

Table 8 Top 10 proteins overexpressed in mice SCC

Name	Fold changes	Location	Family	function
CK5	14.3↑	cytoplasm	enzyme	cellular organization
CK6A	13.0↑	cytoplasm	enzyme	cellular organization
CK14	10.8↑	cytoplasm	enzyme	cellular organization
CK13	8.7↑	cytoplasm	enzyme	cellular organization
GSTO1-1	8.1↑	cytoplasm	metabolism	metabolism
CK4	7.9↑	cytoplasm	enzyme	cellular organization
CK17	7.6↑	cytoplasm	enzyme	cellular organization
CK1B	6.1↑	cytoplasm	enzyme	cellular organization
GSTA4-4	6.0↑	cytoplasm	metabolism	metabolism
CK10	4.8↑	cytoplasm	enzyme	cellular organization

Table 9 Immunohistochemistry of marker proteins in normal area and lesions of mice lung

Protein	Normal tissue		Squamous metaplasia (n=8)		SCC (n=8)	
	Clara cell	Type II cell	Incidence (%)	Expression patt.	Incidence (%)	Expression patt.
COTL1	+, d	+++ , f	8 (100)	+++ , d	8 (100)	+++ , d
CK19	-	-	8 (100)	+++ , d	8 (100)	++ , d
GSTO1	+, f	-	8 (100)	+++ , d	8 (100)	++ , d
YWHAZ	-	-	8 (100)	+++ , d	8 (100)	++ , d

SCC: Squamous cell carcinoma

d: diffuse
f: focal

-: negative
+: weak
++: middle
+++: high

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

中期発がん性試験に関する研究

研究分担者：今井田克己 香川大学医学部 腫瘍病理学 教授

研究要旨

食品添加物で既存添加物として登録されているダンマル樹脂の発がん修飾作用を検討した結果、肝臓に腫瘍性変化をもたらす可能性が示唆された。これを受けて、遺伝子レベルで検索することを目的に、肝臓での遺伝毒性を検討するとともに、同様の実験を雄 *gpt delta* ラットを用いて行うこととし検討している。[実験 1] 雄 *gpt delta* ラットを各 6 匹ずつ 2 群に分け、1 群にはダンマル樹脂を 2% の濃度で混じた飼料を経口投与した。残る 1 群には通常食を投与し、両群とも 4 週間後に屠殺剖検した。[実験 2] ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、雄 *gpt delta* ラットに 5 種類の発がん物質によるイニシエーションを行った後、ダンマル樹脂を 0%, 0.03%, 2% の濃度で混じた飼料を経口投与した。現在<実験 1>は動物実験が終了し、遺伝子解析の検討が現在進行中である。また、<実験 2>の動物実験は現在順調に進行している。

A. 研究目的

以前の実験において、食品添加物で既存添加物として登録されているダンマル樹脂の主要臓器における発がん修飾作用について、ラット多臓器中期発がん試験法を用いて検討した結果、肝臓に腫瘍性変化をもたらす可能性があることが示唆された。これを受けて、遺伝子レベルでの検索を行うことを目的として、肝臓での遺伝毒性を検討するとともに、雄 *gpt delta* ラットを用いて同様の実験を行った。ダンマル樹脂は天然の食品添加物として、厚生労働省の既存添加物名簿収載品目リストに収載されている。マレーシアなど東南アジアで、ラワン属の樹木から採取される軟質の現存樹脂であり、フタバガキ科 (*Shorea wiesneri* SCHRFF.) 又はナンヨウスギ科 (*Agathis dammara* L. C. RICHARD, *Agathis lanceolata* PANCH.) の分泌液より、熱時エタノール又は酢酸エチルで抽出し、ろ液から溶媒を溜去し、乾燥して得られたもので、主成分は多糖類である。従来、油絵の保護ワニスとして使用されているが、現在増粘安定剤としてガムなどの食品への使用が認められている。しかし、その発がんリスクや機序に関してはいまだ詳細な検討が行われていないのが現状である。そこで、ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、ダンマル樹脂を経口投与させ、主要臓器における発がん修飾作用を検討した。

B. 研究方法

[実験 1] 5 週齢の雄 *gpt delta* ラット 12 匹を

日本エスエルシー株式会社(静岡)より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、Fig. 1 に示す実験デザインで動物実験を施行した。実験開始時から 1, 2 群にそれぞれ 4 週間、ダンマル樹脂をオリエンタル MF 飼料中に 0%, 2% の濃度で混じて、それを自由に摂取させた。

[実験 2] [実験 1]と同様に、5 週齢の雄 *gpt delta* ラット 45 匹を日本エスエルシー株式会社(静岡)より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、各群 15 匹ずつ 3 群に配し、Fig. 2 に示す実験デザインで動物実験を施行した。全群に実験開始日に 100mg/kg b. w. diethylnitrosamine (DEN, 東京化成, Cas No. 55-18-5)を腹腔内投与、第 2、5、8、11 日に 20mg/kg b. w. N-methylnitrosourea (MNU, Sigima, Cas No. 684-93-5)を腹腔内投与、第 14、17、20、23 日に 40mg/kg b. w. dimethylhydrazine (DMH, Aldrich, Cas No. 306-37-6)を皮下投与した。さらに、これらの投与と並行して第 1~2 週に 0.05% N-butyl-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN, 東京化成, Cas No. 3817-11-6)を、第 3~4 週に 0.1%N-Bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN, ナカライ, Cas No. 53609-64-6)をそれぞれ飲料水投与し(DMBDD 処置)、イニシエーション処置とした。実験開始第 5 週目から 1~5 群にそれぞれ 27 週間、ダンマル樹脂をオリエンタル MF 飼料中に 0%, 0.03%, 2% の濃度で混じて、それを自由に摂取させた。

[実験 1]、[実験 2]のいずれも、動物の飼育はバ

リヤースシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24 ± 2 度、湿度 $60\pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。被験物質の飼料への添加および固形化をオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は毎週1回測定した。摂餌量は、毎週1回3日間の摂取量をケージ単位で測定し、ケージの収容動物数と日数から1匹あたりの1日平均摂餌量を計算した。

[実験1]では実験開始後4週間後に、麻酔下で開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血による屠殺後剖検した。剖検時、諸臓器を肉眼的に観察し、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、空腸、大腸、肺、心臓、甲状腺、副腎、唾液腺、精巣、精巣上体を摘出し、肝臓および腎臓については液体窒素による凍結ブロックを作成し、さらに10%緩衝ホルマリン液にて固定した。また、摘出した全ての臓器について凍結保存を行い、原因遺伝子検索を行う予定である。

[実験2]は実験開始後32週間後に、全生存例を麻酔下で、腹部大動脈から採血後に脱血致死させ、屠殺・剖検を行い、主要臓器を摘出し病理組織学的に検討する予定である。

本研究の実験は全て香川大学総合生命科学研究センター動物実験部門において行われ、動物実験の開始前には実験計画書を香川大学実験動物委員会に提出し、その承諾を得た上で実験動物の愛護上の問題に配慮し行った。

C. 研究結果

<一般状態および死亡動物>

[実験1] 実験開始前の馴化飼育期間中、一匹の動物が死亡した。

[実験2] 現在、実験はDMBDD処置を終了し、各用量のダンマル樹脂の経口投与を開始している。DMBDD処置中に1匹麻酔処置により死亡した。

<体重>

[実験1]の試験期間中の各群の体重推移をFig. 3に示した。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。

[実験2]の試験期間中の各群の体重推移をFig. 4に示した。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。

<摂餌量>

[実験1]の試験期間中の各群の摂餌量の推移およびダンマル樹脂の総摂餌量をTable 1に示した。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。また、ダンマル樹脂の実験期間での総摂餌量は約6.3g/ratであった。

[実験2]の試験期間中の各群の摂餌・飲水量の推移およびダンマル樹脂の総摂餌量をTable 2に示した。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餌量は用量にほぼ依存していた。

<臓器重量>

[実験1]における試験終了時の臓器の絶対重量と相対重量の結果をTable 3に示した。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。

現在、[実験1]は実験が終了しており、大阪市立大学にて遺伝毒性の検討中である。また、[実験2]の動物実験は進行中であり、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。

D. 考察

今回、既存添加物であるダンマル樹脂の発がん修飾作用について、*gpt delta* ラットを用いて検討している。[実験1]の馴化飼育期間中の死亡例は実験開始前の段階であり、今回の実験の検討には含まなかった。また、[実験2]の死亡例一例はDMBDD処置に対して麻酔を行って直後の死亡であり、麻酔の影響による死亡と推定される。現在、[実験1]は動物実験が終了しており、肝臓での遺伝毒性を検討している。また、[実験2]の動物実験は進行中であり、ダンマル樹脂の発がん修飾作用の*gpt delta* ラットでの検討については、すべての実験結果により最終的に判定する予定である。

E. 結論

ダンマル樹脂による発がん修飾作用の有無について、*gpt delta* ラットを用いて検討している。動物は5週齢の雄*gpt delta* ラットを用い、[実験1]ではそれを2群に分け、実験開始時より2群にダンマル樹脂を0%、2%の濃度で基礎飼料中に混じて経口投与させ、4週目に屠殺剖検を行った。現在大阪市立大学にて結果を検討している。[実験2]では5群に分け、全群に発がんイニシエーション目的にDMBDD処置を行った。実験開始第5週目より、1群

～5 群にダンマル樹脂をそれぞれ 0%, 0.03%, 2% の濃度で基礎飼料中に混じて経口投与させている。いずれの群も実験開始後 32 週目で屠殺剖検し、血液生化学的検査および各臓器の病理組織学的検索を行い、ダンマル樹脂の *gpt delta* ラットでの発がん修飾作用の検討を行う予定である。動物実験は現在まで順調に進行している。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Horii 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
 14. 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^{kip1} and skp2 predicts survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinomas. *Ann Surg Oncol.*, 16: 395-403, 2009
 15. 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] quin oxaline (MeIQx) induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *The Molecular Medicine Reports*, 2: 701-706, 2009.
 16. 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.
 17. Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. A Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO2 Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats: *J. Toxicol. Pathol.*, 22: 71-78, 2009.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.

25. 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] quin oxaline (MeIQx), but not enhancing effects of concomitant high fat diet, on lung carcinogenesis in female A/J mice. *Oncol. Lett.*, 1: 137-142, 2010.
26. 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] quin oxaline (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.

2. 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 岸宗佑, 横平政直, 久野壽也, 橋本希, 竿尾光祐, 今井田克己, NNK 誘発マウス肺腺癌と肺腺腫における EGFR, ER および PR, 第 97 回日本病理学会総会, 金沢 (2008. 05)
5. Toshiya Kuno, Masanao Yokohira, Nozomi Hashimoto, Satoshi Suzuki, Keiko Yamakawa, Katsumi Imaida, Streptozocin is a potent lung carcinogen in A/J mice, 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)
6. Masanao Yokohira, Toshiya Kuno, Keiko

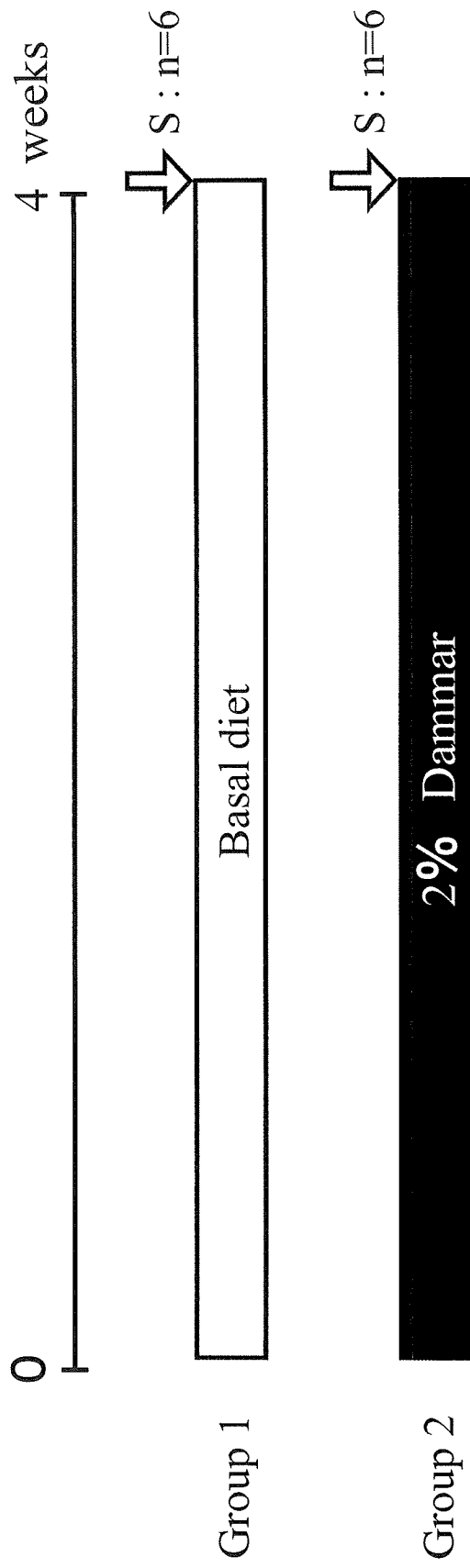
Yamakawa, Nozomi Hashimoto, Satoshi Suzuki, Katsumi Imaida, Effects of nano-sized particles of CuO and TiO₂ by intratracheal instillation on DHPN lung, 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)

7. 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 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)
8. 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 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)
9. Nozomi Hashimoto, Masano 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 回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008. 10)
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)
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)
12. 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)
13. 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, 100th Annual Meeting 2009 (2009.04)
14. 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, 100th Annual Meeting 2009 (2009.04)
 15. 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)
 16. 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-. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)
 17. 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. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)
 18. 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. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)
 19. 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. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2009.10)
2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

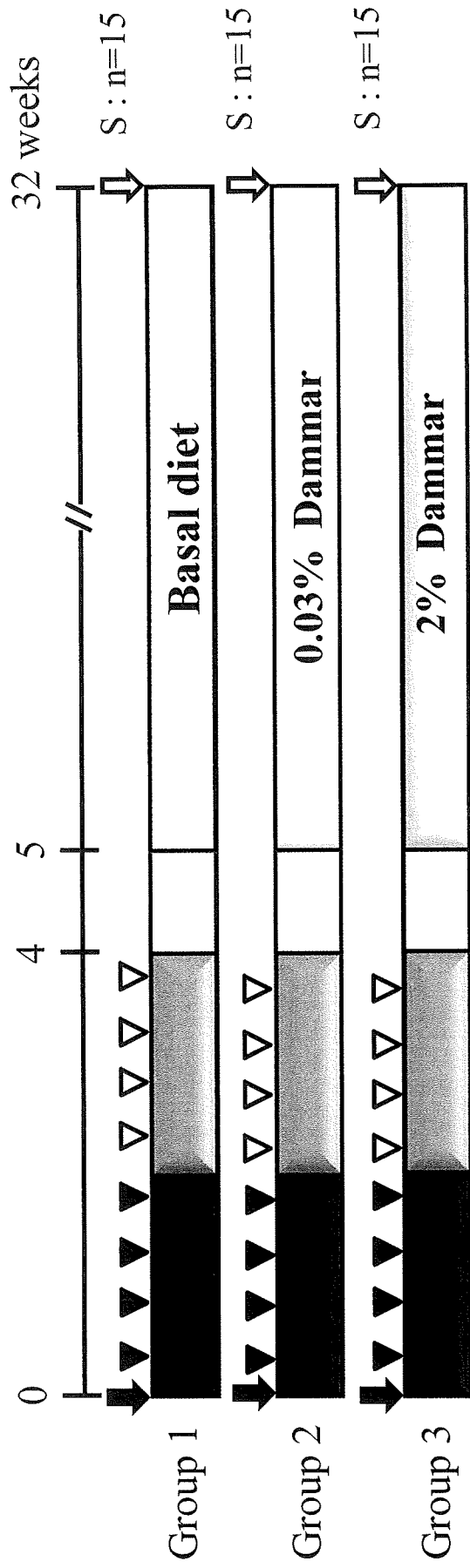
H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし



Animals: 6-week-old, 12 male gpt delta rats
 Test chemical: Dammar resin
 Basal diet: MF
 Examination: *in vivo* mutagenicity analyses
 S: Sacrifice

Fig.1 Experimental Design 1



Animals : 6-week-old, 45 male gpt delta rats

Test chemical : Dammar resin

Basal diet : MF

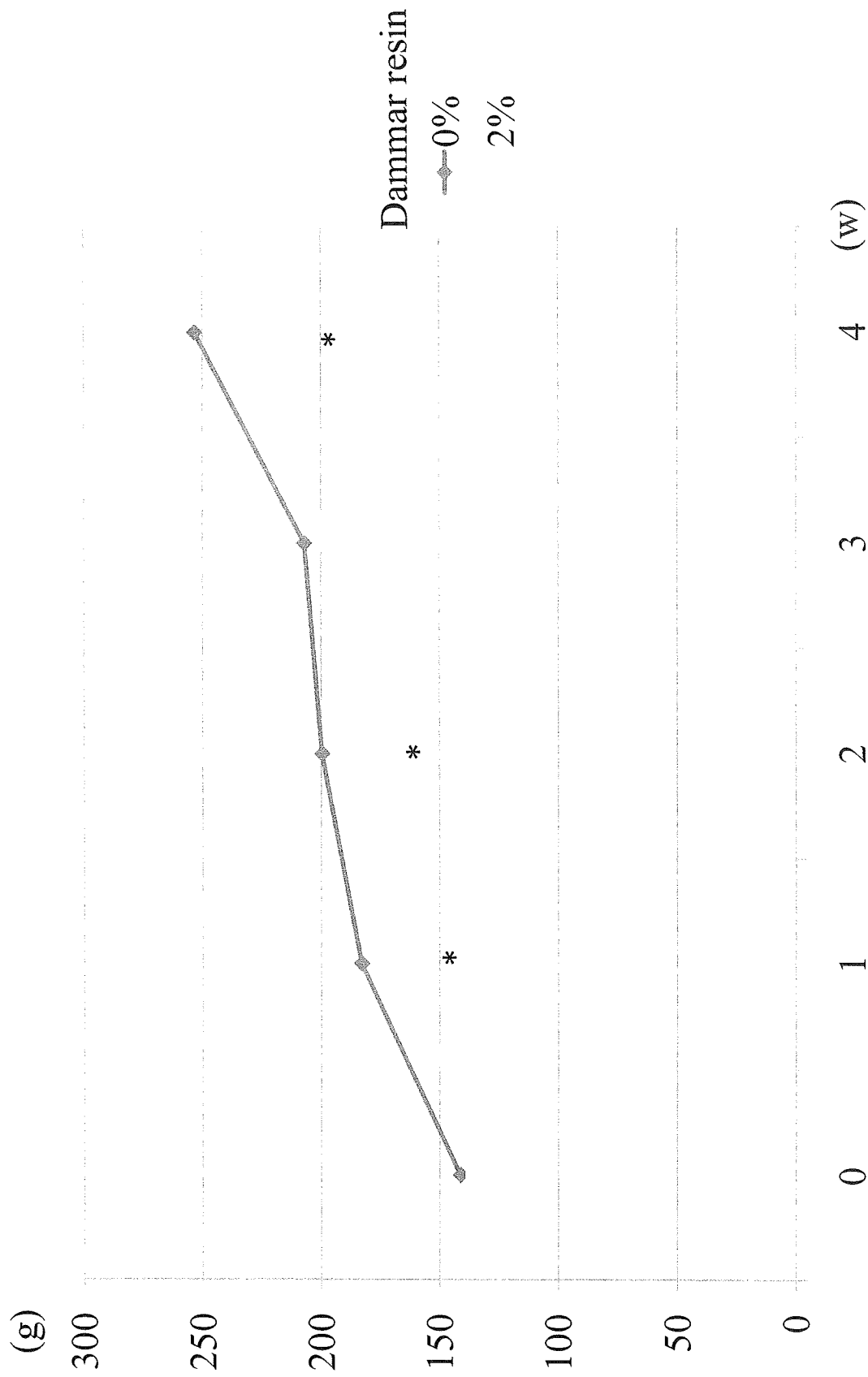
Treatment :

- ↓ DEN: 100 mg/kg body weight, i.p., single dose, at day 0.
- ▼ MNU: 20 mg/kg body weight, i.p., 4 times, during weeks 1 and 2.
- BBN: 0.05% in the drinking water, during weeks 1 and 2.
- ▽ DMH: 40 mg/kg body weight, s.c., 4 times, during weeks 3 and 4.
- ▨ DHPN: 0.1% in the drinking water, during weeks 3 and 4.

↓ S: Sacrifice

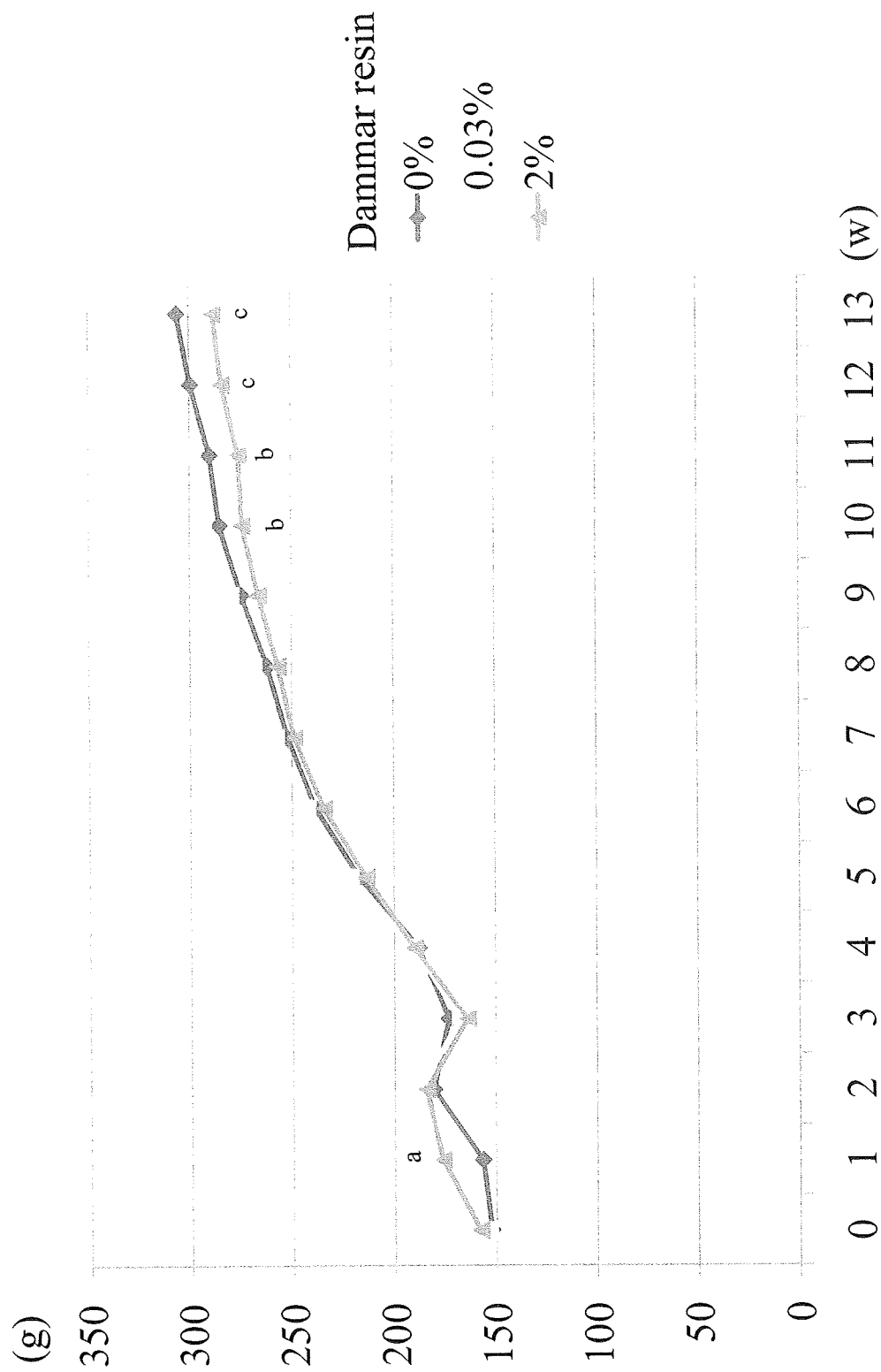
Examination : Development of preneoplastic and neoplastic lesions in major organs

Fig.2 Experimental Design 2



*: Significantly different from the 0% group at $p < 0.05$, respectively.

Fig.3 Body Weight Curves of Experimental 1



a: Significantly different from the 0% group at $p < 0.05$, respectively.
 b: Significantly different from the 0.03% group at $p < 0.05$, respectively.
 c: Significantly different from the 0% and 0.03% group at $p < 0.05$, respectively.

Fig.4 Body Weight Curves of Experimental 2

Table 1. Average Food Consumptions and Total Intake of Dammar Resin of Experimental 1

Group	Dose of Dammar Resin	No. of rats	Food consumption (g/rat day)	Total intake of Dammar Resin (g/rat)
1	0%	5	13.69±0.77	—
2	2%	6	11.17±0.51	6.25±0.29

Table 2. Average Food Consumptions, Total Intake and water intake of Dammar Resin of Experimental 2

Group	Dose of Dammar Resin	No. of rats	Food consumption	Total intake of Dammar Resin		Water intake (ml/rat/day)
			(g/rat day)	(g/rat)	(g/rat)	
1	0%	5	11.78±0.34	-	-	17.34±1.83
2	0.03%	6	11.57±0.19	0.34±0.01	0.34±0.01	18.82±1.09
3	2%	6	11.38±0.36	22.30±0.71	22.30±0.71	17.10±1.08

Table 3. Organ Weights (g) of experimental 1

Dose level (%)	Lungs		Heart		Liver		Spleen		Kidney	
	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative
	0	0.94±0.03	0.36±0.02	0.79±0.05	0.30±0.02	10.45±0.41	4.01±0.25	0.54±0.32	0.21±0.02	1.75±0.04
2	0.87±0.07	0.38±0.02	0.75±0.04	0.33±0.01	9.57±0.63*	4.23±0.08	0.50±0.04	0.22±0.08	1.59±0.04*	0.70±0.03

*: Significantly different from the 0% group at $p < 0.05$, respectively.

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

遺伝子のメチル化異常に関する研究

研究分担者：辻内 俊文 近畿大学工学部生命科学科 准教授

研究要旨

本研究は、既存添加物の一つである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、パイサルファイト・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。

A. 研究目的

遺伝子発現は、DNA メチル化・ヒストンタンパク修飾・microRNA など染色体の構造変化と関連しながら調節が行われている。これら epigenetics な遺伝子調節機構は、細胞・生物の発生、成熟、分化に関わるのみならず、がんをはじめとする様々な疾患の発症にも関与することが知られている。近年、種々のがん細胞において DNA メチル化異常によるがん抑制遺伝子の不活化が、がんの発生・進展・増殖に重要な役割を担うことが明らかとなっている。本研究では、既存添加物の一つであるダンマル樹脂の肝発がん機構を遺伝子レベルで明らかにするために、ダンマル樹脂を用いて誘発したラット肝細胞がんにおける DNA メチル化異常について解析した。研究初年度は、細胞間接着因子であり、がん細胞の浸潤・転移に関与する E-cadherin 遺伝子に着目し、同遺伝子 5' 上流領域の CpG 部位におけるメチル化状態について検索した。

B. 研究方法

＜材料＞

大阪市立大学大学院医学研究科より供与を受けた、ダンマル樹脂で誘発したラット肝細胞がん 5 例(ホルマリン固定パラフィン切片)を用いて、micro dissection 法より genomic DNA を抽出し遺伝子解析を行った。

＜DNA メチル化異常の解析＞

抽出した genomic DNA にパイサルファイト処理を施し DNA を精製した後、それを鋳型として E-cadherin 遺伝子 5' 上流領域に設定したプライ

マー(開始コドンより 82-218bp 塩基上流部位)を用いて PCR 反応を行った。PCR 増幅産物は、2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、標的領域が増幅されているのを確認した後に、TA クローニングを行った。クローニングした 5 例の肝細胞がんは、それぞれ 8 個のコロニーを採取して菌体 PCR 法を行い、DNA シークエンス反応にて CpG 部位(10 ヶ所)のメチル化状態を検索した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

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。今後、ダンマル樹脂によるラット肝細胞がん発生に、DNA メチル化異常は関与しないか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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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、城戸顕、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

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Doi, K., <u>Wei, M.</u> , Kitano, M., Uematsu, N., Inoue, M. and <u>Wanibuchi, H.</u>	Enhancement of preneoplastic lesion yield by chios mastic Ggm in a rat liver medium-term carcinogenesis bioassay.	Toxicol.Appl.Pharmacol	234	135-142	2009
Kushida, M., <u>Wanibuchi, H.</u> , <u>Wei, M.</u> , 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., <u>Wei, M.</u> , <u>Wanibuchi, H.</u> , Mizoguchi, A., Nakamura, H. and Miyoshi, J.	Increased susceptibility to spontaneous lung cancer in mice lacking LIM-domain only 7.	Cancer Sci			2009
Fukushima, S., Kakehashi, A., <u>Wei, M.</u> and <u>Wanibuchi, H.</u>	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., <u>Wei, M.</u> , Fukushima, S. and <u>Wanibuchi, H.</u>	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., <u>Wanibuchi, H.</u> , <u>Wei, M.</u> , 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., <u>Wei, M.</u> , Tachibana, T. and <u>Wanibuchi, H.</u>	Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions.	Toxicol.Appl.Pharmacol.	242	47-55	2009
<u>Wei, M.</u> , Hamoud, A.S., Yamaguchi, T., Kakehashi, A., Morimura, K., Doi, K., Kushida, M., Kitano, M., <u>Wanibuchi, H.</u> and Fukushima, S.	Patassium bromated 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, <u>Imaida K</u> , 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	1774-1777	2008
Kuno T, Yokohira M, Matsuda Y, Suzuki S, Hashimoto N, Yamakawa K, Saoo K, <u>Imaida K</u> .	Lack of modifying potential of 8-methoxypsoralen in the promotion or progression stages of lung carcinogenesis in A/J female mice.	Oncol Rep.	20	767-772	2008
Yachida S, Sakamoto M, <u>Imaida K</u> , 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, <u>Imaida K</u> .	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, <u>Imaida K</u> .	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, <u>Imaida K</u> .	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, <u>Imaida K</u> .	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, <u>Imaida K</u> .	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	545-553	2008
Yokohira M, Yamakawa K, Hosokawa K, Matsuda Y, Kuno T, Saoo K, <u>Imaida K</u> .	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, <u>Imaida K.</u>	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, <u>Imaida K.</u>	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, <u>Imaida K.</u> , 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, <u>Imaida K.</u> , 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, <u>Imaida K.</u> , 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 ^{kip1} 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, <u>Imaida K.</u>	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 <u>Imaida K.</u>	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, <u>Imaida K.</u>	A Lung Carcinogenic Bioassay of CuO and TiO ₂ Nanoparticles with Intratracheal Instillation Using F344 Male Rats.	J. Toxicol. Pathol.	22	71-78	2009