

(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(2009年3月分)～12(2010年2月分)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、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、2009年3月から2010年2月の間で平均85%であった(図1)。前年度と同様、第11胸神経、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(21～68%)が顕著であった(図2)。上記の7部位を除いた残りの25部位は概ね80%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。

また、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理由であるが、第1仙骨神経～第3仙骨神経の背根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

孔の外にある背根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除去率を著しく低下させていると考えられる。同様のことが、第4腰神経～第6腰神経の背根神経節の除去率の低さについても推測できる。なお、第4および5仙骨神経の背根神経節は孔の外に位置するにもかかわらず高い除去率を示したが、これはこれらの部位の神経節がかなり小さく、孔を比較的容易に通過できるためと考えられる。

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)。「交雑種去勢牝」、「交雑種牝」、「ホルスタイン去勢牝」、及び「和牛(黒毛、褐毛和種)去勢牝、ホルスタイン牝、etc.」のいずれの除去率も、85%前後であり、明瞭な差は認められなかった。各グループ別の除去率は月毎にも調べたが、どのグループも概ね80%から90%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2009年3月から2010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85%であった。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。

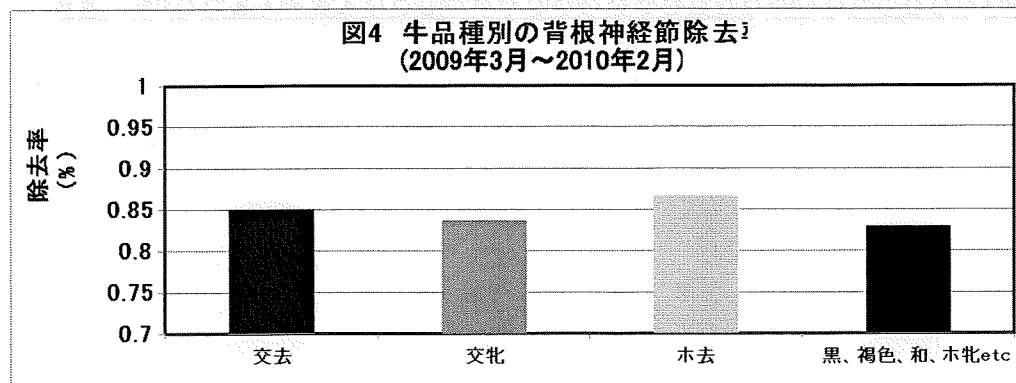
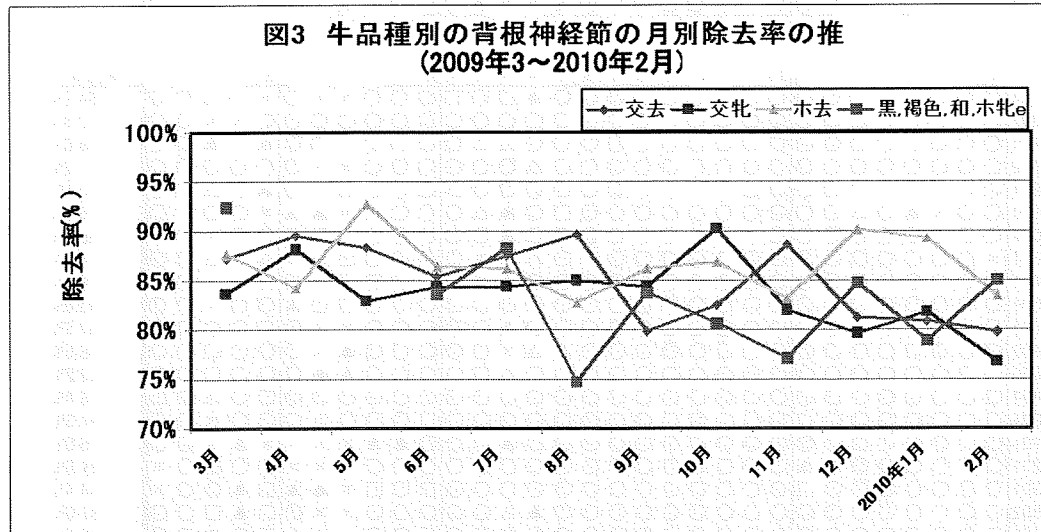
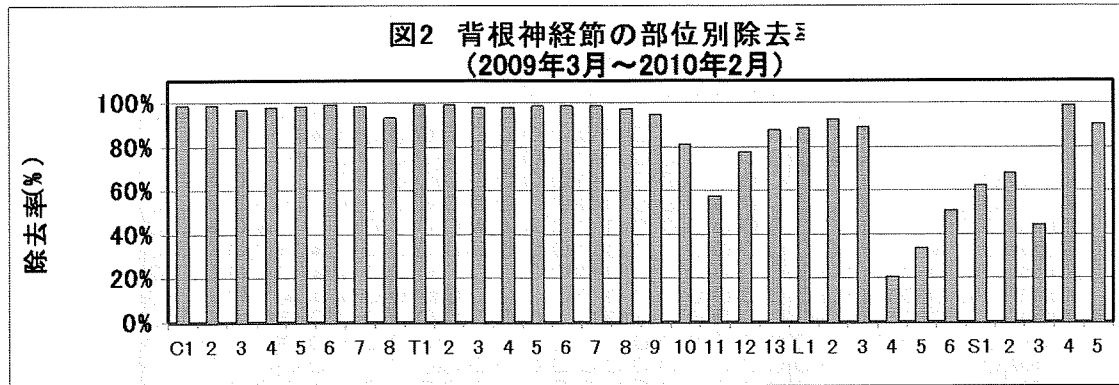
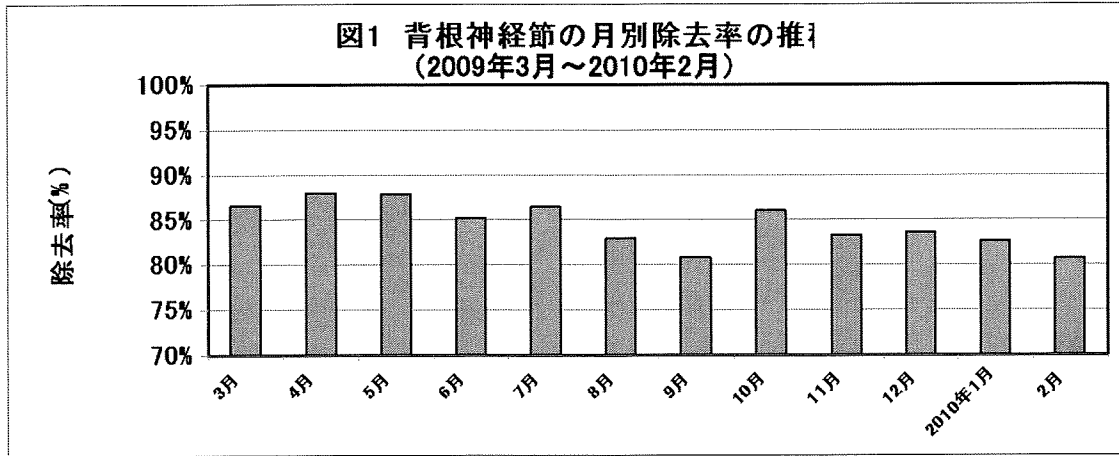
また、牛の品種別及び牝牝別の脊柱からの背根神経節の除去率を比較検討したが、いずれも除去率に差は見られなかった。

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	最小 72% 最大 90% 平均 83% 標準偏差 7%
G. 研究発表 なし	
H. 知的財産権の出願・登録状況 なし	2009年9月 15検体 最小 73% 最大 92% 平均 81% 標準偏差 8%
2009年3月 24検体 最小 72% 最大 97% 平均 87% 標準偏差 6%	
2009年4月 22検体 最小 75% 最大 98% 平均 88% 標準偏差 6%	2009年10月 19検体 最小 72% 最大 95% 平均 86% 標準偏差 6%
2009年5月 19検体 最小 78% 最大 99% 平均 88% 標準偏差 6%	2009年11月 18検体 最小 70% 最大 94% 平均 83% 標準偏差 7%
2009年6月 20検体 最小 73% 最大 95% 平均 85% 標準偏差 6%	2009年12月 10検体 最小 71% 最大 96% 平均 84% 標準偏差 7%
2009年7月 20検体 最小 76% 最大 97% 平均 87% 標準偏差 5%	2010年1月 23検体 最小 72% 最大 94% 平均 83% 標準偏差 6%
2009年8月 14検体	

20010年2月 18 検体
最小 68%
最大 94%
平均 81%
標準偏差 7%

2009年3月～2010年2月 222 検体 最小 63% 最大 99% 平均 85%



付表1

	C1	2	3	4	5	6	7	8	T1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#	L1	2	3	4	5	6	S1	2	3	4	5	除去率		
9030201	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	×	○	▲	○	□	○	○	○	90.1%		
9030301	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	□	▲	×	×	▲	○	○	○	○	78.1%		
9030501	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	85.9%		
9030601	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	×	▲	▲	○	○	○	○	○	▲	×	▲	×	×	×	○	○	74.5%		
9030602	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	□	□	○	○	×	○	○	○	93.8%		
9031001	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	×	×	×	×	○	○	○	○	86.5%	
9031002	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○	×	○	○	90.6%	
9031201	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	○	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	○	○	89.6%	
9031301	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	×	△	×	△	○	○	○	93.8%
9031302	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	□	□	○	×	▲	○	○	△	×	△	▲	○	○	○	○	○	81.3%	
9030901	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	△	○	□	○	○	○	○	△	▲	□	×	○	×	○	○	○	85.4%	
9031601	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	×	○	○	○	□	×	×	○	○	□	○	○	○	87.5%	
9031602	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	○	×	○	×	83.3%	
9031701	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	□	△	▲	○	○	85.9%	
9031801	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	▲	▲	▲	○	○	○	○	×	×	×	▲	○	▲	○	○	80.2%	
9031802	○	○	▲	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	□	▲	□	○	○	△	○	○	○	91.2%	
9031901	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	▲	×	▲	○	○	○	○	○	89.6%
9032301	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	▲	△	▲	×	○	△	○	○	88.5%	
9032401	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	△	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	□	□	×	□	○	○	○	89.1%	
9032501	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	□	○	○	○	95.8%
9032502	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	□	○	○	○	96.9%
9032601	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	○	○	○	○	○	○	×	▲	○	○	×	○	○	○	87.5%	
9033001	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	×	○	○	○	○	×	×	×	×	○	○	○	○	81.3%	
9033101	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	▲	×	×	▲	○	○	○	○	▲	×	×	×	×	×	○	○	71.9%	

付表2

	C1	2	3	4	5	6	7	8	T1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#	L1	2	3	4	5	6	S1	2	3	4	5	除去率			
9040101	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	▲	□	○	□	○	○	○	×	×	×	×	×	○	△	○	○	84.9%		
9040301	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	○	○	○	93.8%	
9040701	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	○	○	○	○	○	○	×	×	○	▲	○	▲	○	○	89.6%		
9040702	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○	92.2%		
9040801	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	○	△	×	○	▲	○	△	○	○	○	90.1%	
9040901	○	○	×	▲	○	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	▲	△	○	○	○	△	×	▲	▲	×	○	○	○	○	76.6%	
9041001	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	×	○	○	○	○	92.2%	
9041301	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	○	×	○	○	○	○	○	□	×	×	△	×	△	○	○	84.9%		
9041401	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	×	×	□	△	×	×	○	87.7%	
9041501	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	×	○	○	○	93.8%	
9041601	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	□	○	○	○	○	87.5%	
9041602	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	×	○	○	○	○	○	○	○	▲	×	○	○	○	○	○	○	88.5%	
9041603	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	□	○	○	○	○	○	○	▲	▲	○	○	○	□	○	○	92.2%	
9041701	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	98.4%	
9042001	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	△	○	○	×	○	○	○	94.3%	
9042101	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	×	○	○	75.0%	
9042201	○	○	○	○	○	○	○	▲	○	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	□	○	□	○	×	81.8%	
9042301	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	×	×	▲	□	○	○	○	×	84.4%	
9042302	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	○	○	○	○	87.0%	
9042401	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	▲	▲	□	○	▲	○	○	89.6%	
9042701	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	▲	○	□	○	▲	○	○	○	90.6%	
9042801	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	▲	×	▲	○	○	○	○	89.1%

付表3

	C1	2	3	4	5	6	7	8	T1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#	L1	2	3	4	5	6	S1	2	3	4	5	除去率		
9050601	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	×	△	×	×	△	○	○	○	○	83.8%	
9050701	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	○	○	○	○	○	○	○	94.3%	
9050702	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	92.7%	
9050801	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	×	△	○	○	○	○	○	○	○	83.8%	
9051101	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	×	○	□	×	×	○	○	○	81.8%	
9051201	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	93.8%	
9051202	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	87.5%
9051301	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	99.0%
9051801	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	○	○	○	○	○	○	○	○	77.6%
9051801	○	○	○	△	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	○	○	○	○	○	○	○	○	78.7%
9052101	○	○	○	○	○	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	○	△	○	○	○	○	○	○	91.2%
9052102	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	92.2%
9052103	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	○	○	○	○	○	○	○	○	92.7%
9052201	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	84.4%
9052501	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	×	△	○	○	○	○	○	○	○	○	84.4%
9052601	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	○	○	○	○	○	○	78.7%
9052801	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	90.6%
9052802	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	95.3%
9052901	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	×	○	△	○	△	×	○	○	88.0%

付表4

	C1	2	3	4	5	6	7	8	T1	2	3	4	5	6	7	8	9	#	#	#	#	L1	2	3	4	5	6	S1	2	3	4	5	除去率		
9060101	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○	△	△	○	○	○	86.5%		
9060201	○	○	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	□	○	○	△	△	×	×	△	△	○	73.4%
9060401	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	○	○	○	○	○	○	○	○	92.7%
9060501	○	□	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○	△	○	○	○	○	○	80.7%
9060801	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	×	×	○	○	○	○	77.6%
9060901	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	○	△	×	×	○	○	○	88.0%
9061001	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○	△	○	○	○	○	89.1%
9061501	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	□	△	○	△	△	△	○	○	88.5%
9061601	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	○	○	△	×	○	○	○	○	89.1%
9061701	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	×	△	×	○	○	○	○	○	87.1%
9061801	○	○	○	△	○	○	○	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	×	×	○	△	○	○	○	○	81.8%
9061901	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	□	×	×	×	×	×	○	○	73.4%	
9062401	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	×	△	○	○	○	○	○	89.1%
9062501	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	93.8%
9062502	○	○	×	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	△	○	○	○	△	○	○	○	82.8%
9062503	○	○	△	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	△	△	×	△	×	×	○	△	○	○	80.7%
9062601	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	90.6%
9062602	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	×	×	×	△	△	○	○	○	○	79.2%
9062901	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	×	×	○	○	×	○	○	○	84.4%
9063001	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	△	○	○	○	○	○	○	○	95.3%

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年度研究）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
—各種動物にける腎糸球体濾過量（GFR）測定の基礎検討—

研究分担者 古濱 和久 岩手大学農学部獣医学課程教授

研究要旨

腎糸球体濾過量（glomerular filtration rate: 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。今回、各種動物の GFR を簡便に測定することを目的に、非イオン性ヨード X 線造影剤 iodixanol を取り上げ、ラット、ウサギ、ネコ、ウシおよびウマを用いて GFR 測定の基礎検討を行った。その結果、iodixanol の投与量、採血時間、血中濃度推移、分布容積および腎疾患モデルでの解析から、iodixanol の単回静注・1 回採血法により GFR 測定が可能となった。なお、各種健常動物における GFR 値は標準 inulin 法で得られ既知報告値と良く一致していた。本法は最小限の負荷で、麻酔や尿採取が不要なことから、臨床学的、毒性学的小および薬物動態学的研究に応用できると結論した。

A. 研究目的

ヒトの GFR 測定には古くから inulin が使用されているが、溶解度が低く、測定には特殊な試薬が必要なため、獣医学領域では殆ど応用されてこなかった。造影剤 iodixanol は腎糸球体から濾過・排泄され、血漿蛋白質との結合や腎尿細管からの分泌・再吸収がなく、濃度測定が簡便な利点がある。本研究では iodixanol の単回静注・1 回採血法により、血中濃度から各種動物の GFR 測定が可能であるか検討したものである。

B. 研究方法

実験には雄 F344 ラット、雄 NZW ウサギ、雄雌雑種ネコ、雄雌黒毛・ホルスタイン種子ウシおよび去勢サラブレッドを使用した。血清ヨード濃度は HPLC 法で測定し、血清尿素窒素およびクレアチニン濃度も測定した。一部動物では腎の組織検索も行った。

（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

健常動物を用いて、iodixanol の単回静注・3 回採血法により投与量と採血時間を調べたところ、ラットでは 1500 mg I/kg と 60, 120 および 180 分、ウサギでは 40 mg I/kg と 60, 90 および 120 分、ネコでは 20 mg I/kg と 60, 90 および 120 分、子ウシでは 40 mg I/kg と 60, 120 および 180 分、ウマでは 20 mg I/kg と 60, 90 および 120 分の組み合わせが最適であった。次に、ラットおよびウサギに各種腎傷害モデル(腎切除、糸球体障害、尿細管障害あるいは乳頭障害)を作成し、3 回採血法で得た数値を基に、 $Cl = 1/(t/V + 0.0016) \times \ln [Q/(V \times C)]$ の式 (Cl: クリアランス, V: 見かけ上の分布容積, Q: 投与量, t: 採血時間, C: t 時間での血中濃度) より、V 値を C 値との scatter diagram より求め、1 回採血法 (投与 90 分後) とした。得られた GFR 値を 3 回採血法と 1 回採血法で比較したところ、良好な相関関係 ($r = 0.90$ 以上) が認められた。現在、ネコ、ウシおよびウマにおいても野外臨床例を用いて、同様の検証を行っている。

D. 考察

Iodixanol 単回投与後のヨード濃度推移からの GFR 測定は獣医療では応用性が広く、正確な採尿が困難なウシおよびウマにおいては有用性が高いと推察される。平成 20 年度研究において“動物用キノロン薬の安全性評価”を行ったが、キノロン薬ガチフロキサシン (GFLX) に関連した血糖異常は膵臓 GFLX 濃度に依存するとともに、膵インスリン貯蔵の予備能の違いが異常発現に繋がることを証明した。一般的にキノロン薬は腎排泄型薬剤であり、腎疾患により GFR が低下した場合、血中濃度が異常に上昇して、有害作用が出現し易いことが示唆されている。

E. 結論

今後、各種動物の GFR 値と腎排泄型薬物の血中薬物濃度との関連性を明らかにすることが、適正使用上重要と考える。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Katayama, R., Yamaguchi, N., Yamashita, T., Watanabe, S., Satoh, H., Yamagishi, N., Furuhama, 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

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能 (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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
Kawai, M., Saegusa, Y., Dewa, Y., Nishimura, J., Kemmochi, S., Harada, T., Ishii, Y., Umemura, T., Shibutani, M., <u>Mitsumori, K.</u>	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	155-164	2010
Kawai, M., Saegusa, Y., Kemmochi, S., Harada, T., Shimamoto, K., Shibutani, M., <u>Mitsumori, K.</u>	Cytokeratin 8/18 Is a Useful Immuno- histochemical 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., <u>Furuhama, K.</u>	Calculation of glomerular filtration rate in conscious rats by the use of a bolus injection of iodixanol and a single blood	J. Pharmacol. Toxicol. Methods.	61	59-64	2010

研究成果の刊行物・別刷

Elevation of cell proliferation via generation of reactive oxygen species by piperonyl butoxide contributes to its liver tumor-promoting effects in mice

Masaomi Kawai · Yukie Saegusa · Yasuaki Dewa · Jihei Nishimura · Sayaka Kemmochi · Tomoaki Harada · Yuji Ishii · Takashi Umemura · Makoto Shibutani · Kunitoshi Mitsumori

Received: 15 July 2009 / Accepted: 2 December 2009 / Published online: 26 January 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Piperonyl butoxide (PBO) is a pesticide synergist used with pyrethroids as a domestic insecticide, and it acts as a non-genotoxic hepatocarcinogen in rats and mice. To clarify whether oxidative stress is involved in the liver tumor-promoting effect of PBO in mice, male mice were subjected to two-thirds partial hepatectomy, followed by *N*-diethylnitrosamine (DEN) treatment, and given a diet containing 0.6% PBO for 25 weeks. The incidences of cytokeratin (CK) 8/18-positive foci, adenomas, and carcinomas significantly increased in the DEN + PBO group compared with the DEN-alone group. The PCNA-positive ratio significantly increased in non-tumor hepatocytes, CK8/18-positive foci and adenomas in the DEN + PBO group compared with the DEN-alone group. PBO increased reactive oxygen species (ROS) production in microsomes but did not change oxidative DNA damage as assessed by 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG). In real-time RT-PCR, PBO upregulated the expression of genes related to metabolism, such as *Cytochrome P450 1a1*, *2a5*, and *2b10*, and metabolic stress, such as *Por* and *Nqo1*, but downregulated *Egfr* and *Ogg1*. PBO also increased early response genes

downstream of mitogen-activated protein kinase (MAPK), such as *c-Myc* that is induced by excessive ROS production, and G1/S transition-related genes, such as *E2f1* and *Cnd1*. Thus, PBO can generate ROS via the metabolic pathway without any induction of oxidative DNA damage, activate cell growth, increase *c-Myc*- and *E2F1*-related pathways, and act as a liver tumor promoter of DEN-induced hepatocarcinogenesis in mice.

Keywords Piperonyl butoxide · Oxidative stress · Mitogen-activated protein kinase · 8-hydroxydeoxyguanosine · Hepatocarcinogenesis

Abbreviations

PBO	Piperonyl butoxide
DEN	<i>N</i> -diethylnitrosamine
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
CK	Cytokeratin
ROS	Reactive oxygen species
8-OHdG	8-hydroxydeoxyguanosine
Cyp1A1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
Cyp2a5	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 5
Cyp2b9	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9
Cyp2b10	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10
Ogg1	8-xoguanine DNA glycosylase
Por	P450 (cytochrome) oxidoreductase
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
<i>c-Myc</i>	Myelocytomatosis oncogene
E2f1	E2F transcription factor 1

M. Kawai · Y. Saegusa · Y. Dewa · J. Nishimura · S. Kemmochi · T. Harada · M. Shibutani · 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: mitsumori@cc.tuat.ac.jp

M. Kawai · Y. Saegusa · Y. Dewa · J. Nishimura · S. Kemmochi
Pathogenetic Veterinary Science,
United Graduate School of Veterinary Sciences,
Gifu University, Gifu 501-1193, Japan

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

ccnd1	Cyclin D1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidase
GST-P	Glutathione s-transferase placental form
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DEN	Diethylnitrosamine
DCFH-DA	2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein diacetate
β -NADPH	β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PBS	Phosphate buffered saline
HE	Hematoxylin and eosin
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
CT	Cycle time

Introduction

Many chemicals, such as drugs, agricultural chemicals, and food additives, generate reactive oxygen species (ROS) via metabolic pathways and induce oxidative stress. ROS are required for physiologic function and regulate cellular signaling in normal cells. However, excessive ROS can induce DNA damage and cause genomic instability, which may contribute to cancer progression. Thus, ROS play multiple roles in tumor initiation, progression, and maintenance (Benhar et al. 2002). We have reported that oxidative stress promotes tumors in rats after treatment with oxfendazole, fenbendazole, fenofibrate, and piperonyl butoxide (PBO), from the early stage of a two-stage hepatocarcinogenesis model (Muguruma et al. 2007; Dewa et al. 2009; Nishimura et al. 2007; Taniai et al. 2009). Our data suggest that these chemicals induce sustained oxidative stress in the livers, which accounts for the enhancement of microsomal ROS production and increased oxidative DNA damage.

PBO is a pesticide synergist that is widely used with pyrethroids for grain protection and as a domestic insecticide. PBO is a non-genotoxic hepatocarcinogen in F344 rats fed a diet containing 1.2% PBO for 2 years (Takahashi et al. 1994) and CD-1 mice fed a diet containing 300 mg/kg/day PBO for 79 weeks (Butler et al. 1998). We previously showed that the number of glutathione S-transferase placental form (GST-P)-positive foci and the expression of *Cyp1a1* gene significantly increased in rats given a diet containing 1 or 2% PBO (Muguruma et al. 2007). The cytochrome P-450 family generates ROS as byproducts of microsomal oxidation, and the upregulation of CYP1A1 and 1A2 isoforms indirectly results in the production of large amounts of ROS (Puntarulo and Cederbaum 1998; Nishikawa et al. 2002). Moreover, PBO and phenobarbital induce CYP2B1 and inhibit intercellular communication through gap junctions by downregulating connexin 32 in

the liver of rats (Okamiya et al. 1998). Moreover, the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), a sensitive marker of oxidative DNA damage (Kasai 1997; Valavanidis et al. 2009), increased in the liver of rats given a diet containing 2% PBO in a two-stage hepatocarcinogenesis model (Muguruma et al. 2007). Therefore, PBO can generate ROS via a metabolic pathway in the liver of rats and induce oxidative stress, including oxidative DNA damage (Muguruma et al. 2009). On the contrary, in male ICR mice fed a diet containing 0.6% PBO for 8 weeks without any initiation treatment, microarray analysis and real-time RT-PCR revealed that oxidative and metabolic stress-related genes, such as *Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b9*, *Cyp2b10*, and NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (*Por*), were upregulated (Muguruma et al. 2006). Therefore, PBO could also generate ROS via the metabolic pathway and induce oxidative stress that is possibly related to the hepatocarcinogenesis in mice. However, there is no data demonstrating that oxidative damage resulting from ROS generation induced by the long-term PBO treatment is involved in the liver tumor promotion of hepatocarcinogenesis in mice.

Here, we investigated the potential mechanism underlying the liver tumor-promoting effect of PBO in mice, with particular attention on gene expression and biochemical events affecting the cell cycle regulators, using a DEN-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized mice given PBO for 25 weeks.

Materials and methods

Chemicals

PBO, α -[2-(2-butoxyethoxy)ethoxy]-4,5-methylenedioxy-2-propyltoluene (CAS register number 51-03-6, EU Number PBO, purity 90%), was purchased from Kanto Chemical Co., Inc. (Kumamoto, Japan). 3,3'-diaminobenzidine (DAB) was purchased from Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Tokyo, Japan). Diethyl nitrosamine (DEN) was purchased from Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan). Anti-cytokeratin 8/18 polyclonal antibody was purchased from PROGEN Biotechnik GmbH (Heidelberg, Germany). Monoclonal mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibodies were purchased from DAKO Cytomation A/S (Glostrup, Denmark). Trizol reagent, SuperScript™ III reverse transcriptase, and random primers were purchased from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). The Power SYBR Green PCR Master Mix was purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). The BCA Protein Assay Kit was purchased from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). 2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) was purchased from Molecular Probes Inc.

(Eugene, OR, USA). β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADPH), dithiothreitol (DTT), and Protease Inhibitor Cocktail were purchased from Sigma–Aldrich, Inc. (St Louis, MO, USA). All other reagents were commercially available and of analytical grade.

Animals and experimental design

Six-week-old male ICR mice were obtained from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan). They were housed in plastic cages (five animals/cage) with absorbent paper chip bedding in an animal room maintained under standard conditions (room temperature, $22 \pm 2^\circ\text{C}$; relative humidity, $55 \pm 5\%$; and light/dark cycle, 12 h) and given free access to a powdered diet (Oriental MF; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) and tap water. The animals were acclimatized for 1 week prior to beginning the experiment. The experiment was performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of the Tokyo University of Agriculture and Technology. We used a short-term, two-stage liver carcinogenesis model (Moto et al. 2006) in ICR mice. To enhance hepatocellular proliferation, mice were subjected to a two-thirds partial hepatectomy. Twenty-four hours after the hepatectomy, mice were given a single i.p. injection of DEN (20 mg/kg body weight) dissolved in saline to initiate hepatocarcinogenesis. One week after injection, the animals were subdivided into two groups and given a powdered diet containing 0 or 0.6% PBO for 25 weeks. On completion of treatment, the mice were killed by exsanguination from the posterior vena cava under ether anesthesia, and livers were immersed in 4% paraformaldehyde solution for microscopy. Some of the livers cut into small pieces without the macroscopic nodules, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis.

Histopathology, immunohistochemistry, and quantitative analysis

After sacrifice, livers were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, sectioned at 3- μm thickness, and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histopathological examinations. The incidence of liver proliferative lesions, such as altered foci, adenomas, and carcinomas, in two HE-stained sections/mouse was counted under a light microscope.

For immunohistochemistry, paraffin-embedded liver sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in ethanol. For antigen retrieval, the liver sections for PCNA were incubated with citrate buffer [0.1 mol/L citrate (pH 6.0)] and heated in a microwave oven at low power for 30 min before incubation with 0.3% hydrogen peroxide in PBS. These liver sections were subjected to immunohistochemistry using a mouse-on-mouse immunodetection kit

(Vector Laboratories Burlingame, CA, USA) for PCNA. The specimens were incubated overnight with the PCNA antibody at a dilution of 1:300 in 0.5% casein–PBS at 4°C .

The liver sections for CK8/18 incubated with citrate buffer [0.1 mol/L citrate (pH 6.0)] and heated in a microwave oven at 98°C for 30 min before incubation with 0.3% hydrogen peroxide in PBS. Non-specific binding sites were blocked with blocking normal goat serum. The specimens were incubated overnight with the CK8/18 antibody at a dilution of 1:100 in 0.5% casein–PBS at 4°C . The sections were incubated with a guinea pig peroxidase-conjugated secondary antibody (Fitzgerald Industries International Inc., MA, USA) diluted in PBS supplemented with 0.5% casein. Subsequently, 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Dojindo laboratories, Kumamoto, Japan) was applied as a chromogen. The sections were finally counterstained with hematoxylin.

The number of CK8/18-positive foci, adenoma, and carcinoma, and the total areas of liver sections were estimated using WinROOF image analysis software (version 5.7; Mitani Corp., Fukui, Japan), and the number of foci per unit area (cm^2) of liver sections was calculated. The PCNA-positive indices were estimated for CK8/18-positive areas using WinROOF image analysis software package.

Measurement of microsomal ROS production in the liver

The liver samples from each treatment group were homogenized with three volumes of ice-cold homogenate buffer (1.15% KCl, 0.2 mM EDTA-2Na, 0.1 mM DTT, 0.1% protease inhibitor cocktail, 20% glycerin; pH 7.4) using a glass-Teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged at $700\times g$ for 10 min, and the supernatant was centrifuged at $10,000\times g$ for 20 min. The resultant supernatant was further centrifuged at $105,000\times g$ for 60 min. Finally, the pellet was resuspended in 0.25 mol/l sucrose and 0.05 mol/l Tris–HCl buffer (pH 7.4) as the microsomal fraction and stored at -80°C . Microsomal protein concentrations were determined using a BCA Protein Assay Kit (Pierce, IL, USA).

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) was used as an intracellular probe for detecting ROS formation during the metabolic process by converting DCFH-DA to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein through oxidation by ROS. Liver microsomes (0.05 mg protein) were incubated in the dark at 37°C in 40 mmol/l Tris buffer (pH 7.4) and DCFH-DA (5 mmol/l) for 30 min followed by further incubation for 30 min after addition of 0.6 mmol/l NADPH. The formation of ROS was detected by measurement of the fluorescent product using a fluorescence microplate reader (excitation, 485 nm; emission, 528 nm).

Measurement of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA

Oxidative DNA damage in liver was estimated as the levels of 8-OHdG. 8-OHdG levels in liver DNA were determined using the method described by Umemura et al. (2006). Briefly, nuclear DNA was isolated from 0.3 g of a wet weight sample using a DNA Extractor WB Kit (Wako Pure Chemical Industries) containing an antioxidant NaI solution to dissolve the cellular components. For further prevention of auto-oxidation in the cell-lysis step, deferoxamine mesylate was added to the lysis buffer (Helbock et al. 1998). DNA was digested into deoxynucleotides using nuclease P1 and alkaline phosphatase. The levels of 8-OHdG (8-OHdG/10⁵ deoxyguanosine) were then assessed by high-performance liquid chromatography using an electrochemical detection system (Coulochem II; ESA Biosciences, Inc., MA, USA) as previously reported (Umemura et al. 2006).

mRNA expression in whole livers by real-time RT-PCR analysis

In our previous studies (Muguruma et al. 2006, 2007, 2008), PBO upregulated metabolism-related genes involved in oxidative stress and DNA repair-related genes, apoptosis-related genes, and cell cycle-, and cell proliferation-related genes. We also measured genes (oncogene, apoptosis, and cell cycle-regulated genes) that were changed by ROS generation (Vafa et al. 2002; Benhar et al. 2002; Matsumura et al. 2003) (Table 1) using quantitative real-time RT-PCR analysis. Briefly, the total RNA from six mice per treatment group was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The total RNA was reverse transcribed using ThermoScript reverse transcriptase (SuperScript III First-Strand Synthesis System; Invitrogen). All PCRs were performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on a Step One Plus (Applied Biosystems) using the following conditions: 1 incubation at 50°C for 2 min followed by 95°C for 10 min, and then 45 incubations at 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. The forward and reverse primers listed in Table 1 were designed using Primer Express 2.0 software following Applied Biosystems' instructions for optimal primer design. The relative differences in gene expression were calculated using the cycle time (Ct) values that were first normalized to β -actin, the endogenous control in the same sample, and then relative to a control Ct value by a 2- $\Delta\Delta$ Ct method described in the Applied Biosystems User Bulletin #2 'Relative quantification of gene expression.' The data represent the average fold changes with standard deviation.

Statistical analysis

Statistical analysis was first carried out using the F-test for homogeneity of variance. If the variance was homogeneous, a Student's *t*-test was applied for comparison, and if it was heterogeneous, the Aspin-Welch's *t*-test was used. The incidences and multiplicities of proliferative lesions observed in the DEN + PBO and DEN-alone group were analyzed using the χ^2 -test.

Results

Body and liver weights and macroscopic examinations

There were no deaths or clinical symptoms related to PBO treatment in any of the groups, but all mice in the DEN + PBO group had liver enlargement at necropsy. The final body weights as well as absolute and relative liver weights are given in Table 2. The absolute and relative liver weights of mice in the DEN + PBO group were significantly higher than those in the DEN-alone group.

Formation of hepatic microsomal ROS in liver DNA

The values of liver microsomal ROS generation in the DEN + PBO and DEN-alone groups were 34.60 ± 18.39 and 89.83 ± 17.45 , respectively, and the value in the DEN + PBO group significantly increased when compared with the DEN-alone group (Fig. 1).

Formation of 8-OHdG in liver DNA

HPLC analysis revealed that the 8-OHdG levels in the DEN + PBO and DEN-alone groups were 1.21 ± 0.36 and 1.44 ± 0.26 , respectively, and there was no significant difference between these groups (Fig. 1).

Histopathological examination

In HE-stained sections, most liver tissues from the DEN + PBO group contained hepatocellular altered foci, adenomas, or carcinomas, while both groups had a similar incidence of altered hepatocellular foci (Table 3; Fig. 2). There was no difference in the histology of liver proliferative lesions induced between the DEN-alone and DEN + PBO groups. However, the incidence of hepatocellular adenomas in the PBO + DEN and DEN-alone groups was 100 and 40%, respectively. Similarly, the incidence of hepatocellular carcinomas in the PBO + DEN group was significantly higher than that in the DEN-alone group.

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	ACCAGACAAGTCAGGGGTTG	TTTCCCTCTTCTTTGGCTACC
NM_010000	<i>Cyp2b9</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9	CCGGTGTGAGCCGATCA	TGCTCAAAGTACCCCCCATGTCA
NM_009998	<i>Cyp2b10</i>	Cytochrome P450, 2b10, phenobarbital inducible, type b	GCTGTCTGTTGAGCCCAACCTT	TCTTCCAAAGTTCCTCCCAATTG
NM_010902	<i>Nrf2</i>	Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	CGACAGAAACCTCCCATCTACTGAA	CCTCATCACGTAACATGCTGAAG
NM_008706	<i>Nqo1</i>	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	TGGCCGAACACAAGAAGCT	ATGGTGGCACCCCAAA
NM_008898	<i>Por</i>	P450 (cytochrome) oxidoreductase	GCCTGCCTGAGATCGACAAG	GGTTCGCTTCTCCGTATGT
NM_010957	<i>Ogg1</i>	8-oxoguanine DNA glycosylase 1	GCCAAACAAGAAGCTGGGAAACT	CAGCATAAGGTCCCCACAGATT
NM_009533	<i>Xrcc5</i>	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	AAAGGATGATGAGGGCGCA	CGATGGCGACCATGTTTAACTC
NM_007912	<i>Egfr</i>	Epidermal growth factor receptor, transcript variant 2	GAAAGTCTGCCAAGGCACAA	AAGGACCACCTTCACAGTTGTT
NM_011697	<i>Vegfb</i>	Vascular endothelial growth factor B	AATGCAGATCCTCATGATCCAG	CATTGGCTGTGTTCTTCCAGG
NM_011577	<i>Tgfb1</i>	Transforming growth factor, beta 1	GCCTGAGTGGCTGCTTTTGAC	TGTATTCCTGCTCCTTGGTTCA
NM_010849	<i>c-Myc</i>	Myelocytomatosis oncogene	GAGTGTTTGAAGGCTGGATTT	TCCTGTTGGTGAAGTTCACGGTT
NM_010234	<i>c-Fos</i>	FBJ osteosarcoma oncogene	GAGGAGGGAGCTGACAGATACACT	AGATTGGCAAICTCAGTCTGCAA
NM_010591	<i>c-Jun</i>	Jun oncogene	AAGAACTCGGACCTTCTCAC	GTAGTGGTGAATGTGCCCAAT
NM_001025093	<i>Arf2</i>	Activating transcription factor 2	GACAGTGTCAATGTGGTGATCA	ACTCATTGAACAAACCCACTTCTC
NM_007498	<i>Arf3</i>	Activating transcription factor 3	CAGCATTGATATACATGCTCAACCT	TCCGGTGTCCGTCCATTCT
NM_007631	<i>Ccnd1</i>	Cyclin D1	CGTGGCCTTAAGATGAAGGA	TCGGGCCGGATAGAGTTGT
NM_007891	<i>E2f1</i>	E2F transcription factor 1	CCAGGCCTGGCCTATG	GCCTTGATCACTATGACCATCTGTT
NM_009029	<i>Rb1</i>	Retinoblastoma 1	GGTCTGCCAACACCCACAA	AGATGTCCCAAATGATTCACCAA
NM_016756	<i>Cdk2</i>	Cyclin-dependent kinase 2, transcript variant 2	GCCATTCTCACCCGTGCTCTT	GATGGACCCCTCTGCATTGA
NM_009870	<i>Cdk4</i>	Cyclin-dependent kinase 4	GGGCCTGCCGGTTGAG	GAAGAAAATCCAGGCCCGCTTA
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, mRNA	CGCCCCGAACCTTTTCG	CGTGAACGTTGGCCCATCA
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), mRNA	AACTAACCCGGGGACTTGGAG	GGCCTGTAGTAGAACTCGG
NM_011640	<i>p53</i>	Transformation-related protein 53 (Trp53), transcript variant 1	CGCTGCTCCGATGGTGTAT	TCGGGATACAAAATTTCTCTCCA
NM_009876	<i>P57</i>	Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (Cdkn1c)	GCCAAATGGGAACGACTTCTT	CGTTCGACGCCTTGTCTTC
NM_007393	<i>Actb</i>	Actin, beta, cytoplasmic	AGATTACTGCTCTGGCTCCTTAGCA	GCCACCCGATCCACAGAGA

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

Group	DEN-alone	DEN + PBO
No. of animals	6	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**

The data represent mean ± SD

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

Immunohistochemical examinations

Almost all hepatocytes and bile ducts were lightly stained for CK8/18, but hepatocellular altered foci, adenomas, and carcinomas were strongly positive for this antibody. The numbers of CK8/18-positive foci and adenomas were significantly higher in DEN + PBO group than those in the DEN-alone group (Table 4; Fig. 2). The PCNA-positive ratio significantly increased in non-tumor hepatocytes, CK8/18-positive foci, and adenomas in the DEN + PBO group compared with the DEN-alone group.

Differential mRNA expression by real-time RT-PCR analysis

PBO increased the expression of *Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b10*, *Por*, NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (*Nqo1*), *Myc* myelocytomatosis oncogene (*c-Myc*), *Cyclin D1* (*Ccnd1*), and E2F transcription factor 1 (*E2f1*) but downregulated epidermal growth factor receptor (*Egfr*) and DNA glycosylase 1 (*Ogg1*) (Table 5).

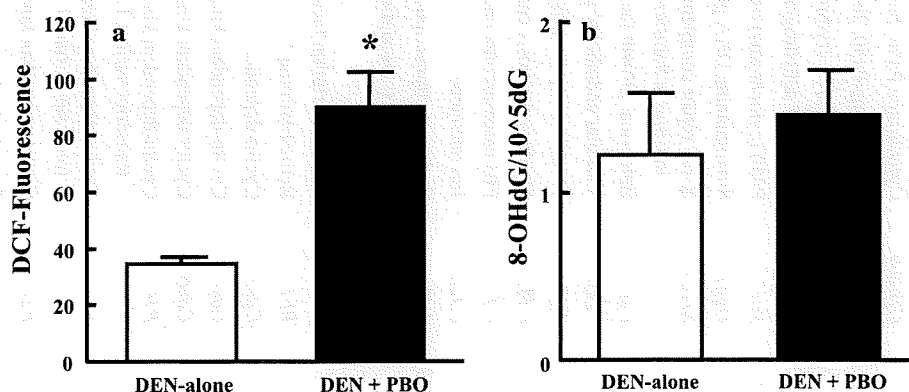


Fig. 1 Oxidative stress markers in mice given PBO for 25 weeks after DEN initiation. **a** NADPH-dependent microsomal ROS production measured by the fluorescent probe, H₂DCFDA. Each column represents the mean + SD of ROS production in isolated liver microsomes

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

Group	DEN-alone	DEN + PBO
No. of mice examined	8	15
Altered foci and 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*

The data represent mean ± SD

*, ** 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)

[#] $p < 0.05$ versus DEN-alone group (χ^2 -test)

Discussion

PBO increased the incidence of hepatocellular adenomas in CD-1 mice at a dose of 300 mg/kg/day for 79 weeks (Butler et al. 1998). Here, PBO increased the incidence of hepatocellular adenomas and carcinomas, confirming that PBO is a hepatocarcinogen in mice and promotes liver tumor formation. The hepatocellular foci were difficult to identify in HE-stained sections and in frozen sections stained with gamma-glutamyltranspeptidase (GGT). CK18 was overexpressed in hepatocellular carcinomas induced in mice that were exposed transplacentally to arsenic during gestation in mice (Liu et al. 2004). CK8/18 overexpression may drive neoplastic transformation of preneoplastic cells in

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's t -test). **b** 8-OHdG levels in liver DNA. Values are expressed as mean + SD in 5 mice

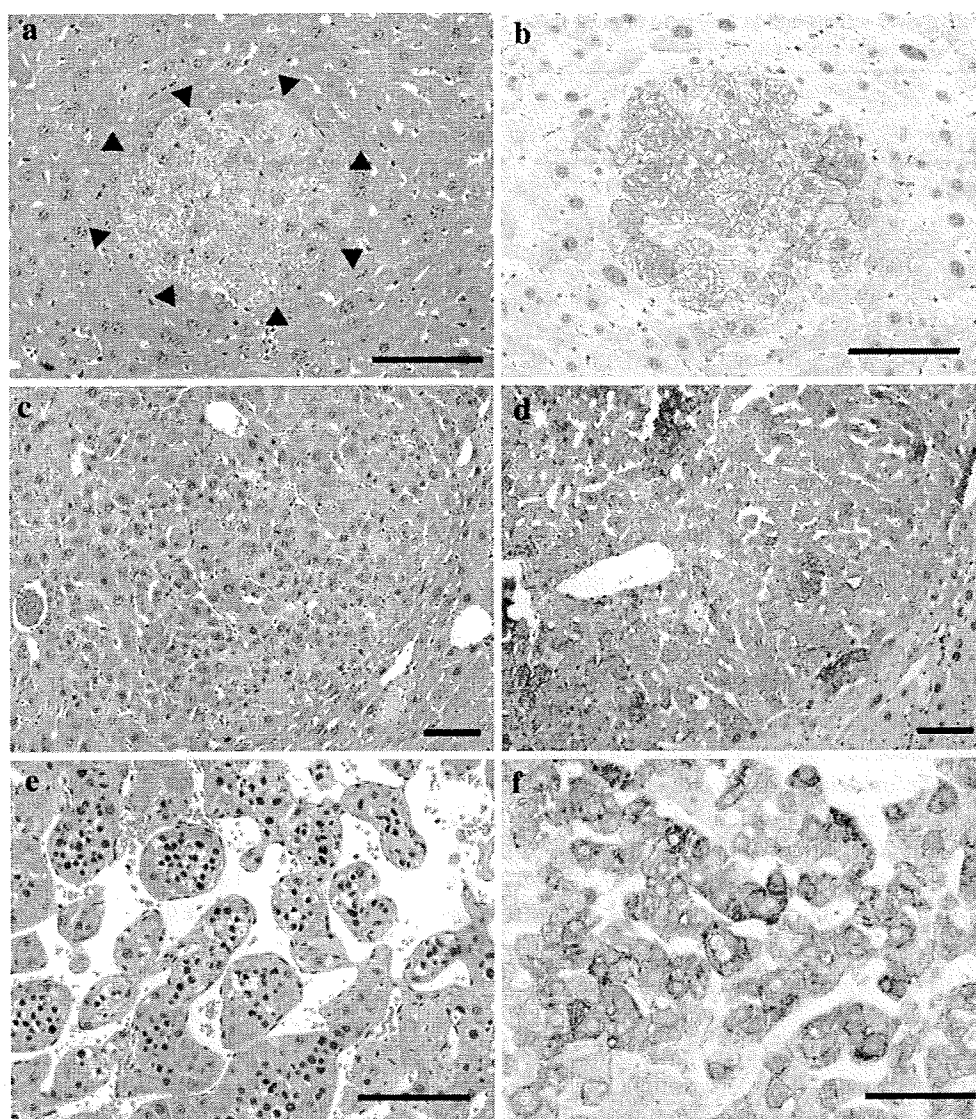


Fig. 2 Light microscopic photographs (a, c, d) and immunohistochemistry of CK8/18 (c, d, e) of hepatocellular proliferative lesions in mice given PBO for 25 weeks after DEN initiation. a and b altered focus, c and d adenoma, e and f carcinoma Bar = 100 μ m

GST-P-positive foci during rat hepatocarcinogenesis (Kakehashi et al. 2009). We previously reported that the number of CK 8/18-positive altered foci significantly increased in rash2 mice given fenofibrate for 8 weeks after DEN initiation (Kawai et al. 2008). Here, most of the proliferative lesions were strongly positive for CK8/18 and PBO increased the incidence of CK8/18-positive altered foci, adenomas, and carcinomas. Therefore, the finding obtained suggests that CK8/18 is a specific marker of altered foci, adenomas, and carcinomas in mice.

We previously used microarray analysis and real-time RT-PCR to show increased levels of oxidative and metabolic stress-related genes, *Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b9*, *Cyp2b10*, and *Por*, in male ICR mice fed a diet containing 0.6% PBO for 1, 4, and 8 weeks without any initiation

treatment (Muguruma et al. 2006). In addition, the expressions of *Ccnd1* (Proliferation-related gene) and *Xrcc5* (DNA damage and repair gene) in PBO-treated mice were significantly higher in tested group than those in the control at each time point and at week 8 only, respectively. PBO also increased NADPH-dependent microsomal ROS production in these mice, although no measurement of 8-OHdG levels was observed in the liver. Since *Xrcc5* is regarded as a DNA repair gene (Difilippantonio et al. 2000), an upregulation of *Xrcc5* appeared to suggest that overt DNA damage might occur in mice treated with PBO for 8 weeks. On the other hand, in the present study, PBO increased the same oxidative and metabolic stress-related genes and *Ccnd1*, but did not increase 8-OHdG or the mRNA expression of *Xrcc5* in mice. De Vizcaya-Ruiz et al. (2008)

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

Group	DEN-alone	DEN + PBO
No. of mice examined	8	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

The data represent mean ± SD

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

reported that ROS production leads to DNA damage and upregulation of DNA repair genes. Our previous study in rats demonstrated that PBO generated ROS via metabolic pathways and induced oxidative stress, including oxidative DNA damage, inducing hepatocellular tumors in hepatectomized rats given a diet containing 1 or 2% PBO for 8 weeks after DEN initiation treatment (Muguruma et al. 2007). Therefore, the result of our study may imply that PBO could generate ROS via metabolic pathways, but does not result in DNA damage in mice. The question thus arises as to why 8-OHdG formation occurred in the rat but not in the mouse. In our previous study, the phase II enzyme genes such as *Nqo1*, *UDPGTR-2*, *Gpx2*, *GRx*, and *Slc7a5* that are regulated under the transcriptional factor *Nrf2* were upregulated in hepatectomized rats given PBO for 8 weeks after DEN initiation (Muguruma et al. 2007). Furthermore, the expression level of *Nqo1*, an important part of cellular antioxidant defense by detoxifying quinines which prevents the generation of ROS (Siegel et al. 2004), in PBO-treated rats was three times higher than that in the 0% PBO rats. In addition, the production of ROS and 8-OHdG in the liver of PBO-treated rats also significantly increased in these rats. This signifies that an excess amount of ROS, which could not be eliminated by the upregulation of Nrf-2-mediated phase II enzymes, is produced from the microsomes in PBO-treated rats and results in the formation of 8-OHdG. On the other hand, in our previous another study, in which hepatectomized mice were given a diet containing 0.6% PBO for 8 weeks after DEN initiation, the expression levels of *Cyp1a1*, *Cyp2a5*, *Cyp2b9*, *Cyp2b10*, and *Por* were upregulated in PBO-treated mice. However, only *Nqo1* among the Nrf-2-mediated phase II enzymes was upregulated, and its expression level increased only 1.80-fold (Kawai et al. 2009). In addition, the expression

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

Gene name	DEN-alone	DEN + PBO
No. of animals	5 ^a	5
<i>Cyp1a1</i>	1.04 ± 0.33 ^b	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>Cend1</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

The data represent mean ± SD

^a No of animals

^b 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)

level of *Nrf2* in mice of the DEN + PBO group was 1.7 times higher than the DEN-alone group, and its induction rate is relatively low, when compared with that in the rat study. In the present study, the expression levels of *Nrf2* and *Nqo1* in PBO-treated mice were 1.31 and 4.45, respectively and are not so high. Furthermore, the expression level of *Ogg1*, that is regarded as a 8-OHdG repair enzyme (Kinoshita et al. 2002), significantly decreased in PBO-treated mice. These findings may suggest that the generation of ROS in PBO-treated mice is not so remarkable and will not result in the 8-OHdG formation. However, since we do not have direct evidence explaining the reason why