

200939045A

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

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法<sup>の開発</sup>に関する研究  
平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐渕 英機

平成22 (2010) 年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 短期発がんリスク評価試験法の開発に関する研究 -----1  
鰐淵 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)

### II. 分担研究報告

1. 新規前がん病変マーカーの開発に関する研究 -----13  
鰐淵 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)  
魏 民 (大阪市立大学大学院医学研究科 講師)
2. 中期発がん性試験に関する研究 -----41  
今井田 克己 (香川大学医学部腫瘍病理学 教授)
3. 遺伝子のメチル化異常に関する研究 -----54  
辻内 俊文 (近畿大学工学部生命科学科 准教授)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----56

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)  
食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究  
平成 21 年度総括研究報告書

研究代表者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

## 研究要旨

本研究は、がんの一次予防を最終目標とし、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期間に包括的に検出できる新しい発がんリスク評価法を開発することを目的とする。本年度では、既知ラット肝発がん物質であるダンマル樹脂について、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットを用いた 18 および 32 週間多臓器発がん性試験でその発がん性および変異原性を検討し、*gpt delta* ラットを用いた新規発がんリスク評価法の開発を行った。また、以前のダンマル樹脂の 2 年間発がん性試験で得られたラット肝細胞がんを用いて E-cadherin のメチル化状態を解析した。さらに、発がん性を検索できる新規早期前がん病変マーカーの開発の一環として、マウス肺扁平上皮がんおよび周囲正常組織のプロテオーム解析を行い、扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定を行った。現在までに得られた研究成果は下記の通りである。

1. ダンマル樹脂の 18 週間多臓器発がん性試験では、*gpt delta* 雄ラットに実験開始 4 週間に無処置あるいはイニシエーション処置として 5 種類の発がん物質を投与した。1 週間の休薬後、イニシエーション群にはダンマル樹脂を 0、0.03、2%の濃度で、非イニシエーション群にはダンマル樹脂を 0 または 2%の濃度で 13 週間混餌投与した。イニシエーション群において、2%投与群で肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数および面積ともに対照群(0%群)と比較して有意な高値を認めた。以上の結果より、ダンマル樹脂が *gpt delta* ラットにおいて肝発がんプロモーション作用を有することが明らかとなった。これまでの F344 ラットを用いた発がん性試験の結果と一致したことから、*gpt delta* ラットを用いた本モデルは肝発がん物質の検出にも有用であることが明らかとなった。他の臓器の病理組織学的検査は現在検討中である。(鰐淵)
2. ダンマル樹脂の 32 週間多臓器発がん性試験では、*gpt delta* 雄ラットに実験開始 4 週間にイニシエーション処置として 5 種類の発がん物質を投与した。1 週間の休薬後、ダンマル樹脂を 0、0.03、2% の濃度で混餌投与した。動物実験は現在順調に進行している。また、*gpt delta* 雄ラットを 2 群に分け、ダンマル樹脂を 0 または 2% の濃度で混餌投与し、4 週間後に屠殺剖検した。(今井田)
3. 上述のダンマル樹脂の 4 週間(今井田)および 18 週間多臓器発がん性試験(鰐淵)で得られた肝臓サンプルを用いて、ダンマル樹脂の変異原性の検討が現在進行中である。(魏)
4. ダンマル樹脂の発がん機構を遺伝子レベルで明らかにするために、ダンマル樹脂で誘発したラット肝細胞がんを用いて E-cadherin 遺伝子 5'上流領域の CpG 部位におけるメチル化状態を、バイサルファイト・シークエンス法により解析した。その結果、E-cadherin 遺伝子は、ダンマル樹脂で誘発したラット肝細胞がん 5 例すべてにおいても、正常肝組織においても低メチル化状態であった。本研究結果より、ダンマル樹脂によるラット肝細胞がん発生に、E-cadherin 遺伝子 DNA メチル化異常の関与は乏しいことが判明した。(辻内)
5. 扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定試験では、A/J マウスに NTCU を投与することにより誘発した肺扁平上皮がんおよび周囲正常組織の凍結サンプルから、プロテオーム解析を行い、マーカー候補蛋白を選出した。その後、候補蛋白に対する抗体を用いた免疫染色を行い、正常部、扁平上皮化生およびがん部におけるその局在を確認した。プロテオーム解析の結果、315 種類の蛋白が同定された。そのうち、周囲正常組織と比較してがん部で有意に発現が上昇している蛋白が 66 種類、減少しているものが 60 種類、合計 126 種類であった。そのうち、cytokeratin (CK) 19 および YWHAZ が周囲正常組織で発現は認められなかったが、がん部および扁平上皮化生において過剰発現が認められた。以上の結果より、CK19 および YWHAZ は扁平上皮がんの早期検出マーカーとして有用である可能性が示唆された。(鰐淵)

研究分担者

今井田 克己 香川大学医学部  
辻内 俊文 近畿大学理工学部  
魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科

## A. 研究目的

環境中には多くの発がん物質が存在し、ヒト発がんの原因と目されており、食品を介しての化学物質曝露はそのなかでも大きな要因となっている。しかし、食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は動物試験だけでも2年間という長期間必要であり、その莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの食品添加物等に対応することが困難なためである。一方、*in vitro*の変異原性試験により変異原性が決められてきたが、変異原性が陰性でも発がん物質が多数見つかってきており、*in vitro*の変異原性試験と発がん性との間に解離がみられているのも事実である。本研究は、がんの一次予防を最終目標とし、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期間に包括的に検出できる新しい発がんリスク評価法を開発することを目的とする。

本年度では、以前に我々が行った2年間発がん性試験で肝発がん性が確認されたダンマル樹脂について、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットを用いた18および32週間多臓器発がん性試験法で、ダンマル樹脂の発がん性を評価し、これまでの評価結果と比較検討した。また、ダンマル樹脂の *gpt delta* ラット肝における *in vivo* 変異原性を検索し、遺伝毒性の有無を検討した。また、ダンマル樹脂の発がん機構を遺伝子レベルで明らかにするために、我々が以前に行ったダンマル樹脂の2年間発がん性試験で得られたラット肝細胞がんを用いて E-cadherin のメチル化状態を解析した。さらに、発がん性を検索できる新規早期前がん病変の開発の一環として、肺扁平上皮がん及び周囲正常組織のプロテオーム解析を行い、扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定を行った。

## B. 研究方法

### 1. *gpt delta* ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験

#### [被験物質]

ダンマル樹脂粉末は、日本食品添加物協会により供与された。ダンマル樹脂はオリエンタル MF 基礎飼料に規定量混ぜたものを検体として使用した。被験物質の飼料への添加、固化はオリエンタル

酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。

#### [投与量の設定]

F344 ラットを用いたダンマル樹脂の2年間発がん性試験の結果に基づいて、*gpt delta* ラットを用いた多臓器中期発がん性試験及び変異原性試験では発がん用量である2%と非発がん用量である0.03%を設定した。

#### [試験プロトコル]

5週齢の *gpt delta* 雄ラット (F344系) 57匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、約一週間の馴化飼育の後、5群に分け、Figure 1に示す実験デザインで動物実験を施行した。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリヤーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度  $24 \pm 2$  度、湿度  $50 \pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物はプラスチックケージに3匹ずつ飼育し、ケージおよびチップを週1回交換した。1~3群に実験開始日に100 mg/kg b.w. diethylnitrosamine (DEN, 東京化成, Cas No. 55-18-5) の腹腔内投与、第3、6、9、13日に20 mg/kg b.w. N-methyl-N-nitrosourea (MNU, Sigima, Cas No. 684-93-5) の腹腔内投与、第16、20、23、27日に40 mg/kg b.w. 1,2-dimethylhydrazine (DMH, Aldrich, Cas No. 306-37-6) の皮下投与を行った。さらに、それらと並行して第1~2週に0.05% N-butyl-N-(4-hydroxypropyl) nitrosamine (BBN, 東京化成, Cas No. 3817-11-6) を、第3~4週に0.1% dihydroxybutyl-di-N-propylnitrosamine (DHPN, ナカライ, Cas No. 53609-64-6) をそれぞれ飲水投与し (DMBDD 処置)、イニシエーション処置とした。実験開始第6週目から1、4群には0%ダンマル樹脂を、3、5群には発がん用量である2%ダンマル樹脂を、2群には0.03%ダンマル樹脂をそれぞれ13週間、オリエンタル MF 飼料中に混ぜて、それを自由に摂取させた。また、発がん物質投与以外の飲料水として、水道水を自由摂取させた。実験開始18週後に屠殺剖検し、1~3群においてはDMBDD 標的臓器の病理組織学的検索を行い、4、5群においては、*gpt assay* および Spi-assay を行った。

#### [一般状態、体重、摂餌量]

全動物は、一般状態を毎日観察し、週1回体重および摂餌量を測定した。1日あたりのダンマル樹脂摂取量 (g/kg/day) は、その結果より算出した。

#### [病理組織学的検査]

18週間の投与終了後に、全例を安楽死させて詳

細な剖検を行った。DMBDD 処置を行った 1~3 群において器官、臓器を採取し、二重線を付したものについて重量を測定した後、網掛けを付したものは凍結保存も行い、全てを 10%中性緩衝ホルマリン液により固定した。1~3 群において採取した器官、臓器は、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、前立腺、その他の肉眼的異常部位である。また、非 DMBDD 処置群である 4、5 群において器官、臓器を採取し、二重下線を付したのものについて重量を測定した後、全て凍結保存を行った。肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸、大腸、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、唾液腺、精巣、精巣上体、その他の肉眼的異常部位である。また、肝臓及び腎臓を 10%中性緩衝ホルマリン液により固定を行った。

病理組織学的検査は、全動物について以下に示す器官、組織の固定標本から切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン/エオジン染色を施して鏡検した。該当する器官は、DMBDD 処置を行った 1~3 群において肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸（十二指腸、空腸、回腸）、大腸（盲腸、結腸、直腸）、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、前立腺、その他の肉眼的異常部位である。また、DMBDD 処置を行っていない 4、5 群においては、肝臓、腎臓、その他の肉眼的異常部位である。

#### [肝臓の免疫組織化学的検査]

肝臓の前がん病変マーカーである胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P) を ABC 法にて免疫染色を行った。GST-P 陽性細胞巢の個数および面積を病理標本画像解析装置 IPAP-WIN [住化テクノサービス株式会社] を用いて計測し、肝臓切片 1cm<sup>2</sup> 当りの GST-P 陽性細胞巢 (直径 0.2mm 以上) の個数および面積を算出し、定量的解析を行った。

#### [統計学的解析]

体重、摂餌量、臓器重量、腫瘍および前がん病変の平均値について 1~3 群は Bartlett 法による等分散検定を行った。等分散の場合はパラメトリックの Dunnett 法による両側検定を行い、不等分散の場合はノンパラメトリックの Steel 法による両側検定を行った。また、4、5 群においては F 検定による等分散検定を行った。等分散の場合は Student's t-test 検定を行い、不等分散の場合は Welch t-test 法による両側検定を行った。病理組織学的検査における発生頻度の差の検定については、Fisher の直接確率検定を行った。

2. *gpt delta* ラットを用いた 4 週間発がん性試験および 32 週間多臓器短期発がん性試験  
分担報告書参照 (今井田)

3. *gpt delta* ラットにおけるダンマル樹脂の *in vivo* 変異原性の検討 (魏)

ダンマル樹脂を 13 週間 (鰐淵分担参照) および 4 週間 (今井田分担参照) 単独投与した肝における変異頻度を *gpt* および Spi- assay 法を用いて検討する。(鰐淵分担報告書参照)

4. ダンマル樹脂誘発肝がんにおける遺伝子のメチル化異常の検討  
分担報告書参照 (辻内)

5. 肺扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定

#### [検体]

6 週齢 A/J 雌マウス 70 匹を用いて、NTCU 0.01 M/75  $\mu$ l acetone/mouse の用量で、週 2 回、合計 18 週間マウスの背中に滴下し、実験開始 22 週後に動物を屠殺し、肺を摘出し、各動物から凍結ブロック及びホルマリン固定パラフィンブロックを作製した。

#### [Proteome analysis]

凍結ブロックから 10  $\mu$ m の厚みで 10 枚の連続切片を作製し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション及びニードルダイセクション法を用いてがん部及び周囲正常組織それぞれをサンプリングした。がん組織からは、細気管支領域に発生した末梢型肺扁平上皮がんのみに限定し、主要な動静脈は混入しないよう気をつけ、周囲正常組織をサンプリングする際には、気管、動静脈のみならず軟骨、脂肪、神経組織を混入しないよう十分気をつけ、肺末梢部から採材するようにした。これより得られたサンプルから合計 18  $\mu$ g の蛋白質をバッチし、iTRAQ 試薬でラベリングして、陽イオン交換カラムによる精製、Sep-pak カラムによる脱塩処理を行った後、QSTAR Elite LC-MS/MS (Applied Biosystems Japan) を用い蛋白の網羅的発現解析を行った。

#### [バイオマーカー候補の選別]

上記により解析を行ったデータに関して、ProteinPilot software 及びバイオマーカー検索やシグナル伝達解析に有用である Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてがん部に特異的な候補蛋白を選出した。

#### [免疫組織学的解析]

選別したバイオマーカー候補に対し、パラフィンブロックから作成した連続切片を用いて免疫染色を行い、その染色性及び局在を確認した。

#### [倫理面への配慮]

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないためにエーテル麻酔下にて実施した。

### C. 研究結果

#### 1. *gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験

##### [一般状態]

実験期間中、全動物が生存した。ダンマル樹脂投与に関連した一般状態への影響は認められなかった。

##### [体重]

DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、実験開始 7 週目以降に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) において、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、実験開始 6, 7 週目と 9 週目以降に 4 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

最終体重は、DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) においても、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、4 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

##### [摂餌量および被験物質摂取量]

平均摂餌量は、DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 2 群 (DMBDD→0.03%投与群) で、実験開始 2 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。また、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、実験開始 6, 11, 13, 15~17 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。

非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) において、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、実験開始 5, 6, 10~12, 16 週目に 4 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

実験期間中における 1 匹 1 日あたりの平均ダンマル樹脂摂取量を Table 4 に示した。ダンマル樹脂の摂取量はその投与量にほぼ関連した。

##### [飲水量]

平均飲水量は、DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、実験開始 16 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) において、被験物質投与群の第 5 群 (2%投与群) で、実験開始 9 週目に 4 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

##### [臓器重量]

肝臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、肝臓の相対重量にて有意な増加が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) では、被験物質投与群の第 5 群 (2%投与群) で、4 群 (0%) と比べて、肝臓の絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

腎臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、腎臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

脾臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) では、被験物質投与群の第 5 群 (2%投与群) で、4 群 (0%) と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

心臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、心臓の絶対重量、相対重量ともに有意な減少が認められた。

精巣においては、非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) で、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、4 群 (0%) と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

##### [肝臓の GST-P 陽性細胞巣]

GST-P 陽性細胞巣の単位面積あたりの発生個数および面積は、DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、発生個数、面積ともに有意な増加を認めた。一方、非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) においては、GST-P 陽性細胞巣が認められなかった。

##### [病理学的検査]

肝臓には腫瘍は認められなかった。他の臓器については現在検索中である。

#### 2. *gpt delta* ラットを用いた 4 週間発がん性試験

## および 32 週間多臓器短期発がん性試験

### [4 週間発がん性試験]

体重は、第 1、2、4 週目に被験物質投与群の 2% 投与群において 0% (対照群) と比較して有意に低値を示した。摂餌量では被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。被験物質投与群において、肝臓および腎臓の絶対重量の有意な低値が観察されたが、相対重量では差がなかった。その他の臓器では有意な差異を認めなかった。

### [32 週間発がん性試験]

体重は、第 12、13 週目に被験物質投与群の 2% 投与群において 0% (対照群) と比較して有意に低値を示した。また、第 10、11、12、13 週目に被験物質投与群の 2% 投与群において 0.03% 投与群と比較して有意に低値を示した。摂餌・飲水量では被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。また、ダンマル樹脂の実験期間での総摂取量はその投与量にほぼ相関していた。現在、実験開始後から 14 週目の段階で、動物実験は順調に進行している。

### 3. *gpt delta* ラットにおけるダンマル樹脂の変異原性の検討

ダンマル樹脂を 13 週間および 4 週間単独投与した *gpt delta* ラット肝における変異頻度を *gpt* assay および Spi- assay 法を用いて検索中である。

### 4. ダンマル樹脂誘発肝がんにおける遺伝子のメチル化異常の検討

E-cadherin 遺伝子 5' 上流領域の CpG 部位は、正常肝組織において、低メチル化状態であった。一方、5 例の肝細胞がんにおいても同様に低メチル化状態であった。

### 5. 肺扁平上皮がんマーカーの同定

ProteinPilot software を用いて検出した蛋白を解析した結果、66% の信頼性で 315 種類の蛋白が検出された。さらにがん部と周囲正常組織での発現量を比較した結果、有意に発現が上昇したものが 66 種類、一方減少したものが 60 種類であった。有意に発現上昇した蛋白の中で、Fold change に注目し選別した結果、CK5 (14 倍) を筆頭に上位 10 位のうち、8 種類が CK であり、扁平上皮の分化マーカーとして用いられている CK5/6 や CK14 も検出された。また、GSTO1 (8 倍) や GSTA4 (6 倍) 等、第 2 相の薬物代謝酵素も認められた。一方、発現の上位蛋白以外にも皮膚において幹細胞マーカーとしての報告がある CK19 や actin binding に関わる COTL1 が検出された。

次に、IPA を用いて検出した蛋白を解析した結果、がん関連のパスウェイで、中心に位置する YWHAZ と、先ほど検出した GSTO1 が認められた。

以上より検出した COTL1, CK19, GSTO1 及び YWHAZ を新しいバイオマーカー候補として、免疫染色にてそれぞれの染色性及び局在を確認した。まず、肺の正常組織において特に、がんの起始細胞となり得る可能性が高いことからクララ細胞と肺胞 II 型細胞に注目し、それぞれの染色性を確認したところ、CK19 及び YWHAZ に関しては共に陰性であった。一方扁平上皮化生及びがん部では、4 種類の蛋白全てが検索した 8 個体全例にて陽性を示した。

### D. 考察

*gpt delta* 雄ラットを用い、多臓器に標的性を持つイニシエーション処置を行い中期多臓器発がん性試験法により、被験物質であるダンマル樹脂の全身諸器官に対する発がんプロモーション期の修飾作用を検討した。その結果、体重において、2% 投与群で体重増加抑制および肝相対重量の有意な増加が認められた。肝臓の GST-P 陽性細胞巢の発生は、2% 投与群では面積および数は 0% (対照群) に比較して有意な高値が認められた。これらの結果から、*gpt delta* ラットにおいて肝臓に対する発がんプロモーション作用を有することが明らかとなった。ダンマル樹脂は 2% の用量では、F344 ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験で肝発がんプロモーション作用を示し、2 年間発がん性試験では肝発がん性が認められた。本試験はこれらの F344 ラットを用いた発がん性試験と一致した結果が得られた。これらのことから、*gpt delta* ラットを用いた本モデルは肝発がん物質の検出にも有用であることが明らかとなった。他の臓器の病理組織学的検査は現在進行中である。

マウス肺扁平上皮がんの早期検出マーカーの実験では、がん部と周囲正常組織をプロテオーム解析に用い、発現蛋白の網羅的解析を行ったことで、早期検出マーカーになりうる蛋白 4 種類を同定した。免疫染色の結果より、CK19 及び YWHAZ は周囲正常部位で発現が認められないこと、さらに前がん病変である化生からがんにかけてその発現が確認されたことからこの 2 種類の蛋白は扁平上皮がんの早期検出マーカーとして有用である可能性が示唆された。

CK19 は Type I cytoskeleton に分類され、毛包隆起部に存在する上皮幹細胞のマーカーの可能性が示唆されている。一方、YWHAZ は、14-3-3 family に属する adapter protein の一種で、細胞生存シグナルに関与する PKC、RAF1、CTTNB やアポトーシスに関与する BAD、BAX 等多数の分子と



結合することによりその機能を調節している。さらに、頭頸部扁平上皮がんにおいて、YWHAZ 遺伝子のコピー数が増加しており、proto-oncogene の候補として報告されている。これらの2種類の蛋白は、肺扁平上皮がんの発がんメカニズム解析においても有用な key protein になり得る可能性を有することが考えられた。

ヒトおよびげっ歯類における肝細胞がんを用いたこれまでの研究では、E-cadherin 遺伝子プロモーター領域は高メチル化であることが数多く報告され、肝細胞がんの発生に E-cadherin 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化異常の関与が示唆されている。一方、本研究では、ダンマル樹脂で誘発したラット肝細胞がん5例いずれにおいても DNA メチル化異常は検出されず、ダンマル樹脂によるラット肝細胞がん発生には、E-cadherin 遺伝子 DNA メチル化異常の関与は乏しいことが明らかとなった。

#### E. 結論

F344 ラットを用いた2年間発がん性試験で肝発がん性が確認されたダンマル樹脂について、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットを用いた18週多臓器発がん性試験法でその発がん性を検討した。その結果、2%群ではダンマル樹脂の肝発がんプロモーション作用が認められ、これまでのF344 ラットを用いた発がん性試験の結果と一致した結果が得られた。*gpt delta* ラットを用いた本モデルは肝発がん物質の検出にも有用であることが明らかとなった。本モデルを用いて、発がん性の評価と *in vivo* 変異原性の検討を合わせて実施できると考えられる。さらに、化学物質の発がん性に対する遺伝毒性の寄与についても検討することができると考えられる。実験期間の最適化については、18週と32週間多臓器発がん性試験の結果および変異原性解析試験の結果に基づいて検討したいと考えている。

今後、ダンマル樹脂によるラット肝細胞がん発生に DNA メチル化異常の関与を明らかにするために、p16 遺伝子などその他のがん抑制遺伝子について DNA メチル化状態の検索を行うとともに、p53, Ki-ras 遺伝子を始めとした種々の遺伝子について点突然変異を含めた genetic な異常の解析も行う予定である。

マウス肺扁平上皮がんモデルを用いて、がん部と周囲正常部をプロテオーム解析に用いた発現蛋白の網羅的解析および免疫染色を行った結果、CK19 及び YWHAZ は周囲正常部位で発現が認められないこと、さらに前がん病変である化生からがんにかけてその発現が確認されたことからこの2種類の蛋白は扁平上皮がんの早期検出マーカーと

して有用であることが示唆された。今後、*gpt delta* ラットの多臓器発がん性試験で得られた肺組織におけるこれらの蛋白の発現を検討し、その有用性を確認する予定である。

#### F. 健康危険情報

ダンマル樹脂が肝発がん性を有する可能性がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Doi, K., Wei, M., Kitano, M., Uematsu, N., Inoue, M. and Wanibuchi, H.: Enhancement of preneoplastic lesion yield by chios mastic Gm in a rat liver medium-term carcinogenesis bioassay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 234, 135-142, 2009.

八代正和、豊川貴弘、鰐渕英機、小野田尚佳、羽室雅夫、渡辺俊雄、斯波政次、六車一哉、富永和作、山下好人、澤田鉄二、大平雅一、平川弘聖、上田真喜子: 残胃癌。総合臨牀, 第58巻第2号, 370-377, 2009.

中村卓也、松井 宏、川又誠也、中野和彦、片山貴子、日野雅之、鰐渕英機、荒波一司、山田 隆、辻 幸一: 血液中金属元素の全反射蛍光 X 線分析。X 線分析の進歩, 40, 249-257, 2009.

Kushida, M., Wanibuchi, H., Wei, M., Kakehashi, A., Ozaki, K., Sukata, T., Miyata, K., Ogata, K., Uwagawa, S. and Fukushima, S.: Ethanol dose not promote MeIQx-initiated rat colon carcinogenesis based on evidence from analysis of a colon cancer surrogate marker. *J Toxicol. Pathol.*, 22, 65-70, 2009.

Tanaka-Okamoto, M., Hori, K., Ishizaki, H., Hosoi, A., Itoh, Y., Wei, M., Wanibuchi, H., Mizoguchi, A., Nakamura, H. and Miyoshi, J.: Increased susceptibility to spontaneous lung cancer in mice lacking LIM-domain only 7. *Cancer Sci.*, 2009. Epub ahead of print.

Fukushima, S., Kakehashi, A., Wei, M. and Wanibuchi, H.: Existence of a threshold for the genotoxic carcinogens: Evidence from mechanism-based carcinogenicity studies. *Genes and Environment*, 31, 33-36, 2009.



- Takehashi, A., Inoue, M., Wei, M., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Cytokeratin 8/18 overexpression and complex formation as an indicator of GST-P positive foci transformation into hepatocellular carcinomas. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238, 71-79, 2009.
- Romanenko, A., Takehashi, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Vozianov, A. and Fukushima S.: Urinary bladder carcinogenesis induced by chronic exposure to persistent low-dose ionizing radiation after Chernobyl accident. *Carcinogenesis*, 30, 1821-1831, 2009.
- Takehashi, A., Kato, A., Inoue, M., Ishii, N., Okazaki, E., Wei, M., Tachibana, T. and Wanibuchi, H.: Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 242, 47-55, 2009.
- Wei, M., Hamoud, A. S., Yamaguchi, T., Takehashi, A., Morimura, K., Doi, K., Kushida, M., Kitano, M., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Potassium bromate enhances N-Ethyl-N-Hydroxyethylnitrosamine-Induced kidney carcinogenesis only at high dose in wistar rats: Indication of the existence of an enhancement threshold. *Toxicol Pathol.*, 37, 983-991, 2009.
- Hori Y, Takasuka N, Mutoh M, Kitahashi T, Kojima S, Imaida K, Suzuki M, Kohara K, Yamamoto S, Moriyama N, Sugimura T, Wakabayashi K. Periodic analysis of urethane-induced pulmonary tumors in living A/J mice by respiration-gated X-ray microcomputed tomography. *Cancer Sci.*, 99 (9) :1774-1777, 2008.
- Kuno T, Yokohira M, Matsuda Y, Suzuki S, Hashimoto N, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K. Lack of modifying potential of 8-methoxypsoralen in the promotion or progression stages of lung carcinogenesis in A/J female mice. *Oncol Rep.*, 20 (4) :767-72, 2008.
- Yachida S, Sakamoto M, Imaida K, Yokohira M, Saoo K, Okano K, Wakabayashi H, Maeta H, Suzuki Y. p27 (Kip1) is overexpressed in very early stages of hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.*, 99:11:2152-2159, 2008.
- Yokohira M, Takeuchi H, Saoo K, Matsuda Y, Yamakawa K, Hosokawa K, Kuno T, Imaida K. Establishment of a bioassay model for lung cancer chemoprevention initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female A/J mice. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 60: 469-473, 2008.
- Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda Y, Hosokawa K, Hashimoto N, Kuno T, Imaida K. Antioxidant Effects of Flavonoids, Used as Food Additives (Purple Corn Color, Enzymatically Modified Isoquercitrin and Isoquercitrin), on Liver Carcinogenesis in a Rat Medium-Term Bioassay. *J. Food Sci.*, 3 (7) :C561-8, 2008.
- Yokohira M, Hosokawa K, Yamakawa K, Hashimoto N, Suzuki S, Matsuda Y, Saoo K, Kuno T, Imaida K. A 90-day toxicity study of L-asparagine, a food additive, in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 2568-2572, 2008.
- Yokohira M, Kuno T, Yamakawa K, Hosokawa K, Matsuda Y, Hashimoto N, Suzuki S, Saoo K, Imaida K. Lung toxicity of 16 fine particles on intratracheal instillation in a bioassay model using F344 male rats. *Toxicol. Pathol.*, 36: 620-631, 2008.
- Yokohira M, Hosokawa K, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda Y, Zeng Y, Kuno T, Imaida K. Potential inhibitory effects of D-allose, a rare sugar, on liver preneoplastic lesion development in a F344 rat medium-term bioassay. *J. Biosci. Bioeng.*, 105: 5: 545-553, 2008.
- Yokohira M, Yamakawa K, Hosokawa K, Matsuda Y, Kuno T, Saoo K, Imaida K. Promotion potential of madder color in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay model in F344 rats. *J. Food Sci.*, 73:T26-32, 2008.
- Ikeda M, Yamakawa K, Saoo K, Matsuda U, Hosokawa K, Takeuchi H, Li J-Q, Zeng Y, Yokohira M, Imaida K. Induction of multiple granulomas in the liver with severe hepatocyte damage by montan wax, a natural food additive,

in a 90-day toxicity study in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 654-661, 2008.

Matsuda Y, Yokohira M, Suzuki S, Hosokawa K, Yamakawa K, Zeng Y, Ninomiya F, Saoo K, Kuno T, Imaida K. One-year chronic toxicity study of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger in Wistar Hannover rats. A pilot study. *Food Chem. Toxicol.*, 46:733-739, 2008.

Goto R, Hoshikawa H, Fujii T, Indo K, Yoshino K, Imaida K, Mori N. Clinicopathological significance of cyclooxygenase-2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.*, 19: 645-650, 2008.

Kitahashi T, Takahashi M, Yamada Y, Oghiso Y, Yokohira M, Imaida K, Tsutsumi M, Takasuka N, Sugimura T, Wakabayashi K. Occurrence of mutations in the epidermal growth factor receptor gene in X-ray-induced rat lung tumors. *Cancer Sci.*, 99:241-245, 2008.

Hashimoto N, Yachida S, Okano K, Wakabayashi H, Imaida K, Kurokohchi K, Masaki T, Kinoshita H, Tominaga M, Ajiki T, Ku Y, Okabayashi T, Hanazaki K, Hiroi M, Izumi S, Mano S, Okada S, Karasawa Y, Maeba T, Suzuki Y. Immunohistochemically detected expression of p27<sup>kip1</sup> and skp2 predicts survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinomas. *Ann Surg Oncol.*, 16: 395-403, 2009.

Matsuda Y, Takeuchi H, Yokohira M, Saoo K, Hosokawa K, Yamakawa K, Zeng Y, Totsuka Y, Wakabayashi K, Imaida K. Enhancing effects of a high fat diet on 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *The Molecular Medicine Reports*, 2: 701-706, 2009.

Takeuchi H, Saoo K, Matsuda Y, Yokohira M, Yamakawa K, Zeng Y, Kuno T, Kamataki T and Imaida K. 8-Methoxypsoralen, a Potent Human CYP2A6 Inhibitor, Inhibits Lung Adenocarcinoma Development Induced by 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in Female A/J Mice. *The Molecular Medicine Reports*, 2:585-588, 2009.

Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. A Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats: *J. Toxicol. Pathol.*, 22: 71-78, 2009.

Yokohira M, Mastuda Y, Suzuki S, Hosokawa K, Yamakawa K, Hashimoto N, Saoo K, Nabae K, Doi Y, Kuno T, Imaida K. Equivocal Colonic Carcinogenicity of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger at High Dose Level in a Wistar Hannover Rat Two-year Study. *J. Food Sci.*, 74 (2): t24-30, 2009.

Yokohira M, Kuno T, Yamakawa K, Hashimoto N, Ninomiya F, Suzuki S, Saoo K, Imaida K. An Intratracheal Instillation Bioassay System for Detection of Lung Toxicity Due to Fine Particles in F344 Rats: *J. Toxicol. Pathol.*, 22: 1-10, 2009.

Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. Lack of modifying effects of intratracheal instillation of quartz or dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water on lung tumor development initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female A/J mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 22: 179-185, 2009.

Tsuda H, Futakuchi M, Fukamachi K, Shirai T, Imaida K, Fukushima S, Tatematsu M, Furukawa F, Tamano S, Ito N. A medium-term, rapid rat bioassay model for the detection of carcinogenic potential of chemicals. *Toxicol Pathol.*, 38: 182-187, 2010.

Kuno T, Hirose Y, Yamada Y, Imaida K, Tatematsu K, Mori Y, Mori H. Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic preneoplastic lesions in Fischer rats by 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate, a wasabi derivative. *Oncology Letters*, 1: 273-278, 2010.

Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Saoo K, Kuno T, Imaida K. Lack of promoting effects from physical pulmonary collapse in a female A/J mouse lung tumor initiated with

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) with remarkable mesothelial cell reactions in the thoracic cavity by the polymer. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2010 in press.

Yamakawa K, Kuno T, Hashimoto N, Yokohira M, Suzuki S, Nakano Y, Saoo K, Imaida, K. Molecular analysis of carcinogen induced rodent lung tumors—Involvement of microRNA expression and Kras or EGFR mutation. *Molecular Medicine Reports*, 3: 141-147, 2010.

Takeuchi H, Saoo K, Yamakawa K, Matsuda Y, Yokohira M, Zeng Y, Kuno T, Totsuka Y, Takahashi M, Wakabayashi K and Imaida K. Tumorigenesis of 2-Amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (MeIQx), but not enhancing effects of concomitant high fat diet, on lung carcinogenesis in female A/J mice. *Oncol. Lett.*, 1: 137-142, 2010.

Suzuki S, Yokohira M, Hashimoto N, Saoo K, Matsuda Y, Yamakawa K, Nakano Y, Kuno T, Imaida K. Different threshold levels for 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (MeIQx) initiation of lung and colon carcinogenesis and the effects of an additional initiation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mice. *Molecular Medicine Reports*, 3: 301-307, 2010.

Yamada T, Obo Y, Furukawa M, Hotta M, Yamasaki A, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Mutations of lysophosphatidic acid receptor-1 gene during progression of lung tumors in rats, *Biochem. Bioph. Res. Com.* 378: 424-427, 2009.

Obo Y, Yamada T, Furukawa M, Hotta M, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Frequent mutations of lysophosphatidic acid receptor-1 gene in rat liver tumors. *Mutat Res*, 660: 47-50, 2009.

Tsujiuchi T, Furukawa M, Obo Y, Yamasaki A, Hotta M, Kusunoki C, Suyama N, Mori T, Honoki K, Fukushima N. Infrequent mutation of lysophosphatidic acid receptor-1 gene in hamster pancreatic duct adenocarcinomas and established cell lines. *J Toxicol Pathol*, 22:

89-92, 2009.

Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem*, 109: 683-693, 2009.

Furukawa M, Yamasaki A, Yoshida J, Tsujino M, Wakabayashi N, Honoki K, Tsujiuchi T. Mutations of LKB1 gene in pancreatic ductal adenocarcinomas induced by N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine in hamsters. *Anticancer res*, 29: 4047-4050, 2009.

Fujii H, Honoki K, Tsujiuchi T, kido A, Yoshitani K, Takakura Y. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int J Oncol*, 34: 1381-1386, 2009.

Wakabayashi N, Tsujino M, Tajiri M, Taki M, Koshino A, Ikeda H, Fukushima N, Tsujiuchi T. No mutations of lysophosphatidic acid receptor genes in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in rats. *J Toxicol Pathol*, 23, 63-63.

Tajiri M, Wakabayashi N, Tsujino M, Fujii M, Okabe K, Honoki K, Tsujiuchi T. Alterations of LKB1 gene in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in rats. *Pathobiology*, in press, 2010.

## 2. 学会発表

Ishii, N., Wei, M., Kakehashi, A., Tago, Y. and Wanibuchi, H. : Modifying effects of diabetes mellitus in a rat multi-organ carcinogenesis model. The American Association for Cancer Research 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, Apr. 18-22, Denver, Colorado, U. S. A., 2009.

Suga, N., Wei, M., Kakehashi, A., Onishi, M., Yamano, S. and Wanibuchi, H. : Oncomodulin is a potential early marker of urinary bladder carcinogenesis in rats. The American Association for Cancer Research 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, Apr. 18-22, Denver, Colorado, U. S. A., 2009.

Sokuza, Y., Kakehashi, A., Tago, Y. and Wanibuchi, H. : Modifying effects of isoflavone

aglycon on mammary gland and uterine carcinogenesis. The American Association for Cancer Research 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, Apr. 18-22, Denver, Colorado, U. S. A., 2009.

魏 民、梯アンナ、福島昭治、鰐淵英機：膀胱発がん物質の早期検出マーカーの検討. 第 98 回日本病理学会総会, 5 月 1-3 日, 京都, 2009 (第 98 回日本病理学会会誌第 98 巻第 1 号 2-E-10, p. 226)

石井真美、魏 民、梯アンナ、多胡善幸、鰐淵英機：ZDF ラットを用いた糖尿病の発がんおよび影響. 第 98 回日本病理学会総会, 5 月 1-3 日, 京都, 2009 (第 98 回日本病理学会会誌第 98 巻第 1 号 P2-98, p. 320)

梯アンナ、石井真美、魏 民、鰐淵英機：マウス肝発がんにおけるプロテオーム及びバイオマーカーの検討. 第 98 回日本病理学会総会, 5 月 1-3 日, 京都, 2009 (第 98 回日本病理学会会誌第 98 巻第 1 号 P3-28, p. 357)

山野荘太郎、土井賢一郎、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：ラット肝中期発がん性試験法を用いたマスティックの発がん性の検討. 日本食品化学学会第 15 回総会・学術大会, 5 月 21-22 日, 東京, 2009 (日本食品化学学会第 15 回総会・学術大会講演要旨集 p. 50, 一般講演 (24))

石井真美、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、仲谷慎也、鰐淵英機：2 型糖尿病ラットは複数臓器において発がんが促進される. がん予防学会 2009 愛知, 6 月 16-17 日, 名古屋, 2009 (がん予防大会 2009 愛知プログラム・抄録集 P19, p. 51)

石井真美、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、鰐淵英機：ZDF ラットを用いた糖尿病の発がんおよび影響. 第 24 回発がん病理研究会, 8 月 25-27 日, 石川県, 2009 (第 24 回発がん病理研究会プログラム p. 21)

謝 暁利、山野荘太郎、陳 慶義、梯アンナ、鰐淵英機：ラット膀胱発がん早期におけるイソロイシンおよびロイシンの修飾作用の検討. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-0036, p. 110)

多胡善幸、山野荘太郎、山田貴宣、串田昌彦、北野光昭、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮がんにおける二段階発がんモデルの開発. 第 68 回日本がん

学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-0070, p. 117)

石井真美、魏 民、梯アンナ、仲谷慎也、森 聖、鰐淵英機：ラット多臓器発がんにおける糖尿病の影響. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-0076, p. 118)

鰐淵英機、魏 民、多胡善幸、石井真美、謝 暁利、蟹江尚平：ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いた浸潤性膀胱がんモデルの開発. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-0078, p. 118)

山田貴宣、魏 民、菅 直人、多胡善幸、山野荘太郎、鰐淵英機：DPAA 投与ラットの肝臓を用いたプロテオーム解析. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-0091, p. 121)

山野荘太郎、梯アンナ、魏 民、多胡善幸、陳 慶義、鰐淵英機：QSTAR Elite LC-MS/MS を用いたマウス肺腫瘍におけるプロテオーム解析. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-0092, p. 121)

魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、石井真美、北野光昭、鰐淵英機：MicroRNA-125b はラット膀胱発がんの早期マーカーとして有用である. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-0219, p. 146)

菅 直人、金川明裕、山田貴宣、大保ゆみ、鰐淵英機：膀胱尿路上皮におけるジメチルモノチオアルシン酸の影響. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-0795, p. 337)

丁 奎光、梯アンナ、今中麻幸代、山野荘太郎、魏 民、西山典利、鰐淵英機：QSTAR Elite LC-MS/MS を用いたヒト肺腺がんにおけるプロテオーム解析. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, 0-604, p. 392)

則座由依、梯アンナ、丁 奎光、林 修次、鰐淵

英機：ラット炎症性大腸がんモデルにおけるプロポリスの修飾作用の検討. 第 68 回日本がん学会学術総会, 10 月 1-3 日, 横浜, 2009 (第 68 回日本がん学会学術総会 PROCEEDING, P-1264, p. 497)

鰐淵英機：動物モデルを用いたヒ素の発がん性と発生機序の解明. 第 15 回ヒ素シンポジウム, 11 月 28-29 日, 大阪, 2009 (第 15 回ヒ素シンポジウム講演要旨集, 会長講演, p. 10)

山田貴宣、謝 曉利、魏 民、菅 直人、梯アンナ、鰐淵英機：ジフェニルアルシン酸による肝発がん促進作用の機序解明. 第 15 回ヒ素シンポジウム, 11 月 28-29 日, 大阪, 2009 (第 15 回ヒ素シンポジウム講演要旨集, 1-7, p. 48)

菅 直人、謝 曉利、金川明裕、吉田 香、魏 民、圓藤吟史、鰐淵英機：膀胱尿路上皮におけるジメチルモノチオアルシン酸の影響. 第 15 回ヒ素シンポジウム, 11 月 28-29 日, 大阪, 2009 (第 15 回ヒ素シンポジウム講演要旨集, 2-8, p. 10)

横平政直；橋本希；久野壽也；今井田克己，ラット気管内投与法による微粒子の肺毒性評価への挑戦, 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋 (2008. 02)

橋本 希, 横平 政直, 山川 けいこ, 細川 京子, 鈴木 智, 久野 壽也, 今井田 克己, L-asparagine のラット 90 日間反復経口投与毒性試験, 第 24 回日本毒性病理学会, 名古屋 (2008. 02)

横平政直；久野壽也；山川けいこ；細川京子；橋本希；竿尾光祐；今井田克己, F344 ラット気管内投与法による微粒子 16 種の肺毒性評価, 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)

岸宗佑、横平政直、久野壽也、橋本希、竿尾光祐、今井田克己、NNK 誘発マウス肺腺がんと肺腺腫における EGFR, ER および PR, 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)

Toshiya Kuno, Masanao Yokohira, Nozomi Hashimoto, Satoshi Suzuki, Keiko Yamakawa, Katsumi Imaida, Streptozocin is a potent lung carcinogen in A/J mice, 第 67 回日本がん学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Nozomi Hashimoto, Satoshi Suzuki, Katsumi Imaida, Effects of nano-sized particles of CuO and TiO<sub>2</sub> by intratracheal instillation on DHPN

lung, 第 67 回日本がん学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

Satoshi Suzuki, Masanao Yokohira, Nozomi Hashimoto, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida, A study on the threshold for MeIQx carcinogenesis in combination with NNK using A/J mice, 第 67 回日本がん学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

Keiko Yamakawa, Nozomi Hashimoto, Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Satoshi Suzuki, Katsumi Imaida, Effect of intragastric administration of nanoparticles on liver carcinogenesis in a rat medium-term, 第 67 回日本がん学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

Nozomi Hashimoto, Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Satoshi Suzuki, Kousuke Saoo, Tadashi Uchino, Hiroshi Tokunaga, Katsumi Imaida, Intratracheal instillation of CuO nanoparticles promotes liver carcinogenesis in F344 male rats, 第 67 回日本がん学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

久野壽也、横平政直、橋本希、今井田克己、竿尾光祐、山本美佐子、鼻腔腫瘍, 第 97 回スライドカンファレンス, 広島 (2008. 11)

横平政直；橋本希；鈴木智；竿尾光祐；久野壽也；今井田克己, 片肺虚脱の試みによるマウス肺中期腫瘍モデルの作成と胸膜中皮腫モデルへの可能性, 第 25 回日本毒性病理学会総会 (2009. 01)

橋本希；横平政直；鈴木智；竿尾光祐；久野壽也；今井田克己, 気管内投与による CuO ナノサイズ粒子の急性変化の検討—マイクロサイズ粒子との比較による—, 第 25 回日本毒性病理学会総会 (2009. 01)

Nozomi Hashimoto, Masanao Yokohira, Satoshi Suzuki, Kousuke Saoo, Toshiya Kuno, Tadashi Uchino, Hiroshi Tokunaga, Katsumi Imaida, Comparison of nano- and micro-sized particles by three different route administrations using a medium-term liver carcinogenesis bioassay in F344 rats. American Association for Cancer Research, 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009 (2009. 04)

Toshiya Kuno, Masanao Yokohira, Nozomi

Hashimoto, Satoshi Suzuki, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida. The establishment of a streptozocin-induced mouse pulmonary tumor model. American Association for Cancer Research, 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009 (2009.04)

橋本希、横平政直、久野壽也、橋本希、竿尾光祐、今井田克己、マウス胸膜中皮腫モデルの検討, 第98回日本病理学会総会, 京都 (2009.05)

Nozomi Hashimoto, Masanao Yokohira, Keiko Yamakawa, Satoshi Suzuki, Kousuke Saoo, Shigemi Kinouchi, Toshiya Kuno, Katsumi Imaida. Pleural mesothelial proliferating reaction by TISMO -possible animal model of mesothelioma-. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)

Satoshi Suzuki, Masanao Yokohira, Nozomi Hashimoto, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa, Kousuke Saoo, Tadao Shiooka, Katsumi Imaida. Overexpressions of liver CYP2A5 and MGMT by the combination treatments of MeIQx and NNK in A/J mice. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)

Toshiya Kuno, Masanao Yokohira, Satoshi Suzuki, Nozomi Hashimoto, Keiko Yamakawa, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida. Modifying effects of obesity and diabetes in the chemical-induced lung tumorigenesis on *db/db* and *ob/ob* female mice. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)

Keiko Yamakawa, Satoshi Suzuki, Masanao Yokohira, Nozomi Hashimoto, Kousuke Saoo, Toshiya Kuno, Katsumi Imaida. Aberrant expression of microRNA on NNK or MeIQx-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)

D. Furuta, M. Yamane, R. Moriyama, T. Tsujiuchi, N. Fukushima. LPA induces neurite shape changes through LPA3. 4th International conference on phospholipase A2 and lipid mediators. Tokyo May, 2009 (Proceeding of the PLM2009).

D. Furuta, M. Yamane, R. Moriyama, T. Tsujiuchi, N. Fukushima. lysophosphatidic acid receptor

3 is involved in neurite branching for maturation in cultured hippocampal neuron. 第82回日本生化学会大会, 10月, 神戸, 2009 (日本生化学会誌)

朴木寛弥、藤井宏真、久保篤史、城戸颯、芳谷和洋、森俊雄、辻内俊文: A ヒト肉腫幹細胞様細胞はアルデヒドデヒドロゲナーゼ1 およびDNA修復酵素を高発現し強い薬剤抵抗性を示す. 第68回日本がん学会総会, 10月1日-3日, 東京, 2009 (日本病理学会誌第95巻第1号P-0491, p.187)

#### <その他>

#### H. 知的所有権の取得状況

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)  
食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究  
平成 21 年度分担研究報告書

短期発がんリスク評価試験法および新規前がん病変マーカーの開発に関する研究

研究分担者： 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授  
魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 講師

## 研究要旨

本研究は、がんの一次予防を最終目標とし、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期間に包括的に検出できる新しい発がんリスク評価法を開発することを目的とする。本年度では、既知ラット肝発がん物質であるダンマル樹脂について、*in vivo* 変異原性を検索できる gpt delta ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験法でその発がん性および変異原性を検討し、gpt delta ラットを用いた新規発がんリスク評価法の開発を行った。また、発がん性を検索できる新規早期前がん病変マーカーの開発の一環として、マウス肺扁平上皮がん及び周囲正常組織のプロテオーム解析を行い、扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定を行った。本年度の研究成果を以下にまとめる。

1. 18 週間多臓器発がん性試験では、雄 gpt delta ラットを用い実験開始 4 週間に無処置あるいはイニシエーション処置として 5 種類の発がん物質を投与した。1 週間の休薬後、イニシエーション群にはダンマル樹脂を 0、0.03、2%の濃度で、非イニシエーション群にはダンマル樹脂を 0 または 2%の濃度で 13 週間混餌投与した。イニシエーション群において、2%投与群で肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数および面積ともに対照群(0%群)と比較して有意な高値を認めた。以上の結果より、ダンマル樹脂が gpt delta ラットにおいて肝発がんプロモーション作用を有することが明らかとなった。これまでの F344 ラットを用いた発がん性試験の結果と一致したことから、gpt delta ラットを用いた本モデルは肝発がん物質の検出にも有用であることが明らかとなった。他の臓器の病理組織学的検査は現在検討中である。肝臓におけるダンマル樹脂の変異原性の検討は現在進行中である。
2. 扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定試験では、A/J マウスに NTCU を投与することにより誘発した肺扁平上皮がん及び周囲正常組織の凍結サンプルから、プロテオーム解析を行い、マーカー候補蛋白を選出した。その後、候補蛋白に対する抗体を用いた免疫染色を行い、正常部、扁平上皮化生及びがん部におけるその局在を確認した。プロテオーム解析の結果、315 種類の蛋白が同定された。そのうち、周囲正常組織と比較してがん部で有意に発現が上昇しているものが 66 種類、減少しているものが 60 種類、合計 126 種類であった。そのうち、cytokeratin 19 および YWHAZ が周囲正常組織で発現は認められなかったが、がん部及び扁平上皮化生において過剰発現が認められた。以上の結果より、CK19 及び YWHAZ は扁平上皮がんの早期検出マーカーとして有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

環境中には多くの発がん物質が存在し、ヒト発がんの原因と目されており、食品を介しての化学物質曝露はそのなかでも大きな要因となっている。しかし、食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は動物試験だけでも 2 年間という長期間が必要であり、その莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの食品添加物等に対応することが困難なためである。一方、*in vitro* の変異原性試

験により変異原が決められてきたが、変異原性が陰性でも発がん物質が多数見つかってきており、*in vitro* の変異原性試験と発がん性との間に解離がみられているのも事実である。本研究は、がんの一次予防を最終目標とし、食品中の化学物質、特に食品添加物等の遺伝毒性と発がん性を短期間に包括的に検出できる新しい発がんリスク評価法を開発することを目的とする。

本年度では、以前に我々が行った 2 年間発がん性試験で肝発がん性が確認されたダンマル樹脂について、*in vivo* 変異原性を検索できる gpt



delta ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験法で、その発がん性を評価し、これまでの評価結果と比較検討した。また、ダンマル樹脂の gpt delta ラット肝における *in vivo* 変異原性を検索し、遺伝毒性の有無を検討した。さらに、発がん性を検索できる新規早期前がん病変の開発の一環として、肺扁平上皮がん及び周囲正常組織のプロテオーム解析を行い、扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定を行った。

## B. 研究方法

### 1. gpt delta ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験

#### [被験物質]

ダンマル樹脂粉末は、日本食品添加物協会により供与された。ダンマル樹脂はオリエンタル MF 基礎飼料に規定量混ぜたものを検体として使用した。被験物質の飼料への添加、固化はオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。

#### [投与量の設定]

F344 ラットを用いたダンマル樹脂の2年間発がん試験性の結果に基づいて、gpt delta ラットを用いた多臓器中期発がん性試験及び変異原性試験では発がん用量である2%と非発がん用量である0.03%を設定した。

#### [試験プロトコル]

5週齢の gpt delta 雄ラット (F344 系) 57匹を日本エスエルシー株式会社より購入し、約一週間の馴化飼育の後、5群に分け、Figure 1に示す実験デザインで動物実験を施行した。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度  $24 \pm 2$  度、湿度  $50 \pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物はプラスチックケージに3匹ずつ飼育し、ケージおよびチップを週1回交換した。1~3群に実験開始日に  $100\text{mg/kg b.w.}$  diethylnitrosamine (DEN, 東京化成, Cas No. 55-18-5) の腹腔内投与、第3、6、9、13日に  $20\text{mg/kg b.w.}$  N-methyl-N-nitrosourea (MNU, Sigima, Cas No. 684-93-5) の腹腔内投与、第16、20、23、27日に  $40\text{mg/kg b.w.}$  1,2-dimethylhydrazine (DMH, Aldrich, Cas No. 306-37-6) の皮下投与を行った。さらに、それらと並行して第1~2週に  $0.05\%$  N-butyl-N-(4-hydroxypropyl) nitrosamine (BBN, 東京化成, Cas No. 3817-11-6) を、第3~4週に  $0.1\%$  dihydroxybutyl-di-N-propylnitrosamine

(DHPN, ナカライ, Cas No. 53609-64-6) をそれぞれ飲水投与し (DMBDD 処置)、イニシエーション処置とした。実験開始第6週目から1、4群には0%ダンマル樹脂を、3、5群には発がん用量である2%ダンマル樹脂を、2群には0.03%ダンマル樹脂をそれぞれ13週間、オリエンタル MF 飼料中に混ぜて、それを自由に摂取させた。また、発がん物質投与以外の飲料水として、水道水を自由摂取させた。実験開始後18週に屠殺剖検し、1~3群においては DMBDD 標的臓器の病理組織学的検索を行い、4、5群においては、gpt assay および Spi- assay を行う。

#### [一般状態、体重、摂餌量]

全動物は、一般状態を毎日観察し、週1回体重および摂餌量を測定した。1日あたりのダンマル樹脂摂取量 ( $\text{mg/kg/day}$ ) は、その結果より算出する。

#### [病理組織学的検査]

18週間の投与終了後に、全例を安楽死させて詳細な剖検を行った。DMBDD 処置を行った1~3群において器官、臓器を採取し、二重線を付したものは凍結保存も行い、全てを10%中性緩衝ホルマリン液により固定した。1~3群において採取した器官、臓器は、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、前立腺、その他の肉眼的異常部位である。また、非 DMBDD 処置群である4、5群において器官、臓器を採取し、二重下線を付したのものについて重量を測定した後、全て凍結保存を行った。肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸、大腸、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、唾液腺、精巣、精巣 上体、その他の肉眼的異常部位である。また、肝臓及び腎臓を10%中性緩衝ホルマリン液により固定を行った。

病理組織学的検索は、全動物について以下に示す器官、組織の固定標本から切り出しを行い、通常の方法でパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン/エオジン染色を施して鏡検した。該当する器官は、DMBDD 処置を行った1~3群において肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、肺、心臓、甲状腺、膀胱、副腎、前立腺、その他の肉眼的異常部位である。また、DMBDD 処置を行っていない4、5群においては、肝臓、腎臓、その他の肉眼的異常部位である。

#### [肝臓の免疫組織化学的検査]

肝臓の前がん病変マーカーである胎盤型

Glutathione S-transferase (GST-P) を ABC 法にて免疫染色を行った。GST-P 陽性細胞巢の個数および面積を病理標本画像解析装置 IPAP-WIN [住化テクノサービス株式会社] を用いて計測し、肝臓切片 1cm<sup>2</sup> 当りの GST-P 陽性細胞巢 (直径 0.2mm 以上) の個数および面積を算出し、定量的解析を行った。

#### [統計学的解析]

体重、摂餌量、臓器重量、腫瘍および前がん病変の平均値について 1~3 群は barlett 法による等分散検定を行った。等分散の場合はパラメトリックの Dunnett 法による両側検定を行い、不等分散の場合はノンパラメトリックの Steel 法による両側検定を行った。また、4、5 群においては F 検定による等分散検定を行った。等分散の場合は Student's t-test 検定を行い、不等分散の場合は Welch t-test 法による両側検定を行った。病理組織学的検査における発生頻度の差の検定については、Fisher の直接確率検定を行った。

## 2. *gpt delta* ラットにおけるダンマル樹脂の *in vivo* 変異原性の検討 (魏分担)

ダンマル樹脂を 13 週間 (上述) および 4 週間 (今井分担参照) 単独投与した肝における変異頻度を *gpt* および Spi- assay 法を用いて検討する。

#### [*gpt* および Spi-assay]

*gpt* assay では、肝臓凍結組織から RecoverEase™ DNA Isolation Kit を用いて DNA を抽出した。*in vivo* パッケージングには、Transpack Packaging Extrac を用いて、抽出した DNA からトランスジーン λ EG10 をファージ粒子として回収した。Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株の菌液に回収したファージを加え、37°C 20min (静置) の後、37°C 20min (振とう) にて回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させた。感染後の YG6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37°C で 2 日間培養を行い、*gpt* 遺伝子が不活化している変異体のコロニーを得た。また、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数は 6-TG を含まない M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数によって求めた。突然変異数は、6-TG を含む寒天培地にまいて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数で除して算出した。

Spi-assay では、*in vivo* パッケージングによりファージを回収するまでの手法は *gpt* assay と

同様に行った。P2 溶原菌に回収したファージを加え、37°C 20min (静置) により回収したファージを P2 溶原菌に感染させた後、λ トリプティック寒天培地にまいて 37°C で一晚培養し、Spi-変異体プラークを得た。また、非溶原菌に感染させ、全ファージが溶菌してプラーク作ることにより回収プラーク数を求めた。突然変異体頻度は変異プラーク数を回収ファージ数で除して算出した。

## 3. 肺扁平上皮がんの早期検出マーカーの同定

#### [検体]

6 週齢 A/J 雌マウス 70 匹を用いて、NTCU 0.01 M/75 μl acetone/mouse の用量で、週 2 回、合計 18 週間マウスの背中に滴下し、実験開始 22 週後に動物を屠殺し、肺を摘出し、各動物から凍結ブロック及びホルマリン固定パラフィンブロックを作製した。

#### [Proteome analysis]

凍結ブロックから 10 μm の厚みで 10 枚の連続切片を作製し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション及びニードルダイセクション法を用いてがん部及び周囲正常組織それぞれをサンプリングした。がん組織からは、細気管支領域に発生した末梢型肺扁平上皮がんのみに限定し、主要な動静脈は混入しないよう気をつけ、周囲正常組織をサンプリングする際には、気管、動静脈のみならず軟骨、脂肪、神経組織を混入しないよう十分気をつけ、肺末梢部から採材するようにした。これより得られたサンプルから合計 18 μg の蛋白質をバッチし、iTRAQ 試薬でラベリングして、陽イオン交換カラムによる精製、Sep-pak カラムによる脱塩処理を行った後、QSTAR Elite LC-MS/MS (Applied Biosystems Japan) を用い蛋白質の網羅的発現解析を行った。

#### [バイオマーカー候補の選別]

上記により解析を行ったデータに関して、ProteinPilot software 及びバイオマーカー検索やシグナル伝達解析に有用である Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてがん部に特異的な候補蛋白を選出した。

#### [免疫組織学的解析]

選別したバイオマーカー候補に対し、パラフィンブロックから作成した連続切片を用いて免疫染色を行い、その染色性及び局在を確認した。

#### 「倫理面への配慮」

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実

験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないためにエーテル麻酔下にて実施した。

## C. 研究結果

### 1. *gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験

#### [一般状態]

実験期間中、全動物が生存した。ダンマル樹脂投与に関連した一般状態への影響は認められなかった。

#### [体重]

実験期間中の各群における平均体重推移を Table 1 および Figure 2 に示した。DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、実験開始 7 週目以降に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) において、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、実験開始 6, 7 週目と 9 週目以降に 6 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

最終体重は Table 2 に示した。DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) においても、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、6 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

#### [摂餌量および被験物質摂取量]

平均摂餌量を Table 3 および Figure 3 に示した。

DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の第 2 群 (DMBDD→0.03%投与群) で、実験開始 2 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。また、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、実験開始 6, 11, 13, 15~17 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。

非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) において、被験物質投与群の第 5 群 (2%投与群) で、実験開始 5, 6, 10~12, 16 週目に 6 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

実験期間中における 1 匹 1 日あたりの平均ダンマル樹脂摂取量を Table 4 に示した。ダンマル樹脂の摂取量はその投与量にほぼ関連した。

#### [飲水量]

平均飲水量を Table 5 および Figure 4 に示した。

DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、実験開始 16 週目に 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、有意な減少が認められた。

非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) において、被験物質投与群の第 5 群 (2%投与群) で、実験開始 9 週目に 6 群 (0%) と比べて、有意な減少が認められた。

#### [臓器重量]

各群の臓器の絶対重量および相対重量を Table 7 に示した。

肝臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、肝臓の相対重量にて有意な増加が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) では、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、4 群 (0%) と比べて、肝臓の絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

腎臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、腎臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

脾臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。また、非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) では、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、4 群 (0%) と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

心臓においては、DMBDD 処置群 (1~3 群) で、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で、1 群 (DMBDD→0%) と比べて、心臓の絶対重量、相対重量ともに有意な減少が認められた。

精巣においては、非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) で、被験物質投与群の 5 群 (2%投与群) で、4 群 (0%) と比べて、脾臓の絶対重量にて有意な減少が認められた。

#### [肝臓の GST-P 陽性細胞巢]

GST-P 陽性巢の単位面積あたりの発生個数および面積を Table 6 に示した。

DMBDD 処置群 (1~3 群) において、被験物質投与群の 3 群 (DMBDD→2%投与群) で 1 群 (DMBDD→0%) と比べて、発生個数、面積ともに有意な増加を認めた。

非 DMBDD 処置群 (4, 5 群) においては、GST-P 陽性細胞巢が認められなかった。

#### [病理学的検査]

肝臓には腫瘍は認められなかった。他の臓器については現在検索中である。

### 2. *gpt delta* ラットにおけるダンマル樹脂の変異原性の検討 (魏分担)

ダンマル樹脂の 13 週間および 4 週間単独投与した *gpt delta* ラット肝における変異頻度を *gpt assay* および *Spi-* assay 法を用いて現在検索中である。

### 3. 肺扁平上皮がんマーカーの同定

ProteinPilot software を用いて検出した蛋白を解析した結果、66%の信頼性で 315 種類の蛋白が検出された。さらにがん部と周囲正常部での発現量を比較した結果、有意に発現が上昇したものが 66 種類、一方減少したものが 60 種類であった。有意に発現上昇した蛋白の中で、Fold change に注目し選別した結果、サイトケラチン (CK) 5 (14 倍) を筆頭に上位 10 位のうち、8 種類が CK であり、扁平上皮の分化マーカーとして用いられている CK5/6 や CK14 も検出された。また、GSTO1 (8 倍) や GSTA4 (6 倍) 等、第 2 相の薬物代謝酵素も認められた (Table 8)。一方、発現の上位蛋白以外にも皮膚において幹細胞マーカーとしての報告がある CK19 や actin binding に関わる COTL1 が検出された。

次に、IPA を用いて検出した蛋白を解析した結果、がん関連のパスウェイで、中心に位置する YWHAZ と、先ほど検出した GSTO1 が認められた (Figure 5)。

以上より検出した COTL1, CK19, GSTO1 及び YWHAZ を新しいバイオマーカー候補として、免疫染色にてそれぞれの染色性及び局在を確認した。まず、肺の正常組織において特に、がんの起始細胞となり得る可能性が高いことからクララ細胞と肺胞 II 型細胞に注目し、それぞれの染色性を確認したところ、CK19 及び YWHAZ に関しては共に陰性であった。一方扁平上皮化生及びがん部では、4 種類の蛋白全てが検索した 8 個体全例にて陽性を示した (Figure 6, Table 9)。

### D. 考察

*gpt delta* 雄ラットを用い、多臓器に標的性を持つイニシエーション処置を行い中期多臓器発がん性試験法により、被験物質であるダンマル樹脂の全身諸臓器に対する発がんプロモーション期の修飾作用を検討した。その結果、体重において、2%投与群で体重増加抑制および肝相対重量の有意な増加が認められた。肝臓の GST-P 陽性細胞巢

の発生は、2%投与群では面積および数は対照群 (0%群) に比較して有意な高値が認められた。これらの結果から、ダンマル樹脂が *gpt delta* ラットにおいて肝臓に対する発がんプロモーション作用を有することが明らかとなった。ダンマル樹脂は 2%の用量では、F344 ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験で肝発がんプロモーション作用を示し、2 年間発がん性試験では肝発がん性が認められた。本試験はこれらの F344 ラットを用いた発がん性試験の結果と一致した結果が得られた。これらのことから、*gpt delta* ラットを用いた本モデルは肝発がん物質の検出にも有用であることが明らかとなった。他の臓器の病理組織学的検査は現在進行中である。

マウス肺扁平上皮がんの早期検出マーカーの実験では、がん部と周囲正常組織をプロテオーム解析に用い、発現蛋白の網羅的解析を行ったことで、早期検出マーカーになりうる蛋白 4 種類を同定した。免疫染色の結果より、CK19 及び YWHAZ は周囲正常部位で発現が認められないこと、さらに前がん病変である化生からがんにかけてその発現が確認されたことからこの 2 種類の蛋白は扁平上皮がんの早期検出マーカーとして有用である可能性が示唆された。

CK19 は Type I cytoskeleton に分類され、毛包隆起部に存在する上皮幹細胞のマーカーの可能性が示唆されている。一方、YWHAZ は、14-3-3 family に属する adapter protein の一種で、細胞生存シグナルに関与する PKC、RAF1、CTTNB や آپトosis に関与する BAD、BAX 等多数の分子と結合することによりその機能を調節している。さらに、頭頸部扁平上皮がんにおいて、YWHAZ 遺伝子のコピー数が増加しており、proto-oncogene の候補として報告されている。これらの 2 種類の蛋白は、肺扁平上皮がんの発がんメカニズム解析においても有用な key protein になり得る可能性を有することが考えられた。

### E. 結論

F344 ラット用いた 2 年間発がん性試験で肝発がん性が確認されたダンマル樹脂について、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験法でその発がん性を検討した。その結果、2%群ではダンマル樹脂の肝発がんプロモーション作用が認められ、これまでの F344 ラットを用いた発がん性試験の結果と一致した結果が得られた。*gpt delta* ラットを用いた本モデルは肝発がん物質の検出にも有用であることが明らかとなった。本モデルを用いて、発がん性の評価と *in vivo* 変異原性の検討を合わせて実施できると考えられる。さらに、化学物質の発

がん性に対する遺伝毒性の寄与についても検討することができると考えられる。

マウス肺扁平上皮がんモデルを用いて、がん部と周囲正常部をプロテオーム解析に用いた発現蛋白の網羅的解析および免疫染色を行った結果、CK19及びYHAZは周囲正常部位で発現が認められないこと、さらに前がん病変である化生からがんにかけてその発現が確認されたことからこの2種類の蛋白は扁平上皮がんの早期検出マーカーとして有用であることが示唆された。今後、gpt delta ラットの多臓器発がん性試験で得られた肺組織におけるこれらの蛋白の発現を検討し、その有用性を確認する予定である。

## F. 健康危険情報

ダンマル樹脂が肝発がん性を有する可能性がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Doi, K., Wei, M., Kitano, M., Uematsu, N., Inoue, M. and Wanibuchi, H.: Enhancement of preneoplastic lesion yield by chios mastic Ggm in a rat liver medium-term carcinogenesis bioassay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 234, 135-142, 2009.

八代正和、豊川貴弘、鰐淵英機、小野田尚佳、羽室雅夫、渡辺俊雄、斯波政次、六車一哉、富永和作、山下好人、澤田鉄二、大平雅一、平川弘聖、上田真喜子：残胃癌。総合臨牀、第58巻第2号、370-377, 2009.

中村卓也、松井 宏、川又誠也、中野和彦、片山貴子、日野雅之、鰐淵英機、荒波一司、山田 隆、辻 幸一：血液中金属元素の全反射蛍光 X 線分析。X 線分析の進歩、40, 249-257, 2009.

Kushida, M., Wanibuchi, H., Wei, M., Kakehashi, A., Ozaki, K., Sukata, T., Miyata, K., Ogata, K., Uwagawa, S. and Fukushima, S.: Ethanol dose not promote MeIQx-initiated rat colon carcinogenesis based on evidence from analysis of a colon cancer surrogate marker. *J Toxicol. Pathol.*, 22, 65-70, 2009.

Tanaka-Okamoto, M., Hori, K., Ishizaki, H., Hosoi, A., Itoh, Y., Wei, M., Wanibuchi, H., Mizoguchi, A., Nakamura, H. and Miyoshi, J.:

Increased susceptibility to spontaneous lung cancer in mice lacking LIM-domain only 7. *Cancer Sci.*, 2009. Epub ahead of print.

Fukushima, S., Kakehashi, A., Wei, M. and Wanibuchi, H.: Existence of a threshold for the genotoxic carcinogens: Evidence from mechanism-based carcinogenicity studies. *Genes and Environment*, 31, 33-36, 2009.

Kakehashi, A., Inoue, M., Wei, M., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Cytokeratin 8/18 overexpression and complex formation as an indicator of GST-P positive foci transformation into hepatocellular carcinomas. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238, 71-79, 2009.

Romanenko, A., Kakehashi, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Vozianov, A. and Fukushima S.: Urinary bladder carcinogenesis induced by chronic exposure to persistent low-dose ionizing radiation after Chernobyl accident. *Carcinogenesis*, 30, 1821-1831, 2009.

Kakehashi, A., Kato, A., Inoue, M., Ishii, N., Okazaki, E., Wei, M., Tachibana, T. and Wanibuchi, H.: Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 242, 47-55, 2009.

Wei, M., Hamoud, A. S., Yamaguchi, T., Kakehashi, A., Morimura, K., Doi, K., Kushida, M., Kitano, M., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Potassium bromate enhances N-Ethyl-N-Hydroxyethylnitrosamine-Induced kidney carcinogenesis only at high dose in wistar rats: Indication of the existence of an enhancement threshold. *Toxicol Pathol.*, 37, 983-991, 2009.

### 2. 学会発表

Ishii, N., Wei, M., Kakehashi, A., Tago, Y. and Wanibuchi, H.: Modifying effects of diabetes mellitus in a rat multi-organ carcinogenesis model. The American Association for Cancer Research 100<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, Apr. 18-22, Denver, Colorado, U. S. A., 2009.

Suga, N., Wei, M., Kakehashi, A., Onishi, M., Yamano, S. and Wanibuchi, H.: Oncomodulin is