

201033035A

別添 1

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

畜水産食品における動物医薬品等の安全性確保に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 三森 国敏

平成 23 (2011) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告書		
畜水産食品における動物医薬品等の安全性確保に関する研究	-----	1
三森国敏		
II. 分担研究報告書		
1. CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾	-----	9
三森 国敏		
2. 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索	-----	18
渋谷 淳		
3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立	-----	29
梅村 隆志		
4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究	-----	37
九郎丸 正道		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	46
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	なし

畜水産食品中の残留動物用医薬品の安全性に関する研究

研究代表者 三森国敏 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門教授
研究分担者 渋谷淳 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門准教授、
梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長、
九郎丸正道 東京大学大学院 農学生命科学研究科教授

研究要旨

CYP1A inducer の同時摂取により、肝発がんイニシエーションないしプロモーション作用がどのように修飾されるかを明確にするため、胃酸分泌阻害剤である Omeprazole (OPZ) と強い CYP1A inducer である β -naphthoflavone (BNF) を用いた発がん実験を実施した。その結果、OPZ 276 mg/kg 投与により肝腫瘍プロモーション作用が誘発されることが明らかとなり、classical MAP kinase pathway を介した細胞増殖亢進が肝腫瘍プロモーションに関与する可能性が示唆された。併用投与によるプロモーション作用の実験では、OPZ 及び BNF 併用投与群で GST-P 陽性巢の数及び面積の増加が認められ、併用投与による肝腫瘍プロモーション修飾作用が相加的に増加することが示された。一方、併用投与によるイニシエーション修飾作用の実験では、併用投与によるイニシエーション作用に顕著な変化は認められなかった。

肝臓を標的とした巨大核出現を伴う発がん物質の 28 日間短期投与試験を行い、G2/M 期付近の細胞周期関連分子を中心とした網羅的分子解析を実施し、免疫組織学的検索に対応可能な候補分子の検索を行った。マイクロアレイ解析の結果、発現変動遺伝子のうち G2 期から M 期に機能するものが半数以上を占めることが見出された。また、Aurora B は発がん物質群で無処置対照群に比して陽性細胞の増加を示し、G2/M 期チェックポイントに関与する Topo II α や M 期関連分子の p-Histone H3、HP1 α も発がん物質群で 1 群以上で陽性細胞の増加を示すことが確認された。特に、p-Histone H3 では発がん物質群の多くで有意に増加した。以上の結果から、肝臓において M 期関連分子が巨大核出現を伴う発がん物質の早期スクリーニングの指標としての可能性が示唆された。

ニトロフラン類は、ニトロフランを基本骨格に隣接するヒドラジド誘導体の違いにより多くの種類が知られている。その中には発がん性が報告されているものもあり、様々なヒドラジド誘導体を用いた新規合成抗菌剤の報告は現在も続いている。本研究では、gpt delta ラット更には p53 ならびに Nrf 2 遺伝子欠損 gpt delta マウスを用いて、DNA 修復の量的解析とレポーター遺伝子突然変異解析を組み合わせてニトロフラン類の化学構造に依存した in vivo 変異原性を解明するとともに、ニトロフラン類の包括的安全性評価法の確立を目指した。本年度では、ニトロフラン類の化学構造に依存する発がん機序を探ることを目的とし、ニトロフラントイン (NFT) とその代謝物を用いて雄ラット腎臓の in vivo 変異原性試験を行った。その結果、投与 4 週目の NFT 群で陽性結果が得られ、またその変異原性にはヒドラジド誘導体代謝物の AHD の関与が示唆された。

牛海綿状脳症の特定危険部位である牛の背根神経節について、前方 3/4 の脊柱内に位置する神経節の完全除去がと畜場において可能か否か検討するため、除去率の算定を試みた。同時に、牛の品種別及び牝牝別に除去率に差があるか否かも検討した。今年度の調査結果では、平均して 92% の除去がと畜場で可能となっているが、100% の除去達成は調査試料全体の 6% に過ぎなかった。と畜場での前方 3/4 の背根神経節の完全除去を達成するためには、今後さらなる技術の改良が必要である。また、牛の品種別及び牝牝別の除去率に差は認められなかった。

A. 研究目的

1. CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾 (三森)

動物薬の一部には、肝発がん過程に活性酸素種 (ROS) が関与するものがあることが明らかにされている。それらの中には CYP1A を誘導する物質 (CYP1A inducer) も含まれている。本研究ではこれらの CYP1A inducer の同時摂取により、肝発がんイニシエーションないしプロモーション作用がどのように修飾されるかを明確にする。2. 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索 (渋谷)

動物用医薬品等の化学物質の発がん性評価手法であるゲッ歯類を用いた発がん性試験は、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題があり、短期発がん検出系の確立が求められている。殊に評価上問題となることの多い非遺伝毒性発がん物質に関しては、多数の発がん標的に共通する検出の手立てがなく、有効な手法開発が望まれている。一方、ラットやマウスの肝臓ないし腎臓に発がん性を及ぼす化学物質の短期投与で、腫瘍性病変とは異なる巨大核の出現がしばしば見出されており、ゲノムの異数性を反映し、発がん好発部位に一致して、投与期間と共に増加することより、巨大核の出現に至る細胞内の分子過程に発がんの鍵となるものが存在する可能性が強く示唆されている。本研究では、肝発がん初期過程を与える可能性の高い巨大核出現に関連する分子標的の同定を目的として、NTP report で肝発がん性と共に核の巨大化を示すことが報告されている複数の発がん物質を陽性対照として、28 日間の短期投与試験を実施した。

本研究では肝臓におけるマイクロアレイ解析より、発がん物質特異的に発現変動する細胞周期関連遺伝子群を同定し、そのデータを基にした免疫組織学的検索に対応可能な分子を選別する。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立 (梅村)

合成抗菌剤であるニトロフラン類は、ニトロ

フランを基本骨格に隣接するヒドラジド誘導体の違いにより多くの種類が知られている。その中には発がん性が報告されているものもあり現在国内での使用は禁止されているが、様々なヒドラジド誘導体を用いた新規合成抗菌剤の報告は現在も続いている。本研究では、*gpt delta* ラット更には遺伝子障害修復機構に関与する p53 ならびに酸化ストレス防御機構に関与する *Nrf2* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを用いて、DNA 修復の量的解析とレポーター遺伝子突然変異解析を組み合わせてニトロフラン類の化学構造に依存した *in vivo* 変異原性を解明するとともに、ニトロフラン類の包括的安全性評価法の確立を目指す。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

BSE の特定危険部位である牛の背根神経節 (以下、神経節) は、脊柱からの分離が困難なことから、本来安全な脊柱も神経節とともに廃棄されている。本研究では、と畜場において神経節を脊柱から完全に分離する手法を確立し、牛の脊柱を資源として再活用をはかることを目的とした。

B. 研究方法

1. CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾 (三森)

6 週齢の雄性 F344 ラットを用い、以下の実験を実施した。(1)プロモーション機序解明実験：イニシエーターである diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週間後にプロモーターとして OPZ 138 mg/kg を 1 日 1 回 6 週間強制経口投与した。OPZ 投与 1 週後に 2/3 部分肝切除 (PH) を行った。(2) 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験：DEN を腹腔内投与し、2 週間後に OPZ 138 mg/kg ないし 276 mg/kg 1 日 1 回強制経口投与、BNF 0.125%、ないし 0.25% 混餌投与、OPZ 138 mg/kg 及び BNF 0.125% の同時併用投与を 6 週間行った。プロモーター投与 1 週間後に

PHを行った。(3) 併用投与によるイニシエーション修飾作用の実験:OPZ 138 mg/kg ないし 276 mg/kg 1日1回強制経口投与、BNF 0.125%ないし 0.25%混餌投与、OPZ138 mg/kg 及び BNF 0.125%の同時併用投与 1週後に PHを施し、12時間後にイニシエーターとして 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)を単回投与した。PH2週後から 2-acetylaminofluorene 混餌投与を10日間行い、さらに開始3週間後には四塩化炭素を強制経口投与し、実験開始6週間後に剖検を行った投与終了後、肝臓について病理組織学的検索、免疫組織化学的解析 [Glutathione-S-transferase placental form (GST-P)、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)]、肝ミクロソームを用いた ROS測定、8-OHdG測定と real-time RT-PCR解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、投与実験は混餌による経口投与が主体であり、また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、国立大学法人 東京農工大学の実験動物取り扱い倫理規定及び米国国立衛生研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

2. 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索 (渋谷)

6週齢の雄性 F344 ラットに、巨大核を誘発する遺伝毒性肝発がん物質の methyleugenol (MEG; 300 mg/kg 体重、強制経口)、巨大核を誘発する非遺伝毒性肝発がん物質の thioacetamide (TAA; 400 ppm, 混餌) や fenbendazole (FB; 1000 ppm, 混餌)、piperonyl butoxide (PBO; 20,000 ppm, 混餌)を用いた28日間反復投与実験を行った(N=10匹/群)。陰性対照である非発がん性の肝毒性物質として、acetaminophen (APAP; 10,000 ppm, 混餌)、 α -naphthyl isothiocyanate (ANIT; 1000 ppm, 混餌)を選択し、無処置対照群も設定した。28日間の

投与終了後、肝臓を採取し、マイクロアレイ解析及び Real-time RT-PCR 解析、免疫組織学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、東京農工大学の利用規定および米国国立衛生研究所 (NIH) が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立 (梅村)

ニトロフラントイン (NFT) とその代謝物を用いて雄ラット腎臓の *in vivo* 変異原性試験を行った。5週齢の *gpt delta* ラット雄にニトロフラントイン (NFT) と、その代謝物であるアミノヒダントイン (AHD) ならびにニトロフルフルール (NFA) を 125 mg/kg bw、80 mg/kg bw、50 mg/Kg bw を13週間連続強制経口投与した血液生化学的検査、病理学的検査、*in vivo* 変異原性試験を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験ガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施した。特に、動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置には倫理基準に充分配慮し、実験終了時、安楽死においても深麻酔下、苦痛に配慮した。また、申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被験物質として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

牛の背根神経節は1頭あたり、頸椎部8対16個、胸椎部13対26個、腰椎部6対12個、及び仙骨部5対10個の計32対64個(背割り後の枝肉[半頭分]では32個)である(尾骨部はこれに含まれていない)。ここでは、前方

3/4 に当たる第 1 頸神経から第 3 腰神経までの脊髄神経・背根神経節の、脊柱からのそれぞれの除去率を調べた。また同様の方法を用いて、牛の品種別及び牝牝別の除去率を比較検討した。牛の品種別及び牝牝別では、「交雑種（黒毛♂×ホルスタイン♀）去勢牝」、「交雑種牝」、「ホルスタイン去勢牝」、及び「和牛（黒毛、褐毛和種）去勢牝、ホルスタイン牝、etc.」4 グループに区分した。

（倫理面への配慮）

本研究は動物実験ではなく、と畜場の協力を得て、作業過程で除去された牛の硬膜と背根神経節を研究材料として使用していることから、倫理面への配慮は特に必要としないと考える。

C. 研究結果

1. CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾（三森）

(1) プロモーション機序解明実験：DDEN+OPZ 投与群では、肝臓の絶対重量及び相対重量が有意に増加した。病理組織学的には、DEN+OPZ 投与群で、肝臓において、瀰漫性肝細胞肥大ならびに好酸性、明細胞性及び好塩基性肝細胞から構成される変異肝細胞巣の発生頻度が増加した。免疫組織学的には、DEN+OPZ 投与群で、GST-P 陽性巣の数及び面積の有意な増加が認められ、PCNA 染色においても同様な結果が認められた。Real-time RT-PCR の結果、AhR gene battery である Cyp1a1, 1a2, Ugt1a6, Ald1a1 及び NF-E2-related factor 2 に制御される Gstm1, Gpx2, Yc2 等の増加が認められた。ミクロソーム ROS 産生能の測定、過酸化脂質の指標である TBARS 測定、DNA 損傷の指標である 8-OHdG 測定を行った。NADPH 添加における ROS 産生量は、DEN+OPZ 群において有意に減少し、TBARS 測定においても同様な結果が認められた。8-OHdG 測定においては、有意な差は認められなかった。更なるメカニズム解析のため、Real-time RT-PCR を行った。その結果、

DEN+OPZ 投与群で、Myc, Raf-1, Map2k2 の有意な増加が認められた。

(2) 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験：肝臓の絶対重量及び相対重量は、DEN+OPZ 投与群、DEN+BNF投与群、DEN+OPZ+BNF投与群で、有意に増加した。免疫組織学的には、DEN+OPZ 投与群、DEN+BNF 投与群、DEN+OPZ+BNF投与群で、GST-P陽性巣の数及び面積の有意な増加が認められ、PCNA染色においても同様な結果が認められた。さらに併用投与群においては、それぞれ単剤を投与した群よりも相加的な増加認められた。Real-time RT-PCR解析においては、薬剤投与群でAhR gene batteryである Cyp1a1, 1a2, Ugt1a6, Ald1a1 及び NF-E2-related factor 2に制御される Gstm1, Gpx2, Yc2等の増加が認められ、さらに併用投与群で、相加的な増加が認められた。

(3) 併用投与によるイニシエーション修飾作用の実験：剖検時の最終体重は、顕著な差は認められなかった。肝臓の絶対重量においては、DEN+0.25%BNF 投与群で有意な増加が認められ、相対重量においては、DEN+0.25%BNF 投与群及び併用投与群において有意な増加が認められた。免疫組織学的には、DEN+0.125%BNF 投与群で、GST-P 陽性巣の数及び面積の有意な増加が認められたが、他の群では認められなかった。

2. 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索（渋谷）

投与 28 日目の FB 群を除く全ての投与群で、無処置対照群に比して体重の有意な減少が認められた。肝臓重量は、絶対値で PBO 群、MEG 群で無処置対照群に比して有意な増加を、TAA 群、APAP 群及び ANIT 群で無処置対照群に比して有意な減少を示した。相対値では全投与群で無処置対照群に比して有意な増加を示した。

マイクロアレイによる遺伝子発現変動を細胞周期、細胞増殖やアポトーシス等の細胞周期関連分子について検討した結果、TAA 群及び FB 群で無処置対照群に比して共通に発現の上昇を

示したものと TAA 群で無処置対照群に比して有意な発現の上昇を示し FB 群でも上昇傾向を示したものが 67 個認められた。逆に TAA 群及び FB 群で無処置対照群に比して共通に発現の低下を示したものと TAA 群で無処置対照群に比して有意な発現の低下を示し FB 群でも低下傾向を示したものは 16 個認められた。

マイクロアレイ解析により発現上昇の認められた遺伝子の内、細胞周期関連分子について、免疫組織学的解析の候補遺伝子について、real-time RT-PCR による mRNA の発現を検証した。実施した全ての遺伝子は、マイクロアレイで TAA 群でのみ有意な上昇を示し、FB 群でも同様の傾向を示したものである。結果、全ての遺伝子は TAA 群で無処置対照群に比していずれの内在性コントロール下でも有意な高値を認め、FB 群でも内在性コントロール 3 遺伝子中 1 遺伝子以上で有意な高値ないし同様の傾向が認められた。

Real-time RT PCR で mRNA の発現検証を実施した遺伝子の内、M 期主要関連分子の Aurora B の免疫組織学的検索を実施した。さらに、細胞増殖指標の Ki-67、発がん物質投与初期過程への関連が示唆される G2/M 期関連分子の Topo II α 及び、Aurora B 以外の M 期関連分子の p-Histone H3 と HP1 α の免疫組織学的検索を実施した。細胞増殖の指標である Ki-67 は、発がん物質投与群とその他の群で特徴的な陽性細胞数の変化を認めなかった。一方、G2/M 期チェックポイントに関与する Topo II α では、発がん物質群で陰性対照群に比して陽性細胞数が増加を示し、無処置対照群に比して 4 群中 2 群が有意な増加を示した。さらに M 期進行に関わる分子群では、発がん物質群で陰性対照群に比して陽性細胞数の増加を認め、p-Histone H3 では発がん物質 4 群中 3 群で、無処置対照群に比して増加が認められた。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立(梅村)

体重は、NFT 群では、投与 3 週目から有意な

体重増加抑制が認められ、投与期間を通じて対照群よりも低値で推移した。NFA 群でも、投与 2、3 および 4 週目と 10 週目以降で有意な体重増加抑制が認められた。AHD 群は対照群と同様な推移を示した。血液生化学的検査では、投与 4 週目において、AHD および NFA 群で BUN と AST が対照群より有意な低値を示した。また、NFA 群では、CRN および ALT でも有意な低値を示した。13 週目では、NFT および NFA 投与群において CRN、AST および ALT で、対照群より有意な低値を示した。また、NFA 群では ALP においても有意な低値を示した。臓器重量および相対重量は、対照群と比較して、肝臓および腎臓の実重量・相対重量ともに、全ての投与群において有意な変化は認められなかった。投与 13 週目では、NFT および NFA 群において肝臓および腎臓の相対重量が対照群より有意な高値を示した。

投与 4 週目の腎臓における *gpt* 突然変異頻度は、NFT 群で、*gpt* MF が対照群より有意な高値を示し、AHD 群で上昇傾向が認められた。投与 4 週目の腎臓における Spi 突然変異頻度 (Spi MF) を Table. 4 に示す。全ての投与群において、対照群と比較し有意な変化は認められなかった。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究(九郎丸)

根神経節の脊柱からの除去率は、2010 年 3 月から 2011 年 2 月の間で平均 92%であった。しかし、特に第 10~第 12 胸神経・背根神経節の除去率の低さ(49~73%)が顕著であった。上記の 3 部位を除いた残りの 21 部位は 85%以上の除去率を示した。

牛の品種別及び牝牡別に脊柱からの背根神経節の除去率は、「交雑種去勢牡」、「交雑種牝」、「ホルスタイン去勢牡」、及び「和牛(黒毛、褐毛和種)去勢牡、ホルスタイン牝、etc.」のいずれの除去率も、90%以上であり、明瞭な差は認められなかった。

D. 考察

1. CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾 (三森)

(1) の実験では、OPZ の 276 mg/kg 投与により肝腫瘍プロモーション作用が引き起こされることが明らかになった。AhR gene battery である Cyp1a1、1a2 や NF-E2-related factor 2 に制御される遺伝子の増加が認められた。しかし、ミクロソーム ROS および TBARS 測定において有意な減少が認められ、さらに 8-OHdG 測定においても顕著な変化は認められなかった。更なる Real-time RT-PCR 解析の結果、Myc の上昇およびその上流にある Raf-1 や MEK2 の増加がみられたことから classical MAP kinase pathway を介した細胞増殖亢進が肝腫瘍プロモーション作用に関与する可能性が示唆された。

(2) の実験では、OPZ と BNF の併用投与群で肝腫瘍プロモーション作用の相加的増加が認められた。real-time RT-PCR 解析においては、AhR gene battery である Cyp1a1、1a2 や Nrf2 に制御される遺伝子が併用投与群で顕著に増加した。今後マイクロアレイによる解析を引き続き行う予定である。

(3) の実験では、OPZ と BNF の併用投与によるイニシエーション作用に対しては明確な修飾作用は誘発されないことが明らかになった。

2. 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索 (渋谷)

本研究で、発がん物質投与早期過程からの分子変動を検討するため、巨大核出現を伴う肝発がん物質及び、巨大核出現を伴わない肝毒性物質の 28 日間投与実験を実施したところ、マイクロアレイ及び免疫組織学的検索で、発がん物質群に特徴的な細胞周期関連分子の発現変動が見出された。

マイクロアレイでは、TAA 群や FB 群といった肝発がん物質群で、細胞周期やアポトーシスに関連した 67 遺伝子の発現上昇が認められ、特に細胞周期に機能する 44 遺伝子の内、G2 期か

ら M 期進行への関与が考えられる遺伝子が半数以上にのぼった。さらに、real-time RT-PCR でもこれらの遺伝子はマイクロアレイ解析結果を反映する mRNA 発現を示し、発がん物質群で細胞周期に特異的な発現変動が認められた。

発がん物質を投与すると、その初期過程から細胞周期関連分子の発現変動が起こることが知られており、さらに最近では G2/M 期付近での分子発現変動が示唆されている。このことより、G2/M 期から M 期進行に関与する分子として Topo II α 、p-Histone H3、HP1 α を候補分子として選出し、Aurora B と合わせて免疫組織学的検索を実施した。その結果、S 期後期から G2/M 期チェックポイントに機能する Topo II α では、発がん物質群で他の群に比して陽性細胞数の増加を示し、その内 2 群で無処置対照群に比して有意な増加を認めた。さらに、M 期進行に関わる分子群では、マイクロアレイ解析より発現上昇を認めた Aurora B を含め、p-Histone H3、HP1 α でも Topo II α と同様に発がん物質群で陰性対照群に比して陽性細胞数の増加を認めた。無処置対照群との比較では、Aurora B で発がん物質 2 群に、p-Histone H3 で発がん物質 3 群に、HP1 α で発がん物質 1 群に有意な増加を示した。特に発がん物質群の多くで有意な増加を示した p-Histone H3 は、M 期において Aurora B にリン酸化活性化され姉妹染色分体の接着を不安定化することから、肝臓の発がん物質投与早期過程においては G2/M 期のみならず M 期でも特徴的な細胞周期の発現変動が起こる可能性が示唆された。一方、細胞増殖指標である Ki-67 を検索したところ、発がん物質群に特徴的な変動を認めず、細胞増殖性と細胞周期の関連性は明らかに出来なかった。

今回検索した分子は肝臓においても反応性が認められたことより、短期発がん検出に適する分子群であることが見出された。特に遺伝子レベルから蛋白レベルまで発現上昇が認められた Aurora B や、発がん物質群の多くで有意に増加した p-Histone H3 は巨大核を誘発する肝発がん

早期スクリーニングの候補分子となり得る可能性が示唆された。今後、これら分子と共に機能する細胞周期関連分子や、real-time RT-PCR の検証を行った残りの遺伝子の免疫組織学的検索が必要と考えられた。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立 (梅村)

gpt delta ラットを用いた実験において、NFT 投与 4 週目の腎臓の *gpt* MF が対照群に比して有意な高値を示し、その *in vivo* 変異原性が発がん性の報告されているラット腎臓において確認された。また、その代謝物であるヒドラジド誘導体の AHD 群の *gpt* MF が有意の変化とはならなかったものの、NFT 投与群とほぼ同程度の上昇傾向を示したことから、NFT の点突然変異を主体とした *in vivo* 変異原性にはヒドラジド誘導体が関与していることが強く示唆された。一方で、欠失変異を検出する *Spi* assay においては、NFT 群と代謝物 AHD および NFA 群のいずれの群も対照群と比べて有意な変化は認められなかった。

ニトロフラン類は、ヒドロキシルラジカルを発生させ酸化的 DNA 損傷を誘発することが考えられている。また一方、ヒドラジド類のアミノ基がアミノ基転移酵素により活性化体となり、DNA 付加を形成することも予想されている。今回認められた NFT の *in vivo* 変異原性には AHD の関与が示唆されたことから、ヒドラジド類のアミノ基に起因した DNA 付加体形成の可能性が考えられたが、今後、*gpt* 変異体のスペクトラム解析、13 週目の腎臓を用いた *gpt* アッセイさらには酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの解析を通して、NFT の *in vivo* 変異原性の機序解明を進める予定である。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

第 1 頸神経から第 9 胸神経の背根神経節が除去されやすいのは、硬膜から背根神経節までの背根の長さが短いことと、背根神経節がある

程度大きいことに起因すると思われる。

また、牛の品種別及び牝牝別の除去率に差は認められなかった。

E. 結論

1. CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾 (三森)

OPZ276 mg/kg をラットに投与した肝二段階発がんモデルでは、OPZ は肝腫瘍プロモーション作用が存在することが明らかとなり、そのプロモーション機序には酸化ストレスは関与せず、classical MAP kinase pathway を介した細胞増殖亢進がその肝腫瘍プロモーションに関与する可能性が示唆された。

OPZ 及び BNF の併用投与においては、併用投与群で肝腫瘍プロモーション作用の相加的増加が認められた。一方、併用投与によりイニシエーション作用に顕著な修飾作用は認められなかった。

2. 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索 (渋谷)

巨大核を起点とした肝発がん早期スクリーニング指標の確立を目的として、発がん物質に特徴的な細胞周期関連分子の発現変動が見出された。特に、M 期関連分子である Aurora B や p-Histone H3 が発がん物質投与早期過程から発現変動を認めたことより、肝臓において M 期関連分子が発がん早期スクリーニングの指標となり得る可能性が示唆され、これら分子のスクリーニング候補分子としての有用性が提示された。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立 (梅村)

ニトロフラン類の化学構造に依存した発がん機序を探ることを目的として、ニトロフラン類の NFT とその代謝物を用いて雄ラット腎臓の *in vivo* 変異原性試験を行った。その結果、投与 4 週目で、NFT の *in vivo* 変異原性が明らかとなった。また、その機序には、代謝物であるヒドラジド誘導体 AHD が深く関与する可能性

が示唆された。

4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 (九郎丸)

2010年3月から2011年2月までに得られた試料について、背根神経節の脊柱からの除去率を調べたところ、平均92%であった。除去率の極端に低い第10~第12胸神経の背根神経節の除去率が向上しない限り、前方3/4の背根神経節の完全除去達成は困難である。

また、牛の品種別及び牝牝別の脊柱からの背根神経節の除去率を比較検討したが、いずれも除去率に差は見られなかった。

牛の脊柱をゼラチンや牛エキスの原材料として利用するためには、と畜場において背根神経節が完全に脊柱から分離されなければならないが、現在までのところ、除去率はその状況には達していない。今後、さらなる除去技術の改良が必要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

林仁美、剣持明、嶋本敬介、嶋本敬介、谷合枝里子、盛田怜子、石井雄二、鈴木和彦、渋谷淳、三森国敏：オメガアラゾールのラット肝発がん促進作用機序に関する分子病理学的解析、第27回毒性病理学会、大阪、2011年1月

谷合枝里子、土屋卓磨、黒岩有一、林仁美、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：巨大核出現を伴う腎発がん物質の28日間投与時でのラット腎尿管における細胞周期関連分子の発現挙動、第27回日本毒性病理学会学術集会、大阪、2011.1.27-28

谷合枝里子、土屋卓磨、黒岩有一、林仁美、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：巨大核出現を伴う腎発がん物質の28日間投与ラットの腎尿管における細胞周期関連分子の発現変化、平成22年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、滋賀、2011.2.3-4

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

畜水産食品における動物医薬品等の安全性確保に関する研究 —CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾—

研究代表者 三森 国敏 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究要旨

動物薬の一部には、肝発がん過程に活性酸素種（ROS）が関与するものがあることが明らかにされている。それらの中には CYP1A を誘導する物質（CYP1A inducer）も含まれている。本研究ではこれらの CYP1A inducer の同時暴露により、肝発がんイニシエーションないしプロモーション作用がどのように修飾されるかを明確にする。動物薬として胃酸分泌阻害剤である omeprazole (OPZ)、また強い CYP1A inducer として β -naphthoflavone (BNF) を用いた。6 週齢の雄性 F344 ラットを用いた。(1) プロモーション機序解明実験： diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週間後にプロモーターとして OPZ 138 mg/kg を 1 日 1 回、6 週間強制経口投与した。OPZ 投与 1 週間後に 2/3 部分肝切除 (PH) を行った。(2) 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験：DEN を腹腔内投与し、2 週間後に OPZ 138 mg/kg ないし 276 mg/kg 1 日 1 回強制経口投与、BNF 0.125% ないし 0.25% 混餌投与、OPZ 138 mg/kg 及び BNF 0.125% の同時併用投与を 6 週間行った。プロモーター投与 1 週間後に PH を行った。(3) 併用投与によるイニシエーション修飾作用の実験： OPZ 138 mg/kg、276 mg/kg 1 日 1 回強制経口投与、BNF 0.125% ないし 0.25% 混餌投与、OPZ 138 mg/kg 及び BNF 0.125% の同時併用投与 1 週間後に PH を施し、12 時間後にイニシエーターとして 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を単回投与した。PH 2 週間後から 2-acetylaminofluorene の混餌投与を 10 日間行い、さらに開始 3 週間後には四塩化炭素を強制経口投与し、実験開始 6 週間後に剖検を行った。投与終了後採取した肝臓について、病理組織学的検索、免疫組織学化学的解析、遺伝子の発現変動解析及び酸化的損傷マーカーの測定を行った。その結果、(1) の実験では、OPZ 276 mg/kg 投与により肝腫瘍プロモーション作用が誘発されることが明らかとなり、classical MAP kinase pathway を介した細胞増殖亢進が肝腫瘍プロモーションに関与する可能性が示唆された。(2) の実験では、OPZ 及び BNF 併用投与群で GST-P 陽性巢の数及び面積の有意な増加が認められ、併用投与により肝腫瘍プロモーション作用が相加的に増加することが示された。一方、(3) の実験では、併用投与によるイニシエーション作用に顕著な変化は認められなかった。

A. 研究目的

動物薬の一部には、肝発がん過程に活性酸素種（ROS）が関与するものがあることが明らかにされている。それらの中には CYP1A を誘導する物質（CYP1A inducer）も含まれている。消費者は、種々の動物薬や農薬等が残留している食品を毎日微量ではあるが摂食していることから、本研究ではこれらの CYP1A inducer の同時摂取により、肝発がんイニシエーションないしプロモーション作用がどのように修飾されるかを明確にする。

オメプラゾール（omeprazole、OPZ）は、プロトンポンプ（ H^+ 、 K^+ -ATP）インヒビターであり、胃酸分泌阻害剤として広く使用されており、CYP1A1/2 inducer としても知られている。その

有効性から、ヒトにおいては消化不良や消化性潰瘍、胃食道逆流性疾患、Zollinger-Ellison 症候群の治療に用いられている。また、馬においては胃潰瘍の治療にも用いられている。

OPZ の安全性評価に関しては、いくつかの動物を用いた毒性試験報告がなされている。げっ歯類における急性毒性は低く、経口摂取における LD_{50} は 4g/kg 以上である。発がん性試験においては、ラットに胃のカリチノイドが誘発されるが、これは胃酸分泌阻害による高ガストリン血症により ECL 細胞の過形成が引き起こされることに起因することが明確となっている。一方、肝臓においては、138 mg/kg 投与群（雌）で腫瘍性結節の発生頻度の増加が認められている。

OPZはCYP1A inducerであること、また発がん性試験において、肝臓に腫瘍性結節の増加が認められたことから、肝腫瘍プロモーション作用を有する可能性が示唆されることから、本研究では、OPZの肝腫瘍プロモーション作用の有無を明らかにし、そのメカニズム解析を行った。さらに強いCYP1A inducerとして知られる β -naphthoflavone (BNF)と併用投与することで、肝発がんイニシエーションないしプロモーション作用がどのように修飾されるか(相乗作用的な影響が発現するか否か)を検索した。

B. 研究方法

6週齢の雄性F344ラットを用い、以下の実験を実施した。(1)プロモーション機序解明実験：イニシエーターであるdiethylnitrosamine (DEN)を腹腔内投与し、2週間後にプロモーターとしてOPZ 138 mg/kgを1日1回6週間強制経口投与した。OPZ投与1週後に2/3部分肝切除(PH)を行った。(2)併用投与によるプロモーション修飾作用の実験：DENを腹腔内投与し、2週間後にOPZ 138 mg/kgないし276 mg/kg1日1回強制経口投与、BNF 0.125%ないし0.25%混餌投与、OPZ138 mg/kg及びBNF 0.125%の同時併用投与を6週間行った。プロモーター投与1週間後にPHを行った。(3)併用投与によるイニシエーション修飾作用の実験：OPZ 138 mg/kgないし276 mg/kg1日1回強制経口投与、BNF 0.125%ないし0.25%混餌投与、OPZ138 mg/kg及びBNF 0.125%の同時併用投与1週後にPHを施し、12時間後にイニシエーターとして2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)を単回投与した。PH2週間後から2-acetylaminofluorene混餌投与を10日間行い、さらに開始3週間後には四塩化炭素を強制経口投与し、実験開始6週間後に剖検を行った。投与期間終了後、エーテル麻酔下にて放血致死させ、肝臓を採取し、重量測定を行った。一部の肝臓は遺伝子発現解析・生化学的解析用に分取し、液体窒素で急速凍結した後、検索まで-80°C

に保存した。また病理組織学的・免疫組織化学的検索用に10%緩衝ホルマリン固定した後パラフィン包埋を行った。

組織学的検索は、固定生検材料を常法に従いパラフィン包埋及び薄切後にヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。さらに、ラット肝増殖性病変に陽性を示すGlutathione-S-transferase placental form (GST-P)並びに細胞増殖活性マーカーであるproliferating cell nuclear antigen (PCNA)の免疫組織化学染色による観察を実施した。

遺伝子発現解析では、各群1例ずつ抽出しマイクロアレイを実施した。さらにそのデータをもとにmRNAについて、各群6例ずつreal-time RT-PCR法(補正は内部標準遺伝子である β アクチンを用いて実施)を用いて定量解析した(Table 1)。また、肝DNAについては、HPLC-ECD法により酸化DNA損傷指標である8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)レベルを測定した。肝臓から抽出したタンパクについては、ミクロソーム分画まで単離した後、NADPH依存性の活性酸素種(ROS)産生能を測定した。さらに脂質過酸化の指標であるthiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)を測定した。

統計解析は、対照群とOPZ投与群との間でF検定を行い、等分散の場合はStudent *t*検定を、不等分散の場合はAspin-Welch *t*検定をそれぞれ実施し、有意水準5%以下を有意差ありとした。また対照群とOPZ/BNF投与群との間では、等分散の場合はDannett検定を、不等分散の場合はSteel検定をそれぞれ実施し有意水準5%以下を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究は、投与実験は混餌による経口投与が主体であり、また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育管理に当たっては、国立大学法人東京農工大学の実験動物取り扱い倫理規定及び米国国立衛生研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関する

ガイドラインに従った。

C. 研究結果

(1) プロモーション機序解明実験: DEN+OPZ 投与群において、投与1週間後から体重増加抑制が認められ、剖検時の最終体重は DEN+OPZ 投与群で有意に低値を示した。DEN+OPZ 投与群では、肝臓の絶対重量及び相対重量が有意に増加した (Table 1)。病理組織学的には、DEN+OPZ 投与群で、肝臓において、瀰漫性肝細胞肥大ならびに好酸性、明細胞性及び好塩基性肝細胞から構成される変異肝細胞巣の発生頻度が増加した。免疫組織学的には、DEN+OPZ 投与群で、GST-P 陽性巣の数及び面積の有意な増加が認められ、PCNA 染色においても同様な結果が認められた (Table 1)。マイクロアレイ解析では、DEN+OPZ 投与群で、DEN 群に比べ2倍以上増加/減少した遺伝子は 119/241 個であった。このうち増加したものに注目し Real-time RT-PCR にて解析を行った (Table 2)。その結果、AhR gene battery である Cyp1a1, 1a2, Ugt1a6, Ald1a1 及び NF-E2-related factor 2 に制御される Gstm1, Gpx2, Yc2 等の増加が認められた。細胞内における ROS 発生源の一つとして、単離肝ミクロソームからの NADPH 依存性 ROS 産生能の測定、過酸化脂質の指標である TBARS 測定、DNA 損傷の指標である 8-OHdG 測定を行った (Figure 1)。NADPH 添加における ROS 産生量は、DEN+OPZ 群において有意に減少し (Fig. 1A)、TBARS 測定においても同様な結果が認められた (Figure 1B)。8-OHdG 測定においては、有意な差は認められなかった (Figure 1C)。更なるメカニズム解析のため、Real-time RT-PCR を行った。その結果、DEN+OPZ 投与群で、Myc、Raf-1、Map2k2 の有意な増加が認められた (Table 2)。

(2) 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験: 剖検時の最終体重は、DEN+OPZ 投与群、DEN+BNF 投与群、DEN+OPZ+BNF 投与群で、有意に減少した (Table 3)。肝臓の絶対重量及び相

対重量も同様に有意に増加した (Table 3)。免疫組織学的には、DEN+OPZ 投与群、DEN+BNF 投与群、DEN+OPZ+BNF 投与群で、GST-P 陽性巣の数及び面積の有意な増加が認められ、PCNA 染色においても同様な結果が認められた (Table 3)。さらに併用投与群においては、それぞれ単剤を投与した群よりも相加的な増加が認められた。Real-time RT-PCR 解析においては、薬剤投与群で AhR gene battery である Cyp1a1, 1a2, Ugt1a6, Ald1a1 及び NF-E2-related factor 2 に制御される Gstm1, Gpx2, Yc2 等の増加が認められ、さらに併用投与群で、相加的な増加が認められた (Figure 4)。

(3) 併用投与によるイニシエーション修飾作用の実験: 剖検時の最終体重は、顕著な差は認められなかった。肝臓の絶対重量においては、DEN+0.25%BNF 投与群で有意な増加が認められ、相対重量においては、DEN+0.25%BNF 投与群及び併用投与群において有意な増加が認められた。免疫組織学的には、DEN+0.125%BNF 投与群で、GST-P 陽性巣の数及び面積の有意な増加が認められたが、他の群では認められなかった。

D. 考察

(1) の実験では、OPZ の 276 mg/kg 投与により肝腫瘍プロモーション作用が引き起こされることが明らかになった。酸化的ストレスに注目し解析を行った結果、AhR gene battery である Cyp1a1, 1a2 や NF-E2-related factor 2 に制御される遺伝子の増加が認められた。しかし、ミクロソーム ROS および TBARS 測定において有意な減少が認められ、さらに 8-OHdG 測定においても顕著な変化は認められなかったことから、OPZ の肝腫瘍プロモーション作用には酸化ストレス以外の関与が考えられた。更なる Real-time RT-PCR 解析の結果、Myc の上昇およびその上流にある Raf-1 や MEK2 の増加がみられたことから classical MAP kinase pathway を介した細胞増殖亢進が肝腫瘍プロ

モーション作用に関与する可能性が示唆された。

(2)の実験では、OPZ と BNF の併用投与群で肝腫瘍プロモーション作用の相加的増加が認められた。real-time RT-PCR 解析においては、AhR gene battery である Cyp1a1、1a2 や Nrf2 に制御される遺伝子が併用投与群で顕著に増加した。今後マイクロアレイによる解析を引き続き行う予定である。

(3)の実験では、OPZ と BNF の併用投与によるイニシエーション作用に対しては明確な修飾作用は誘発されないことが明らかになった。

E. 結論

OPZ276 mg/kg をラットに投与した肝二段階発がんモデルでは、OPZ は肝腫瘍プロモーション作用が存在することが明らかとなり、そのプロモーション機序には酸化ストレスは関与せず、classical MAP kinase pathway を介した細胞増殖亢進がその肝腫瘍プロモーションに関与する可能性が示唆された。

OPZ 及び BNF の併用投与においては、併用投与群で肝腫瘍プロモーション作用の相加的増加が認められた。一方、併用投与によりイニシエーション作用に顕著な修飾作用は認められなかった。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

林仁美、剣持明、嶋本敬介、嶋本敬介、谷合枝里子、盛田怜子、石井雄二、鈴木和彦、渋谷淳、三森国敏：オメプラゾールのラット肝発がん促進作用機序に関する分子病理学的解析、第 27 回毒性病理学会、大阪、2011 年 1 月

Table 1 Changes in body weights, liver weights, and GST-P positive foci, and PCNA positive hepatocytes in the liver of male F344 rats given OPZ for 6week after DEN initiation.

Group	DEN	DEN + OPZ
Final body weight (g)	274.2 ± 13.1	261.6 ± 16.8*
Absolute liver weight (g)	8.35 ± 0.46	10.52 ± 0.87**
Relative liver weight (g/100g body weight)	3.06 ± 0.15	4.02 ± 0.18**
GST-P positive foci (≥0.2 mm)		
Number (number/cm ²)	2.65 ± 1.08	5.77 ± 2.46**
Area (mm ² /cm ²)	0.2 ± 0.14	0.41 ± 0.18**
PCNA-positive cells (%)	1.68 ± 0.87	3.8 ± 1.94##

DEN: *N*-diethylnitrosamine, OPZ: Omeprazole. The data represent mean ± S.D.

*, **: significantly different from the DEN control ($p < 0.05$, 0.01 , Student's *t*-test).

##: significantly different from the DEN control ($p < 0.01$, Aspin-Welch's *t*-test).

Table 2 Real-time RT-PCR analysis of livers in male F344 rats given OPZ for 6 weeks after DEN-initiation.

Accession no.	Gene description	Gene symbol	DEN	DEN+OPZ 276 mg/kg
Ahr and Nr2 transcripts				
NM_013149	aryl hydrocarbon receptor	AhR	1.01 ± 0.13	2.62 ± 0.27**
NM_010902	Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	Nrf2	1.03 ± 0.25	0.97 ± 0.25
Phase I drug metabolizing enzymes				
NM_012540	Cytochrome P450, family 1, subfamily am polypeptide 1	Cyp1a1	1.08 ± 0.49	1163.82 ± 1311.16##
NM_012540	Cytochrome P450, family 1, subfamily am polypeptide 2	Cyp1a2	1.00 ± 0.08	8.79 ± 4.10##
NM_022407	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	Ald1a1	1.32 ± 0.29	4.17 ± 1.44##
NM_057105	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6, transcript variant 2	Ugt1a6	1.02 ± 0.2	2.59 ± 0.27**
NM_017000	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Nqo1	1.01 ± 0.14	5.08 ± 1.55##
Phase II drug metabolizing enzymes				
NM_020540	Glutathione S-transferase, mu 1	Gstm1	1.04 ± 0.31	3.70 ± 1.60**
NM_183403.2	Glutathione peroxidase 2	Gpx2	1.05 ± 0.34	9.59 ± 3.54**
X78847	Glutathione S-transferase Yc2 subunit	Yc2	1.09 ± 0.53	11.90 ± 3.48##
NM_013215	Aldo-keto reductase family 7, member A3	Akr7a3	1.09 ± 0.53	6.78 ± 3.01**
NM_012600.2	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	Me1	1.01 ± 0.15	2.39 ± 0.53##
NM_053840	gamma-glutamyltransferase 1	Ggt1	1.04 ± 0.16	3.23 ± 0.09##
MAP kinase pathway family related genes				
NM_012603	myelocytomatosis oncogene	Myc	1.03 ± 0.29	6.79 ± 5.02#
NM_012639.2	v-raf-leukemia viral oncogene 1	Raf-1	1.00 ± 0.01	1.40 ± 0.13**
NM_133283	mitogen activated protein kinase kinase 2	Map2k2	1.01 ± 0.16	1.25 ± 0.09**

DEN: *N*-diethylnitrosamine, OPZ: Omeprazole. The data represent mean ± S.D.

a) Expression level / (β-actin)

*, **: significantly different from the DEN control ($p < 0.05$, 0.01 , Student's *t*-test).

##: significantly different from the DEN control ($p < 0.01$, Aspin-Welch's *t*-test).

Table 3 Changes in body weights, liver weights, GST-P positive foci, and PCNA positive hepatocytes in the liver of male F344 rats given OPZ/BNF for 6week after DEN initiation or OPZ/BNF for one week before MeIQx initiation.

Group	DEN	DEN+OPZ 138 mg/kg	DEN+OPZ 276 mg/kg	DEN+0.125%BNF	DEN+0.25%BNF	DEN+OPZ138mg/kg +BNF0.125%
OPZ/BNF promotion assay						
No. of animals	12	12	12	9	12	12
Final body weight (g)	276.2 ± 11.4	258.9 ± 11.9**	255.6 ± 14.8**	267.6 ± 11.7	260.7 ± 14.8*	229.3 ± 19.1**
Absolute liver weight (g)	8.36 ± 0.53	9.32 ± 0.67##	10.12 ± 0.84##	10.44 ± 0.91##	11.23 ± 0.89##	12.26 ± 1.64##
Relative liver weight (g/100g body weight)	3.03 ± 0.24	3.60 ± 0.22##	3.98 ± 0.15##	3.90 ± 0.22##	4.31 ± 0.18##	5.35 ± 0.99##
GST-P positive foci (≥0.2 mm)						
Number (number/cm ²)	3.02 ± 1.91	4.47 ± 1.65	5.78 ± 2.18**	7.05 ± 1.45**	7.30 ± 2.45**	10.66 ± 2.76**
Area (mm ² /cm ²)	0.19 ± 0.12	0.37 ± 0.27	0.42 ± 0.20#	0.57 ± 0.20##	0.58 ± 0.31##	0.82 ± 0.34##
PCNA-positive cells (%)	0.20 ± 0.21	0.22 ± 0.22	0.48 ± 0.24*	0.30 ± 0.17	0.37 ± 0.12	0.70 ± 0.38**
OPZ/BNF initiation assay						
No. of animals	12	11	12	11	12	11
Final body weight (g)	235.4 ± 8.4	233.0 ± 9.2	232.3 ± 10.9	237.0 ± 10.0	234.5 ± 7.3	231.6 ± 10.5
Absolute liver weight (g)	9.14 ± 0.53	9.37 ± 0.52	9.26 ± 0.62	9.73 ± 0.84	9.87 ± 0.27##	9.59 ± 0.69
Relative liver weight (g/100g body weight)	3.58 ± 0.13	3.59 ± 0.10	3.61 ± 0.12	3.68 ± 0.19	3.80 ± 0.13##	3.61 ± 0.11#
GST-P positive foci (≥0.2 mm)						
Number (number/cm ²)	1.55 ± 1.21	0.82 ± 0.61	1.89 ± 2.62	3.61 ± 2.01#	3.07 ± 2.57	2.03 ± 1.86
Area (mm ² /cm ²)	0.04 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.11	0.13 ± 0.10#	0.16 ± 0.23	0.07 ± 0.12

DEN: *N*-diethylnitrosamine, OPZ: Omeprazole, BNF: β -naphthoflavone. The data represent mean \pm S.D.

*, **: significantly different from the DEN control ($p < 0.05, 0.01$, Dunnett test).

##: significantly different from the DEN control ($p < 0.01$, Steel test).

Table 4 Real-time RT-PCR analysis of livers in male F344 rats given OPZ/BNF for 6 weeks after DEN-initiation.

Gene symbol	DEN	DEN+OPZ 138 mg/kg	DEN+OPZ 276 mg/kg	DEN+0.125%BNF	DEN+0.25%BNF	DEN+OPZ 138 mg/kg+0.125%BNF
Phase I drug metabolizing enzymes						
Cyp1a1	1.19 ± 0.67	158.19 ± 197.79 ^{##}	138.19 ± 120.20 ^{##}	2842.87 ± 824.82 ^{##}	3357.84 ± 831.00 ^{##}	3138.85 ± 579.83 ^{##}
Cyp1a2	1.01 ± 0.18	6.50 ± 1.95 ^{##}	27.79 ± 4.53 ^{##}	42.91 ± 6.37 ^{##}	52.03 ± 11.37 ^{##}	52.03 ± 11.37 ^{##}
Akl1a1	1.08 ± 0.52	3.50 ± 0.92 ^{##}	3.67 ± 1.45 [#]	1.25 ± 0.12	1.98 ± 0.39 [#]	2.30 ± 0.64 [#]
Ugt1a6	1.03 ± 0.25	1.86 ± 0.35 ^{##}	1.71 ± 0.50 [#]	1.62 ± 0.18 [#]	2.45 ± 0.54 ^{##}	3.85 ± 0.86 ^{##}
Nqo1	1.03 ± 0.29	2.54 ± 0.88 ^{##}	2.81 ± 0.75 ^{##}	5.40 ± 0.58 ^{##}	10.10 ± 2.85 ^{##}	16.86 ± 3.37 ^{##}
Phase II drug metabolizing enzymes						
Gstm1	1.06 ± 0.42	4.32 ± 3.05 [#]	3.08 ± 0.77 [#]	2.75 ± 1.04 [#]	7.75 ± 3.60 ^{##}	16.25 ± 12.67 ^{##}
Yc2	1.00 ± 0.10	1.73 ± 0.36 ^{##}	1.73 ± 0.27 ^{##}	1.26 ± 0.18 [#]	1.60 ± 0.25 ^{##}	2.42 ± 0.60 ^{##}
Akr7a3	1.01 ± 0.17	3.28 ± 1.03 ^{##}	4.78 ± 2.18 ^{##}	1.88 ± 0.71 ^{##}	3.25 ± 1.20 ^{##}	5.75 ± 3.77 ^{##}
MAP kinase pathway family related genes						
Myc	1.03 ± 0.26	2.59 ± 1.15	3.00 ± 1.18 [#]	1.10 ± 0.43	1.50 ± 0.52	3.15 ± 1.62 ^{##}

DEN: *N*-diethylnitrosamine, OPZ: Omeprazole, BNF: β -naphthoflavone. The data represent mean \pm S.D.

[#], ^{##}: significantly different from the DEN control ($p < 0.05$, 0.01 , Steel test).

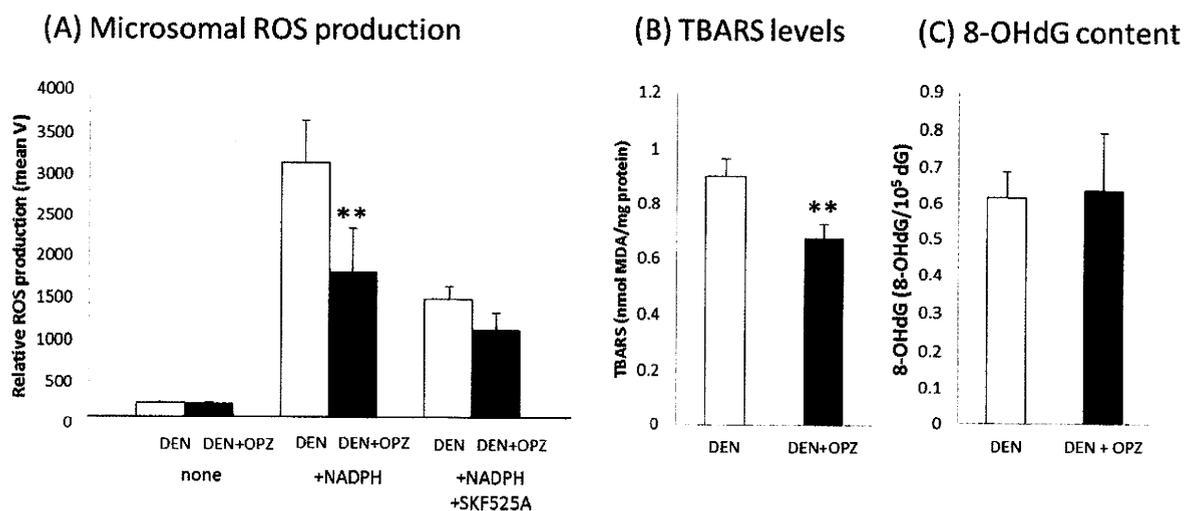


Figure 1 Contents of ROS production, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in the liver of rats given DEN control (white) and 276 mg/kg OPZ (black) for 6 weeks after DEN initiation. (A) NADPH-dependent microsomal ROS production examined by the fluorescent probe H₂DCFDA. Each column represents the mean \pm S.D. Left panel: without NADPH treatment; middle panel: with NADPH treatment; right panel: with NADPH and SKF525A treatment in the pooled fraction. (B) TBARS levels: TBARS level in the DEN+OPZ group is significantly lower than that in the DEN control group. (C) 8-OHdG content: There is no significant change in 8-OHdG between the DEN control and DEN+OPZ groups. **: $p < 0.01$ significantly different from the DEN control group (student *t*-test).

畜水産食品における動物用医薬品等の安全性確保に関する研究

巨大核出現に關与する標的遺伝子の探索

研究分担者 渋谷 淳 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 准教授

研究要旨

肝臓を標的とした巨大核出現を伴う発がん物質のラットに対する 28 日間短期投与試験を行い、網羅的遺伝子発現解析の結果得られた G2/M 期の細胞周期関連分子を中心とした候補分子について、免疫組織学的な陽性細胞分布の検索を行った。マイクロアレイ解析の結果、発現変動遺伝子の半数以上が G2 期から M 期に機能する細胞周期関連分子であることが見出され、real-time RT-PCR にて発現変動が検証された。またマイクロアレイデータから見出された M 期分子の Aurora B やその他の G2 期から M 期に機能する分子の免疫組織学的検索を実施した結果、Aurora B は発がん物質群で無処置対照群に比して陽性細胞の有意な増加を示し、G2/M 期チェックポイントに關与する Topo II α や M 期関連分子の p-Histone H3、HP1 α も発がん物質群で少なくとも 1 群以上で陽性細胞の増加を示すことが確認された。特に、p-Histone H3 は発がん物質群に特異性が高かった。以上より、巨大核出現を伴う肝発がん物質を用いた検索で、M 期異常を反映すると考えられる分子変化が見出され、M 期分子の発現解析がこれらの発がん物質の早期スクリーニング指標になり得る可能性を示唆した。

A. 研究目的

動物用医薬品等の化学物質の発がん性評価手法であるゲッ菌類を用いた発がん性試験は、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題があり、短期発がん検出系の確立が求められている。殊に評価上問題となることの多い非遺伝毒性発がん物質に関しては、多数の発がん標的に共通する検出の手立てがなく、有効な手法開発が望まれている。一方、ラットやマウスの肝臓ないし腎臓に発がん性を及ぼす化学物質の短期投与で、腫瘍性病変とは異なる巨大核の出現がしばしば見出されており、ゲノムの異数性を反映し、発がん好発部位に一致して、投与期間と共に増加することより、巨大核の出現に至る細胞内の分子過程に発がんの鍵となるものが存在する可能性が強く示唆されている。さらに、National Toxicology Program (NTP) で行われた発がん性試験では、肝発がん性を示す物質の特徴として、ラットなどの亜急性毒性試験等において、肝重量増加、肝細胞過形成と変性、異数性・倍数性、チトクローム P450 酵素誘導の所見が多ければ多いほど、肝発がん性の陽性頻度が高くなることが報告されている (Allan et al., 2004)。これらのことより、本研究では、肝発がん初期過程を与える可能性の高い巨大核出現に關連する分子標的の同定を目的として、NTP report で肝発が

ん性と共に核の巨大化を示すことが報告されている複数の発がん物質を陽性対照として、Allan らの報告の criteria を満たす動物薬を選択して、28 日間の短期投与試験を実施した。

出現した巨大核はゲノムの異数性を示し、遺伝子傷害の蓄積あるいは核分裂機構の障害を反映した前がん病変と位置付ける研究者もいる (Brown et al., 2007; Adler et al., 2009)。このような核異常は非遺伝毒性腎発がん物質でも誘発されるため、核分裂機構の障害を誘発するような分子メカニズムの中に、遺伝子の直接傷害をせずに、間接的に染色体の不安定化を図って発がんに至らしめるものが存在している可能性が高い。また巨大核の出現は、腎臓や大腸等の他の臓器の発がん過程でも見出され (Adler et al., 2009; Williams et al., 2002)、広く発がんとの関連性が指摘されている (Lankoff et al., 2002)。さらに最近では G2/M 期付近での細胞周期関連分子の発現変動が示唆されている。そこで、本研究では肝臓におけるマイクロアレイ解析より、発がん物質特異的に発現変動する細胞周期関連遺伝子群を同定し、そのデータを基にした免疫組織学的検索に対応可能な分子を選別する。

B. 研究方法

動物実験