的ストレスに対する生体内防御機構への *Nrf2* 蛋白の関与の可能性は低いことが示唆された。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

第 4 腰神経～第 3 仙骨神経の神経節の除去率の低さの原因として、第 1～第 3 仙骨神経の神経節は脊柱管外にあり、孔 (腹側仙骨孔) の外の脂肪層内に位置する。したがって、断面にした脊柱管の内側から孔の外にある神経節を引き

出そうとする場合、神経節を孔の外から内に通過させなければならない。この際に、神経節が剥がれ落ちる危険性が高いことが考えられる。同様のことが、第4～第6腰神経の神経節についても推測できる。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。

5. 各種動物における腎系球体濾過量 (GFR) 測定の基礎検討 (古濱)

単回静注・1回採血法で得られた健常各種動物の GFR 値は既知文献値とよく一致していた。

E. 結論

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)

PBO を 0.6% 含有する飼料を 25 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、PBO によるマウス肝発がん機序は、ラットと異なり、ROS の産生に伴う二次的な DNA 損傷は関与しないことが示唆された。さらに、PBO により過剰な ROS が産生されることで、細胞増殖機構に変調を来し、結果的に PBO が肝腫瘍プロモーターとなる可能性が考えられた。

2. 網羅的発現解析手法を用いた発がん関連遺伝子の解析 (渋谷)

マウス肝二段階発がんモデルを用いて、イネシエーション後の発がん促進時期に、25 週間におよぼ PBO の投与により、DNA メチル化パターンに変動の生じるプロモーター配列断片群が見出された。特に肝細胞や好中球などの多様な機能のエピジェネティックなメカニズムによる変調が、PBO による発がんに関与している可能性が示唆された。

3. 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)

PBO を 0.3 ならびに 0.6% の濃度に混じた飼料を 8 週間、雄の *nrf2* 欠損マウスならびにその野生型マウスに与えたところ、肝 DNA 中の 8-OHdG レベルは野生型マウスの高用量群、*nrf2*

欠損マウスの低用量群から有意な上昇が認められたが、高用量群間での比較ではむしろ野生型マウスで高く、明らかな遺伝子型間による差異は認められなかった。従って、PBO が誘導するマウス肝における酸化的ストレスに対する生体内防御機構に Nrf2 蛋白の関与は低いことが示唆された。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

2009 年 3 月から 2010 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 85% であり、除去率の極端に低い第 11 胸神経及び第 4 腰神経～第 3 仙骨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。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。

5. 各種動物における腎系球体濾過量 (GFR) 測定の基礎検討 (古濱)

Iodixanol を tracer とした GFR 速手は薬理的、毒性学および臨床学的に応用できると結論した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawai, M., Saegusa, Y., Dewa, Y., Nishimura, J., Kemmochi, S., Harada, T., Ishii, Y., Umemura, T., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Elevation of cell proliferation via generation of reactive oxygen species by piperonyl butoxide contributes to its liver tumor-promoting effects in mice. Arch. Toxicol. 84:155-64, 2010.

Kawai, M., Saegusa, Y., Kemmochi, S.,

Harada, T., Shimamoto, K., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Cytokeratin 8/18 Is a Useful Immunohistochemical Marker for Hepatocellular Proliferative Lesions in Mice. J. Vet. Med. Sci. 2010, in press

Katayama, R., Yamaguchi, N., Yamashita, T., Watanabe, S., Satoh, H., Yamagishi, N., Furuhashi, K.: Calculation of glomerular filtration rate in conscious rats by the use of a bolus injection of iodixanol and a single blood sample. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 61: 59-64, 2010.

2. 学会発表

川合正臣、三枝由紀恵、剣持明、嶋本敬介、石井雄二、梅村隆志、渋谷淳、三森国敏：マウスにおけるピペロニルブトキサイドの肝発がん機序、第 26 回毒性病理学会、名古屋、2010 年 2 月

川合正臣、三枝由紀恵、剣持明、嶋本敬介、石井雄二、梅村隆志、渋谷淳、三森国敏：ピペロニルブトキサイドのマウス肝発がん機序、第 24 回発癌病理研究会、金沢、2009 年 8 月

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 回毒性病理学会、浜松、2009 年 2 月

川合正臣、三枝由紀恵、剣持明、嶋本敬介、石井雄二、梅村隆志、渋谷淳、三森国敏：ピペロニルブトキサイドのマウス肝発がん機序、第 24 回発癌病理研究会、金沢、2009 年 8 月

川合正臣、三枝由紀恵、剣持明、嶋本敬介、石井雄二、梅村隆志、渋谷淳、三森国敏：マウスにおけるピペロニルブトキサイドの肝発がん

機序、第 26 回日本毒性病理学会学術集会、2010 年 2 月

山口菜美、片山理恵子、佐藤洋、古濱和久：非イオン性 X 線造影剤 iodixanol によるラット糸球体濾過能の検討、第 147 回日本獣医学会学術集会、栃木、2009 年 4 月

今井杏子、山岸則夫、大倉徳太、福田卓巳、平田統一、山下哲郎、岡田啓司、佐藤繁、古濱和久：非イオン性 X 線造影剤 iodixanol による牛腎糸球体濾過量 (GFR) の測定 - 1. 子牛での検討 -、第 148 回日本獣医学会学術集会、鳥取、2010 年 9 月

三浦萌、金壇一、古濱和久、平田統一、山岸則夫：非イオン性 X 線造影剤 iodixanol による牛腎糸球体濾過量 (GFR) の測定 - 2. 比色法の検討 -、第 148 回日本十位学会学術集会、鳥取、2010 年 9 月

渡邊寛治、片山理恵子、佐藤洋、古濱和久：非イオン性 X 線造影剤 iodixanol の単回静注・1 回採血法による各種腎障害ラットの腎糸球体濾過能 (GFR) の測定、第 149 回日本獣医学会学術集会、東京、2010 年 3 月

道越勇樹、佐藤洋、古濱和久：inulin の単回静注・1 回採血法によるウサギ腎糸球体濾過量 (GFR) 測定の基礎検討、第 149 回日本獣医学会学術集会、東京、2010 年 3 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

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（平成21年度）

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

非遺伝毒性発がん物質と評価されているピレスロイド系農薬の共力剤ピペロニルブトキシサイド（PBO）の発がんメカニズム解明の1環として、PBOの肝腫瘍形成過程における酸化的ストレスの関与について検索した。正常ICRマウスに2/3肝部分切除術を施し、12時間後に20 mg/kgのDENを1回腹腔内投与し、その投与1週間後からPBOを0（DEN単独群）ないし0.6%（DEN+PBO群）の濃度で25週間、混餌投与を行った。投与終了後採取した肝臓（n=8~15/群）について、病理組織学的検索、免疫組織学化学的解析、代謝・酸化的ストレス関連遺伝子の発現変動解析及び酸化的損傷マーカーの測定を行った。その結果、PBO投与によりDEN+PBO群において腫瘍を含む増殖性病変数およびCK8/18陽性細胞巢・腫瘍数と面積の有意に増加した。さらに、単離肝ミクロソームにおけるROS産生量、代謝・酸化的ストレス関連遺伝子（*Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b10*, *Por*, *Nqo1*）のmRNA発現が有意に増加した。しかし、酸化的DNA損傷マーカーである8-hydroxydeoxy-guanosine(8-OHdG)、DNA修復関連遺伝子（*Xrcc5*, *Ogg1*）のmRNA発現の増加は認められず、DNAレベルでの障害はマウスでは誘発されないことが示唆された。さらに初期応答遺伝子c-Mycや細胞増殖関連遺伝子（*CcnD1*, *E2f1*）の発現変動が認められ、PBO投与により細胞増殖が亢進していることが示唆された。以上の結果から、PBOによるマウス肝発がん機序は、ラットと異なり、ROSの産生に伴う二次的なDNA損傷は関与しないことが示唆された。さらに、PBOにより過剰なROSが産生されることで、細胞増殖機構に変調を来し、結果的にPBOが肝腫瘍プロモーターとなる可能性が考えられた。

A. 研究目的

ピペロニルブトキシサイド（Piperonyl butoxide、PBO）は、ピレスロイド系農薬の共力剤として、また、家庭用殺虫剤として広く使用されている。国内においては、殺虫剤の登録はすでに失効になっているが、穀物に対する食品添加物としては現在も用いられている。また海外においては現在も殺虫剤として使用されており、レンズ豆、麦芽、アボカド全果など輸入作物の中から検出されている。このように食品中に残留したPBOに暴露される可能性があることから、PBOの安全性を評価することは、食品中の安全性担保に必要不可欠な課題である。

このPBOの安全性についてヒトにおける発がんの報告はされていない。しかし、ラットやマウスにおいては、非遺伝毒性肝発がん性物質として評価されている。さらに、これまでの研究から、PBOを反復投与したラット肝臓において、代謝経路を介した活性酸素種（ROS）の産

生と、それに伴う酸化的DNA損傷を含む酸化ストレスがラット肝発がんに関与するデータが得られている。しかし、PBOのマウス肝発がん機序に、ROS産生に起因した酸化的損傷が関与するか否かはまだ明らかにされていない。そこで本年度は、酸化ストレスと細胞周期調節に関わる遺伝子発現と生化学的変化に着目して、マウスにおけるPBOの肝発がんメカニズムの解析を行った。

B. 研究方法

6週齢の雄性ICRマウスに2/3部分肝切除を施し、12時間後にイニシエーターであるdiethylnitrosamine(DEN)を単回投与（20mg/kg体重）した。部分肝切除1週間後から0（基礎飼料、DEN単独群）ないし0.6%のPBO（DEN+PBO群）を25週間混餌投与した。投与期間終了後、エーテル麻酔下にて放血致死させ、肝臓を採取し、重量測定を行った。一部の肝臓は遺伝子発

現解析・生化学的解析用に分取し、液体窒素で急速凍結した後、検索まで-80℃に保存した。また病理組織学的・免疫組織化学的検索用に4%パラフォルムアルデヒド固定したのちパラフィン包埋を行った。さらに残りの肝臓は、O.C.T.コンパウンドに埋没させ、ドライアイスで凍結後、組織化学的検索に用いた。

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、マウス肝増殖性病変に陽性を示すcytokeratin 8/18 (CK8/18) 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。また凍結標本組織は、薄切後gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)の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βアクチンを用いて実施)をリアルタイムRT-PCR法を用いて定量解析した (Table 1)。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、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)産生能を測定した。

統計解析は、対照群とPBO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

PBO投与に関連した死亡は認められなかったが、PBO投与開始から投与終了時まで体重増加抑制がみられ、DEN+PBO群の剖検時の最終体重はDEN単独群と比較して有意な低値を示した。また、DEN+PBO群では、肝臓の絶対重量および相対重量の有意に増加した (Table 2)。

病理組織学的には、PBOを投与した肝臓において、好酸性細胞質を伴う瀰漫性肝細胞肥大ならびに好酸性、明細胞性ないし好塩基性肝細胞から構成される変異肝細胞巣、肝細胞腺腫および肝細胞癌が認められた (Table 3)。免疫組織染色の結果、CK8/18陽性の変異肝細胞巣および肝細胞腺腫の発生率の有意に増加した (Table 4、Fig. 2)。また、PCNA陽性細胞数は、DEN+PBO群の非がん部、変異肝細胞巣および肝細胞腺腫において、DEN単独群と比較して有意な発生率の増加が認められた (Table 4)。

細胞内におけるROS発生源の一つとして、単離肝ミクロソームからのNADPH依存性ROS産生能を測定した (Fig. 1a)。NADPH添加30分後におけるROS産生量は、DEN+PBO群において有意に増加した。

肝腫瘍形成期における酸化ストレスの影響を評価するため、DNA損傷指標である8-OHdG量を測定した結果、DEN+PBO群の肝臓において変化は認められなかった (Fig. 1b)。

PBO投与による遺伝子発現増加を確認するため、各群5例のマウス肝臓におけるmRNA発現レベルをreal-time RT-PCRにより解析した (Table 5)。その結果、薬物代謝第I相系酵素 (*Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b10*, *Por*, *Nqo*)、初期応答遺伝子 (*c-Myc*)、細胞周期G1/S期関連遺伝子 (*Ccnd1*, *E2f1*) はDEN単独群と比較してDEN+PBO投与群において有意に増加した。一方、DNA修復関連遺伝子 (*Ogg1*) は、DEN+PBO

投与群において有意に低下した。

D. 考察

我々はこれまでの研究の中で、PBO のラット肝発がん機序には、酸化ストレスを介した二次的 DNA 損傷が関与することを報告してきた。さらに、PBO を反復投与したラット肝臓では異物代謝・抗酸化に関連した機能分子の mRNA 発現が亢進し、レドックスバランスに変調を来している可能性について確認している。

本年度は、PBO の肝発がん機序における酸化ストレスの関与について検討するため、マウス肝二段階発がんモデルを用いて実験を行った結果、PBO 長期投与により変異肝細胞巣および肝細胞腺腫の発生頻度・発生個数が有意に増加することが明らかになり、マウスにおける PBO の肝腫瘍プロモーション作用が確認された。さらに PBO 投与による肝腫瘍形成期では、薬物代謝第 I 相系・II 相系酵素をコードする遺伝子群 (*Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b9*, *Cyp2b10*, *Por* および *Nqo1*) の mRNA 発現は、DEN 対照群の肝臓と比較して DEN+PBO 群で有意に増加し、肝腫瘍形成期においても前がん病変形成期と同様、酸化ストレスによるレドックスバランスの変化に対応し、これらの薬物代謝第 I 相・II 相系酵素の mRNA 発現が誘発されている可能性が示された。

さらに生体における酸化ストレスの変動について確認した結果、PBO を投与した肝臓から単離したミクロソームでは、前がん病変形成期と同様、肝腫瘍形成期においても NADPH 依存性の ROS 産生増加が認められた。さらに酸化ストレスの影響を評価するため、DNA 損傷指標である 8-OHdG 量を測定した結果、PBO を投与したマウス肝臓における核 DNA 中の 8-OHdG 量は DEN 対照群と比較して DEN+PBO 群で有意な増加は認められなかった。この 8-OHdG は、DNA の構成塩基のなかで最も酸化されやすいグアニンが、ROS の作用により酸化されることで形成される。この DNA 中に生じた 8-OHdG

は、シトシンだけでなくアデニンも容易に取り込むため、トランスバージョン型の突然変異を誘発し、肝発がんに関与することが知られている。さらに、腫瘍プロモーターであるペンタクロロフェノール、オクスフェンダゾールおよび β -ナフトフラボンなどの投与によって生じた酸化ストレスによる 8-OHdG の増加が、その腫瘍プロモーション過程に重要であるとする報告がある。しかし、本実験においては 8-OHdG の増加は認められず、マウスにおける PBO の腫瘍プロモーション作用には、ラットと異なり、ROS に起因した二次的な DNA 損傷は関与しないことが示唆された。

酸化ストレスにより初期応答遺伝子 (例えば *c-Fos*, *c-Jun* と *c-Myc*) が誘導されることは知られており、酸化ストレスによるこれら遺伝子の発現上昇は、それぞれの遺伝子の標的転写制御因子を調節し、結果的に細胞反応調節の役割を果たす。本実験において発現増加が認められた *c-Myc* は、ROS 産生により誘導されることが知られており、さらに誘導された *c-Myc* が転写因子 E2F1 の発現調整をすることが報告されている。この E2F1 は、*in vitro* トランスフェクション実験において、NF- κ B 活性を抑制することでアポトーシスを亢進することが知られている。一方、リンパ腫の発症過程においては、*c-Myc* と E2F1 が細胞増殖を調整することが知られており、さらに腫瘍発達の後期における E2F1 と *c-Myc* の過剰発現は、G1/S 移行もしくはアポトーシス移行の両方を亢進することが報告されている。これらの文献から、今回の実験における、*c-Myc* と E2f1 遺伝子の発現上昇を考えると、今回の実験の結果においては、アポトーシス関連遺伝子 (*P16*, *P21*, *P27*, *P53*, *P57*) の発現変動が認められなかったこと、また、PCNA 陽性率および CK8/18 陽性巣の発現増加や Cyclin D1 の mRNA 発現増加が認められていることから、おそらく細胞増殖活性が亢進していると考えられた。

これらの結果から、マウスにおける PBO の肝

発がんメカニズムには、ROS 産生に起因すると考えられる二次的な DNA 損傷が関与しないことが示唆された。さらに、PBO により過剰な ROS が産生されることで、細胞増殖機構に変調を来し、結果的に PBO が肝腫瘍プロモーターとなる可能性が考えられた。

E. 結論

PBO を 0.6%含有する飼料を 25 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、PBO によるマウス肝発がん機序は、ラットと異なり、ROS の産生に伴う二次的な DNA 損傷は関与しないことが示唆された。さらに、PBO により過剰な ROS が産生されることで、細胞増殖機構に変調を来し、結果的に PBO が肝腫瘍プロモーターとなる可能性が考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawai, M., Saegusa, Y., Dewa, Y., Nishimura, J., Kemmochi, S., Harada, T., Ishii, Y., Umemura, T., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Elevation of cell proliferation via generation of reactive oxygen species by piperonyl butoxide contributes to its liver tumor-promoting effects in mice Arch. Toxicol. 84:155-64、2010.

Kawai, M., Saegusa, Y., Kemmochi, S., Harada, T., Shimamoto, K., Shibutani, M. Mitsumori, K.: Cytokeratin 8/18 Is a Useful Immunohistochemical Marker for Hepatocellular Proliferative Lesions in Mice J. Vet. Med. Sci. 2010、 in press

2. 学会発表

川合正臣、三枝由紀恵、剣持明、嶋本敬介、石井雄二、梅村隆志、渋谷淳、三森国敏：マウスにおけるピペロニルブトキシサイドの肝発がん機序、第 26 回毒性病理学会、名古屋、2010 年 2 月

川合正臣、三枝由紀恵、剣持明、嶋本敬介、石井雄二、梅村隆志、渋谷淳、三森国敏：ピペロニルブトキシサイドのマウス肝発がん機序、第 24 回発癌病理研究会、金沢、2009 年 8 月

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シ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 回毒性病理学会、浜松、2009 年 2 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

Table 1. Sequence of primers used for real-time RT-PCR analysis.

Accession no.	Symbol	Description	Forward primer	Reverse primer
NM_009992	<i>Cyp1a1</i>	Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	GTGGAGCCTCATGTACCTGGTAAC	TGCCAATCACTGTGTCTAGTTCCT
NM_009997	<i>Cyp2a5</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 5	ACCAGACAAGTCAGGGGTG	TTCCCTCTTCTTTGGCTACC
NM_010000	<i>Cyp2b9</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9	CCGGTGTGAGCCGATCA	TGCTCAAGTACCCCCATGTC
NM_009998	<i>Cyp2b10</i>	Cytochrome P450, 2b10, phenobarbital inducible, type b	GCTGTCGTTGAGCCAACCTT	TCTCCAACGTTCCCCATTG
NM_010902	<i>Nrf2</i>	Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	CGACAGAAACCTCCATCTACTGAA	CCTCATCACGTAACATGCTGAAG
NM_008706	<i>Nqo1</i>	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	TGGCCGAACACAAGAAGCT	ATGGCTGGCACCCCCAAA
NM_008898	<i>Por</i>	P450 (cytochrome) oxidoreductase	GCCTGCCTGAGATCGACAAG	GGGTCGCCTTCTCCGTATGT
NM_010957	<i>Ogg1</i>	8-oxoguanine DNA-glycosylase 1	GCCAACAAAGAACTGGGAAACT	CAGCATAAGGTCCCCACAGATT
NM_009533	<i>Xrcc5</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	AAAGGATGATGAGGCGGCA	CGATGGCGACCATGTTTAAC
NM_007912	<i>Egfr</i>	Epidermal growth factor receptor, transcript variant 2	GAAAGTCTGCCAAGGCACA	AAGGACCACTTCACAGTTGT
NM_011697	<i>Vegfb</i>	Vascular endothelial growth factor B	AATGCAGATCCTCATGATCCAG	CATTGGCTGTGTTCTTCCAG
NM_011577	<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor, beta 1	GCCTGAGTGGCTGTCTTTTGAC	TGTATTCGGTCTCCTTGTTCA
NM_010849	<i>c-Myc</i>	Myelocytomatosis oncogene	GAGCTGTTTGAAGGCTGGATTT	TCCTGTTGGTGAAGTTCACGTT
NM_010234	<i>c-Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	GAGGAGGGAGCTGACAGATACACT	AGATTGGCAATCTCAGTCTG
NM_010591	<i>c-Jun</i>	Jun oncogene	AAGAAGCTCGGACCTTCTCAC	GTAGTGGTGTGATGTGCCCAT
NM_001025093	<i>Atf2</i>	Activating transcription factor 2	GACAGTGTCAATTGTGGCTGATCA	ACTCATTGAACAAACCCACTTCTTC
NM_007498	<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	CAGCATTTGATATACATGCTCAACCT	TCCGGTGTCCGTCCATTCT
NM_007631	<i>Ccnd1</i>	Cyclin D1	CGTGGCCTCTAAGATGAAGGA	TCGGGCCGGATAGAGTTGT
NM_007891	<i>E2f1</i>	E2F transcription factor 1	CCAGCGCCTGGCCTATG	GCCTTGATCACTATGACCATCTGTT
NM_009029	<i>Rb1</i>	Retinoblastoma 1	GGTCTGCCAACACCCACAA	AGATGTCCCAAATGATTCA
NM_016756	<i>Cdk2</i>	Cyclin-dependent kinase 2, transcript variant 2	GCCATTCTACCGTGTCTT	GATGGACCCCTCTGCATTGA
NM_009870	<i>Cdk4</i>	Cyclin-dependent kinase 4	GGGCTGCCGGTTGAG	GAAGAAAATCCAGGCCGCTTA
NM_009873	<i>Cdk6</i>	Cyclin-dependent kinase 6	GCCCTGAATCACCCGTACTTC	TGGCAGGTGAGAGTTCAGGTT
NM_009877	<i>P16</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Cdkn2a), transcript variant 1	CGCCCCGAACTCTTTTCG	CGTGAACGTTGCCCATCA
NM_007669	<i>P21</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cdkn1a), transcript variant 1	AAAGTGTGCCGTTGTCTCTT	CGTGACGAAGTAAAGTTCC
NM_009875	<i>P27</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (Cdkn1b)	AACTAACCCGGGGACTTGGAG	GGCCTGTAGTAGAACTCGG
NM_011640	<i>p53</i>	Transformation related protein 53 (Trp53), transcript variant 1	CGCTGCTCCGATGGTGAT	TCGGGATACAAATTCCTTCA
NM_009876	<i>P57</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (Cdkn1c)	GCCAATGCGAACGACTTCTT	CGTTCGACGCCTTGTCTC
NM_007393	<i>Actb</i>	Actin, beta, cytoplasmic	AGATTACTGCTCTGGCTCCTAGCA	GCCACCGATCCACAGAGA

Table 2. Changes in body weights, liver weights of male ICR mice given PBO for 25 weeks after DEN-initiation

Group (No. of animals)	DEN-alone (6)	DEN+PBO (15)
Final body weight (g)	51.43 ± 6.37	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 **

DEN: *N*-diethylnitrosamine, PBO: piperonyl butoxide.

The data represents mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the DEN-alone group at $p < 0.05$ or 0.01 (Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test).

Table 3. Incidence of liver proliferative lesions in ICR mice given PBO for 25 weeks after DEN-initiation

Group (No. of mice examined)		DEN-alone (8)	DEN+PBO (15)
Altered foci & liver tumors			
Incidence (%)	Altered foci	8 (100)	15 (100)
	Adenoma	3 (38)	15 (100) [#]
	Carcinoma	0 (0)	6 (40) [#]
Multiplicity	Altered foci	5.85 ± 3.71	4.53 ± 2.06
	Adenoma	1.53 ± 2.30	6.26 ± 2.23 **
	Carcinoma	0 ± 0	0.45 ± 0.67 *

DEN: *N*-diethylnitrosamine, PBO: piperonyl butoxide.

The data represents mean ± S.D.

* **: Significantly different from the DEN-alone group at $p < 0.05$ or 0.01 , respectively (Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test)

#: Significantly different from the DEN-alone group at $p < 0.05$ (χ^2 -test)

Table 4. CK8/18-positive liver lesions and PCNA ratio in male ICR mice given PBO for 25 weeks after DEN-initiation

Group (No. of mice examined)	DEN-alone (8)	DEN+PBO (12)
Number of CK 8/18-positive liver lesions (number/cm ²)		
Altered foci	0.46 ± 0.70	2.74 ± 1.78 **
Adenomas	0.08 ± 0.22	2.68 ± 1.48 **
Carcinomas	0	0.37 ± 0.41
PCNA ratio		
Non-tumor hepatocytes	0.38 ± 0.59	1.44 ± 1.01 *
Altered foci	5.39 ± 7.06	23.25 ± 17.06 **
Adenomas	6.17 ± 5.45	21.08 ± 14.74 **
Carcinomas	0	23.75 ± 14.02

DEN: *N*-diethylnitrosamine, PBO: piperonyl butoxide.

The data represents mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the DEN-alone group at $p < 0.05, 0.01$ (Student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test)

Table 5. Real-time RT-PCR analysis of livers of male ICR mice given PBO for 25 weeks after DEN-initiation

Gene name (No. of animals)	DEN-alone (5)	DEN+PBO (5)
<i>Cyp1a1</i>	1.04 ± 0.33 ^{a)}	66.63 ± 39.08 **
<i>Cyp2a5</i>	1.06 ± 0.37	8.72 ± 2.76 **
<i>Cyp2b9</i>	1.69 ± 1.62	3.83 ± 4.70
<i>Cyp2b10</i>	1.04 ± 0.27	61.46 ± 22.67 **
<i>Por</i>	1.01 ± 0.14	4.67 ± 0.65 **
<i>Nrf2</i>	1.08 ± 0.46	1.31 ± 0.19
<i>Nqo1</i>	1.01 ± 0.14	4.45 ± 1.10 **
<i>Ogg1</i>	1.01 ± 0.19	0.74 ± 0.14 *
<i>Xrcc5</i>	1.01 ± 0.17	0.90 ± 0.18
<i>Egfr</i>	1.00 ± 0.11	0.22 ± 0.26 **
<i>Vegf</i>	1.03 ± 0.28	0.89 ± 0.33
<i>Tgfb1</i>	1.05 ± 0.34	0.99 ± 0.47
<i>c-Myc</i>	1.17 ± 0.68	2.15 ± 0.45 *
<i>c-Fos</i>	1.18 ± 0.60	1.47 ± 0.72
<i>c-Jun</i>	1.09 ± 0.43	1.31 ± 0.99
<i>Atf2</i>	1.08 ± 0.50	0.61 ± 0.09
<i>Atf3</i>	1.50 ± 1.20	2.23 ± 0.94
<i>Ccnd1</i>	1.07 ± 0.42	4.05 ± 1.56 **
<i>E2f1</i>	1.01 ± 0.17	1.50 ± 0.39 *
<i>Rb1</i>	1.01 ± 0.18	0.95 ± 0.36
<i>Cdk2</i>	1.14 ± 0.64	1.10 ± 0.50
<i>Cdk4</i>	1.03 ± 0.31	0.90 ± 0.26
<i>Cdk6</i>	1.04 ± 0.33	1.29 ± 0.35
<i>P16</i>	1.25 ± 0.85	0.69 ± 0.42
<i>P21</i>	1.14 ± 0.55	0.77 ± 0.38
<i>P27</i>	1.02 ± 0.22	0.80 ± 0.33
<i>P53</i>	1.02 ± 0.24	0.79 ± 0.22
<i>P57</i>	1.01 ± 0.15	1.06 ± 0.39

DEN: *N*-diethylnitrosamine, PBO: piperonyl butoxide

The data represents mean ± S.D.

a) Expression level / (β -actin)

* **: Significantly different from the DEN-alone group at $p < 0.05$ or 0.01 , respectively (student's *t*-test or Aspin-Welch's *t*-test)

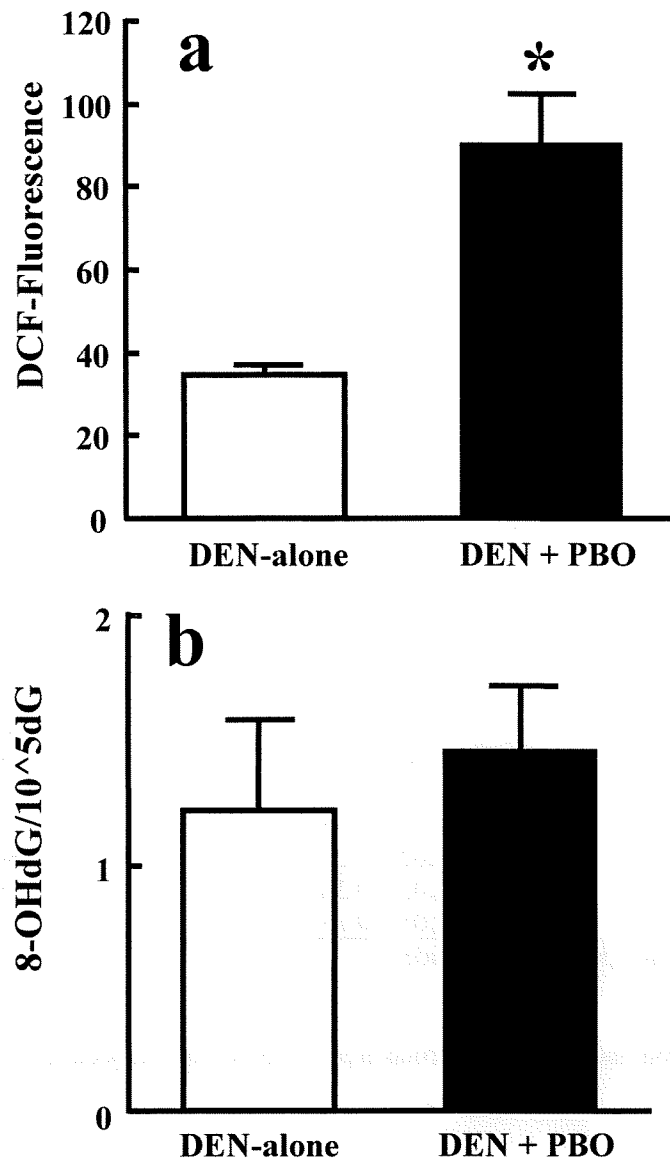


Figure 1. Oxidative stress markers in mice given PBO for 25 weeks after DEN-initiation. a: NADPH-dependent microsomal ROS production measured by the fluorescent probe, H₂DCFDA. Each column represents the mean \pm S.D. of ROS production in isolated liver microsomes from partially hepatectomized mice given DEN-alone (white column; n = 5) or DEN + PBO (black column; n = 5). * Significantly different from the DEN-alone group at $p < 0.05$ (Student-t test). b: 8-OHdG levels in liver DNA. Values are expressed as mean \pm SD in 5 mice.

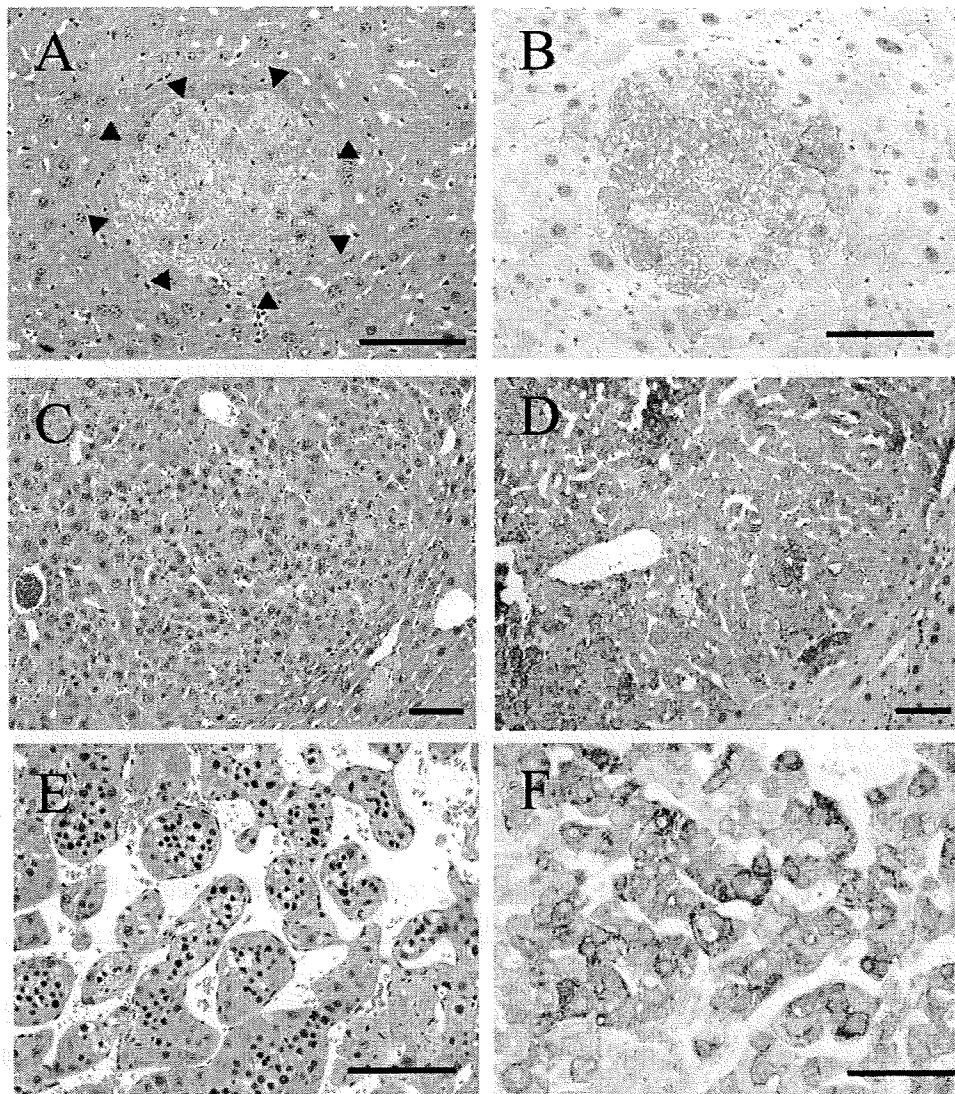


Figure 2. Light microscopic photographs (a, c, d) and immunohistochemistry of CK8/18 (c, d, e) of hepatocellular proliferative lesions in mice given PBO for 25 weeks after DEN-initiation. a and b: altered focus, c and d: adenoma., e and f: carcinoma Bar = 100 μ m