

201033025A

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に関する研究
平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐渕 英機

平成23(2011)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 -----18
鰐淵 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)
2. *gpt delta*ラットを用いた*in vivo*変異原性試験 -----74
魏 民 (大阪市立大学大学院医学研究科 講師)
3. 中期発がん性試験に関する研究 -----90
今井田 克己 (香川大学医学部腫瘍病理学 教授)
4. 遺伝子のメチル化異常に関する研究 -----106
辻内 俊文 (近畿大学理工学部生命科学科 准教授)

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----109

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 22 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的かつ包括的に検出できる新しい発がんリスク評価法の開発を目的とする。本年度では、前年度に引き続き既知ラット肝発がん物質であるダンマル樹脂、2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) およびコウジ酸を用いて、*in vivo* 変異原性の検索可能な *gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験法の開発を行った。さらに、C57BL/6J 系 *gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂および IQ の変異原性を検討すると同時に、C57BL/6J または B6C3F1 マウスを用いた肝二段階発がん性試験で被検物質の発がん性を検討し、新規マウス発がんリスク評価試験法を開発した。加えて、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、ラット腎発がんおよびマウス肺発がんの新規前がん病変マーカーの同定を行った。なお、ダンマル樹脂の 2 年間投与で誘発したラット肝細胞がんにおけるがん関連遺伝子の DNA メチル化異常および突然変異の有無も検討した。本年度の研究成果を以下にまとめる。

1. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法の開発

- ① *gpt delta* ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験では、発がん物質によるイニシエーション群では、ダンマル樹脂投与群で肝発がん促進作用が認められた。一方、甲状腺、肺、腎臓など他の臓器に対する発がん促進作用は認められなかった(鰐淵)。これらの結果は、2 年間発がん性試験と一致した。非イニシエーション群で変異原性を検討した結果、ダンマル樹脂は肝臓において変異原性を示さないことが明らかとなった。一方、遺伝毒性発がん物質である IQ は変異原性を有することが確認された。これらの結果は、この 2 物質の変異原性に関するこれまでの報告と一致していた。また、遺伝毒性の有無が明らかでないコウジ酸を検討した結果、変異原性を有しない可能性が強く示唆された(魏)。なお、*gpt delta* ラットの背景動物である F344 ラットを用いたコウジ酸および IQ の 18 週間多臓器発がん性試験では、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用が認められた(鰐淵)。以上より、本試験法では、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同時に、化学食品添加物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。
- ② *gpt delta* ラットを用いた 32 週間多臓器発がん性試験では、18 週と同様にダンマル樹脂投与群で肝発がん促進作用が認められた。他の臓器に対する発がん促進作用は認められなかった(今井田)。
- ③ 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発では、*N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) 単独および EHEN→KBrO₃ 誘発腎腫瘍のプロテオーム解析結果より、異型尿細管から全ての腎腫瘍にかけて高発現する S100A11 の同定に成功した。新規腎発がん前がん病変マーカーになり得る可能性が示唆された。今後 *gpt delta* ラットを用いた多臓器発がん性試験における腎標本を用いて検討を行い、発がん性の短期包括的試験法の開発に対する有用性を検討する予定である(鰐淵)。
- ④ ダンマル樹脂による発がん機構を遺伝子レベルで明らかにするために、ダンマル樹脂誘発ラット肝細胞がんにおける p16 遺伝子 DNA メチル化状態を検討した結果、低メチル化状態であった。また、p53 および β -catenin 遺伝子点突然変異が低頻度ながら検出された(辻内)。

2. 新規マウス発がんリスク評価試験法の開発

- ① ダンマル樹脂および IQ の C57BL/6J マウス肝二段階発がん試験では、22 週において、ダンマル樹脂および IQ の肝発がん促進作用は認められなかった。40 週における肝臓の病理組織学的検討は現在進行中である。本試験法の有用性について、22 週および 40 週の解析結果を総合して最終的な評価を行う予定である(鰐淵)。C57BL/6J 系 *gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂および IQ の変異原性の解析は現在進行中である(魏)。

- ② B6C3F1 マウスを用いた肝二段階発がん性試験では、肝部分切除→DEN→IQ の投与順で IQ の肝発がん促進作用が認められ、新規マウス発がんリスク評価試験法の開発に成功した。
- ③ マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、扁平上皮化生が生じるより以前に、気管支肺胞幹細胞が増加することが明らかとなった。肺扁平上皮がんの発生に関与する幹細胞 (BASC) が存在することが考えられた。この結果、がん幹細胞説の観点からの前がん病変マーカーの同定につながりうると期待される。

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、前年度に引き続き既知ラット肝発がん物質であるダンマル樹脂、2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline

(IQ) およびコウジ酸を用いて、*in vivo* 変異原性の検索可能な *gpt delta* ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験法の開発を行った。さらに、C57BL/6J系 *gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂およびIQの変異原性を検討すると同時に、C57BL/6JまたはB6C3F1マウスを用いた肝二段階発がん性試験で被検物質の発がん性を検討し、新規マウス発がんリスク評価試験法を開発した。加えて、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、ラット腎発がんおよびマウス肺発がんの新規前がん病変マーカーの同定を行った。なお、ダンマル樹脂の2年間投与で誘発したラット肝細胞がんにおけるがん関連遺伝子のDNAメチル化異常および突然変異の有無も検討した。

B. 研究方法

1. 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、固形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。

コウジ酸は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)、IQ は株式会社ナード研究所 (Osaka, Japan) よりそれぞれ入手した。コウジ酸およびIQ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。

2. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法の開発

2.1 ダンマル樹脂の *gpt delta* ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験

[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。

[試験プロトコール]

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、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 ± 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 100mg/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 20mg/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 40mg/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 (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。

[*in vivo* 変異原性の検討]

DMBDD 単独投与群、DMBDD→2%ダンマル樹脂群、2%ダンマル樹脂単独投与群および無処置群について、肝における変異頻度を *gpt* および Spi-アッセイ法を用いて検討した。なお、*gpt* アッセイでは点突然変異を、Spi-アッセイでは欠失変異を明らかにできる試験法である。

[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 1cm² 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。

2.2 *gpt* delta ラットを 32 週間多臓器短期発がん性試験

分担報告書参照 (今井田)

2.3 コウジ酸および IQ の F344 ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験

[投与量の設定]

コウジ酸の投与用量は、F344 ラット 55 週間慢性毒性試験の結果より、前がん病変の増加が認められた用量である 2% 設定した。

IQ の投与用量は、本研究では発がん用量である 0.01% を設定した。

[試験プロトコル]

5 週齢の雄性 F344 ラット 45 匹 (日本エスエルシ

一株株式会社) および5週齢の雄性 *gpt delta* ラット 18 匹(日本エスエルシー株式会社)を用いた。実験動物納入より7日間は、環境に適応させる期間とし、8日目より実験を開始した。その間の飲料水は水道水とし、基礎飼料として MF 粉末(オリエンタル酵母)を使用した。動物を、第1群から第3群は F344 ラット 15 匹ずつ、第3群から第6群は *gpt delta* ラット 6 匹ずつ無作為に6群に分けて実験を行った。

DMBDD 処置および病理組織学的検査は、上述したダンマル樹脂の18週間多臓器発がん性試験と同様に行った。すなわち、実験開始後4週間は基礎飼料を与えた上で DMBDD 処置群である第1群から第3群に実験開始日に DEN を 100mg/kg の用量にて腹腔内投与、実験開始後3、6、9、13日に MNU を 20mg/kg b.w. の用量で腹腔内投与、実験開始後16、20、23、27日に DMH を 40mg/kg の用量で皮下投与を行った。投与物質の調整には大塚生食注(株式会社大塚製薬工場, Tokushima, Japan)を用いた。さらに、それらと並行して実験開始後1から2週に0.05%BBNを、第3~4週に0.1%DHPNをそれぞれ飲水投与し、イニシエーション処置とした。一週間の休薬期間を置き、実験開始後5週目から第3、6群には2%コウジ酸を、2、5群には0.01%IQを、それぞれ13週間、オリエンタル MF 粉末飼料中に混ぜ自由に摂取させた。また、第1、4群には通常の MF 粉末飼料を自由に摂取させた。さらに、発がん物質投与以外の飲料水として、水道水を自由に摂取させた。実験期間終了後、第1群から第6群のすべての動物においてジエチルエーテルで麻酔後屠殺した。第1から3群においては DMBDD 標的臓器の病理組織学的検索を行い、第4から6群においては、変異原性試験を行った(魏分担報告書参照)。

[IQ およびコウジ酸の変異原性の検討]

ダンマル樹脂の *gpt delta* ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験の0.01%ダンマル樹脂単独投与群、2%コウジ酸単独投与群および無処置群について、肝における変異頻度を *gpt* および Spi-アッセイ法を用いて検討した。

[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。

2.4 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)

2.5 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発

[検体]

雄性 Wistar ラット、6週齢、240匹を30匹ずつ8群に別け、全動物に EHEN を 500 ppm の濃度で2週間飲水投与した。投与終了後、KBrO₃ を 0, 0.02, 2, 8, 30, 125 及び 500 ppm の濃度で24週間飲水投与し、実験終了後、腎のホルマリン固定パラフィン標本を作製し、病理組織学的解析に興じた。

[プロテオーム解析]

Liquid Tissue MS Protein Prep kit で処理したホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)標本を用いて蛋白の抽出を行った。KBrO₃ が 0 及び 500 ppm 群の各群5個体から10µmの厚みで10枚の連続切片を作成し、顕微鏡下で確認しながらニードルダイセクション法を用いて腫瘍部及び周囲正常組織をそれぞれサンプリングした。各腎腫瘍においては、直径1mm以上の大きさを有する腫瘍を、周囲正常組織においては、尿細管が豊富に存在する腎皮質部を肉眼的に確認しながらサンプリングした。これより得られたサンプルから、合計20µgの蛋白をバッチし、iTRAQ 試薬でラベリングを行い、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 を用いて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)を用いて腎腫瘍に特異的に発現する候補蛋白の選別を行った。

[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、その局在を確認した。

3. マウス発がんリスク評価試験法の開発

3.1 ダンマル樹脂およびIQのC57BL/6Jマウス肝二段階発がん試験

2週齢の雄性 C57BL/6J マウスに DEN を単回腹腔内投与し、実験開始2週より基礎飼料、

2%ダンマル樹脂および300 ppm IQを混餌投与した。実験開始後22週および40週で肝臓における前がん病変および腫瘍の発生を検討した。

3.2 C57BL/6J系 *gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂およびIQの変異原性の検討

6週齢の雄性C57BL/6J系 *gpt delta* マウスに基礎飼料、2%ダンマル樹脂および0.03% IQをそれぞれ12週間投与し、実験開始後14週で肝臓における *gpt* および Spi⁻アッセイを行った。

3.3 IQのB6C3F1マウス肝二段階発がん性試験

6週齢の雄性B6C3F1マウスを10群に分けた。1-4群に2/3肝部分切除術(HP)を行い、1日後にDENを単回腹腔内投与し、1週間後からIQを0、30、100および300ppmの用量で混餌投与した。5-6群はHP後、DENを投与せずにIQを0、および300ppmの用量で混餌投与した。7-8群はHPをせずに、DEN投与後IQを0および300ppmの用量で混餌投与した。9-10群300 ppm IQのみおよび無処置群であった。実験開始後8週および40週で肝臓における前がん病変および腫瘍の発生を検討した。

3.4 マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

[検体]

6週齢A/J雌マウス30匹を用いて、NTCU 0.01 M/75 μ l acetone/mouseの用量で、週2回、合計4週間マウスの背中に滴下し、実験開始8週後に動物を屠殺した。そのうち、20匹は、フローサイトメトリー興じた。また、10匹は、肺を摘出し、各動物からホルマリン固定パラフィンブロックを作製した。

[病理組織学的解析]

肺におけるホルマリン固定パラフィン包埋標本から連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色により形態学的解析、CC10及びSPC抗体を用いた気管支肺胞幹細胞(BASC)の形態計測及び、Ki67およびTUNEL染色による細胞増殖能及びアポトーシス能の検討を行った。

[フローサイトメトリー]

1 サンプル調整

まずマウスに対し0.1 mlヘパリンを投与し、血液凝固を抑制する前処置を行った。ジエチルエー

テル麻酔下で、放血致死させた後、胸腔を開いた後に冷PBS 10 mlを用いて右心室から灌流を行い、肺から血漿及び血球成分を可能な限り取り除いた。灌流後、すぐにdispase (50 IU/1 ml)と1% LMP agaroseを各1 mlずつ気管から注入し、on iceにて肺を固まらせた。その後、各肺葉を分離し、1 mm³以下になるように細切を行った後、collagenase/dispase (最終濃度: 2 mg/ml) 6 mlの中に入れて37°Cで45分インキュベーションを行った。その後、100及び40 μ mのセルストレーナーを用いて凝集物を除去し、残存する赤血球を溶解した後、細胞数を測定した。

2 細胞染色

1x10⁶個/100 μ lに細胞濃度を調整し、Sca-1-FITC、CD45-PE及びPecam-PEの3種類の抗体を用いてそれぞれ1:100の希釈濃度でon iceで30分インキュベーション後、洗浄を行ってからフローサイトメトリーに興じた。また、フローサイトメトリーにかける10分前に7AADの染色を行い、死細胞の除去を行った。

3 細胞分取

フローサイトメトリー(Aria II:BD)を用いてダブリングした細胞及び死細胞を除いた後、Pecam及びCD45が陰性の領域で、さらにSca-1陰性(neg)、Sca-1弱陽性(dim)及びSca-1陽性(pos)の3つの分画から細胞を分取した。各分画からは、20万細胞以上を分取し、プロテオーム解析に興じた。

[プロテオーム解析]

フローサイトメトリーで分取した細胞をlysis bufferであるT-PERを用いて蛋白を抽出し、以下の工程に興じた。これより得られたサンプルから各4 μ gの蛋白質をバッチし、iTRAQ試薬でラベリング、もしくはラベリングなしで、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。

[発現蛋白の検討]

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sca-1 posの分画に特異的に発現する蛋白を選出した。

4. 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。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 陽性細胞巢]

GST-P 陽性細胞巢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。

甲状腺、肺、腎臓など他の臓器に対する発がん促進作用は認められなかった。

2. *gpt delta* ラットを 32 週間多臓器短期発がん性試験

[一般状態および死亡動物]

DMBDD 処置中に 1 匹麻酔処置により死亡した。その他、ダンマル樹脂によると思われる一般状態への影響は観察されず、また、前記以外の死亡動物もなかった。

[体重]

第 1、17-22 週目、第 24 週目から屠殺時まで

において、被験物質投与群の 0.03% 投与群において 0%(対照)群と比較して有意に高値を示した。また、第 1 週目において 2% 投与群において 0%群と比較して有意な高値を、第 12 週目から屠殺時までには有意な低値を示した。

[摂餌・飲水量]

摂餌量では、第 5, 6, 9, 11, 12, 16~23, 29 週目に 2%投与群において 0%投与群と比較して有意に低値を示した。さらに飲水量では、第 7, 13~17, 19, 21 週目に 0.03%投与群において、第 7 週目に 2% 投与群において 0%投与群と比較して高値を示した。また、ダンマル樹脂の実験期間での総摂取量は投与用量にほぼ依存していた。

[血液学的検査および生化学的検査]

血液学的検査において、軽微な減少は認められたが、毒性学的変化は認められなかった。

2%投与群では、TP、Alb、T-Cho、BUN、K が 0% 投与群と比較して有意な高値を示した。

[臓器重量]

2%投与群において、肝臓および脾臓の絶対重量の有意な高値が観察され、肝臓では相対重量でも有意な高値が認められた。また、脳、副腎、精巣の相対重量も有意な高値を認めた。その他の臓器では有意な差異は認められなかった。

[肝の GST-P 陽性細胞巢]

被験物質 2%投与群において、GST-P 陽性細胞巢の発生個数ならびに面積の有意な増加を認めた。

[病理学的検査]

現在、病理学的検査が終了している肝臓と甲状腺の結果を示した。

肝臓の非腫瘍性、ならびに腫瘍性変化の発生頻度は、2%投与群において肝細胞がんが観察されたが、0%投与群と比較して有意差は認められなかった。

甲状腺の過形成ならびに腫瘍性病変の発生頻度および平均発生個数は、被験物質投与群は 0% 投与群と比較して、有意な差は見られなかったが、甲状腺の濾胞細胞過形成の発生個数においては、要量依存性の増加傾向が見られた。

また、その他の臓器の病理組織学的変化については現在検討中である。

3. コウジ酸および IQ の F344 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、第 1 群で 1 匹、第 2 群、第 3 群で各群 2 匹、DMBDD 処理の影響により死亡した。Kojic acid、IQ 投与に関連した一般状態への影響は認められなかった。

DMBDD 処置群 (第 1~3 群) において、被験物質投与群の DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群では、DMBDD 単独処置群と比べて有意な体重の増加抑制が認められた。DMBDD→0.01%IQ 投与群では、DMBDD 単独処置群と比べて有意な差は認められなかった。非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) において、被験物質投与群の 2.0%Kojic acid 投与群では、無処置群と比べて有意な体重の増加抑制が認められた。0.01%IQ 単独投与群では、無処置群と比べて有意な差は認められなかった。

DMBDD 処置群 (第 1~3 群) において、被験物質投与群の DMBDD→0.01%IQ 投与群で、実験開始 3 週目に DMBDD 単独処置群と比べて、有意な減少が認められた。また、DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で、実験開始 7, 9, 11, 12 週目に DMBDD 単独処置群と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) において、被験物質投与群の 0.01%IQ 単独投与群で、実験開始 14, 15, 17, 18 週目に無処置群と比べて、有意な減少が認められた。また、被験物質投与群の 2.0%Kojic acid 単独投与群で、実験開始 3, 4, 15, 18 週目に無処置群と比べて、有意な減少が認められた。

DMBDD 処置群 (第 1~3 群) において、被験物質投与群の DMBDD→0.01%IQ 投与群で、実験開始 6 週目に DMBDD 単独処置群と比べて、有意な減少が認められた。非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) において、無処置群と比べて、有意な差は認められなかった。

ラットにおける体重当たりの 1 日平均摂取量 (g/kg b. w. /day) は、DMBDD→0.01%IQ 投与群では 0.049 g、0.01%IQ 単独投与群では 0.055g であった。DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群では 1.109 g、2.0%Kojic acid 単独投与群では 1.140g であった。これを体重 60kg のヒトにおいて換算して計算すると、1 日当たりに DMBDD→0.01%IQ 投与群では 2.94 g、0.01%IQ 単独投与群では 3.30g、DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群では 66.54 g、2.0%Kojic acid 単独投与群では 68.40g 摂取していることになった。

[最終体重と臓器重量]

DMBDD 処置群 (第 1~3 群) において、被験物質投与群の DMBDD→0.01%IQ 投与群で DMBDD 単独処置群と比べて、有意な差は認められなかった。DMBDD→2.0%Kojic acid 投与群で DMBDD 単独処置群と比べて、有意な減少が認められた ($p < 0.05$)。非 DMBDD 処置群 (第 4~6 群) において、被験物質

投与群の0.01%IQ単独投与群で、無処置群と比べて、有意な差は認められなかった。2.0%Kojic acid投与群で無処置群と比べて、有意な減少が認められた ($p < 0.05$)。

肝臓においては、DMBDD処置群(第1~3群)で、被験物質投与群のDMBDD→0.01%IQおよび2.0%Kojic acid投与群で、DMBDD単独処置群と比べて、肝臓の絶対重量、相対重量にて有意な増加が認められた。また、非DMBDD処置群(第4~6群)では、被験物質投与群の0.01%IQおよび2.0%Kojic acid単独投与群で、無処置群と比べて、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(第1~3群)で、被験物質投与群のDMBDD→2.0%Kojic acid投与群で、DMBDD単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な減少が認められた。また、非DMBDD処置群(第4~6群)では、被験物質投与群の2.0%Kojic acid単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量、相対重量ともに有意な減少が認められた。

脾臓においては、DMBDD処置群(第1~3群)で、被験物質投与群のDMBDD→2.0%Kojic acid投与群で、DMBDD単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な減少が認められた。また、非DMBDD処置群(第4~6群)では、被験物質投与群の2.0%Kojic acid単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

心臓においては、DMBDD処置群(第1~3群)で、被験物質投与群のDMBDD→2.0%Kojic acid投与群で、DMBDD単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な減少が認められた。また、非DMBDD処置群(第4~6群)では、被験物質投与群の2.0%Kojic acid単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量にて有意な減少が認められた。

甲状腺においては、DMBDD処置群(第1~3群)で、被験物質投与群のDMBDD→2.0%Kojic acid投与群で、DMBDD単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な増加が認められた。また、非DMBDD処置群では、被験物質投与群の2.0%Kojic acid単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

副腎においては、DMBDD処置群(第1~3群)で、被験物質投与群のDMBDD→2.0%Kojic acid投与群で、DMBDD単独処置群と比べて、絶対重量、相対重量にて有意な増加が認められた。また、非DMBDD処置群(第4~6群)では、被験物質投与群の2.0%Kojic acid単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められた。

精巣においては、非DMBDD処置群(第4~6群)で、被験物質投与群の2.0%Kojic acid単独投与群で、無処置群と比べて、絶対重量にて有意な減少、相対重量に有意な増加が認められた。

[GST-P陽性細胞巢の定量解析]

DMBDD処置群(第1~3群)において、被験物質投与群のDMBDD→0.01%IQおよび2.0%Kojic acid投与群でDMBDD処置単独と比べて、肝臓のGST-P陽性細胞巢の発生個数、面積ともに有意な増加を認めた。非DMBDD処置群(第4~6群)において、直径20 μ m以上のGST-P陽性細胞巢は認められなかった。

[病理学的検査]

肝臓には腫瘍は認められなかった。他の臓器の病理組織学的検査は現在進行中である。

4. *gpt delta* ラットにおけるIQおよびコウジ酸の変異原性

gpt 遺伝子の突然変異頻度が無処置群では $3.6 \pm 1.0 (\times 10^{-6})$ 、0.01%IQ単独投与群では $27.9 \pm 8.3 (\times 10^{-6})$ 、2.0%コウジ酸単独投与群では $5.8 \pm 2.4 (\times 10^{-6})$ であった。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度は、無処置群と比較して、0.01%IQ投与群で有意に増加したが、2.0%コウジ酸単独投与群では有意な差は認められなかった。*gpt* 遺伝子の変異スペクトラの解析は現在進行中である。

red/gam 遺伝子のMFが無処置群では $1.8 \pm 0.5 (\times 10^{-6})$ 、0.01%IQ単独投与群では $7.4 \pm 2.6 (\times 10^{-6})$ 、2.0%コウジ酸単独投与群では $2.9 \pm 1.1 (\times 10^{-6})$ であった。0.01%IQ投与群で有意に増加したが、2.0%コウジ酸単独投与群では有意な差は認められなかった。

5. 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

p16遺伝子5'上流領域におけるDNAメチル化状態は5例の肝細胞がんいずれにおいても、正常肝組織と同様に低メチル化状態であった。p53遺伝子点突然変異は、5例中1例の肝細胞がんにおいて検出されcodon 285のGAA→AAA(Glu→Lys)へのアミノ酸置換を伴う変異であることがわかった。また、b-catenin遺伝子も5例中1例の肝細胞がんにおいてcodon 14のATG→ATA(Met→Ile)への変異が検出された。一方、Ki-ras遺伝子はいずれの肝細胞がんにおいても点突然変異は検出されなかった。

6. 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発

腎腫瘍と周囲正常組織から蛋白の網羅的発現解析を行った結果、66%の信頼性で 600 種類の蛋白が同定された。そのうち、EHEN 単独投与群から採取した腎腫瘍と対応する周囲正常組織を比較した結果、319 種類の蛋白が有意に発現変動しており、発現上昇した蛋白が 135 種類、発現減少した蛋白が 184 種類であった。この中で、発現が 2.0 倍以上増加した蛋白は全部で 11 種類あり keratin 1 (3.5 倍)、carbonic anhydrase 3 (3.0 倍) 及び vimentin (2.4 倍) 等細胞質に局在する蛋白が多く検出されていた。

また、EHEN→KBrO₃ 投与群における腎腫瘍と周囲正常組織を比較した結果、322 種類の蛋白が有意に発現変動しており、発現上昇した蛋白が 150 種類、発現減少した蛋白が 172 種類であった。この中で、発現が 2.0 倍以上増加した蛋白は全部で 16 種類あり GSTM5 (3.2 倍)、crystallin alpha B (3.0 倍)、COX7A2 (2.8 倍) 等細胞質に局在する蛋白が多く検出されていた。

そこで、EHEN 単独投与及び EHEN→KBrO₃ 複合投与の両方の腫瘍で発現増加した蛋白を選別するために、両方の腫瘍で共通して 2.0 倍以上発現上昇した蛋白に注目した結果、8 種類の蛋白が選別された。今回は、その中で良好な染色結果を得られた S100A11 に注目した。

S100A11 の免疫組織化学的解析の結果、正常の腎皮質における遠位尿細管で、弱陽性ながら陽性所見を認めたが、腎腫瘍の腫瘍細胞細胞質にて強陽性を示した。またラット腎発がんでは主なフェノタイプである好塩基性腎腫瘍のみならずヒトで最も多い明細胞性腎腫瘍においても陽性所見を認め、今回プロテオーム解析に興じた腎腫瘍サンプルでは、全例にて強陽性を示した。さらに同標本を検討した結果、腎発がんにおける前がん病変との報告がなされている異型尿細管や微小な腺腫においてもその強い発現が認められ、周囲尿細管に比較して高い染色強度を示した。

7. ダンマル樹脂および IQ の C57BL/6J マウス肝二段階発がん性試験

22 週において、肝臓における変異細胞巢の総数は DEN 単独投与群に比較してダンマル樹脂および IQ 投与群で有意な差は認められなかった。なお、いずれの群においても肝腫瘍はみられなかった。40 週における肝臓の病理組織学的検討は現在進行中である。

8. C57BL/6J 系 *gpt delta* マウスにおけるダンマル樹脂および IQ の変異原性

ダンマル樹脂および IQ の単独投与した *gpt delta* マウス肝における変異頻度を *gpt* assay お

よび Spi-アッセイ法を用いて現在検索中である。

9. IQ の B6C3F1 マウス肝二段階発がん性試験

8 週ではいずれの群の肝臓においても変異細胞巢は認められなかった。40 週では、HP→DEN 群に比較して HP→DEN→300 ppm IQ 群で肝がんの発生頻度および数が有意に増加した。一方、DEN→300 ppm IQ 群および 300 ppm IQ 単独群では腫瘍はみられなかった。以上より、B6C3F1 マウスを用いて肝発がん物質を検出するには HP→DEN→被検物質の投与が有用であることが考えられた。

10. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

NTCU 処置したマウスの肺について病理組織学的解析を行った結果、全例の呼吸細気管支において上皮の腫大、細胞質の腔胞化、核内の好酸性封入体様小体及び上皮の脱落等を主な所見とする異型細気管支を認めた。一方で扁平上皮化生を始めとする扁平上皮系の病変を全例に認めなかった。次にこれら肺に対して細胞増殖能及びアポトーシス能を検討するため、Ki-67 及び TUNEL 染色を行った結果、溶媒対照群と比較し、有意な差を認めなかった。次にこの変化に対する BASC の関与を検討するため、肺胞 II 型上皮細胞のマーカーである SPC 及びクララ細胞のマーカーである CC10 を用いて 2 重染色を行った。その結果、溶媒対照群で気管支と肺胞の接合部にてわずかに認められた CC10^{pos}SPC^{pos} 細胞 (BASC) が、NTCU 投与群にて増加していることが明らかとなった。そこで BASC に対して形態計測を行った所、単位気管支当たりの BASC の個数が溶媒対照群 0.3 個に対して NTCU 投与群で 1.1 個と有意に増加しており、気管支に存在する BASC 個数の割合も増加していた。そこで、フローサイトメトリーを用いて BASC を分取し、プロテオーム解析と組み合わせることで、BASC で特異的に発現、もしくは発現量が増加しており、なおかつがん部においても発現が認められる蛋白の同定を試みた。フローサイトメトリーを行った結果、BASC が豊富に存在することが知られている Sca-1^{pos}CD31^{neg}Pecam^{neg} (pos) の分画において溶媒対照群で 0.7% のところ、NTCU 投与群で 2.5% と増加していることが明らかとなった。そこで NTCU 投与群より Sca-1^{neg}CD31^{neg}Pecam^{neg} (neg)、Sca-1^{dim}CD31^{neg}Pecam^{neg} (dim)、Sca-1^{pos}CD31^{neg}Pecam^{neg} (pos) の 3 分画からそれぞれ細胞を分取し、プロテオーム解析を行った。その結果、iTRAQ-labeling を行ったサンプルでは neg 分画と pos 分画を相対比較した結果、28 種類の蛋白が同

定された。一方、iTRAQ-labeling を行わなかったサンプルでは neg 分画:118 種類、dim 分画:194 種類、pos 分画:22 種類の蛋白が同定された。これらの中から pos 分画で発現上昇が認められた蛋白または、pos 分画のみで発現が認められた蛋白に注目した。現在同定された蛋白の免疫染色を行い、発現の強度及び局在を検討中である。

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 16 週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、肝臓における 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促進作用を有することが明らかとなった。DMBDD 処置群における ACF の定量解析および大腸、肺、腎臓、膀胱、甲状腺の腫瘍性病変において DMBDD 処置単独群と比較し、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群および DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群に有意な変化は認められず、他の臓器において修飾作用を有しないことが明らかになった。ダンマル樹脂は 2%の用量において、F344 ラットを用いた 2 年間発がん性試験で肝発がん性が認められている。本研究は F344 ラットを用いた 2 年間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発がん物質の検出にも有用であることが示唆された。

gpt delta 雄ラットを用いた 32 週多臓器発がん性試験法では肝臓の GST-P 陽性細胞巢の肝臓切片全体の面積に対する発生個数ならびに面積の結果において、2%投与群において、発生個数、面積ともに有意な増加が見られ、ダンマル樹脂の高用量群では肝発がんの促進作用を示唆するものと考えられる。病理組織学的検討で、F344 ラットと同様、2%投与群において、1 例に肝細胞がんが観察されたが、0%投与群と比較して有意差は認めなかった。また、甲状腺においては濾胞細胞過形成の平均発生個数において有意差はないものの、増加傾向が認められたが、その他の腫瘍性病変の促進作用は観察されなかった。以上の肝臓の GST-P 陽性細胞巢の肝臓切片全体の面積に対する発生個数ならびに面積の結果および病理組織学的検討を併せて考察すると、*gpt delta* ラットでは、F344 ラットと同様、ダンマル樹脂の高用量群における肝臓に対する発がん促進作用を有する可能性が示唆されたが、甲状腺に対しては明らかではないと考えられる。

雄性 F344 ラットを用いたコウジ酸および IQ の 18 週間多臓器発がん性試験では、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用が確認された。このことより、18 週間という試験期間が肝発がんを検出するのに適切であることが明らかとなった。よって、中期多臓器発がん性試験の期間を 36 週間から 18 週間に短縮できることが考えられた。

ダンマル樹脂における *gpt* アッセイおよび Spi- アッセイの結果、いずれのアッセイも陰性であった。これらのことより、ダンマル樹脂は *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなった。また、ダンマル樹脂は Ames 試験、染色体試験およびマウス小核試験の各変異原性試験でも陰性であり、変異原性は認められなかった。本研究は既知の変異原性試験と一致した結果を得た。遺伝毒性発がん物質である IQ に関して、*gpt* アッセイにおける点突然変異の指標である *gpt* 遺伝子の突然変異体頻度は、無処置群と比較して、IQ 投与群において有意な増加が認められた。また、Spi- アッセイにおける欠失変異の指標である *red/gam* 遺伝子の変異体頻度も無処置群と比較して、IQ 投与群において有意な増加が認められた。これらのことより、IQ は点突然変異および欠失変異の両方の変異を誘発することが明らかとなり、変異原性を有することが確認された。一方、コウジ酸投与群では、*gpt* および Spi-アッセイの両方とも、変異頻度が対照群と比較して有意な差は認められず、変異原性を有しない可能性が強く示唆された。現在、*gpt* 遺伝子の変異スペクトラの解析中であり、遺伝子レベルでのコウジ酸の変異原性の有無を確認し、今後報告する予定である。

腎発がんの前がん病変マーカーの開発試験で着目した S100A11 は、カルシウムバインディングプロテインの 1 種であり、細胞周期の調節や分化等細胞の発達に関与することが報告されている。さらに、前立腺を始め、種々のがんにおいてその異常発現が報告されており、細胞増殖の亢進に関与するとの報告がある。本実験では、S100A11 は腎腫瘍のみならず、前がん病変との報告がなされている異型尿細管や微小な腺腫においてもその強い発現が認められ、周囲尿細管に比較して高い染色強度を示した。このことから、通常のヘマトキシリン・エオジンで診断・発見が困難な微細な前がん病変においても明瞭に識別することが可能であることが明らかとなった。

前年度の研究では、ダンマル樹脂によって誘発されたラット肝細胞がんにおいて E-cadherin 遺伝子 DNA メチル化異常は見られないことを明らかにした。今回、同モデルで誘発したラット肝細胞がんにおいて p16 遺伝子 5' 上流領域の DNA メチル化異常は検出されなかった。一方、p53、

β -catenin 遺伝子に点突然変異が見られることより、ダンマル樹脂によるラット肝細胞がん発生に点突然変異が関与する可能性が示唆された。

2週齢の雄性 C57BL/6J マウスに DEN を単回腹腔内投与した 2 段階肝発がん性試験では、22 週においては、IQ およびダンマルの肝発がん促進作用が認められなかったため、本試験法の有用性については、22 週および 40 週の解析結果を総合して最終的な評価を行う必要があると考えられた。

IQ については、これまでにマウスを用いた発がん性試験において、その肝発がん性がすでに明らかにされていたが、マウスを用いた 2 段階発がん性試験において、肝発がん促進作用は、いまだ明らかにされていない。今回、我々は B6C3F1 マウスを用いて 40 週という 2 年間より短い短期で、肝部分切除及び DEN を組み合わせたモデルを開発することにより、その肝発がん促進作用を明らかにすることに成功した。

マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、扁平上皮系の病変が生じるより以前に、気管支肺胞幹細胞が増加することが明らかとなった。また、これらの細胞を分離・回収するために FACS が有用であることが示唆された。これら分収した微量サンプルからプロテオーム解析を行うことが可能であることが明らかとなった。この方法論は、今後肺の微小な増殖性病変を扱う際に有用な方法となる可能性が示唆された。

E. 結論

gpt delta ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験法で、ダンマル樹脂の肝発がん促進作用が認められ、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。また、同試験法を使用し、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用をも確認することに成功した。さらに、*gpt delta* ラットを用いてダンマル樹脂および IQ の変異原性を検討した結果、ダンマル樹脂は変異原性を示さないことが明らかとなったと同時に、遺伝毒性発がん物質である IQ は変異原性が確認された。これまでのこの 2 物質の変異原性に関する長期試験報告と一致した結果を得ることができた。以上の結果より、本試験法では、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同時に、化学食品添加物質の発がん性に対する遺伝毒性の寄与についても、より短期的に検討することができると考えられる。

異型尿細管から腎腫瘍にかけて高発現が認められた S100A11 については、新規腎発がん前がん病変マーカーになり得る可能性が示唆された。今

後 *gpt delta* ラットを用いた多臓器発がん性試験における腎標本を用いて検討を行い、発がん性の短期包括的試験法の開発に対する有用性を検討する。

B6C3F1 マウスを用いて新規マウス発がんリスク評価試験法の開発に成功した。さらに投与方法として、HP→DEN→被検物質の順で行うことが最も有効であることが明らかとなった。マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、扁平上皮系の病変が生じるより以前に、気管支肺胞幹細胞が増加することが明らかとなった。肺扁平上皮がんの発生に関与する幹細胞が存在することが考えられた。本試験法は、かん幹細胞の同定に有用である可能性が示唆された

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., Sakai, K., Tanaka, R., Toma, K., Yamaguchi, T., Wei, M., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Chemopreventive effects of 13alpha, 14alpha-epoxy-3beta-methoxyserratane-21beta-ol (PJJ-34), a serratane-type triterpenoid, in a rat multi-organ carcinogenesis bioassay. *Cancer Lett*, 289: 161-169(2010).

Suzuki, S., Arnold, L. L., Pennington, K. L., Kakiuchi-Kiyota, S., Wei, M., Wanibuchi, H. and Cohen, S. M.: Effects of pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, on the urine and urothelium of the rat. *Toxicol Sci*, 113:349-357(2010).

Takahashi, Y., Hara, Y., Imanaka, M., Wanibuchi, H., Tanaka, K., Ishikawa, T., Mori, S. and Fukusato, T.: No inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate and lycopene on spontaneous hepatotumorigenesis in C3H/HeN mice. *Fukushima J. Med. Sci.*, 56:17-27(2010).

Fukushima, S., Wei, M., Kakehashi, A. and Wanibuchi, H.: Thresholds for genotoxic carcinogens: Evidence from mechanism-based carcinogenicity studies. *Cancer Risk Assessment*, 8:207-221(2010).

- Tago, Y., Wei, M., Ishii, N., Kakehashi, A. and Wanibuchi, H.: Evaluation of the subchronic toxicity of dietary administered *Equisetum arvense* in F344 rats. *J Toxicol. Pathol.*, 23:245-251(2010).
- Wei, M., Wanibuchi H., Nakae D, Tsuda H, Takahashi H, Hirose M, Totsuka M, Tatematsu M, Fukushima S. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21Cip/WAF1. *Cancer Sci.*, 102:88-94(2011).
- Kakehashi, A., Ishii, N., Shibata, T., Wei, M., Okazaki, E., Tachibana, T., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Mitochondrial prohibitins and septin 9 are implicated in the onset of rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Sci.*, 119:61-72(2011).
- Chusiri, Y., Wongpoomchai, R., Kakehashi, A., Wei, M., Wanibuchi, H., Vinitketkumnuan, U. and Fukushima, S.: Non-genotoxic mode of action and possible threshold for hepatocarcinogenicity of Kojic acid in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 49(2):471-6(2011).
- Hoshi, H., Sawada, T., Uchida, M., Saito, H., Iijima, H., Toda-Agetsuma, M., Wada, T., Yamazoe, S., Tanaka, H., Kimura, K., Kakehashi, A., Wei, M., Hirakawa, K. and Wanibuchi, H.: Tumor-associated MUC5AC stimulates in vivo tumorigenicity of human pancreatic cancer. *International journal of oncology* 38(3):619-627(2011).
- Ishii, N., Wei, M., Kakehashi, A., Doi, K., Yamano, S., Inaba, M. and Wanibuchi, H.: Enhanced urinary bladder, liver and colon carcinogenesis in Zucker diabetic fatty rats in a multi-organ carcinogenesis: Evidence for mechanisms involving activation of PI3K signaling and impairment of p53 on urinary bladder carcinogenesis. *J Toxicol Pathol.* 24: 1-12(2011).
- Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Sao 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-butanol (NNK) in female A/J mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 22: 179-185, 2009.
- 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 V, Maeba V, Suzuki Y. Immunohisto-chemically detected expression of p27kip1 and skp2 predicts survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinomas. *Ann. Surg. Oncol.*, 16: 395-403, 2009.
- Matsuda Y, Takeuchi H, Yokohira M, Sao 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. *Molecular Medicine Reports*, 2: 701-706, 2009.
- Takeuchi H, Sao K, Matsuda Y, Yokohira M, Yamakawa K, Zeng Y, Kuno T, Kamataki T, Imaida K. 8-Methoxy-psoralen, a potent human CYP2A6 inhibitor, inhibits lung adenocarcinoma development induced by 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNK) in female A/J mice. *Molecular Medicine Reports*, 2: 585-588, 2009.
- Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Sao 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.
- Yokohira M, Mastuda Y, Suzuki S, Hosokawa K, Yamakawa K, Hashimoto N, Sao 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 2-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.
- Yachida S, Imaida K, Yokohira M, Hashimoto N, Suzuki S, Okano K, Wakabayashi H, Maeta H, Suzuki Y. Jun activation domain binding protein 1 is overexpressed from the very early stages of hepatocarcinogenesis. *Surgical Oncol.* 17: 3386-3393, 2010.
- Kohno M, Haramoto M, Nakajima O, Yang L, Hinotsu S, Yokohira M, Imaida K, Kawakami K. Antedrug budesonide by intrapulmonary treatment attenuates bleomycin-induced lung injury in rats with minimal systemic adverse effects. *Biol. Pharm. Bull.*, 33:1206-1211, 2010.
- Imaida K, Yokohira M, Hashimoto N, Kuno T. Risk analysis of environmental chemicals on lung carcinogenesis. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 11: 9-12, 2010.
- Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. Potassium octatitanate fibers (TISMO) induce pleural mesothelial cell reactions with iron accumulation in female A/J mice. *Oncol. Lett.*, 1: 273-278, 2010.
- 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-dimethyl-hydrazine-induced colonic preneoplastic lesions in Fischer rats by 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate, a wasabi derivative. *Oncology Letters*, 1: 273-278, 2010.
- 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.
- 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-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) with remarkable mesothelial cell reactions in the thoracic cavity by the polymer. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 63: 181-185, 2011
- 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, 2010.
- 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*, 77, 225-229, 2010.

Honoki K, Fujii H, Kubo A, Kido A, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol Rep*, 24, 501-505, 2010.

Tsujino M, Fujii M, Okabe K, Mori T, Tsujiuchi T. Differential expressions and DNA methylation patterns of lysophosphatidic acid receptor genes in human colon cancer cells. *Virchows Arch*, 457, 669-676, 2010.

Okabe K, Hayashi M, Fujii M, Honoki K, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Mutations of lysophosphatidic acid receptor genes in human osteosarcoma cells. *Pathobiology*, 77, 278-282, 2010.

Okabe K, Hayashi M, Wakabayashi N, Yamawaki Y, Teranishi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Differential expressions and DNA methylation patterns of lysophosphatidic acid receptor genes in mouse tumor cells. *Pathobiology*, 77, 278-282, 2010.

Wakabayashi N, Okabe K, Hayashi M, Honoki K, Tsujiuchi T. Mutations and aberrant transcriptions of *Stk11* (*Lkb1*) gene in rat liver tumors. *Anticancer Res*, 31, 543-547, 2011.

Hayashi M, Okabe K, Yamawaki Y, Teranishi M, Honoki K, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Loss of lysophosphatidic acid receptor-3 enhances cell migration in rat lung tumor cells. *Bioch Bioph Res Com*, 405, 450-454, 2011.

Okabe K, Hayashi M, Yoshida I, Nishimura K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Distinct DNA methylation patterns of lysophosphatidic acid receptor genes during rat hepatocarcinogenesis induced by a choline deficient L-amino acid defined diet. *Arch Toxicol*, in press, 2011.

Okabe K, Hayashi M, Yamawaki Y, Teranishi M, Honoki K, Mori T, Fukushima N, Tsujiuchi T. Possible involvement of lysophosphatidic acid receptor-5 gene in the acquisition of growth

advantage of rat tumor cells. *Mol Carcinog*, in press, 2011.

2. 学会発表

魏 民、山野荘太郎、石井真美、梯アンナ、鰐淵英機：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 99 回日本病理学会総会、東京都（2010 年 4 月）

山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、魏 民、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 99 回日本病理学会総会、東京都（2010 年 4 月）

石井真美、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、若狭研一、鰐淵英機：ペリニ管がんの一部検例。第 99 回日本病理学会総会、東京都（2010 年 4 月）

魏 民、金川明裕、田尻正喜、山田貴宣、山野荘太郎、梯アンナ、鰐淵英機：ヒ素膀胱発がん原因物質の探索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の同定およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討。第 25 回発がん病理研究会、松島市（2010 年 8 月）

魏 民、石井真美、北野光昭、多胡善幸、福島昭治、鰐淵英機：IQ の発がん性には実際的な閾値が存在する。第 69 回日本がん学会学術総会、大阪市（2010 年 9 月）

金川明裕、魏 民、田尻正喜、仲谷慎也、武下正憲、吉田 香、鰐淵英機：DMA^v 誘発ラット膀胱発がんにおける DMMTA^v の役割。第 69 回日本がん学会学術総会、大阪市（2010 年 9 月）

梯 アンナ、石井真美、山野荘太郎、大保ゆみ、林 修次、鰐淵英機：マウス肝発がんにおけるプロテオーム解析を用いた新たなバイオマーカーの検討。第 69 回日本がん学会学術総会、大阪市（2010 年 9 月）

大保ゆみ、魏 民、山野荘太郎、謝 暁利、星 学、神吉将之、鰐淵英機：*gpt delta rat* を用いたダンマル樹脂の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討。第 69 回日本がん学会学術総会、9 月 22-24 日、大阪市（2010 年 9 月）

山田貴宣、魏 民、豊田武士、金川明裕、仲谷慎也、陳 慶義、鰐淵英機：ラファノブラシカにおけるピロリ菌感染胃炎の修飾作用。第 69 回日本

がん学会学術総会、大阪市（2010年9月）

花田庄司、梯アンナ、山野荘太郎、丁 奎光、魏民、西山典利、鰐淵英機：質量分析に基づいた肺扁平上皮がんのプロテオーム特性。第69回日本がん学会学術総会、大阪市（2010年9月）

山野荘太郎、梯アンナ、丁 奎光、花田庄司、蟹江尚平、鰐淵英機：NTCU誘発異型細気管支上皮細胞における細胞表面マーカーの同定。第69回日本がん学会学術総会、大阪市（2010年9月）

丁 奎光、梯アンナ、山野荘太郎、花田庄司、魏民、西山典利、鰐淵英機：ヒト肺腺がんの有用な新規腫瘍マーカーとしてのAGR2。第69回日本がん学会学術総会、大阪市（2010年9月）

Rawiwan Wongpoomchai, Charatda Punvittayagul, Wilart Pompimonm, Nirush Lertprasertsuke, Shoji Fukushima, Hideki Wanibuchi: Effect of pinocembrin isolated from *Boesenbergia pandurata* on the early stages of hepatocarcinogenesis in rat. 第69回日本がん学会学術総会、大阪市（2010年9月）

櫻井靖高、横井雅幸、塚本徹哉、立松正衛、魏民、鰐淵英機、花岡文雄：UVB照射DNAの損傷乗り越え複製におけるDNAポリメラーゼイータとイオタの生体内での役割。第69回日本がん学会学術総会、大阪市（2010年9月）

鰐淵英機：ヒ素膀胱がん原因物質の探索：新規ヒ素代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の同定およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の検討。第17回岐山毒性病理セミナー、岐阜市（2010年10月）

金川明裕、魏民、田尻正喜、吉田 香、圓藤吟史、鰐淵英機：DMA^V誘発ラット膀胱がんにおけるDMMTA^Vの役割～代謝経路の解明及び、膀胱上皮細胞に与える影響の検討～。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

魏民、梯アンナ、石井真美、北野光昭、福島昭治、鰐淵英機：IQの低用量域における発がん性：閾値の存在。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

田尻正喜、魏民、梯アンナ、山野荘太郎、加藤 実、鰐淵英機：Diphenylarsinic acidのラッ

トにおける慢性毒性および発がん性の検討。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

多胡善幸、仲谷和記、魏民、山田貴宣、太田成男、中島裕司、鰐淵英機：水素水によるTAA誘発ラット肝線維化の抑制効果。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

仲谷慎也、山野荘太郎、梯アンナ、金川明裕、花田庄司、石村栄治、鰐淵英機：糖尿病ラットの糸球体における細胞骨格関連蛋白の検討。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

武下正憲、山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、蟹江尚平、魏民、鰐淵英機：NASH-HCC発症STAMマウスにおける病理組織学的解析。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

謝 暁利、魏民、梯アンナ、山田貴宣、大保ゆみ、林 修次、鰐淵英機：マウス二段階肝発がんモデルを用いたIQの肝発がん性の検討。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

梯アンナ、石井真美、山野荘太郎、魏民、神吉将之、鰐淵英機：マウス肝発がんにおける新規バイオマーカー候補分子の検討。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

大保ゆみ、魏民、田尻正喜、謝 暁利、増村健一、能美健彦、鰐淵英機：*gpt delta rat*を用いたダンマル樹脂の*in vivo*変異原性および発がん修飾作用の検討。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

山田貴宣、魏民、豊田武士、金川明裕、仲谷慎也、星 学、鰐淵英機：新規野菜ラファノブラシカによるピロリ菌誘発胃炎の抑制。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

山野荘太郎、魏民、梯アンナ、多胡善幸、丁奎光、陳 慶義、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮がんの早期発がん過程における気管支肺胞幹細胞の関与。第27回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

山田貴宣、魏 民、梯 アンナ、山野莊太郎、鰐
淵英機：ジフェニルアルシン酸による肝発がん促
進作用及びその機序。第 10 回分子予防環境医学
研究会、京都市（2011 年 1 月）

金川明裕、魏 民、吉田 香、圓藤吟史、鰐淵英
機：ヒ素膀胱発がんの原因物質の検索：新規ヒ素
代謝物ジメチルモノチオアルシン酸の産生経路
の解明およびその膀胱上皮細胞に及ぼす影響の
検討。第 16 回ヒ素シンポジウム、旭川市（2011
年 2 月）

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, 100th 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, 100th 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-.
68th Annual Meeting of the Japanese Cancer

Association (2009. 10)

Satoshi Suzuki, Masanao Yokohira, Nozomi
Hashimoto, Toshiya Kuno, Keiko Yamakawa,
Kousuke Saoo, Tadao Shioka, 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)

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)

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)

鬼松幸子、船本康申、平口貴子、三谷由香利、山
川けいこ、横平政直、今井田克己、大森正樹、竿
尾光祐、術中迅速診断時に細胞診が有用であった
angiomatous meningioma の一例，第 49 回日本臨
床細胞学会秋季大会，神戸（2010. 11）

Toshiya Kuno, Masanao Yokohira, Satoshi Suzuki,
Nozomi Hashimoto, Keiko Yamakawa, Yuko Nakano,
Kousuke Saoo, Akira Hara, Katsumi Imaida,
Modifying effects of PPAR gamma agonist,
Troglitazone in the chemically-induced lung
tumorigenesis in A/J female mice, 69th Annual
Meeting of the Japanese Cancer Association
(2010. 9)

Masanao Yokohira, Shugo Suzuki, Katsumi Imaida,
Samuel M. Cohen, 69th Annual Meeting of the
Japanese Cancer Association (2010. 9)

Yuko Nakano, Nozomi Hashimoto, Masanao
Yokohira, Keiko Yamakawa, Toshiya Kuno,
Satoshi Suzuki, Kousuke Saoo, Tadao Shioka,
Katsumi Imaida, Effect of chronic inflammation
on DHPN lung carcinogenesis in F344 and SD rats,

69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2010.9)

横平政直、山川けいこ、二宮芙美子、中野裕子、井上達史、竿尾光祐、今井田克己、Wistar-Hannover GALAS ラットを用いた慢性毒性ならびに長期発がん性評価(キダチアロエ), 第27回日本毒性病理学会総会 (2011.1)

中野裕子、横平政直、橋本希、山川けいこ、井上達史、二宮芙美子、竿尾光祐、今井田克己、ラット気管内投与による nicotine の毒性作用の検討, 第27回日本毒性病理学会総会 (2011.1)

Masanao Yokohira, Lora L. Arnold, Karen L. Pennington, Shugo Suzuki, Satoko Kakiuchi-Kiyota, Karen Herbin-Davis, David J. Thomas, Katsumi Imaida, Samuel M. Cohen, Severe urinary bladder cytotoxicity and regenerative hyperplasia with dose response induced by arsenite in arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase knockout mice, 50th Anniversary Annual Meeting & ToxExpo (2011.3)

岡部恭子、藤井美奈子、林麻衣、西村和樹、朴木寛弥、辻内俊文: コリン欠乏アミノ酸食によるラット肝発がん過程における Lpa3 遺伝子 DNA メチル化異常. 第69回日本がん学会総会, 9月22日-24日, 大阪, 2010 (日本がん学会誌 P-0171, p.113)

藤井美奈子、岡部恭子、山脇靖奈、吉田唯真、朴木寛弥、辻内俊文: ニトロソ化合物によるラット肺・肝がん発生における Lpa5 遺伝子発現異常. 第69回日本がん学会総会, 9月22日-24日, 大阪, 2010 (日本がん学会誌 P-0172, p.113)

朴木寛弥、藤井宏真、藤間保晶、森俊雄、城戸頭、辻内俊文: 間葉系幹細胞はラット肉腫モデルにおいて腫瘍細胞の早期正着および転移巣形成を促進する. 第69回日本がん学会総会, 9月22日-24日, 大阪, 2010 (日本がん学会誌 P-1201, p.290)

岡部恭子、福嶋伸之、辻内俊文: ニトロソ化合物によるラット肺・肝がん発生における LPA 受容体遺伝子異常の関与. 第69回日本がん学会総会, 1月27日-28日, 大阪, 2011 (日本毒性病理学会誌 P-064, p.120)

<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 22 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：鱒淵 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および早期発見を最終目標とし、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的かつ包括的に検出できる、新しい発がんリスク評価法の開発を目的とする。本年度では、前年度に引き続き、ラット肝発がん物質であるダンマル樹脂の発がん性を、*in vivo* 変異原性の検索が可能な *gpt delta* ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験法で検討し、新規発がんリスク評価法の開発を行った。また、F344 ラットを用いた同試験法でコウジ酸および 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) の発がん性を検討し、その有用性を検証した。さらに、新規マウス発がんリスク評価試験法を開発するために、ダンマル樹脂および IQ の C57BL/6J または B6C3F1 マウスを用いた肝二段階発がん性試験を行った。以上の発がん性試験に加えて、本研究では、発がん性を検索できるがんの早期発見に必要不可欠な、新規早期前がん病変マーカーの開発を目的としての一環として、ラット腎発がんおよびマウス肺発がんの新規前がん病変マーカーの同定をプロテオーム解析により、新規前がん病変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. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法の開発

- ① ダンマル樹脂の 18 週間多臓器発がん性試験では、*gpt delta* ラットを用い 5 種類の発がん物質を投与し、ダンマル樹脂を 0、0.03、2%の濃度で 13 週間混餌投与した。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。このことから、ダンマル樹脂が *gpt delta* ラットにおいて肝発がん促進作用を有することが明らかとなった。一方、甲状腺、肺、腎臓など他の臓器に対する発がん促進作用は認められなかった。これらの結果は、2 年間発がん性試験と一致した。*gpt delta* ラットを用いた本試験法は発がん物質の検出に有用であることが明らかとなった。
- ② F344 ラットを用いたコウジ酸および IQ の 18 週間多臓器発がん性試験では、肝臓における GST-P 陽性細胞巢の数および面積が対照群に比較してコウジ酸および IQ 投与群で有意に増加したことから、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用が認められた。この結果より、本試験法が肝発がん物質の検出に有用であることが確認された。他の臓器の病理組織学検討は現在進行中である。
- ③ ラット腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発では、*N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine (EHEN) 単独および EHEN→KBrO₃ 誘発腎腫瘍のプロテオーム解析結果より、異型尿細管から全ての腎腫瘍にかけて高発現する S100A11 の同定に成功した。新規腎発がん前がん病変マーカーになり得る可能性が示唆された。今後 *gpt delta* ラットを用いた多臓器発がん性試験における腎標本を用いて検討を行い、発がん性の短期包括的試験法の開発に対する有用性を検討する予定である。

2. 新規マウス発がんリスク評価試験法の開発

- ① ダンマル樹脂および IQ の C57BL/6J マウス肝二段階発がん試験では、2 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに DEN を単回腹腔内投与後、2%ダンマル樹脂および 300 ppm IQ を混餌投与した。22 週において、ダンマル樹脂および IQ とともに肝発がん促進作用は認められなかった。40 週における肝臓の病理組織学的検討は現在進行中である。本試験法の有用性について、22 週および 40 週の解析結果を総合して最終的な評価を行う予定である。
- ② B6C3F1 マウスを用いた肝二段階発がん性試験では、肝部分切除後 DEN を単回腹腔投与し、さらに→IQ 混餌投与することで IQ の肝発がん促進作用が認められ、新規マウス発