

200930510-B

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19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 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19年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 三森 国敏

平成22(2010)年 3月

別添 2

目次

I. 総合研究報告書		
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
III. 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）
総括研究年度終了報告書

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

研究代表者 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

動物用駆虫薬のオクスフェンダゾール(OX)の肝発がん機序への酸化ストレスの関与を明らかにするため、ラット二段階肝発がんモデルを用いて6週間投与した肝臓について検索を行った。前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の増加に加え、異物代謝・抗酸化酵素関連遺伝子の mRNA 発現及び酸化 DNA 損傷等の酸化ストレスマーカーの上昇が確認された。これらの結果から、OX の発がん機序における酸化ストレスの関与が示唆された。

マウス二段階肝発がんモデルを用いて、ジサイクラニル(DC)の *cyp1a1* 誘導による活性酸素種(ROS)の発生に起因した肝発がんプロモーション作用に対する、ウリ科果実由来自然甘味料である羅漢果抽出物(SGE)の修飾作用を検討した。SGE 投与により、GGT 陽性細胞率、生体内 TBARS level が低下した。また遺伝子発現解析では、SGE 投与群で *cyp1a1* を含む第 I 相及び第 II 相解毒酵素が低下した。SGE は *Cyp1a1* の発現・誘導を抑制することで、*Cyp1a1* による代謝過程において発生する ROS の発生を抑制することが示唆された。

オクスフェンダゾール(OX)の肝発がん過程における酸化ストレスの関与を明らかにするため、ラット肝二段階発がんモデルを用い、メラトニン (MLT) の修飾作用を検討した。DEN-OX 群と比較し、DEN-OX-MLT 群において、GST-P 陽性巢の数及び面積、薬物代謝第一相酵素 (*Cyp1a1*, *Cyp2b2*) 及び解毒・抗酸化関連遺伝子 (*Afar*, *Me1*) の発現が低下した。ROS 産生実験では、MLT 添加により ROS 産生量が減少した。OX のラット肝発がんプロモーション過程には ROS が関与する可能性が示唆された。

ラット二段階肝発がんモデルを用い、OX を 26 週間投与して作出した腫瘍性病変において、酸化ストレス及び細胞増殖関連分子の発現変動を免疫組織化学的検索及び部位特異的 mRNA 発現解析を用いて周辺組織と比較を行った。腫瘍性病変では異物代謝酵素(*Cyp1a1*)の発現低下、抗酸化酵素(*Afar*, *Gpx2*)の発現上昇が観察され、OX 投与による持続的な酸化ストレスに起因したレドックスバランスの破綻が肝腫瘍誘発機序の一部に関与している可能性が強く示唆された。

DC によるマウス肝発がんプロモーション作用の閾値を検索することを目的として、187.5、375 または 750 ppm の DC によるマウス二段階発がん性試験を行った。750 ppm 群で、PCNA 陽性細胞数が DEN 単独群に比べ有意に増加した。cytochrome P450 1A1 (*Cyp1a1*) が 375 ppm 以上の DC 群で、*Cyp1a2* が全ての群で有意に増加した。さらに、DNA 修復に関連する 8-oxoguanine DNA glycosylase は 750 ppm 群で有意に増加した。これらの結果から、DC の肝発がんプロモーション作用の閾値は 750 ppm と 1500 ppm の間にあることが示唆された。

DC のマウス肝前がん病変形成期におけるアポトーシスの関与を明らかにするため、TUNEL 染色及びアポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現解析を行った。TUNEL 染色では、アポトーシスを示唆する結果は得られなかった。mRNA 解析では、*Trail* の発現抑制が DC の最高用量群で認められた。DC の肝前がん病変形成期では、アポトーシスの関与は軽微であることが示唆された。

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。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。

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、CpG アイランド (CGI) マイクロアレイを用いて、代表的な非発がん性肝毒性物質である acetaminophen (APAP)、非遺伝毒性肝発がん物質である phenobarbital (PB)、遺伝毒性肝発がん物質である 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) によるマウス肝発がん発がん促進過程でのゲノムのメチル化プロファイルの網羅的解析を CGI アレイ (UHN 製、7,262 スポット) により検討した。解析の結果、発がん促進 8 週目では APAP 群と PB 群、IQ 群を区別しえるグローバルなメチル化変動パターンは明らかではなかった。一方、16 週目では、PB 群と IQ 群のみで増加した CGI プローブのうち Zim1、FTO 遺伝子等のプロモーター領域に存在するものが 12 個見出された。逆に PB 群と IQ 群で特異的に減少したもののうち、Cdk13、Cyr61 遺伝子等のプロモーター領域に存在するものが 11 個見出された。以上より、今回 16 週間に及ぶ発がん促進によって初めて、肝発がん物質と非発がん物質でメチル化パターンに分離の生じる CGI の出現する可能性が見出された。

次に、農薬/動物薬・殺虫剤相乗剤で非遺伝毒性肝発がん物質である piperonyl butoxide (PBO) について、マウス二段階肝発がんモデルを用いた発がん促進による腫瘍形成時期 (25 週目) に、発がんの基礎環境となる非がん部でメチル化の変動するゲノムプロファイルを、より高密度でアノテーションのしっかりしている CpG プロモーターマイクロアレイの網羅的解析により検討した。その結果、転写開始点からその 5' 側に 100 bp の間でメチル化変動パターンに差の生じたプロモーター配列断片群を複数認めた。これらのプロモーター配列断片群の下流遺伝子のうち、メチル化の亢進した遺伝子に注目して、部位特異的 real-time RT-PCR ならびに免疫組織学的解析を行った。その結果、PBO 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、好中球の活性化による発がん発がん促進作用への関与が示唆された。WDR6 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ことから、この遺伝子産物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、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。WDR6 と同様の発現局在を示し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、PBO による 8 週間の発がん促進をした肝臓においても、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、発がん促進初期からの関与が示唆された。以上の結果から、動物薬として用いられているような非遺伝毒性肝発がん物質による発がん促進によりメチル化制御機転の働く遺伝子群の出現が見出され、それらの肝発がんへの寄与が示唆された。

DC と PBO は何れも従来の変異原性試験は陰性ながらマウスの肝臓に発がん性を有し、その発がん機序に酸化ストレスの関与の可能性が報告されてきた。今回、DC ならびに 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転写因子 Nrf2 の関与の可能性を探った。また、PBO については遺伝子障害性を探る目的で *in vivo* mutation assay を実施した。発がん用量の DC を雌の *nrf2* 欠損マウスとその野生型マウスに投与して酸化 DNA 損傷をけんさくしたところ、DC 投与による肝 DNA 中の 8-OHdG レベルの上昇は Nrf2 蛋白量に逆相関した。一方、発がん用量の PBO を雄の *nrf2* 欠損マウスとその野生型マウスに投与したところ、肝 DNA 中の 8-OHdG レベルの上昇

に明らかな遺伝子型間での差異は認められなかった。また、同様に PBO を *p53* 欠損 *gpt delta* マウスとその野生型マウスに投与したところ、いずれの遺伝子型マウスにおいても *gpt* 遺伝子変異の上昇は認められなかった。以上の結果より、DC の産生する酸化的ストレスへの防御機構には Nrf2 蛋白の関与の可能性が示唆された。一方、PBO ではその関与の可能性は低いと考えられた。これまで、DC の投与は *gpt* 遺伝子変異頻度を有意に上昇させることを報告したが、PBO においては DNA 損傷修復に深く関与する *p53* 蛋白の有無に関わらず *gpt* 遺伝子変異頻度に影響を与えないことが明らかとなった。Nrf2 蛋白により転写誘導される抗酸化酵素の中にはヒトで遺伝子多型が報告されているものがあり、本研究結果はこの種の動物用医薬品のヒト危険度評価の精度向上に大きく貢献するものであると考えられた。

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検討するため、3 年間に渡って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。その結果、平均して全背根神経節の 87% の除去がと畜場で可能となっているが、100% の除去は現時点の技術では依然として困難であるといわざるを得ない。と畜場での背根神経節の完全除去を達成するためには、今後さらなる技術の改良が必要である。また、牛の品種別及び牝牝別の除去率に差は認められなかった。

ニューキノロン薬ガチフロキサシン(GFLX)の有害作用のうち、血糖異常の病態を明らかにした。その後、本病態の主因子としての腎糸球体濾過量(GFR)に注目し、まず各種動物での GFR 測定を造影剤 iodixanol を tracer として簡便な単回静注・1 回採血法を確立した。

研究分担者 三森 国敏

東京農工大学大学院 共生科学技術研究所
動物生命科学部門 教授

研究分担者 渋谷 淳

東京農工大学大学院 共生科学技術研究所
動物生命科学部門 准教授

研究分担者 梅村 隆志

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究分担者 九郎丸 正道

東京大学大学院 農学生命研究科 獣医解剖学教室 教授

研究分担者 古濱 和久

岩手大学 農学部獣医学課程 教授

発がん過程早期(6 週間投与)において異物代謝・抗酸化酵素関連遺伝子の mRNA 発現や酸化的ストレスマーカーの上昇が確認される。

OX については、肝発がん機序における酸化的ストレスの関与について検討するため、ラット二段階肝発がんモデルを用い、発がん過程早期(6 週間投与)における異物代謝・抗酸化酵素関連遺伝子の mRNA 発現及び酸化的ストレスマーカーの変動について評価を行った。

2. DC と羅漢果抽出物併用投与によるマウス肝増殖性病変発生の抑制 (三森)

昆虫成長制御剤のジサイクラニル(DC)は、マウスの肝臓がんを誘発する非遺伝毒性発がん物質である。その発がん機序は、酸化的ストレスを介した二次的 DNA 損傷によるものと考えられている。羅漢果は、中国産のウリ科果実で、甘味飲料の原料や生薬として利用されており、近年の研究では、抗酸化作用を有することが報告されている。本実験では、DC の肝発がんプロモーション機序における羅漢果抽出物(SGE)の修飾作用とその分子メカニズムについて検討

A. 研究目的

1. OX のラット肝発がんにおける ROS の関与(8 週間実験) (三森)

オクスフェンダゾール(OX)は、駆虫薬として産業動物に用いられている動物用医薬品であり、その母化合物及び代謝物が微量ながら体内に残留する事が報告されている。ラット二段階肝発

した。

3. OX と MLT 併用投与によるラット肝増殖性病変発生の抑制 (三森)

OX を投与し前がん病変巣を形成させた肝臓では、異物代謝・抗酸化に関与する遺伝子群の発現上昇と共に、その代謝過程において生じると考えられるミクロソーム由来の活性酸素種 (ROS) 産生の増大や酸化的 DNA 損傷の増加が確認されている。本年度は、OX の発がん過程における酸化的ストレスの関与を更に詳細に明らかにするため、ラット肝二段階発がんモデル用い、抗酸化剤であるメラトニン (MLT) の修飾作用を検討した。

4. OX のラット肝発がんにおける ROS の関与 (26 週間実験) (三森)

OX のラット肝発がん過程後期(26 週間投与)の検索として、得られた腫瘍性病変におけるこれらの分子の発現変動について、mRNA 発現解析及び免疫組織化学的解析による発現局在解析を行った。

5. DC の腫瘍プロモーション作用閾値 (三森)

DC によるマウス肝発がんプロモーション作用の閾値を検索するために実験を行った。

6. DC の肝発がんに対するアポトーシスの関与 (三森)

DC の肝腫瘍形成期での肝腫瘍部において、酸化的ストレス、酸化的 DNA 損傷修復能並びにアポトーシス誘導能への抑制的な影響が生じている可能性が示唆されている。本年度は、DC の発がん機序を更に詳細に明らかにするため、DC のマウス肝前がん病変形成期におけるアポトーシスの関与を検討した。

7. PBO のマウス肝発がん機序に関する研究 (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。

8. 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)

動物薬など化学物質による毒性作用を予測する目的で、化学物質を暴露した時の発現遺伝子のゲノムワイドな解析によるトキシコゲノミクス手法が行われてきた。mRNA 発現の低下には、抑制性転写因子による転写制御や RNA 安定性の低下が要因として考えられるが、エピジェネティックな遺伝子修飾 (DNA のメチル化やヒストン蛋白質の脱アセチル化) による転写抑制も考慮しなければならない。

ゲノム中にはメチル化を受けやすい CpG-rich な領域 (CpG アイランド : CGI) が存在し、その多くはメチル化を免れている。この CGI のメチル化は、遺伝子転写のサイレンシングに作用し、発生過程での不活性な X 染色体上の遺伝子やがん細胞でのがん抑制遺伝子の不活化に機能することが知られている。この直接遺伝子を傷害せずに転写のサイレンシングを起こすエピジェネティックな修飾作用は、各種の生物現象に関与する事が考えられるが、その意義やメカニズムについては、その関与を受ける生物現象の解明も含めて、これからの研究対象領域と考えられる。化学物質投与に関連した報告は数少ないが、発がん感受性の異なる 3 系統のマウスに代表的な非遺伝毒性肝発がん物質である PB を 14 日間投与した際に、発がん感受性に応じて肝臓でメチル化する CGI の数が増加するという報告 (Watson and Goodman, Toxicol. Sci. 68: 51-58, 2002) や、ラットに PB を 14 日間投与した結果、投与 3 日目にがん抑制遺伝子である *p16* 遺伝子のプロモーター領域のメチレーションが増加するという報告 (Kostka et al., Toxicol. 239: 127-135, 2007) がなされ、本申請研究の着想を一部裏付けるデータを提供している。

最近、マイクロアレイ法を利用したメチル化 CGI の網羅的解析が可能となり、これによりヒ

トのがんの進展に重要な役割を果たすがん抑制遺伝子が多数見出されてきている。網羅的解析手法を利用することによりクラスター分類が可能となるため、化学物質を動物に投与した時の標的臓器における各種の生物作用の予測に利用できる可能性がでてきた。本研究では、発がんに向かう分子制御機構の破綻に関して、エピジェネティックなサイレンシングの役割を明らかにし、その網羅的パターンから発がん物質の分類が可能となれば、*in vivo* 突然変異評価系と組み合わせ、機能遺伝子の突然変異/サイレンシングを基盤とした化学物質発がんのリスク評価上の新たな重み付けが可能となる。

本研究では、まず実験1として、マウス肝二段階発がんモデルを用いて、代表的な遺伝毒性及び非遺伝毒性肝発がん物質による発がん発がん促進過程におけるDNAメチル化のプロファイルをCGIマイクロアレイにより網羅的に検索した。特に、非発がん物質投与例でのメチル化変動遺伝子のプロファイルとの比較により、発がん物質特異的なメチル化遺伝子のクラスター分類を試みた。

続いて、実験2として、マウス肝二段階発がんモデルを用いた、農薬/動物薬・殺虫剤相乗剤で非遺伝毒性肝発がん物質であることが知られている piperonyl butoxide (PBO)による肝腫瘍形成期での、発がんの基礎環境(発生母地)となる非がん部におけるDNAメチル化のシグナル変動を、より高密度でアノテーションがしっかりしている CpG プロモーターマイクロアレイの網羅的解析により検討した。その結果、対照群の非がん部と比較してメチル化変動を示したプローブ配列断片群をプロモーター領域に持つ遺伝子の発現解析を行った。さらに8ないし25週間にわたりPBOにより発がん促進した肝臓について、これら遺伝子の発現局在も検索した。

9. 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)

非変原性発がん物質に分類されている動物用医薬品の引き起こす酸化的ストレスに対する生

体内防御機構への転写因子 Nrf2 の関与の可能性を探り、ヒト遺伝子多型を考慮に入れたこの種の動物用医薬品のヒト危険度評価の精度向上を目指すことにある。

10. 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(脊髄)神経節は、脊柱に密着して存在し、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。具体的作業としては、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、断面となった脊柱管の内側から、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、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検討した。

11. 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)

動物薬の適正使用を目的に、キノロン薬の有害作用のうち血糖異常に注目し、その病態解析を行った。その後、本病態の増悪に大きく関与するGFRに注目し、測定の基礎検討を行った。

B. 研究方法

1. OXのラット肝発がんにおけるROSの関与(8週間実験)(三森)

ラット二段階肝発がんモデルを用い、DEN単独投与群及びDEN+OX 500ppm投与群を設け、OXを6週間投与した肝組織について以下の解析を行った。すなわち、異物代謝・抗酸化酵素に関連した遺伝子のmRNA発現解析並びに肝ミクロソームにおける活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)産生、過酸化脂質(TBARS)

及び酸化的 DNA 損傷(8-OHdG)について測定を行い、OX の発がん過程早期における酸化的ストレスの関与について評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、投与実験は混餌あるいは混水による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限にとどめている。動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺するため、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、国立大学法人 東京農工大学の実験動物取り扱い倫理規定、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い指針及び米国国立衛生研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

2. DC と羅漢果抽出物併用投与によるマウス肝増殖性病変発生の抑制 (三森)

雄性 ICR マウスを用い二段階肝発がん試験を実施した。SGE 2500 ppm の飲水投与開始 1 週後、2/3 部分肝切除を施し、12 時間後にジエチルニトロソアミン投与によるイニシエーション処置を施した。処置後 1 週後から DC 1500 ppm を 9 週間混餌投与した。得られた肝臓について、HE 染色による病理組織学的検索と GGT 組織化学染色、PCNA 免疫染色による陽性細胞率の検討とともに、肝 total RNA を用い、低密度マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析及び、real time RT-PCR 法を用いた定量解析を行った。また肝脂質過酸化物量 (TBARS) を測定した。追加実験として、Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) 高親和性の C57BL/6J と低親和性の DBA/2J マウスを用いて、SGE の Ahr への作用を検討した。無処置群、DC 単独群、DC+SGE 群をそれぞれの種で設け、DC 1500 ppm を 2 週間、SGE 2500ppm を 3 週間投与した。得られた肝臓について real time RT-PCR 法を用いて *Cyp1a1* の定量解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、東京農工大学の実験動物に関するガイドラインに従って実施された。実験動物数は、解析に最低限必要な数で設定し、実験終了

後のと殺は、ジエトルエーテルによる麻酔下で施された。

3. OX と MLT 併用投与によるラット肝増殖性病変発生の抑制 (三森)

5 週齢の雄性 F344 ラットに DEN の 200 mg/kg を腹腔内投与し、イニシエーション処置を施した。2 週間後、OX の 0 ないし 500 ppm の 10 週間混餌投与を開始し、OX の投与開始 1 週間後には 2/3 肝部分切除術を施した。抗酸化剤メラトニンは OX 投与開始時より 100 ppm の濃度で飲水投与を行った。投与終了後、全生存動物をエーテル麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取した。

組織学的検索は、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、さらに、glutathione S-transferase, placental form(GST-P)の免疫組織化学染色による観察を実施した。

mRNA 発現解析では、酸化的ストレス及び薬物代謝関連遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて定量解析した。また、DEN-OX 群から単離した肝ミクロソーム分画を用いて、MLT を添加したときの NADPH 依存性の ROS 産生能の抑制効果を評価した。また、陽性対照として P450 蛋白の阻害剤である SKF-525A を用いた。

(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。

4. OX のラット肝発がんにおける ROS の関与 (26 週間実験) (三森)

ラット二段階肝発がんモデルを用い、DEN 単独投与群及び DEN+OX 500ppm 投与群を設け、OX を 26 週間投与した肝組織について解析を行った。すなわち、得られた肝細胞腺腫と周辺組

織における異物代謝・抗酸化酵素及び細胞周期関連分子の遺伝子発現変動パターンの違いについて、real-time RT-PCR 法による部位特異的 mRNA 発現解析及び免疫組織化学的検索により検討を行い、肝腫瘍誘発時期における酸化ストレスの関与に加え、細胞増殖関連分子の発現変動についても評価を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌あるいは混水による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限にとどめている。動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺するため、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、国立大学法人 東京農工大学の実験動物取り扱い倫理規定、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い指針及び米国国立衛生研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

5. DC の腫瘍プロモーション作用閾値 (三森)

187.5、375 または 750 ppm の DC によるマウス二段階発がん性試験を行った。得られた肝臓について、病理組織学的検索、GGT、PCNA 染色および分子病理学的解析を行った。また、単離肝ミクロソームからの ROS 産生量を測定した。

(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。

6. DC の肝発がんに対するアポトーシスの関与 (三森)

「DC のマウス肝二段階発がんプロモーション作用の閾値の検索に関する実験」における DC の 750、375、187.5 ないし 0 ppm を 10 週間混餌投与したマウス肝二段階発がんモデルにて

得られた肝臓を用いて TUNEL 染色を行った。また、p53 の下流に存在する因子や既報を参考に、アポトーシス関連遺伝子について、リアルタイム RT-PCR を用いた mRNA 発現解析を実施した。

(倫理面への配慮)

平成 19 年度追加研究分の「DC のマウス肝二段階発がんプロモーション作用の閾値の検索に関する実験」で得られた試料を用いて実施したため、該当しない。

7. PBO のマウス肝発がん機序に関する研究 (三森)

雄 ICR マウスに肝部分切除術を施し、12 時間後に DEN を 1 回腹腔内投与し、肝部分切除 1 週間から 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。

8. 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)

実験 1 :

5 週齢の雄性 B6C3F₁ マウス (日本チャールズ・リバー株式会社) にイニシエーターである diethylnitrosamine (DEN) の 90 mg/kg を腹腔内投与し、イニシエーション処置を施した。2 週間無処置で飼育後、APAP 10,000 ppm、PB 500 ppm 及び IQ 100、300 ppm を 8 及び 16 週間暴露し、各群それぞれ 5 匹解剖を行った。また投与 24 週目では、全生存動物 (DEN 単独群 : 13 匹、

DEN + PB 500 ppm 群 11 匹、DEN + IQ 100 ppm 群 14 匹、DEN + IQ 300 ppm 投与群 14 匹) をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取し、臓器重量を測定後、肝組織の一部を採取し、RNAlater 中に浸漬させて mRNA 抽出用に、一部を液体窒素に凍結させ DNA 抽出用に保存した。残りは、10%中性緩衝ホルマリンにて 48 時間固定した。組織学的検索として、固定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・エオジン (HE) 染色標本を作製し、光学顕微鏡下にて肝変異細胞巢の数を測定した。DEN + PB 500 ppm、DEN + IQ 100 ppm 及び 300 ppm において、投与 24 週間目の肝変異細胞巢数を DEN 単独群と比較した結果、いずれも増加を示したので、これらの群でプロモーション時期での投与 8 週目と 16 週目の DNA メチル化変動プロファイルを CGI マイクロアレイにより求め (n=5/群)、それぞれ APAP 10,000 ppm 群及び DEN 単独群と比較した。CGI マイクロアレイ用の組織サンプルは、DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN) を使用してゲノム DNA を抽出後、メチル化感受性制限酵素 (*Afu I*) による DNA の切断、除タンパク、抗 5-methylcytosine monoclonal 抗体 (CALBIOCHEM) を用いた免疫沈降、Bio prime plus array GCH Indirect Genomic Labeling System による DNA のラベル化(エンドラベル)を行った。ラベル化した DNA は、ハイブリダイゼーション後、CGI マイクロアレイ (Mouse CpG-island 7.3K Array (MCGI7.3K)、UHN microarray centre、カナダ) を用い、GenePix4000A にてシグナルデータを取り込んで定量した。CGI メチル化データについては、マイクロアレイに搭載されている CGI 群のうち、遺伝子情報が記載されている CGI プローブを対象として、PB 500 ppm と IQ 100 ppm 各群で、DEN 単独群に比較して 1.5 倍以上メチル化変動した CGI プローブ群を選別した。方法としては、GeneSpring GX (Silicon Genetics) を用いて、各データの per spot, per chip intensity-dependent (lowess) normalization と

global normalization を行い、シグナルの信頼性を示す flag が各群の 5 サンプル中 3 サンプルで present であった CGI プローブを選択した。さらに、その中から各群のいずれかの群で、シグナルレベルが 1 以上である CGI プローブを選択した。それらのうち、DEN 単独群と比較して、1.5 倍以上のシグナル差 (増加及び減少) が見られた CGI プローブを選別した。さらにその選別されたプローブの CGI 領域が転写開始点から上流 100 bp 以内の領域に見出される遺伝子について Real-time RT PCR 法により定量的な遺伝子発現解析を実施した。つまり投与 16 週目の RNA 用凍結サンプルから各群 5 例の Total RNA (TRIzol[®] 試薬、Invitrogen、USA) を抽出後、SuperScript III[™] Reverse Transcriptase (Invitrogen、USA) により cDNA を合成した。合成した cDNA は、SYBR[®] Green Real-time PCR detection System (Applied Biosystems、USA) を用いて定量的解析を行った。なお内部標準遺伝子として GAPDH および β -actin を用い、発現値は GAPDH 発現量で補正した値を示した。

実験 2 :

6 週齢の雄性 ICR マウス (日本 SLC 株式会社) に再生性の肝細胞増殖を誘導させるためエーテル麻酔下で 2/3 肝部分切除術を施した。その 24 時間後に肝発がん剤である diethylnitrosamine (DEN) を 20 mg/kg の割合で腹腔内投与し、イニシエーション処置を施した。1 週間後より、PBO を 0 ないし 0.6% の割合で飼料に混じて 25 週間投与した。投与 25 週目に全生存動物 (DEN 単独群 : 8 匹、DEN + PBO 群 : 15 匹) をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取し、重量を測定後、肝組織の一部を採取し、メタカーン固定液にて、4°C で 24 時間固定した。また、残りの肝組織を 10% 中性緩衝ホルマリン固定液にて 48 時間固定し、常法に従いパラフィン包埋、薄切後にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製し、光学顕微鏡下にて肝変異細胞巢、肝細胞腺腫および肝細胞癌の数を測定した。PBO 発がん促進群において、投与 26 週間目に

における肝細胞腺腫および肝細胞癌の数を DEN 単独群と比較した結果、いずれも増加を示した (Table 1)。PBO による発がん促進で、DEN 単独群と比較して DNA メチル化変動を示したプロファイル CpG プロモーターマイクロアレイにより求めた (n=5 /群)。

メタカーン固定パラフィン包埋した肝組織より薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による観察の後に、HE 染色切片と照らし合わせながら、非がん部組織 (DEN+PBO 群および DEN 単独群)、変異肝細胞巢

(DEN+PBO 群)、肝細胞腺腫 (DEN+PBO 群) ならびに肝細胞癌 (PBO 投与群) をそれぞれマイクロダイセクション装置 (Leica Microsystems Japan) を用いて採取した。採取した組織は、使用時まで -80°C で保存した。

採取したサンプルより DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN, Germany) によりゲノム DNA を抽出後、制限酵素 (*MseI*, New England Biolabs, USA) による DNA の切断、除タンパクを行った。*MseI* 処理後 DNA の一部を Input DNA とした。残りの DNA を、抗 5-methyl cytidine monoclonal 抗体 (Abcam, USA) を用いた免疫沈降を行い immunoprecipitated (IP) DNA とした。Input および IP DNA は、WGA2 Kit (Sigma, USA) により DNA を増幅後、DNA のラベル化 (エンドラベル) を行った。ラベル化した DNA は、ハイブリダイゼーション後、CpG プロモーターマイクロアレイ (MM8 CpG-island Pro, NimbleGene, USA) を用い、Innoscan700 (Inopsys, France) にてシグナルデータを取り込んで定量後、ChipMonk (Babraham Bioinformatics, France) を用いて解析を行った。方法としては、各データの per array lowess normalization と global normalization を行った。そしてマイクロアレイに搭載されているプロモーター領域プローブのうち、一つの遺伝子の転写開始点がいくつであっても、転写開始点を含むプローブ配列断片、もしくは上流 100 bp 以内に位置するプローブ配列断片の全てを選択した

(178,730 probes)。各シグナルの値は、IP DNA と Input DNA の比 (IP DNA/Input DNA) をメチル化のシグナル値とし、DEN 単独群および PBO 各群のそれぞれ 5 サンプル中 3 サンプル以上で、メチル化が減少もしくは変化しないプローブ配列断片 (DEN 単独群 : 67,995 probes、PBO 69,710 probes) およびメチル化が 1.5 倍以上増加したプローブ配列断片 (DEN 単独群 : 12,128 probes、PBO 群 9,620 probes) を選出した。それら選出したプローブ配列断片をそれぞれ比較し選別した。

マイクロダイセクションで組織部位特異的に採取した DEN 単独群の非がん部 (non-tumour tissue)、DEN+PBO 群の非がん部 (non-tumour tissue)、変異肝細胞巢 (foci)、肝細胞腺腫 (adenoma) および肝細胞癌 (carcinoma) から RNA Micro kit (Quiagen, Germany) を用いて total RNA をそれぞれ抽出し、real-time RT-PCR を行った。抽出した total RNA は、吸光度計を用いて定量し、得られた total RNA 10 ng について QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Quiagen) を用いて増幅を行うと同時に、cDNA を合成した。全ての PCR 反応は Power SYBR Green I chemistry (Applied Biosystems Japan, Tokyo) を用い、 50°C 、2 分のインキュベーション後、 95°C 、10 分および 95°C 、15 秒、45 サイクルおよび 60°C 、1 分の条件下、Step one Plus (Applied Biosystems Japan) にて行った。各プライマーは Primer Express 3.0 Software (Applied Biosystems Japan) を用い、製造元の手順書に従って設計を行った。各遺伝子の mRNA 発現は、対照群の非がん部組織での発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である GAPDH の検量線を求め、相対定量法にて算出した。

免疫組織化学的検索として、採取した肝臓の一部を 4%パラフォルムアルデヒド固定後、エタノール系列で脱水、パラフィン包埋した後、薄切し、一部は HE 染色を施した。免疫組織学的解析については、以下の手順で行った。サイ

トケラチン 8/18 (CK8/18) については、脱パラフィン処理した肝組織切片を、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、マイクロウェーブにて 30 分間低出力で反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて内因性ペルオキダーゼ処理として 0.3% 過酸化水素を含む PBS 液で 20 分間処理した後、正常ヤギ血清でブロッキングし、モルモット抗 CK8/18 抗体 (100 倍希釈; ROGEN Biotechnik GmbH、ドイツ) を用いて 4°C で一晩反応させた。一次抗体反応後、モルモット 2 次抗体 (Fitzgerald Industries International Inc.、MA、USA) で室温 30 分処理した後、3,3'-ジアミノベンジジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。さらに WD Repeat Domain 6 (WDR6) 抗体及び CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6 (Chemokine-like factor superfamily member 6 (CMTM6) の免疫組織学的解析については、以下の手順で行った。脱パラフィン処理した肝組織切片を内因性ペルオキダーゼ処理として 0.3% 過酸化水素を含む PBS 液で 20 分間処理した後、正常ヤギ血清でブロッキングし、一次抗体として、ウサギ抗 WDR6 抗体 (200 倍希釈; LifeSpan BioSciences、UK) およびウサギ抗 CMTM6 抗体 (100 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology、USA) を用いて 4°C で一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories; 米国) を用い、3,3'-ジアミノベンジジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

統計解析

統計解析としては、実験 1 では多群検定を用い、DEN 単独群と各投与群との間で Bartlett 検定を行い、等分散の場合はパラメトリックの Dunnett 検定を、不等分散の場合はノンパラメトリックの Dunnett 検定もしくは、Steel 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。実験 2 では、DEN 単独群と DEN+PBO

群との間で Student's/Welch's t-test を行い、有意水準 5% 以下を有意差ありとした。マイクロアレイの結果に対しては統計解析を実施しなかった。

(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。

9. 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)

DC あるいは PBO の発がん用量をそれぞれ雌あるいは雄の *nrf2* 欠損マウスならびにその野生型マウスに投与して、肝臓 DNA 中の 8-OHdG レベルならびに Nrf2 に転写調節を受ける種々の酵素群を測定し、それぞれが産生する酸化的ストレスに対する生体内防御機構への Nrf2 蛋白の関与を検討した。また、PBO の遺伝子障害性を検索する目的で、*p53* 欠損 *gpt delta* マウスならびにその野生型に PBO を投与して肝臓の 8-OHdG レベルの測定ならびに *gpt* アッセイを実施した。

(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。

10. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

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 2007 年 3 月から 2010 年 2 月までの計 851 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、「交雑種 (黒毛♂×ホルスタイン♀) 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 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。

11. 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)

血糖異常の解析には、糖尿ラットを用い、糖負荷試験、血中・腓臓薬物濃度測定、pharmacokinetics、臨床病理学的アプローチを行った。GFR 測定には 5 種動物を用い、単回静注・1 回採血法の妥当性を iodixanol の投与量、採血時間、血中濃度測定と分布容積から解析した。

(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. OX のラット肝発がんにおける ROS の関与 (8 週間実験) (三森)

ラット二段階肝発がんモデルを用いて OX を 6 週間投与した肝臓では、DEN 単独群と比較して glutathione S-transferase, placental form (GST-P) 陽性巢数に有意な増加が観察され、面積においても増加傾向が認められた。遺伝子発現解析では、薬物代謝酵素である *Cyp1a1*、*Cyp1a2* に加え、解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Afar*、*Gpx2*、*Nqo1*、*Yc2*、*Gstm1*、*Me1* の mRNA 発現に有意な増加が認められ、さらに酸化ストレス指標である単離肝ミクロソーム由来の ROS 産生、TBARS、8-OHdG レベルの増加が観察された。OX については、ラット二段階肝発がんモデルにおける発がん過程早期 (6 週間投与) において、GST-P 陽性巢の増加と共に薬物代謝第 I 相酵素 *Cyp1a1* の mRNA 発現増加、肝ミクロソーム由来の ROS 産生亢進、過酸化脂質の増加、8-OHGdG レベルの上昇が認められたことから、OX 投与肝では *Cyp1a1* 誘導とともにその代謝過程において過剰な ROS 産生が惹起されていることが示唆された。さらに酸化ストレスより活性化される転写因子 Nrf2 によって発現誘導されることが知られている解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子の mRNA 発現にも増加が認められたことから、OX 投与群では発がん促進過程において、過剰に産生された ROS あるいは親電子物質の解毒・消去のための防御系が作動していることが推察された。OX を 500 ppm 含有する飼料を 6 週間、ラット二段階肝発がんモデルに与えた結果、肝組織における異物代謝・抗酸化酵素に関連した遺伝子の mRNA 発現上昇及び酸化ストレスマーカーの上昇が確認され、OX の肝発がん過程早期における酸化ストレスの関与が示唆された。

2. DC と羅漢果抽出物併用投与によるマウス肝増殖性病変発生の抑制 (三森)

SGE 投与により、マウス前がん病変マーカーである GGT 染色の陽性細胞率、生体内酸化ストレスマーカーである TBARS レベルが有意に減少した。遺伝子発現解析では、第 I 相解毒酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2a5*、第 II 相解毒酵素である *Gstu2*、酸化ストレス誘導蛋白である *HO-1*、抗酸化酵素である *Gpx2* が有意に減少した。また SGE 投与により、追加実験においては、*Cyp1a1* 発現量が C57BL/6J マウスでは、DC+SGE 群は DC 単独群に比べて有意に減少したのに対し、DBA/2J マウスでは DC 単独群と DC+SGE 群間における差は認められなかった。SGE は *Cyp1a1* の発現・誘導を抑制することで、*Cyp1a1* による代謝過程において発生する ROS の発生を抑制することが示唆された。その結果として、第 II 相解毒酵素、抗酸化酵素、ストレス誘導蛋白関連遺伝子の発現量、TBARS レベル、前がん病変マーカーである GGT 陽性細胞数の減少が生じるものと考えられる。また追加実験から SGE の *Cyp1a1* 抑制作用機序は、*Cyp1a1* の発現に依存性をもつ Ahr を抑制することによることが示された。SGE は Ahr の作用を抑制することにより、*Cyp1a1* の誘導を抑制し、DC の肝発がんプロモーション作用を抑制している可能性が示唆された。

3. OX と MLT 併用投与によるラット肝増殖性病変発生の抑制（三森）

肝重量については、MLT 併用投与による影響はなかった。GST-P 免疫組織化学的染色では、DEN-OX-MLT 群において、DEN-OX 群と比較し、GST-P 陽性細胞巣の数及び面積が減少した。mRNA 発現解析では、DEN-OX 投与群と比較し、薬物代謝第一相酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2b2* 並びに解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Afar*、*Me1* の発現が減少した。DEN-OX 群の肝臓から単離したマイクロソーム分画を用いて *In vitro* ROS 産生実験では、MLT 添加により ROS 産生量の低下がみられた。また、陽性対照である SKF-525A でも顕著な減少が見られた。DEN-OX 群に対する MLT の併用投与は、

DEN-OX 群で認められた GST-P 陽性巣の数及び面積の増加を減少させた。加えて、DEN-OX 群から抽出した肝マイクロソーム分画を用いた *In vitro* ROS 産生実験では、MLT の添加により ROS 産生量が減少した。本結果は MLT が ROS の抑制効果を有するという報告と一致し、さらにこの事実は OX の有する肝発がんプロモーション作用が ROS 産生の減少により抑制された可能性を強く示唆する。

mRNA 発現解析では、DEN-OX 投与群で発現上昇が認められた薬物代謝第一相酵素である *Cyp1a1*、*Cyp2b2* 並びに解毒・抗酸化関連遺伝子である *Afar*、*Me1* の発現が、MLT 投与により減少した。CYP1A や 2B 分子種の発現誘導は酸化的ストレスの誘発に関与することが知られている。また、TCDD や PCB といった代表的な CYP1A 誘導剤や Phenobarbital 等の CYP2B を誘導する薬剤では、それらの代謝過程において ROS の過剰産生に加えて、肝発がんを誘発することが知られている。本研究では、CYP 酵素の活性化に必要な NADPH の供給にかかわる *Me1* の mRNA レベルが MLT 併用投与により減少した。加えて、解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子である *Akr7a3* の発現も MLT 併用投与により減少した。CYP 分子種の発現低下に加えて、解毒・抗酸化能に関する機能遺伝子の発現低下が見られたことは、OX の代謝過程において産生される過剰な ROS あるいは親電子物質が減少したことを意味するものと思われる。以上より、OX の肝発がんプロモーション作用には活性酸素種が関与することが示唆された。OX を 500 ppm 含有する飼料を 10 週間ならびに抗酸化剤であるメラトニンをラット肝二段階発がんモデルに同時併用投与した結果、OX 誘発前がん病変の形成が抑制されたことから、OX の肝発がんプロモーション作用には、OX の肝発がん過程で生じると考えられる活性酸素種産生の増加が関与していることが示唆された。

4. OX のラット肝発がんにおける ROS の関与（26 週間実験）（三森）

ラット二段階肝発がんモデルを用いて OX を 26 週間投与した結果、GST-P 陽性巣の数・面積の増加と共に、肝細胞腺腫の発生個数及び発生頻度に有意な増加が確認された。誘発された肝細胞腺腫における酸化的ストレス及び細胞増殖関連分子の発現変動を免疫組織化学的に解析した結果、周辺組織の肝細胞質と比較して *Cyp1a1* の染色性に低下が認められたのに対し、*Afar* 及び *Gpx2* については染色性の増強が観察された。さらに、細胞周期を負に制御する因子の一つである p21 並びに p21 蛋白の安定化に関与する *C/ebpα* 蛋白については核内における染色性の低下が観察された。また部位特異的 mRNA 発現解析においても同様の結果が得られた。OX については、ラット二段階肝発がんモデルを用いて投与を行い、肝細胞腺腫の有意な増加が確認された発がん過程後期(26 週間投与)では、得られた肝細胞腺腫の細胞質において *Cyp1a1* に対する染色性の低下と共に *Afar* 及び *Gpx2* に対する染色性の増加が免疫組織化学的に確認され、mRNA レベルにおいても同様の結果が得られた。これらの結果から、OX の発がん促進過程では、その暴露に伴う持続的な酸化的ストレスの惹起が重要であり、腫瘍性病変の形成においては酸化的ストレスからの回避機構が存在する可能性が推察された。さらに、肝細胞腺腫の核内では、周辺組織と比較して PCNA 陽性細胞数の増加と共に、細胞周期を負に制御する因子の一つである p21 及び *C/EBPα* 蛋白の染色性低下が観察されことから、誘発された腫瘍性病変の増殖活性亢進におけるこれらの分子の関与が推察された。OX を 500ppm 含有する飼料を 26 週間、ラット二段階肝発がんモデルに与えて誘発した肝腫瘍性病変において mRNA・蛋白発現解析を行った。その結果、周辺組織における酸化的ストレスの亢進とは対照的に、酸化的ストレスレベルの減少が推察され、肝腫瘍誘発機序における酸化的ストレスの関与の一端が確認された。

5. DC の腫瘍プロモーション作用閾値 (三森)

DC 投与により 750 ppm DC 群で、PCNA 陽性細胞数のみ DEN 単独群に比べ有意に増加した。遺伝子発現解析では、cytochrome P450 1A1 (*Cyp1a1*) が 375 ppm 以上の DC 群で、*Cyp1a2* が全ての群で有意に増加した。さらに 750 ppm DC 群において、DNA 修復に関連する 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) は 750 ppm DC 群で DEN 単独群に比べ有意に増加した。ROS 産生量は、DC 投与群と DEN 単独群との間に有意な差はなかった。これまでの DC の肝二段階発がん性試験においては、1500 ppm DC 投与群で GGT 陽性細胞巣の数と PCNA 陽性細胞率が対照群に比べ有意に増加した。しかし、今回の実験においては、750 ppm DC 投与群では、DEN 単独投与群と比較して PCNA 陽性細胞率のみ有意に増加した。これらの結果は、今回の実験条件下では、DC の肝発がんプロモーション作用の閾値が 750 ppm より高いことが示唆された。

以前の研究から、肝発がん早期過程において発現上昇することが報告されており、さらに他の CYP よりも ROS の産生に広く関わっていることが報告されている *Cyp1a1*、*Cyp1a2* においては、DEN 単独群に比べ、375 ppm 以上の DC 投与群または全 DC 投与群において有意に発現増加していることが確認された。一方、酸化的 DNA タメージの指標である OGG1 の mRNA の有意な発現増加が 750 ppm DC 群において認められた。しかし、今回の実験では、DC 投与群の肝臓において、肝ミクロソーム由来の ROS 産生量が DEN 単独群に比べ増加傾向にはあるものの有意な差は認められなかった。さらに、代謝・酸化的ストレスまたは DNA タメージ/修復に関連する遺伝子も DC 投与群において DEN 単独群に比べ有意に発現増加しなかった。これらの結果から、*Cyp1a1*、*Cyp1a2* は DC の毒性に対してもっとも感受性が高い分子マーカーであるが、750 ppm またはそれ以下の濃度の DC 投与群におけるこれらの発現増加は ROS の産生に不十分であることが推察された。今回の実験

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

6. DC の肝発がんに対するアポトーシスの関与 (三森)

TUNEL 染色では、差は認められなかった。mRNA 発現解析では、*Trail* の発現抑制が 750 ppm 群で認められた。DC の肝前がん病変形成期の肝組織を用いた TUNEL 染色では、DC 投与群において有意な差は認められなかった。一方、遺伝子発現解析では、アポトーシスの亢進に関与する *Trail* の有意な発現低下が高用量群 (750 ppm) で認められた。*Trail* は DC による腫瘍形成期において重要な役割を担っている可能性が示唆されている。しかしながら、本研究結果からは、DC の肝前がん病変形成期におけるアポトーシスの関与は軽微であることが示唆された。DC のマウス肝前がん病変形成期におけるアポトーシスの関与を検討した結果、DC の肝前がん病変形成期では、アポトーシスの抑制傾向は認められるもののその関与は軽微であり、発がん後期のプロモーションあるいはプログレッション期において重要な役割を担っている可能性が推察された。

7. PBO のマウス肝発がん機序に関する研究 (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。DEN+PBO 群において腫瘍を含む増殖性病変数および CK8/18 陽性細胞巣・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。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、肝臓における遺伝子発現解析ならびに酸化的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たし、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。

8. 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)

実験 1 :

投与 8、16 週目の DEN + APAP 群及び DEN + IQ 300 ppm 群では、DEN 単独群と比較して、体重の有意な低値が認められた。また DEN + IQ 300 ppm 群は、24 週目にも体重の有意な低値を示した。肝臓重量は、DEN + APAP 群の 8 週目に絶対値と相対値の有意な低値、DEN + IQ 100 ppm 群では、24 週目に絶対値、DEN + IQ 300 ppm 群では、8、16 と 24 週目の絶対値と 8、24 週目の相対値がそれぞれ DEN 単独群と比較して有意な低値を示した。一方 DEN + PB 500 ppm 群では、8、16 週目の絶対値、16 と 24 週目の相対値が DEN 単独群と比較して有意に高値を示した。

肝臓の病理組織学的検索では、投与 24 週目の観察で、DEN + PB 500 ppm 群で肝細胞の変異増殖巣及び腺腫の数の増加が認められ、また IQ は用量依存的に、変異増殖巣の数の増加を示した。

次に、投与 8 週目の CGI マイクロアレイによる DNA メチル化を検討した結果、DEN + APAP 群と DEN + PB 群、DEN + IQ 群を区別しえるグローバルなメチル化の変動パターンは明らかではなかった。一方、投与 16 週目では、DEN 単独群と比較して、APAP 群の DNA メチル化が変動しない、もしくは減少した CGI プローブが 657 個認められた。逆に、DEN + PB 群と DEN + IQ 群で DEN 単独群と比較して DNA メチル化が 1.5 倍以上増加した CGI プローブはそれぞれ 145 と 130 個認められた。これらのうち、DEN 単独群と比較してシグナル強度が APAP 投与により変動しないか減少し、DEN + PB 群と DEN + IQ 群に共通して増加を示した CGI プローブは 39 個であった。一方、DEN 単独群と比較して、DEN + APAP 群の DNA メチル化が変動しない、もしくは増加した CGI プローブが 355 個認められた。逆に、DEN + PB 群と DEN + IQ 群で DEN 単独群と比較して DNA メチル化が 1.5 倍以上減少した CGI プローブはそれぞれ 25 と 34 個認められた。これらのうち、DEN 単独群と比較してシグナル強度が DEN + APAP 群で変動しないか

増加し、DEN + PB 群と DEN + IQ 群に共通して減少を示した CGI プローブは 25 個であった。

さらに DEN 単独群と比較してシグナル強度が DEN + APAP 群で変動しないか減少し、DEN + PB 群と DEN + IQ 群に共通して増加を示した CGI プローブのうち、CGI 領域が転写開始点から上流 100 bp 以内に一致して存在する遺伝子について Real-time RT-PCR 法による定量的な遺伝子発現解析を行った。その結果、DEN + APAP 群において、Zim1 遺伝子のみの有意な発現増加が認められた。

実験 2 :

投与 8 及び 25 週目の PBO 群では、DEN 単独群と比較して、体重の有意な低値が認められた。肝臓重量は、PBO 群で絶対値と相対値がそれぞれ DEN 単独群と比較して有意に高値を示した。

肝臓における CK8/18 免疫組織学的検索の結果、PBO 25 週間における発がん促進により肝細胞腺腫および肝細胞癌の増加がそれぞれ認められた。

次に CpG プロモーターマイクロアレイによる DNA メチル化を検討した結果、DEN 単独群でメチル化が不変か、もしくは低下したプローブ配列断片中に DEN + PBO 群において 1.5 倍以上メチル化が増加したものが 31 個認められ、いずれも下流に向かって 100 bp 以内に mRNA 情報が含まれていた。逆に DEN + PBO 群でメチル化が不変か、もしくは低下し、DEN 単独群で 1.5 倍以上メチル化が増加したプローブ配列断片は 122 個認められ、そのうち下流に 100 bp 以内に mRNA 情報が含まれている 113 個を選出した。

CpG プロモーターマイクロアレイ解析によって選出されたプローブ配列断片に相当する遺伝子について、real-time RT-PCR による mRNA の発現解析を実施し、実際に発現変動が認められた遺伝子を複数得た。すなわち、DEN 単独群の非がん部と比較して、DEN + PBO 群の非がん部では、Epb4.1、Tnfrsf26、Wdr6、Cdc32、Serpina3m などの遺伝子の発現低下傾向が認め

られた。また、Serpina3m は、DEN 単独群の非がん部に比較して、PBO 発がん促進によって生じた肝変異細胞巣、肝細胞腺腫および肝細胞癌で、有意に mRNA 発現の減少を示した。Tnfrsf26 は、肝変異細胞巣および肝細胞癌において有意な発現減少を示した。さらに Wdr6 は、肝細胞癌において有意な発現増加を示した。

WDR6 および CMTM6 免疫組織染色の結果、いずれも DEN 単独群の非がん部において弱く構成的な発現を示し、逆に多くの肝変異細胞巣および肝細胞腺腫においては陰性を示した。一方、DEN+PBO 群の非がん部においては WDR6 および CMTM6 は陰性を示し、肝変異細胞巣、腺腫および肝細胞癌においては逆に陽性を示し、この陽性レベルは、DEN 単独群の非がん部よりも強かった。さらに、より短期間の PBO の発がん促進を行った肝臓での発現分布を検討する目的で、PBO の 8 週間の発がん促進を行ったマウスの肝臓において、非がん部に WDR6 および CMTM6 の弱陽性を示す部位と陰性部位が混在した。さらに肝変異細胞巣では、WDR6 および CMTM6 の陽性巣が多く認められた。

実験 1 において、マウス肝臓における発がんプロモーション過程で DNA メチル化のシグナル変動を検討したところ、8 週間のプロモーションでは、肝発がん物質に特異的な変動パターンを示す CGI プローブを見出せなかったが、16 週間では非発がん物質の APAP と分離して発がん物質である PB 及び IQ でメチル化の増加した CGI プローブを 39 個見出した。このことをエピジェネティックな遺伝子発現制御の観点から考察すると、プロモーション 8 週目の時期には発がん物質で共通な制御を受ける遺伝子群は少ないものの 16 週間に及ぶと発がん物質に特有な制御機転の働く遺伝子群の出現する可能性が示唆される。言い換えるとこの時点で発がん過程に特異的な分子機能の起動する可能性を示唆している。

この選出された 39 個の CGI プローブのなかには、慢性的なアルコールの消費により発現が

上昇し、アルコール依存症のマーカーとして報告されている gamma-aminobutyric acid(GABA)A receptor (Gabra3, Dick et al., 2004, Alcohol Clin Exp Res., 28, 4.) 遺伝子のプロモーター領域に位置するものなどが認められた。

また逆に、この時期で DEN+APAP 群と分離して DEN+PB 群と DEN+IQ 群でメチル化の減少した 55 個の CGI プローブの内、細胞回転や細胞増殖に関連する cyclin-dependent kinase-like 3(Cdkl3, Jaluria et al., 2007, BMC Biotechnol., 7, 71)遺伝子のプロモーター領域に位置するものなどが認められた。

一方、DEN+PB 群と DEN+IQ 群に共通して高メチル化変動を示した CGI プローブの内、CGI 領域が転写開始点から上流 100 bp 以内存在する 12 個の遺伝子を選抜して、real-time RT-PCR 法により定量的遺伝子解析を行ったところ、DEN+PB 群と DEN+IQ 群に共通して発現が減少している遺伝子を見出す事はできなかった。これらの事は、CGI アレイ解析により見出された弱いメチル化の変動は、転写制御には反映されていない可能性を示唆した。また Zim1 遺伝子は、DEN 単独群と比較して、DEN+APAP 群で有意な mRNA の発現増加が認められた。

実験 2 において、マウス肝二段階発がんモデルを用いた PBO の 25 週間におよぶ発がん促進により、発がんの基礎環境となる非がん部でのメチル化の変動するゲノムプロファイルを検討したところ、非がん部において特異的なメチル化変動パターンを示すプローブ配列断片群が 31 個認められ、これらの中に PBO による発がん促進によりメチル化制御機転の変化する遺伝子群の出現する可能性が示唆された。言い換えると PBO 発がん促進過程において、エピジェネティックな分子発現制御により細胞機能が変化する可能性を示唆した。

選出された 31 個のメチル化亢進プローブ配列断片群の下流に位置する遺伝子には、ユビキチン転移酵素ファミリーであり、プロテインキナーゼ CK2 を介してリン酸化されることで、

Cdc34-SCFCdc4 をユビキチン化し、細胞周期を促進している Cdc34 遺伝子が見出された。さらにこの遺伝子は、ヒトにおいて細胞周期抑制遺伝子 p27kip1 をユビキチン化し、細胞周期の促進に関与することがすでに報告されている。また、同様に見出された Wdr6 遺伝子は、Hela 細胞において、セリン/スレオニンキナーゼ LBK1 と共発現し、細胞周期の G₁ 期を停止して細胞増殖に関わる遺伝子として既に報告されている。

近年、ROS 誘導性の酸化ストレスが DNA メチル化の亢進を引き起こし、さらに遺伝子発現制御にも影響を及ぼすことで、肝発がんに関与する事が報告されている。これらのことを考えると、PBO 投与によって誘発される肝細胞の酸化ストレスが、DNA メチル化の変動に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

選出された 31 個のプロンプ配列断片群の下流に位置する遺伝子について real-time RT-PCR 解析を行い、DNA メチル化制御による遺伝子サイレンシングが誘導されているかの確認を行った。その結果、一部の遺伝子で DEN 単独群の非がん部と比較して、DEN+PBO 群の非がん部で mRNA の発現低下傾向が認められたことから、DNA メチル化制御による遺伝子サイレンシングの生じている可能性が示唆された。さらに PBO による発がん促進で非がん部における mRNA 発現の減少傾向が認められた *Serpina3m* については、変異肝細胞巣、腺腫および肝細胞癌においても有意な発現低下が認められた。この遺伝子産物は serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin) であり、好中球の elastase の阻害因子である。好中球 elastase が過剰になると組織傷害により発がんし易くなることが報告されている。また、WDR6 は、PBO の発がん促進により、肝細胞癌部位において有意な mRNA 発現上昇が認められたことから免疫組織化学染色を行った結果、発がん促進により肝変異細胞巣、腺腫および肝細胞癌において陽性を示し、このことより、細胞周期の G₁ 停止にあった細胞が発がんに伴って解除

されたため、細胞分裂能を獲得するものと考えられた。また CMTM6 はケモカイン様の分子であるが、生物学的な機能が知られていない。本研究において、その免疫染色結果から、CMTM6 は WDR6 とほぼ同じ染色性を示し、PBO による肝発がんメカニズムに重要な働きをもつ可能性が示唆された。

以上、マウス肝二段階発がんモデルにおいて、25 週間に及ぶ 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、本研究で得られたメチル化亢進している遺伝子の中に、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。

実験 1 において、マウス肝二段階発がんモデルを用いて 16 週間におよぶプロモーションで、肝発がん物質と肝非発がん物質間でメチル化パターンに分離の生じる CGI 群の出現する可能性が見出された。このことから、CGI マイクロアレイによるゲノム DNA のメチル化変動の検索は、発がん性に寄与するエピジェネティックな転写調節機転の解明に有用な手法として期待が持てるものの、本研究では mRNA 発現に反映されるメチル化変動を見出せなかったため、プロモーター領域特異的な CGI オリゴヌクレオチドアレイの開発・導入が必要と考えられた。

実験 2 においては、より高密度でアノテーションがしっかりしている CpG プロモーターマイクロアレイを用いて解析を行った結果、イニシエーション後の発がん促進時期での 25 週間におよぶ 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