

がんリスク評価試験法の開発に成功し

- 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しており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) の存在が示唆された。この結果、がん幹細胞説の観点から考えて、今後 BASC の追加検討が肺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。

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年間という長期的検討が必要であり、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、変異原は *in vitro* の変異原性試験により決められてきたが、変異原性が陰性であるにも関わらず、発がん性を有する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的、かつ包括的に検出可能な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、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。

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、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 ± 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, Sigma, 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(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の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、二重下線を付したものの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. 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%を設定した。

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(日本エスエルシー株式会社)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。

実験プロトコルをFigure 5に示す。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)。

[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。

2.3 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 10 μm 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 20 μg 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 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。

3.3 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 μl 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 µm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 µl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)を用いてダブル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 µg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]

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相関した。

[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 6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 7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。

甲状腺の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれTable 8に示した。Follicular cell hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD単独投与群で100%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で93.3%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で100%とほぼすべての動物で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で 3.1 ± 2.2 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 2.7 ± 2.2 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 2.8 ± 2.2 認められた。Follicular cell adenomaにおいてはDMBDD単独投与群で46.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で33.3%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で40.0%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で 0.7 ± 0.9 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.5 ± 0.7 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.5 ± 0.6 認められた。Follicular cell adenocarcinomaにおいてはDMBDD単独投与群で26.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で6.7%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で 0.3 ± 0.5 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.4 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 認められた。また、Tumor (follicular cell adenoma + follicular cell adenocarcinoma)ではDMBDD単独投与群で53.3%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で40.0%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で46.7%の発生頻度で認められた。DMBDD単独投与群で 1.0 ± 1.1 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.5 ± 0.7 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.5 ± 0.7 認められた。これらの甲状腺における病変の発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

腎臓の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれTable 9に示した。Atypical tubule hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD単独投与群で73.3%、DMBDD→0.03%ダンマ

ル樹脂投与群で46.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で33.3%認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で 1.0 ± 0.8 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.6 ± 0.7 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.4 ± 0.6 認められた。Renal cell papillomaにおいてはDMBDD単独投与群では認められなかったが、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で13.3%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.4 認められた。NephroblastomaはDMBDD単独投与群で6.7%認められたが、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で認められなかった。発生頻度はDMBDD単独投与群で 0.1 ± 0.3 認められた。Renal cell carcinomaにおいてはDMBDD単独投与群、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で認められなかった。また、Tumor (Renal cell papilloma+Renal cell carcinoma) ではDMBDD単独投与群では認められなかったが、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で13.3%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.4 認められた。これらの腎臓における病変の発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

膀胱の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれTable 10に示した。PN hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD単独投与群で26.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で26.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で20.0%で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で 0.3 ± 0.6 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.3 ± 0.5 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.3 ± 0.7 認められた。PapillomaにおいてはDMBDD単独投与群で6.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%認められ、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で 0.1 ± 0.3 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 認められた。Transitional cell adenocarcinomaにおいてはDMBDD単独投与群で13.3%の発生頻度で認められたが、ダンマル樹脂投与群で認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で 0.1 ± 0.4 認められた。また、Tumor (Papilloma + Transitional cell adenocarcinoma) ではDMBDD単独投与群で20.0%、DMBDD→0.03%ダンマル

樹脂投与群で6.7%の発生頻度で認められたが、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群では認められなかった。発生個数については、DMBDD単独投与群で 0.2 ± 0.4 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 認められた。これらの膀胱における病変の発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

肺の過形成病変および腫瘍性病変の発生頻度および個数をそれぞれTable 11に示した。Hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD単独投与群で100%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で100%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で100%とすべての動物で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で 29.1 ± 11.3 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 20.2 ± 6.2 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 24.6 ± 7.6 認められた。AdenomaにおいてはDMBDD単独投与群で40.0%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で33.3%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で 0.5 ± 0.8 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.4 ± 0.6 認められた。CarcinomaにおいてはDMBDD単独投与群で6.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で6.7%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で6.7%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD単独投与群で 0.1 ± 0.3 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 認められた。また、Tumor (Adenoma + Carcinoma) ではDMBDD単独投与群で46.7%、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で13.3%、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で40.0%の発生頻度で認められた。DMBDD単独投与群で 0.6 ± 0.8 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.4 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.5 ± 0.6 認められた。これらの肺における病変の発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

DMBDD処置群(第1から3群)においてACFの定量解析を行った結果をTable 12に示した。その発生個数においてDMBDD単独投与群で 337 ± 60.7 、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群で 324 ± 64.2 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 396 ± 91.8 認められた。DMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。DMBDD→0.03%ダンマ

ル樹脂投与群の1例(6.7%)においてTumor(Adenocarcinoma)を認めた。その発生頻度は 0.1 ± 0.3 であった。

小腸において、DMBDD処置単独投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群において各1例(6.7%)ずつ、Tumor(Adenocarcinoma)を認めた。発生頻度はそれぞれ、DMBDD処置単独投与群で 0.1 ± 0.3 、DMBDD→2%ダンマル樹脂投与群で 0.1 ± 0.3 であった。これら発生頻度および発生個数はDMBDD処置単独投与群と比較し、DMBDD→0.03%ダンマル樹脂投与群およびDMBDD→2%ダンマル樹脂投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

2. 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。

実験期間中の各群における平均体重推移をTable 13およびFigure 6に示した。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。

平均飲水量をTable 14に示した。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。

平均摂餌量をTable 15に示した。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。

実験期間中における1匹1日あたりの平均IQ、Kojic acid摂取量をTable 16に示した。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0.049g、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1.109g、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2.94g、0.01%IQ単独投与群では3.30g、DMBDD→2.0%Kojic acid投与群では66.54g、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]

最終体重はTable 17に示した。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($p < 0.05$)。

各群の臓器の絶対重量および相対重量をTable 18に示した。

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]

GST-P 陽性巢（直径 20 μ m 以上）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を Table 19 に示した。DMBDD 処置群（第 1～3 群）において、被験物質投与群の DMBDD→0. 01%IQ 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。

3. 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 (Figure 7)。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癌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 (Figure 8)。

4. 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 (Table 20)。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。

5. 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 (Figure 9)。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。

6. 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 (Figure 10)。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 (Figures 11, 12)。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、なおかつ癌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、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。

また、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。

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、種々の癌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。

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。(魏分担報告書参照)。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).

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: ベリニ管癌の一剖検例. 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回発癌病理研究会、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回日本癌学会学術総会、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誘発ラット膀胱発癌におけるDMMTA^Vの役割. 第69回日本癌学会学術総会、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回日本癌学会学術総会、大阪市(2010年9月)

大保ゆみ、魏 民、山野荘太郎、謝 曉利、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回日本癌学会学術総会、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回日本癌学会学術総会、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癌のプロテオーム特性. 第69回日本癌学会学術総会、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回日本癌学会学術総会、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: ヒト肺腺癌の有用な新規腫瘍マーカーとしてのAGR2. 第69回日本癌学会学術総会、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回日本癌学

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 回日本癌学会学術総会、大阪市（2010年9月）

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 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 誘発ラット膀胱発癌における 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）

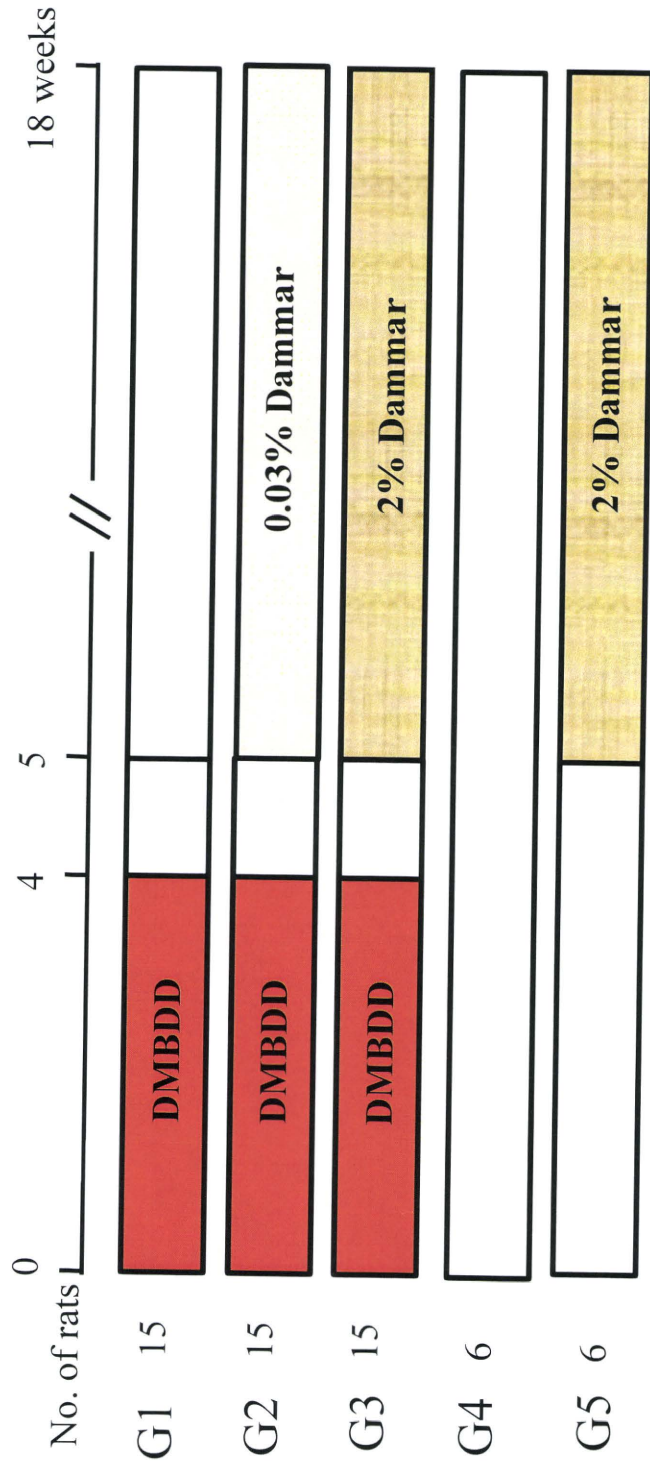
山野荘太郎、魏 民、梯 アンナ、多胡善幸、丁奎光、陳 慶義、鰐淵英機：マウス肺扁平上皮癌の早期発癌過程における気管支肺胞幹細胞の関与. 第 27 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、大阪市（2011年1月）

山田貴宣、魏 民、梯 アンナ、山野荘太郎、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）

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



➤ Animals: 6-week-old, 57 male gpt delta rats

➤ Test chemical: Dammar in the diet

➤ Basal diet: MF pellet

➤ Treatment:

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

Figure 1. Experimental design

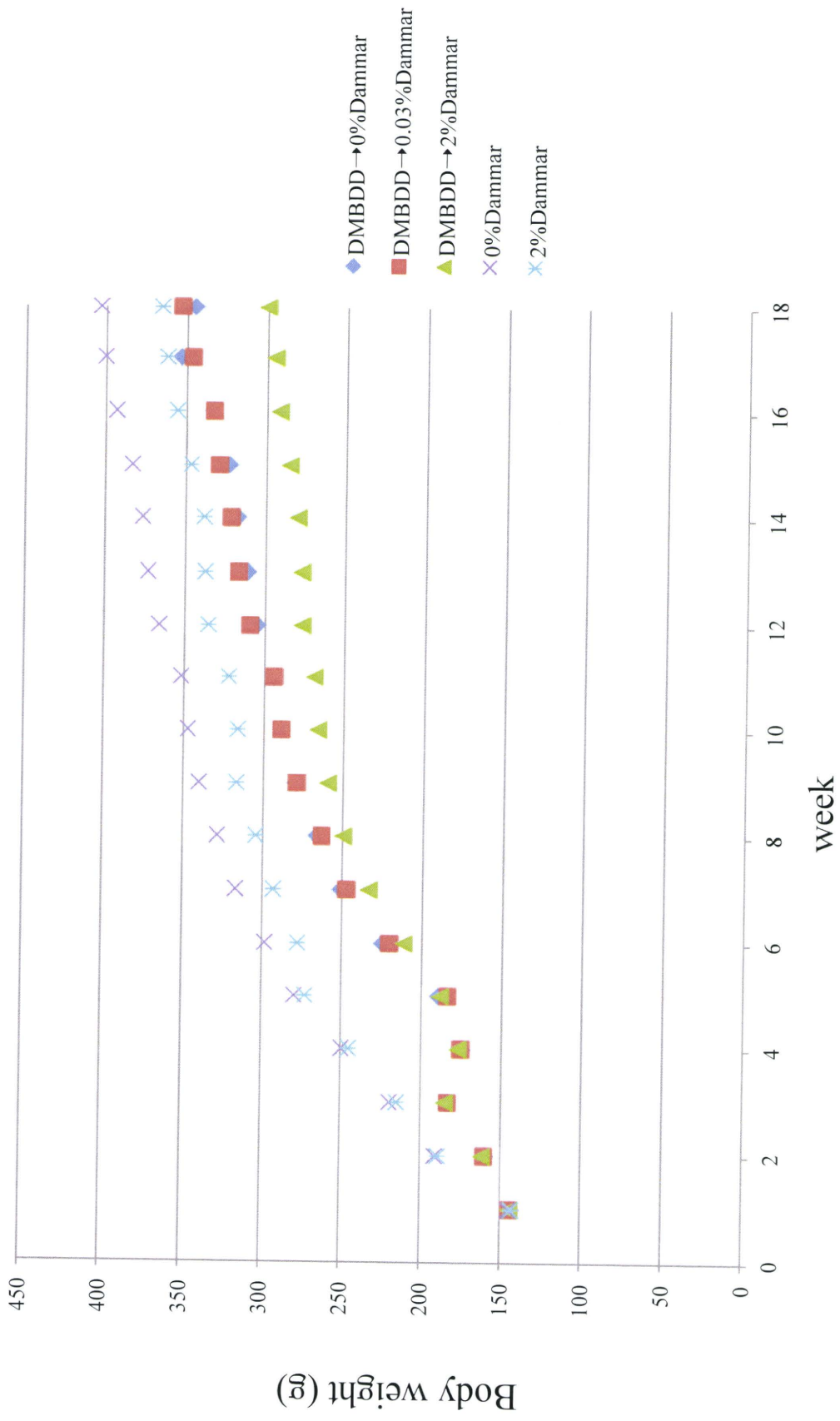


Figure 2. Body weight

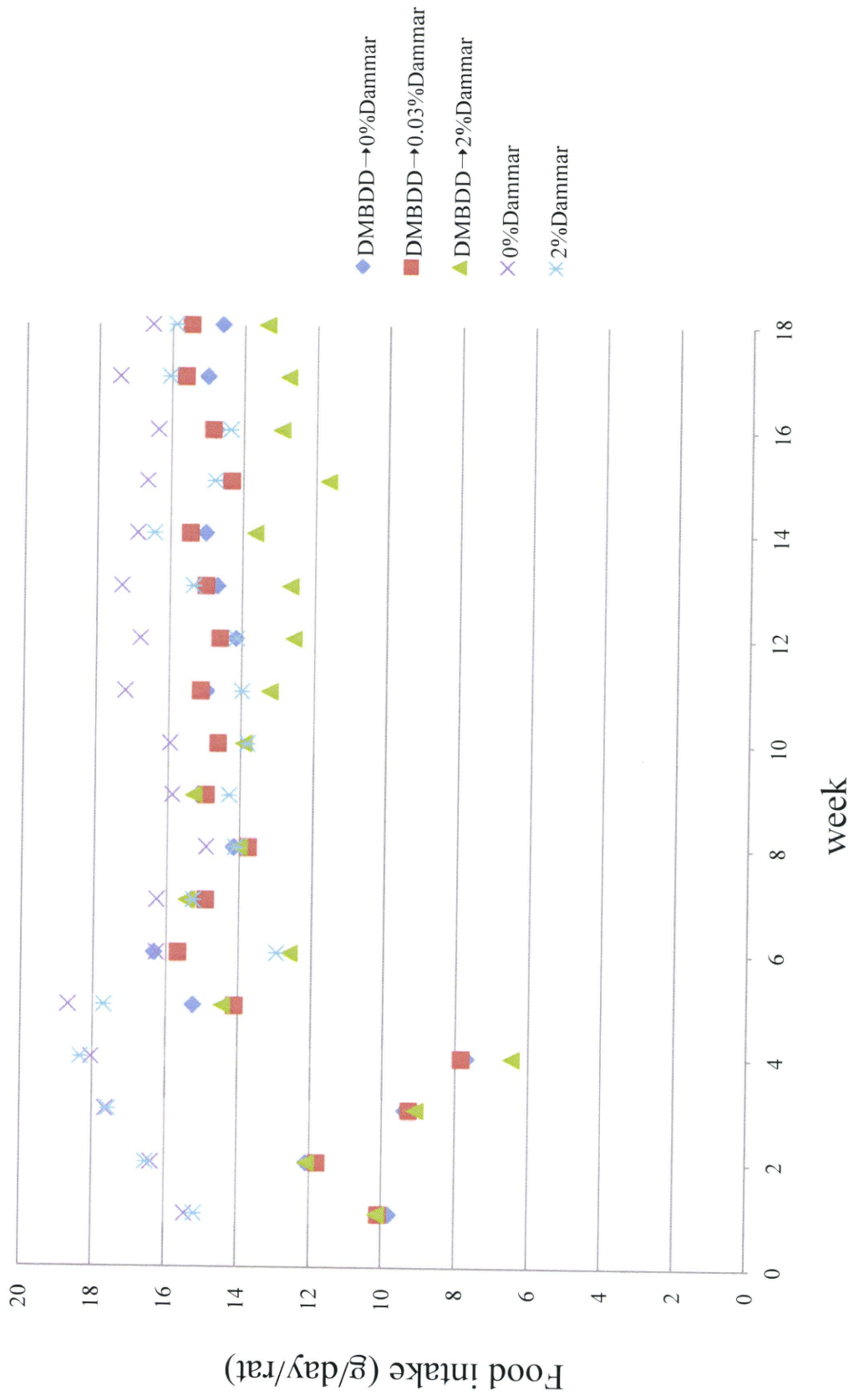


Figure 3. Food consumption

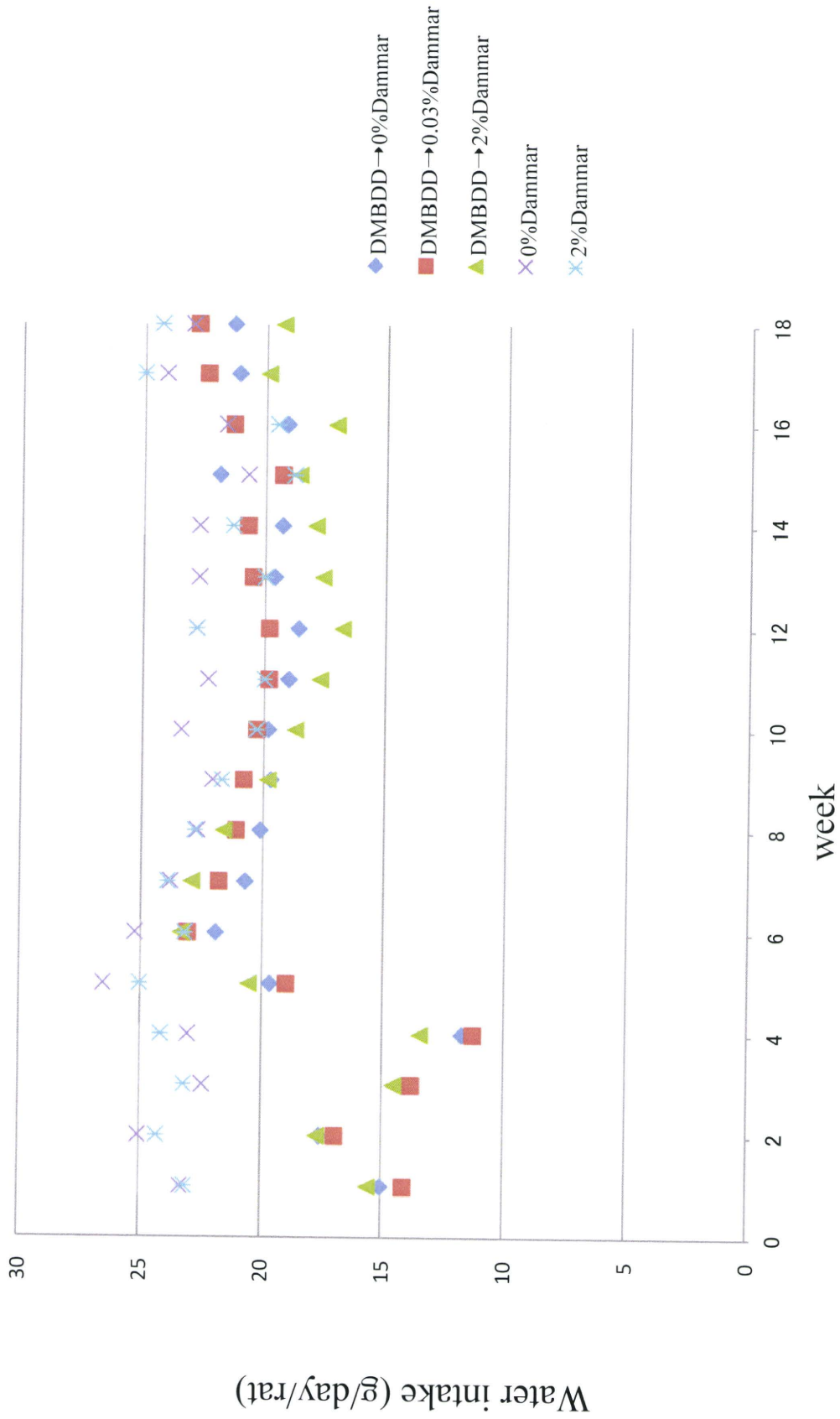
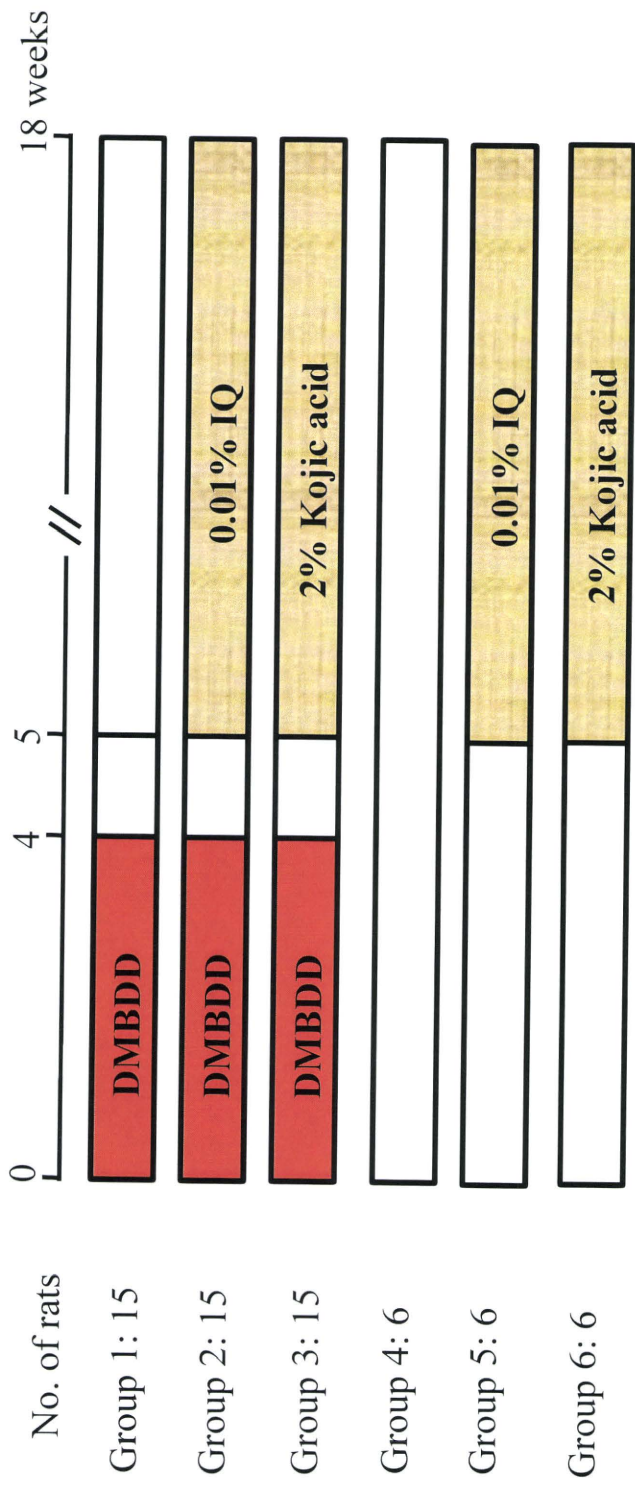


Figure 4. Water consumption



➤ **Animals: 6-week-old**

 Groups 1 and 2 and 3: 45 male F344 rats

 Groups 4 and 5 and 6: 18 male gpt delta rats

➤ **Test chemical: 0.01% IQ in the diet**

➤ **Basal diet: MF**

➤ **Treatment:**

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

Figure 5 . Experiment design

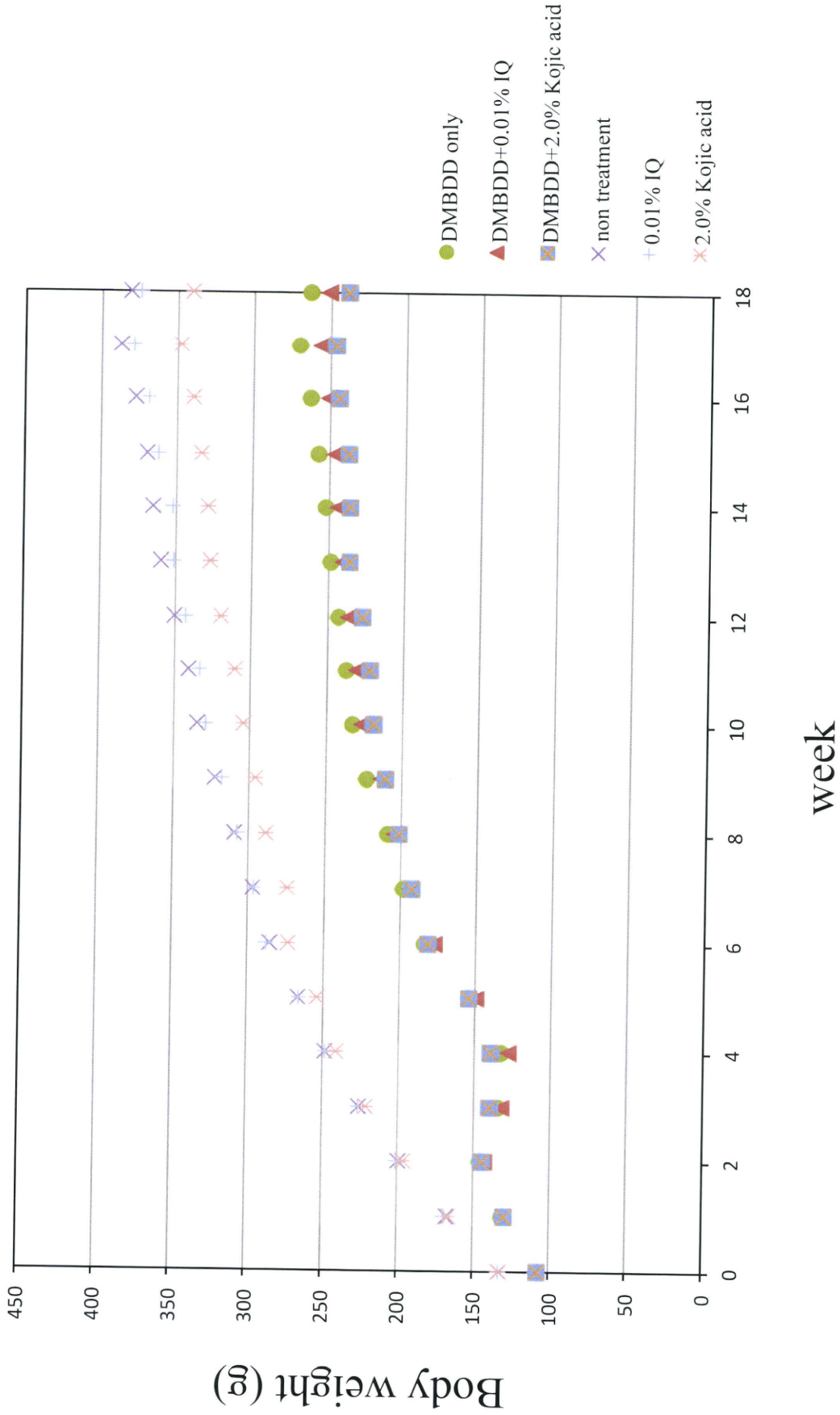
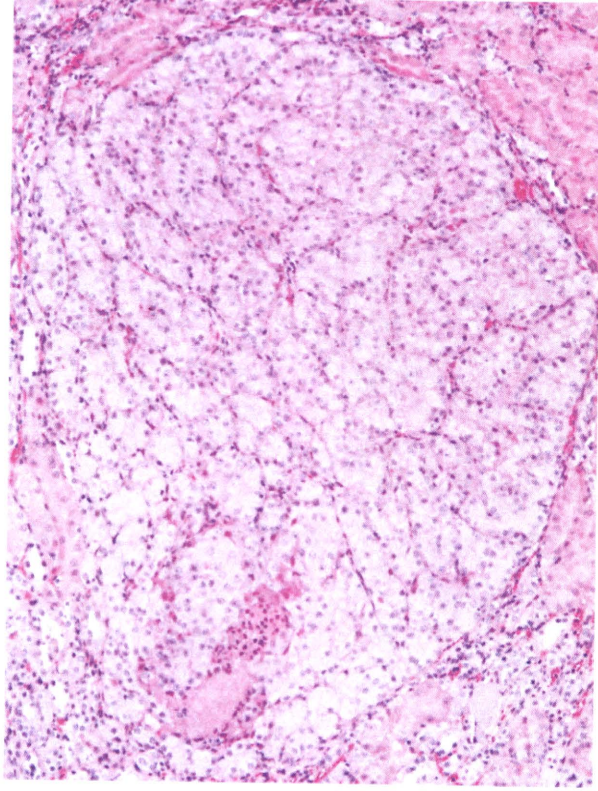


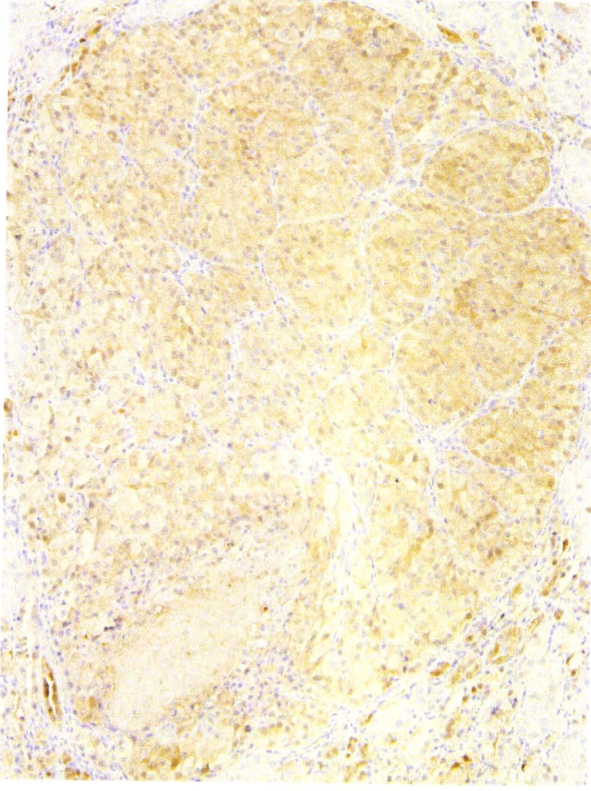
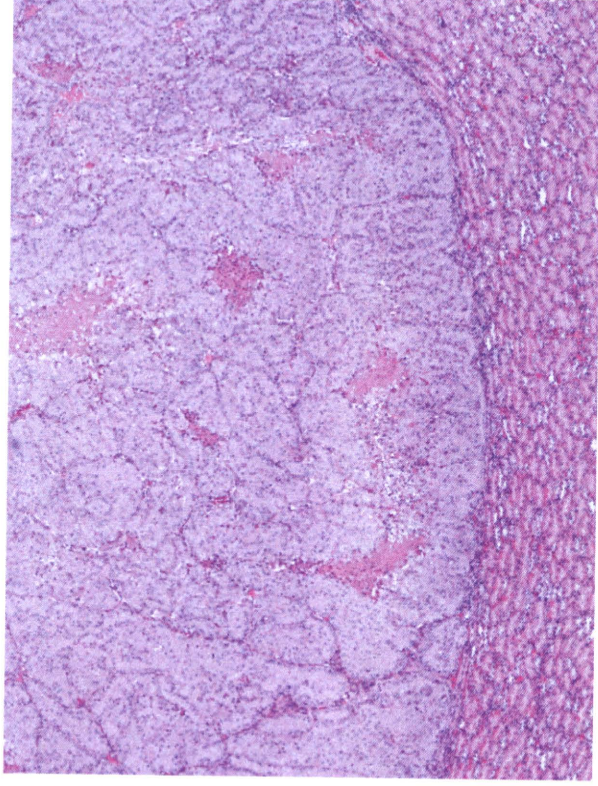
Figure 6. Body weight

RCT, clear cell type



HE

RCT, basophilic type



S100A11

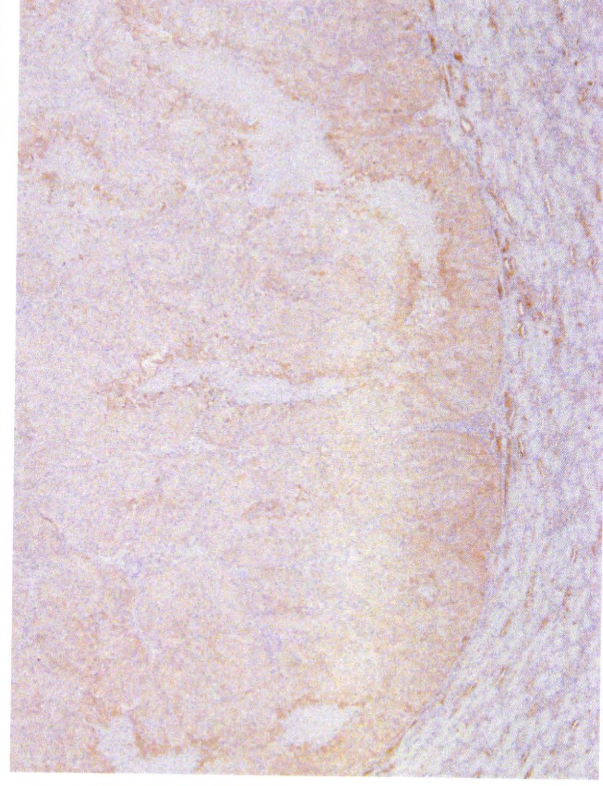


Figure 7 Expression of S100A11 in renal cell tumor (RCT)

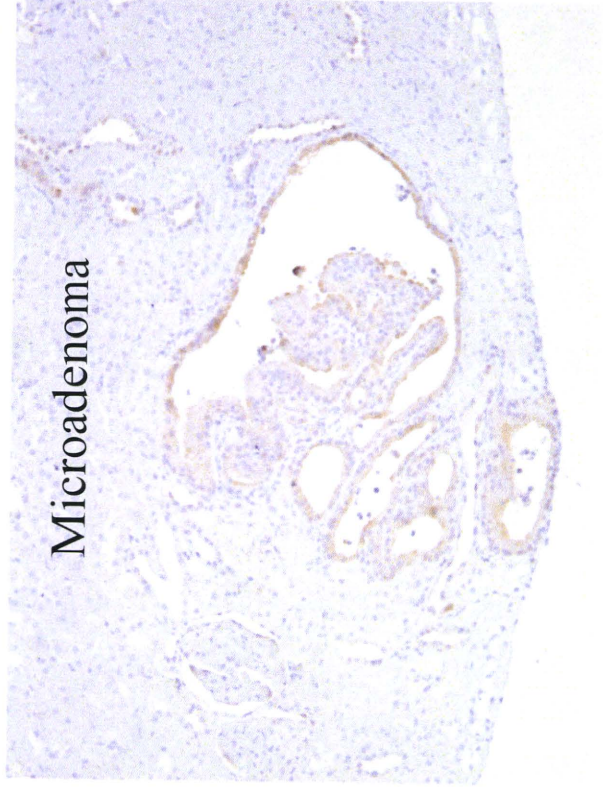
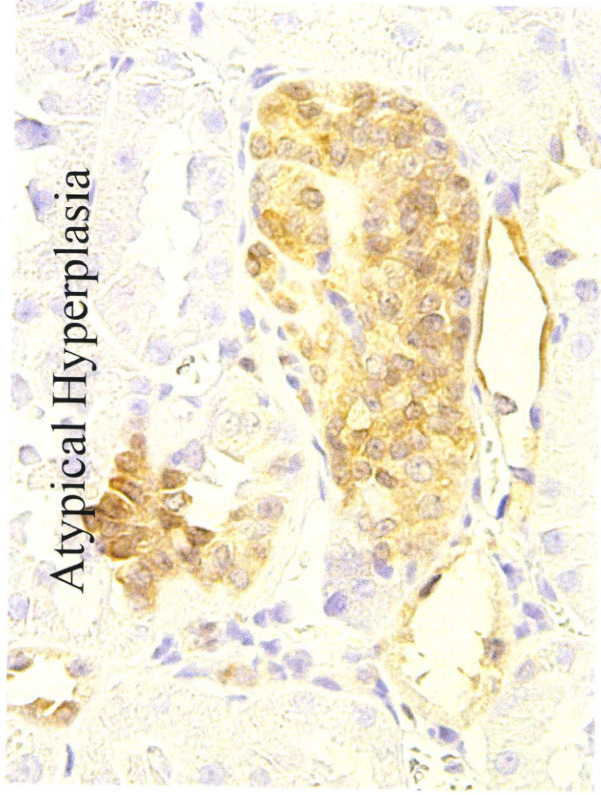
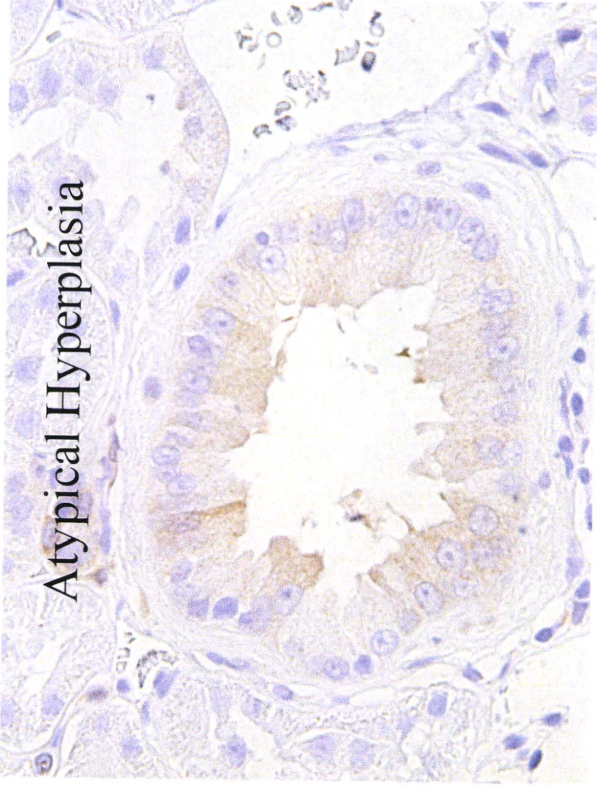
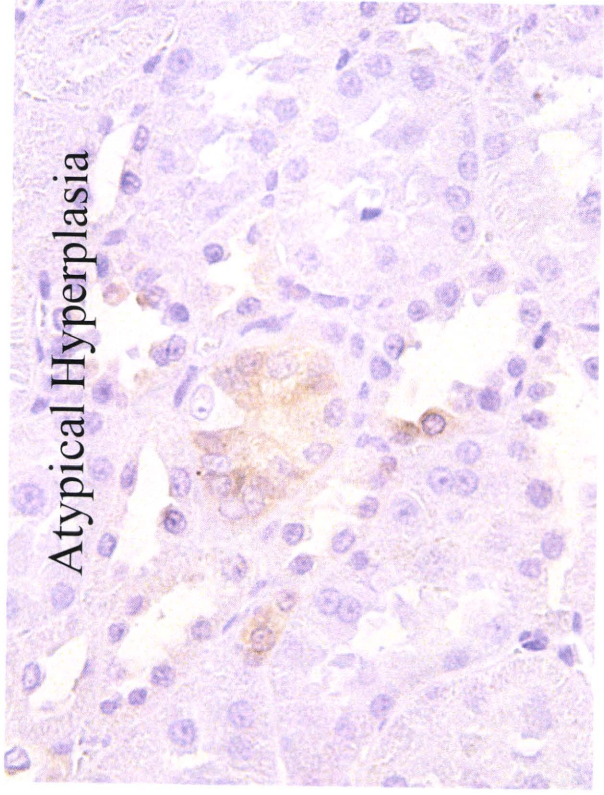


Figure 8 Expression of S100A11 in atypical hyperplasia and microadenoma in kidney