

実験デザインを Fig. 1 に示す。6週齢の雄性 F344 ラット（日本 SLC 株式会社）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）、 $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate（ANIT; 1000 ppm, 混餌）を選択し、無処置対照群も設定した。28 日間の投与終了後全生存動物（70 匹 : N=10 匹 \* 7 群）をエーテル深麻酔下にて放血屠殺して肝臓を採取し、重量を測定後、各葉に分割した。外側左葉と内側右・左葉は血管走行に直角して 2 分割し、門脈側半分をメタカーン固定液にて 4°C で 2~5 時間固定した。残りの半分を 4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液（PFA）にて 84 時間固定し、常法に従いパラフィン包埋、薄切後ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を作製し、光学顕微鏡下にて巨大核の出現を確認した。また、外側左葉と内側右・左葉以外の葉より、遺伝子・蛋白解析用に 1500 mg 採材し、使用時まで -80°C で保存した。

#### マイクロアレイ解析

PFA 固定した肝組織の HE 染色切片を光学顕微鏡下で観察し、巨大核の出現、炎症や胆管増生等の反応性変化を定性評価した。発がん物質投与群では、核の巨大化が顕著な 2 群を選別し、無処置対照群 1 群と合わせて計 3 群を選別した。さらに各群で炎症反応などの反応性変化の少ない 4 個体を採択し、マイクロアレイ解析に供した。各個体の採取したサンプルより RNeasy Mini Kit（QIAGEN, Germany）により total RNA を抽出後、NimbleGen Arrays User's Guide に従って cDNA 合成を行った。得られた cDNA は、遺伝子発現マイクロアレイ（4x72K Catalog Arr Del, NimbleGen, USA）を用い、Innoscan700（Inopsys, France）にて

シグナルデータを取り込んで定量後、GeneSpring GX 10（Agilent Technologies, USA）を用いて解析を行った。方法としては、各データの normalization を行い、遺伝子発現の相同性が高い 4 サンプル中 3 サンプル以上（FB: N=3, Co, TAA: N=4）を選択し、無処置対照群に比して 2 倍以上発現上昇を示した遺伝子を選別した。

#### Real-time RT-PCR 解析

マイクロアレイ解析に用いた各群 4 個体と、HE 染色の定性評価で新たに選択された 2 個体の計 6 個体を real-time RT-PCR 解析に供した。採取したサンプルより RNeasy Mini Kit（QIAGEN, Germany）により total RNA を抽出後、real-time RT-PCR を行った。抽出した total RNA は吸光度計を用いて定量し、得られた total RNA 2  $\mu$ g について cDNA を合成した。全ての PCR 反応は Power SYBR Green I Chemistry（Applied Biosystems Japan, Tokyo）を用い、50°C, 2 分のインキュベーション後、95°C, 10 分および 95°C, 15 秒, 45 サイクルおよび 60°C, 1 分の条件下、Step one Plus（Applied Biosystems Japan）にて行った。各遺伝子のプライマリストを Table 1 に示す。各プライマーは Primer Express 3.0 Software（Applied Biosystems Japan）を用い、製造元の手順書に従って設計を行った。各遺伝子の mRNA 発現は、無処置対照群の発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である ACTB、Hprt、GAPDH の検量線を求め、相対定量法にて算出した。

#### 免疫組織学的検索

免疫組織化学的検索として、採取した肝臓の外側左葉と内側右・左葉を PFA 固定後、エタノール系列で脱水、パラフィン包埋した後、薄切し、一部は HE 染色を施した。免疫組織学的検索については、次の手順で行った。Ki-67 については、脱パラフィン処理した肝組織切片を、内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3%過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、10 mmol/l クエ

ン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、オートクレーブ 121°C 10 分間にて反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて正常ウマ血清でブロックし、マウス抗 Ki-67 抗体 (50 倍希釈; Dako, Denmark) を用いて 4°C で一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories; 米国) を用い、3,3'-ジアミノベンジジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。さらに Topoisomerase II alpha (Topo II  $\alpha$ )、Aurora B、p-Histone H3、HP1  $\alpha$  の免疫組織学的解析については、次の手順で行った。脱パラフィン処理した肝組織切片を、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) に浸漬し、Topo II  $\alpha$  及び Aurora B はオートクレーブ 121°C 10 分間、p-Histone H3 及び HP1  $\alpha$  はマイクロウェーブ 90°C、10 分間にて反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3% 過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、正常ヤギ血清でブロックし、ウサギ抗 Topo II  $\alpha$  抗体 (200 倍希釈; Epitomics, USA)、ウサギ抗 Aurora B 抗体 (200 倍希釈; Abcam, UK)、ウサギ抗 p-Histone H3 抗体 (50 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA) 及びウサギ抗 HP1  $\alpha$  抗体 (200 倍希釈; Cell Signaling Technology, USA) を用いて一晩反応させた。次いで二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories; 米国) を用い、3,3'-ジアミノベンジジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

#### 統計解析

統計解析としては、体重及び肝重量の結果については、無処置対照群に比して各群の Student's/Welch's t-test を行った。免疫組織学的検索については、無処置対照群に比して全群の Dunnett/Steel test を行った。マイクロアレイの結果については Student's t-test を行った。全ての統計解析は、有意水準 5% 以下を有意差ありとした。

(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。

#### C. 研究結果

##### 体重および肝臓重量の変化

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 (Table 2)。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 (Table 2)。

##### マイクロアレイによる遺伝子発現変動のプロファイリング

マイクロアレイ解析により、無処置対照群に比して 2 倍以上発現上昇を示した遺伝子 (FB&TAA 群共に有意に上昇: 62 probes; FB 群有意に上昇, TAA 群上昇傾向: 146 probes; TAA 群有意に上昇, FB 群上昇傾向: 691 probes)、同様に発現減少を示した遺伝子 (FB&TAA 群共に有意に低下: 93 probes; FB 群有意に減少, TAA 群減少傾向: 252 probes; TAA 群有意に減少, FB 群減少傾向: 579 probes) を見出した (Fig. 2)。これらの遺伝子の中から、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抽出した結果、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 (Table 3)。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 (Table 3)。

## 細胞周期関連遺伝子の mRNA 発現検証

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 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。その結果、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蔵性コントロール下でも有意な高値を認め、FB 群でも内蔵性コントロール 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 (Table 4)。

## 候補分子の局在解析

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  $\alpha$  及び、Aurora B 以外の M 期関連分子の p-Histone H3 と HP1  $\alpha$  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  $\alpha$  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 (Fig. 3)。

## D. 考察

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ラットを用いた 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。

マイクロアレイ解析では、TAA 群や FB 群等の

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 期進行に機能す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  $\alpha$ 、p-Histone H3、HP1  $\alpha$  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  $\alpha$  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で発現上昇を認めた Aurora B を含め、p-Histone H3、HP1 $\alpha$  でも Topo II  $\alpha$  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 $\alpha$  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では G2/M 期というよりは、M 期異常を反映すると思われる細胞周期の発現変動が起こることが見出された。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ならなかった。

今回検索した M 期分子は、短期肝発がん性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。

#### E. 結論

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 期分子である Aurora B や p-Histone H3 の陽性細胞が増加したことから、肝臓において M 期異常を反映すると考えられる分子変化が見出され、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が示唆された。

#### 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

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細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細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

なし

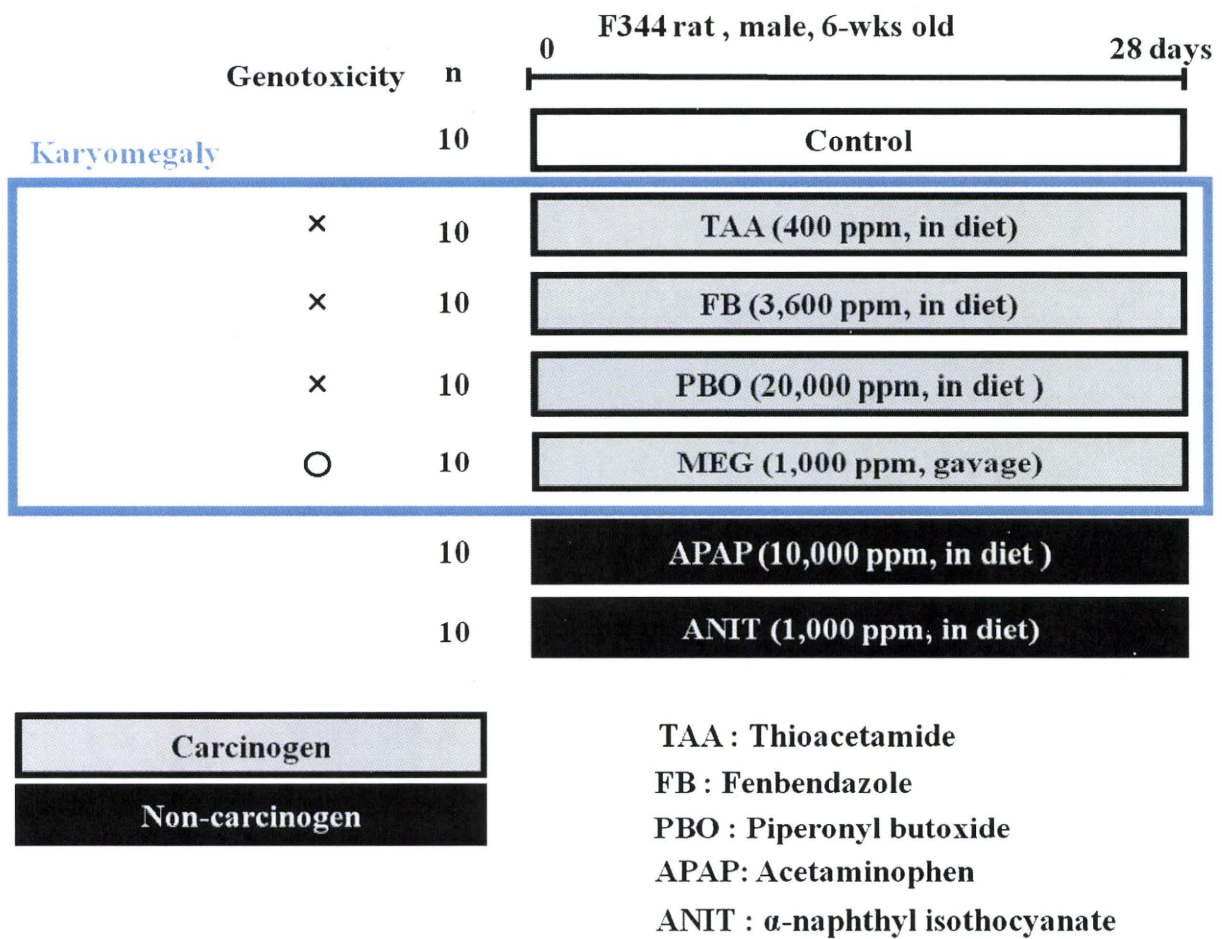


Fig. 1. Experimental design

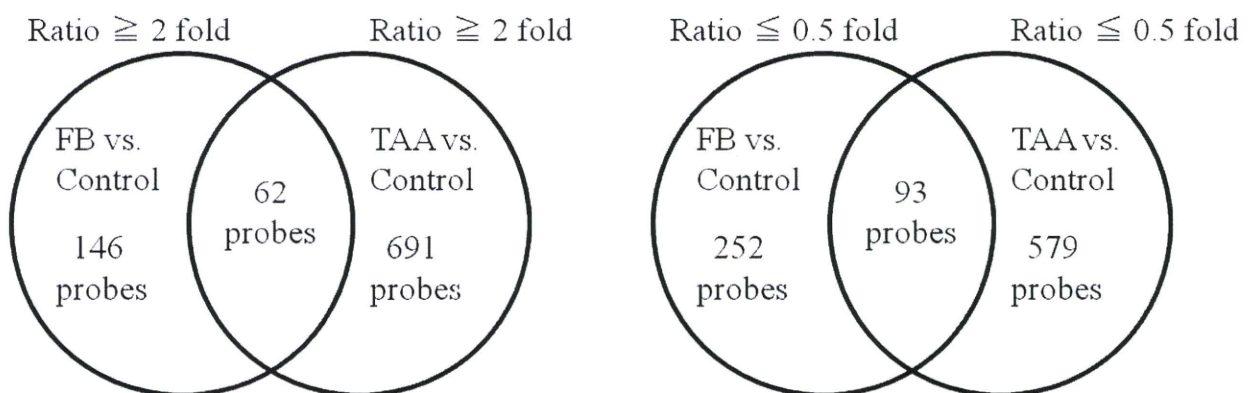
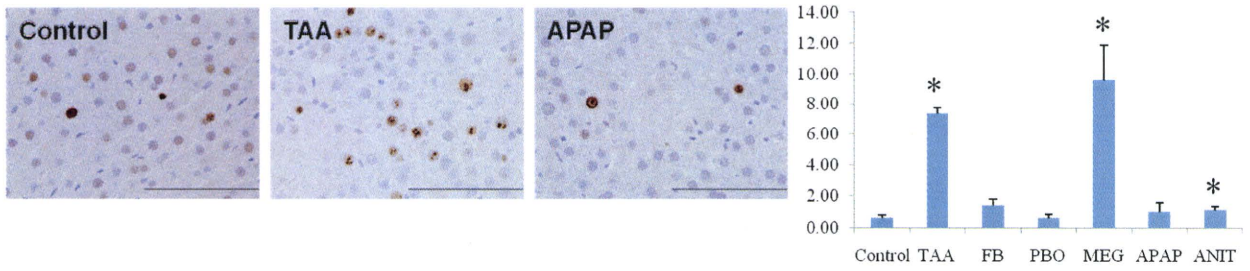
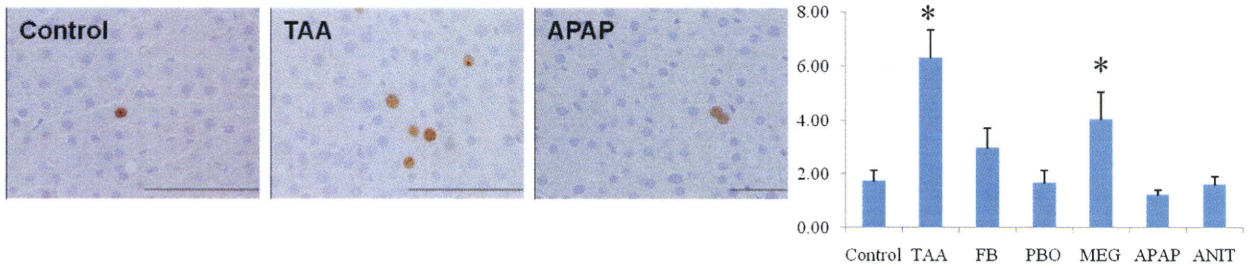


Fig. 2. Venn diagram of probes showing increased (left) or decreased (right) signals in FB group or TAA group compared with control group.

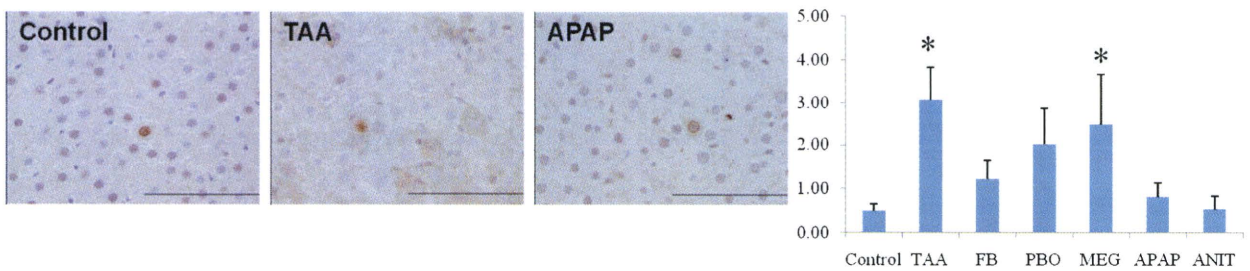
(A) Ki-67



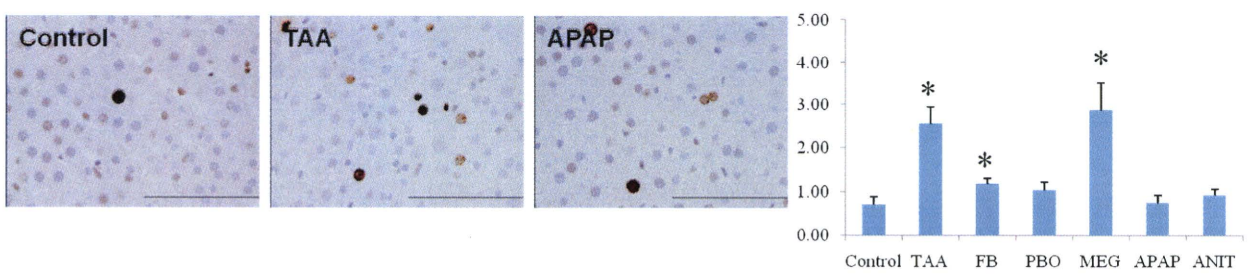
(B) Topo II  $\alpha$



(C) Aurora B



(D) p-Histone H3



(E) HP1  $\alpha$

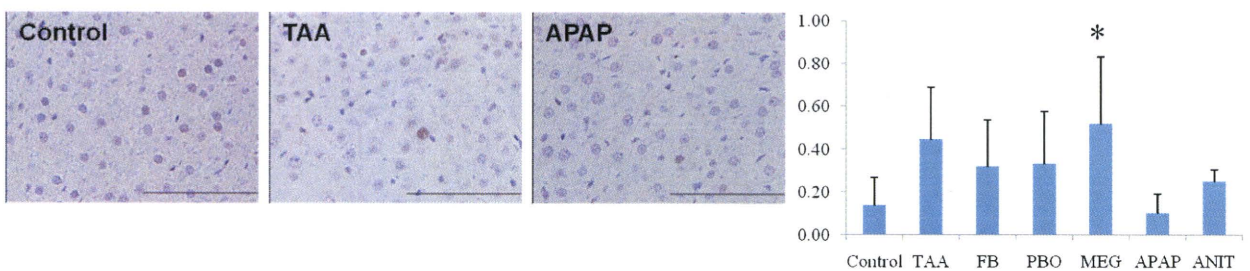


Fig.3 Immunohistochemical distribution of Ki-67, Topo II  $\alpha$ , Aurora B, p-Histone H3 and HP1  $\alpha$  in the liver after 28-day-treatment with liver carcinogens or toxicants. (A) Ki-67; (B) Topo II  $\alpha$ ; (C) Aurora B; (D) p-Histone H3; (E) HP1  $\alpha$ . (A) ~ (E) Bar = 100  $\mu$  m \*, \*\*:  $p < 0.05$ ,  $0.01$  vs. Control group (Dunnet/Steel test).

Table 1. Sequence of primers used for real-time RT-PCR analysis.

Accession no.	Symbol	Forward primer	Reverse primer
NM_130812	Cdkn2b	CCCTCACCAGACCTGTGCAT	CAGGCGTCACACACATCCA
NM_171992	Ccnd1	GCGAGCCATGCTTAAGACTGA	CCCTCTGCACGCACTTGA
NM_053702	Ccna2	TGTCTCTGGTGGGTTGAGAAGA	ACCACAGCATGCCAACAG
XM_001064075	Ccne2	TCTCCACAAGAAGCCCAGATAATT	GGTGATCTCCTCTGTTCCTTTTTTG
NM_001025682	Cdr2	CAAGGCCTCACAGCAGAAAATC	GAGGTGATCAATGTTGGTTTTGC
NM_001012742	Wee1	CGGCAAACCTCCTCAAGTGAATATT	CACTGTCCTGAGGAATGAAGCAT
NM_001107790	Tpx2	CCCAAGAGACCACCTGTTAAGC	ACTCTCGCTCATGAATTCGTTTCT
NM_024127	Gadd45a	CACCATAACTGTCGGCGTGTA	GGCACAGGACCACGTTGTC
NM_019296	Cdc2	GGTCGCCAGAGGTGTTGCT	TCTGCAAATATGGTCCCCTATGCT
NM_171991	Cenb1	TGTCCACACGGAAGAATCTCT	GGCCACGGTTCACCATGA
NM_053749	Aurkb	CGGATGCATAATGAGATGGTAGAT	TCCCACCATCAGTTCATAGC
NM_153296	Aurka	AAGAGAGTCATCCACAGAGACATCAA	CGATCTTCAACTCCCCATTG

Table 2. Body and liver weights of rats after 28-day-treatment with liver carcinogens or toxicants.

Group	No. of animals examined	Final body weight (g)	Abusolute liver weight (g)	Relative liver weight (g/100g BW)
Control	10	210 $\pm$ 16.00	7.93 $\pm$ 0.87	3.68 $\pm$ 0.17
TAA	10	141 $\pm$ 13.00 **	7.08 $\pm$ 0.87 *	4.94 $\pm$ 0.24 **
FB	10	208 $\pm$ 14.00	8.62 $\pm$ 0.68	4.04 $\pm$ 0.14 **
PBO	10	164 $\pm$ 10.00 **	11.89 $\pm$ 0.77 **	7.16 $\pm$ 0.18 **
MEG	10	175 $\pm$ 13.00 **	10.09 $\pm$ 0.89 **	5.68 $\pm$ 0.31 **
APAP	10	173 $\pm$ 9.00 **	7.17 $\pm$ 0.55 *	4.07 $\pm$ 0.15 **
ANIT	10	111 $\pm$ 5.00 **	6.43 $\pm$ 0.44 **	5.70 $\pm$ 0.21 **

Each quantitative value represents mean  $\pm$  S.D.

Significantly different from control : \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  (Aspin-Welch or Student's t-test)

Table 3. List of genes showing up- or down-regulation common to FB and TAA groups or TAA group alone in the liver ( $\geq 2$ -fold,  $\leq 0.5$ -fold).

Accession No.	Gene title	Symbol	FB	TAA
<i>Up-regulated (67 genes)</i>				
NM_130812	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	Cdkn2b	1.4	2.5 *
NM_001007754	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	Rassf1	1.1	2.4 *
XM_001078275	G-2 and S-phase expressed 1	Gtse1	2.2	* 14.5 *
NM_001025693	cell division cycle associated 7	Cdca7	1.3	7.7 *
NM_171992	cyclin D1	Cend1	1.2	2.5 *
NM_199092	origin recognition complex, subunit 4-like (yeast)	Orc4l	1.3	2.5 *
NM_001033690	origin recognition complex, subunit 6 like (yeast)	Orc6l	1.2	2.2 *
NM_080782	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cdkn1a	1.3	6.0 *
NM_053702	cyclin A2	Ccna2	1.0	2.3 *
XM_001064075	cyclin E2	Ccne2	1.2	3.9 *
XM_001061676	CDC45 cell division cycle 45-like ( <i>S. cerevisiae</i> )	Cdc45l	1.2	2.9 *
NM_001008321	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	Gadd45b	1.1	2.7 *
NM_001025682	cerebellar degeneration-related 2	Cdr2	1.8	5.9 *
NM_001012742	wee 1 homolog ( <i>S. pombe</i> )	Wee1	1.4	6.4 *
NM_001107790	TPX2, microtubule-associated, homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	Tpx2	1.3	3.2 *
NM_001007648	cell division cycle associated 3	Cdca3	1.2	2.9 *
NM_024127	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Gadd45a	1.3	2.5 *
XM_001064064	similar to Fgfr1 oncogene partner	LOC683722	1.2	3.5 *
NM_001008882	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	Uhrf1	1.0	2.7 *
XM_001074823	similar to NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	LOC690209	1.4	2.4 *
XM_001058264	claspin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	Clspn	1.3	2.3 *
XM_001055166	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	Nek2	2.1	2.1 *
XM_001077474	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	Spc24	2.4	* 4.7 *
NM_019296	cyclin-dependent kinase 1	Cdc2	1.3	2.5 *
NM_171991	cyclin B1	Ccnb1	1.5	4.2 *
NM_053749	aurora kinase B	Aurkb	1.3	4.0 *
XM_001074188	inner centromere protein	Incenp	1.6	3.4 *
NM_017100	polo-like kinase 1 ( <i>Drosophila</i> )	Plk1	1.0	3.2 *
NM_001009470	cyclin B2	Ccnb2	1.4	2.4 *
NM_153296	aurora kinase A	Aurka	1.3	2.2 *
XM_001065116	kinesin family member 2A	Kif2a	1.0	4.8 *
NM_001017470	centrosomal protein 70kDa	Cep70	1.1	2.9 *
XM_001069485	centromere protein A	Cenpa	1.1	2.7 *
XM_001080790	cancer susceptibility candidate 5	Casc5	1.7	2.7 *
XM_001073486	discs, large ( <i>Drosophila</i> ) homolog-associated protein 5	Dlgap5	1.4	2.7 *
NM_001014215	centromere protein Q	Cenpq	1.5	2.3 *
XM_001070442	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 - like	Ercc6l	1.2	2.1 *
XM_001065873	F-box protein 5	Fbxo5	1.5	2.1 *
NM_001012035	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)	Cdkl2	2.8	2.1 *
NM_001008278	CDKN2A interacting protein N-terminal like	Cdkn2aipnl	1.0	3.1 *
XM_001068286	cell division cycle associated 2	Cdca2	1.3	5.1 *



Table 3. Continued

NM_001009654	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	SpC25	1.1	5.7	*
NM_019191	SMAD family member 2	Smad2	1.2	2.8	*
Accession No.	Gene title	Symbol	FB	TAA	
XM_573992	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	Cks2	1.4	2.1	*
XM_001056221	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Mki67	2.4	* 2.4	*
NM_139087	cell growth regulator with EF hand domain 1	Cgref1	2.9	* 12.3	*
NM_181086	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	Tnfrsf12a	2.2	8.5	*
XM_001065985	similar to Tumor necrosis factor receptor superfamily member 23 precursor (Tumor necrosis factor receptor p60 homolog 1) (TNF receptor family member SOB) (Decoy TRAIL receptor 1) (TNF receptor homolog 1)	LOC683447	1.1	5.7	*
NM_012923	cyclin G1	Ccng1	1.2	6.2	*
XM_001073260	similar to apoptosis signal-regulating kinase 1	RGD1306565	2.5	* 2.2	*
XM_214551	cell death-inducing DFFA-like effector a	Cidea	3.8	* 5.2	*
XM_001064302	apoptosis enhancing nuclease	Aen	1.5	5.4	*
NM_012912	activating transcription factor 3	Atf3	1.0	4.2	*
XM_001069338	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	Tnfrsf10b	1.3	4.0	*
NM_199103	inhibitor of kappaB kinase gamma	Ikkbg	1.6	2.3	*
XM_001052977	cell cycle associated protein 1	Caprin1	1.1	2.2	*
NM_171988	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	Bcl2l11	1.0	2.1	*
XM_001080981	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)	Mdm2	1.2	7.9	*
XM_001080941	tumor protein p53 binding protein 1	Tp53bp1	1.4	2.1	*
XM_001064938	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	Map3k6	1.0	5.8	*
XM_001065644	SMEK homolog 1, suppressor of mek1 ( <i>Dictyostelium</i> )	Smek1	1.5	3.2	*
XM_001058485	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	Map4k4	1.4	2.9	*
NM_133578	dual specificity phosphatase 5	Dusp5	1.6	2.5	*
NM_021835	Jun oncogene	Jun	1.7	4.4	*
XM_001075705	similar to NFkB interacting protein 1	LOC686781	1.5	3.8	*
NM_134465	cytokine receptor-like factor 2	Crlf2	1.1	2.1	*
NM_001005384	oncostatin M receptor	Osmr	1.2	2.1	*
<i>Down-regulated (16 genes)</i>					
NM_175582	inhibitor of DNA binding 4	Id4	0.5	0.4	*
XM_001081824	anaphase promoting complex subunit 11	Anapc11	0.8	0.5	*
NM_031507	epidermal growth factor receptor	Egfr	0.8	0.4	*
NM_057138	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Cflar	0.9	0.5	*
NM_139258	Bcl2 modifying factor	Bmf	0.6	0.2	*
NM_145681	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Tnfsf10	1.0	0.4	*
XM_001075880	apoptosis-associated tyrosine kinase	Aatk	0.6	0.4	*
NM_133314	STEAP family member 3	Steap3	0.7	0.5	*
XM_001063870	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	Tp53inp2	0.8	0.4	*
NM_001077640	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	Gadd45g	0.7	0.2	*
NM_053703	mitogen-activated protein kinase kinase 6	Map2k6	0.4	0.3	*
NM_012842	epidermal growth factor	Egf	0.9	0.2	*
NM_001034164	signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	0.4	* 0.3	*
NM_017020	interleukin 6 receptor	Il6r	0.8	0.4	*
NM_058208	suppressor of cytokine signaling 2	Socs2	0.7	0.4	*
NM_139116	interleukin 11 receptor, alpha chain 1	Il11ra1	0.7	0.4	*

\* Significantly different from the Control group : P<0.05 (Student's t-test calculated by GeneSpring).

Table 4. Validation of microarray data by real-time RT-PCR

Gene symbol	FB			TAA				
	Microarray	Real-time RT-PCR normalized to			Microarray	Real-time RT-PCR normalized to		
		ACTB	Hprt	GAPDH2		ACTB	Hprt	GAPDH2
Cdkn2b	1.44	2.03± 0.57 <sup>c</sup>	1.60± 0.56 <sup>b</sup>	1.60± 0.34 <sup>b</sup>	2.52	<sup>a</sup> 4.32± 0.20 <sup>c</sup>	3.07± 0.56 <sup>c</sup>	5.86 ± 0.62 <sup>c</sup>
Ccnd1	1.15	1.79± 0.48	1.48± 0.47	1.34± 0.52	2.54	<sup>a</sup> 2.73± 0.52 <sup>c</sup>	1.96± 0.38 <sup>c</sup>	3.77 ± 0.76 <sup>c</sup>
Ccna2	1.01	1.56± 0.52 <sup>b</sup>	1.26± 0.51	1.37± 0.80	2.26	<sup>a</sup> 3.06± 0.61 <sup>c</sup>	2.22± 0.54 <sup>c</sup>	4.20 ± 0.83 <sup>c</sup>
Ccne2	1.24	1.48± 0.33 <sup>b</sup>	1.16± 0.21	1.23± 0.45	3.94	<sup>a</sup> 6.60± 2.11 <sup>c</sup>	4.69± 1.53 <sup>c</sup>	8.92 ± 2.74 <sup>c</sup>
Cdr2	1.75	1.44± 0.25 <sup>c</sup>	1.13± 0.26	1.30± 0.78	5.90	<sup>a</sup> 7.94± 2.01 <sup>c</sup>	5.57± 1.35 <sup>c</sup>	10.72± 2.83 <sup>c</sup>
Wee1	1.38	1.18± 0.54	0.95± 0.29	1.16± 1.05	6.38	<sup>a</sup> 4.99± 2.83 <sup>c</sup>	3.68± 1.90 <sup>c</sup>	7.24 ± 3.88 <sup>c</sup>
Tpx2	1.31	1.16± 0.28	0.94± 0.26	0.99± 0.34	3.18	<sup>a</sup> 3.38± 0.28 <sup>c</sup>	2.45± 0.36 <sup>c</sup>	4.81 ± 0.67 <sup>c</sup>
Gadd45a	1.29	1.60± 0.62 <sup>b</sup>	1.20± 0.38	1.27± 0.61	2.54	<sup>a</sup> 2.76± 0.80 <sup>c</sup>	1.89± 0.21 <sup>c</sup>	3.70 ± 1.46 <sup>c</sup>
Cdc2	1.31	1.64± 0.44 <sup>b</sup>	1.32± 0.44	1.34± 0.52	2.52	<sup>a</sup> 2.69± 0.61 <sup>c</sup>	1.89± 0.34 <sup>c</sup>	3.68 ± 0.94 <sup>c</sup>
Ccnb1	1.47	1.57± 0.50	1.29± 0.41	1.31± 0.38	4.16	<sup>a</sup> 2.28± 0.59 <sup>c</sup>	1.68± 0.49 <sup>c</sup>	3.24 ± 0.78 <sup>c</sup>
Aurkb	1.28	1.34± 0.21 <sup>b</sup>	1.07± 0.25	1.19± 0.55	4.03	<sup>a</sup> 2.75± 0.65 <sup>c</sup>	1.94± 0.33 <sup>c</sup>	3.82 ± 1.03 <sup>c</sup>
Aurka	1.32	1.27± 0.27	1.01± 0.20	1.11± 0.40	2.22	<sup>a</sup> 2.85± 0.42 <sup>c</sup>	2.05± 0.31 <sup>c</sup>	4.06 ± 0.60 <sup>c</sup>

ACTB, actin, beta; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Values are mean ± standard deviation (n=6) with the expression level in the Control group set as 1.

a Significantly different from the Control group : P<0.05 (Student's t-test calculated by GeneSpring).

b Significantly different from the Control group : P<0.05 (Aspin-Welch or Student's t-test).

c Significantly different from the Control group : P< 0.01 (Aspin-Welch or Student's t-test).

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  
分担課題：ニトロフラン類の安全性評価法の確立

研究分担者 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 第一室長

## 研究要旨

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ることで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。

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。今後、さらに投与 13 週目の腎臓で同解析を行うとともに、酸化ストレスマーカーの解析を加え、NFT の発がん機序解明を進める。

## A. 研究目的

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、ニトロフラゾンやフラゾリドンなど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ることで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。

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、雄のラット腎臓において発がん性の報告がある (NTP, 1989) ニトロフラントイン (NFT) とその代謝物を用いて *in vivo* 変異原性試験を行った。

## B. 研究方法

## 1. 動物ならびに飼育条件

動物は5週齢の *gpt delta* ラット雄40匹を SLC 社（静岡）より購入し、CRF-1 固形基礎飼料（オリエンタル酵母工業株式会社；東京）と蒸留水で約1週間馴化飼育した後、各群10匹ずつ4群に配した。動物の飼育はバリエーションシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、室温  $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時間、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。動物はポリカーボネード製箱型ケージに5匹ずつ収容し、床敷には三協ラボサービス株式会社（東京）のソフトチップを用い、週2回交換した。馴化飼育の後、各被験物質を  $0.5\text{w/v}\%$  メチルセルロース 400（MC；和光純薬；大阪）に懸濁させ、テフロン製ディスポーサブルラット用経口ゾンデを用いて、13週間強制経口投与を行った。また、対照群には、MCのみを13週間経口投与させた。

## 2. 被験物質ならびに投与量

ニトロフランチン（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）はシグマアルドリッチジャパン（東京）より購入した。

NFTの投与濃度は、混餌投与による2年間のラット発がん性試験で雄の腎臓に発がん性が認められた用量を強制経口投与での用量に換算し、 $125\text{ mg/kg bw}$  に設定した。また代謝物 AHD および NFA については経口投与による動物実験の報告がなかったため、上記 NFT 投与量と同モルの用量を基準に2週間の予備試験を実施し、そこで明らかとなった最大耐量である AHD： $80\text{ mg/kg bw}$ 、NFA： $50\text{ mg/Kg bw}$  をそれぞれ設定し

た。

## 3. 観察ならびに検索方法

### 3-1. 一般状態の観察

投与期間中は一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量を週1回測定した。動物は投与開始から4週目および13週目に各群5匹ずつ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血し、屠殺・剖検した。剖検時には、肉眼的観察した後、腎臓、肝臓、胃を摘出し、諸臓器の一部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、残りを液体窒素で凍結した後、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

### 3-2. 血液生化学的検査

採血後に分離した血清を凍結後、尿素窒素（BUN）、クレアチン（CRN）、アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アラニントランスアミナーゼ（ALT）およびアルカリフォスタファアーゼ（ALP）について SRL 社（東京）に依頼し、測定した。

### 3-3. 病理学的検査

10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した諸臓器は、常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

### 3-4. *in vivo* 変異原性試験

腎臓の高分子 DNA を、Recover Ease DNA Isolation Kit（Stratagene, La, Jolla, CA）を用いて抽出し、Transpack Packaging Extract（Stratagene）を用いて  $\lambda\text{EG10}$  フェージに感染させた。この腎 DNA パッケージングサンプルを用いて *gpt* ならびに  $\text{Spi}^+$  assay を行った。

*gpt* assay については、これまでに報告されている方法に従って行った。(Nohmi, *et al*, 1996) 確認された全ての *gpt* 突然変異体は、シーケンス解析を行い、同じ動物個体間で一致する変異体は1つとしてカウントした。*gpt* 遺伝子突然変異体頻度 (*gpt* MF) は、6 TG 耐性コロニーの数で除算して算出した。変異体の *gpt* 遺伝子配列はタカラバイオ社 (滋賀) に依頼し解析を行った。

*Spi* assay については、これまでに報告されている方法に従って行った。(Masumura *et al*, 2002) 確認された *Spi* 表現型のプラークを採取した後、緩衝液に懸濁し、XL-1 Blue MRA, XL-1 Blue MRA P2 および WL95 P2 の3つの系統の菌を撒いたプレート上にスポットした。3つ全てのプレートにおいて鮮明なプラークを有したものを、*Spi* 突然変異体として、カウントした。

### 3-5. 統計学的処理方法

体重、血液生化学的検査結果、臓器相対重量および突然変異体頻度については、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、例数が等しければ Dunnett 型で、また、例数が異なれば Scheffe 型で、それぞれ対照群と被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

## C. 研究結果

### 1. 一般状態および死亡動物

NFT 群で投与3週目と5週目に1例ずつ、

NFA 群で3週間に1例、死亡動物が認められた。

### 2. 体重および摂餌量

体重の推移を Fig.1 に示す。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。摂餌量の推移を Fig. 2 に示す。摂餌量は、NFT および NAF 群で対照群よりやや低値で推移を示したが、全ての群において、約7~15g の間での推移であった。

### 3. 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Table. 1 に示す。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。

### 4. 臓器重量

臓器実重量および相対重量の結果を Table. 2 に示す。投与4週目では、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。

## 5. 病理組織学的検査

病理組織学的所見については、腎臓、肝臓および胃の病理組織標本を作製し、現在検索中である。

## 6. *In vivo* 変異原性試験

投与 4 週目の腎臓における *gpt* 突然変異頻度 (*gpt* MF) を Table.3 に示す。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。なお、*gpt* 遺伝子変異体のシーケンス解析結果については、現在検索中である。

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。

## D. 考察

今回、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 *in vivo* 変異原性試験を行った。NFT に関しては、雄ラットの腎臓に発がん性を有することが報告されており、また、Big Blue マウスを用いた *in vivo* 変異原性試験においても、腎臓において陽性の結果が報告されている (Philippe, *et al*, 2006)。今回実施した *gpt delta* ラットを用いた実験においても、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。

また、今回の実験で認められたその他の変化としては、NFT 群および代謝物 NFA 群において、体重増加抑制が認められ、死亡動物も NFT 群で 1 例、NFA 群で 2 例認められた。さらに、投与 13 週目の腎臓および肝臓の相対重量において、NFT 群および NFA 群で有意な増加が認められ、NFT の毒性発現には化合物中のニトロフラン骨格の存在が重要である可能性が考えられた。

ニトロフラン類は、その代謝過程において、ニトロフランのニトロ基が最終的にアミンに代謝される過程で、ニトロアニオンラジカル、ヒドロキシルアミンラジカルさらにはヒドロキシルアミンを生成することから、これらが起因となり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。

また次年度では *p53* ならびに *nrf2* 遺伝子

欠損 *gpt delta* マウスを用いて、DNA 修飾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。

#### E. 結論

今回、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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

G-1. 学会発表

G-2. 発表論文

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fig.1 Body weight

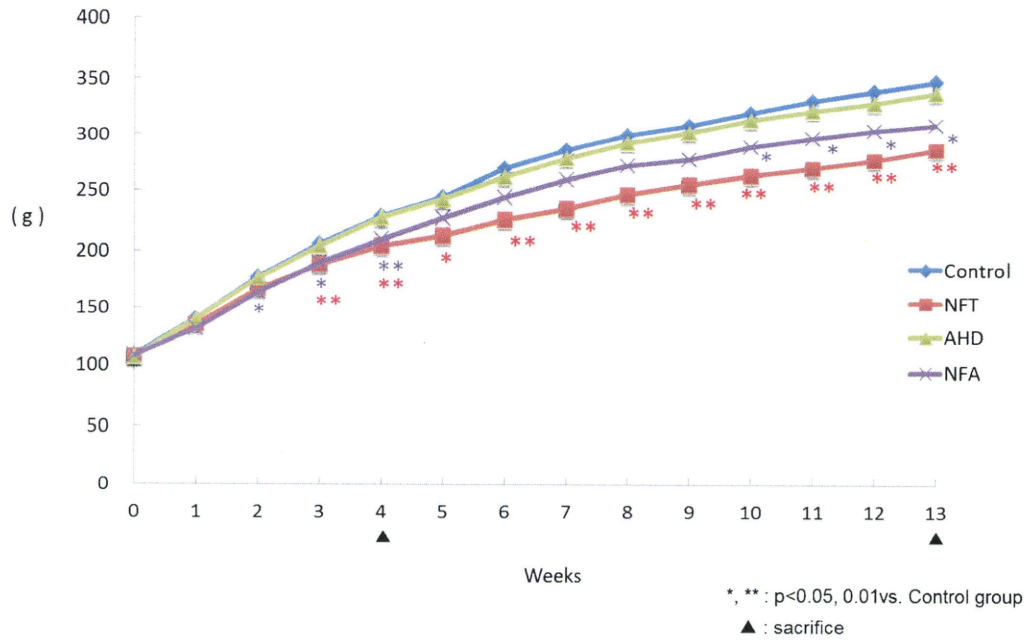


Fig.2 Food consumption

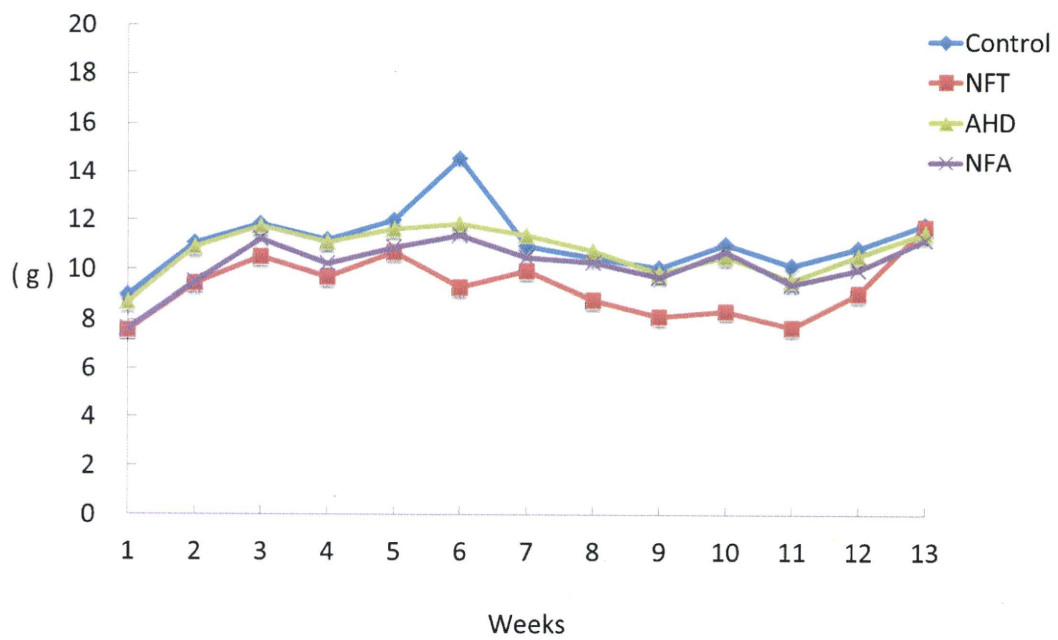




Table. 1 Serum biochemical data

Item	BUN (mg / dL)	CRN (mg / dL)	AST (IU / L)	ALT (IU / L)	ALP (IU / L)
<b>4weeks</b>					
Control	19.9 ± 1.4	0.25 ± 0.01	96 ± 16	45 ± 12	1279 ± 68
NFT	19.2 ± 2.0	0.24 ± 0.01	81 ± 8	35 ± 4	1272 ± 183
AHD	17.5 ± 0.9 *	0.24 ± 0.01	77 ± 6 *	43 ± 3	1249 ± 45
NFA	15.8 ± 1.3 **	0.23 ± 0.01 *	68 ± 5 **	30 ± 2 *	1080 ± 101
<b>13weeks</b>					
Control	21.2 ± 1.3	0.34 ± 0.01	88 ± 7	59 ± 7	781 ± 20
NFT	20.8 ± 2.0	0.28 ± 0.02 **	74 ± 7 *	40 ± 5 **	710 ± 54
AHD	21.4 ± 1.3	0.31 ± 0.02	79 ± 6	50 ± 6	746 ± 63
NFA	20.1 ± 0.9	0.28 ± 0.01 **	66 ± 4 **	37 ± 3 **	644 ± 22 **

a : Mean ± S.D      \*, \*\*: p<0.05, 0.01vs. Control group

Table.2 Organ weights

	BW	Liver	Kidney
<b>4weeks</b>			
<u>Absolute (g)</u>			
Control	223 ± 7 <sup>a</sup>	8.2 ± 0.6	1.5 ± 0.1
NFT	202 ± 13	7.5 ± 0.8	1.5 ± 0.1
AHD	228 ± 9	8.6 ± 0.6	1.5 ± 0.1
NFA	207 ± 19	7.8 ± 0.8	1.4 ± 0.2
<u>Relative (g%)</u>			
Control		3.7 ± 0.2	0.67 ± 0.04
NFT		3.7 ± 0.1	0.74 ± 0.02
AHD		3.8 ± 0.1	0.67 ± 0.01
NFA		3.8 ± 0.1	0.69 ± 0.02
<b>13weeks</b>			
<u>Absolute (g)</u>			
Control	347 ± 22	10.8 ± 1.2	1.9 ± 0.1
NFT	286 ± 8 **	9.7 ± 0.6	1.9 ± 0.1
AHD	338 ± 26	10.7 ± 0.8	1.9 ± 0.1
NFA	309 ± 12 *	10.6 ± 0.6	1.9 ± 0.1
<u>Relative (g%)</u>			
Control		3.1 ± 0.1	0.54 ± 0.01
NFT		3.4 ± 0.1 **	0.67 ± 0.02 **
AHD		3.2 ± 0.0	0.55 ± 0.03
NFA		3.4 ± 0.1 **	0.62 ± 0.01 **

a : Mean ± S.D      \*, \*\*: p<0.05, 0.01vs. Control group

Table. 3 *gpt* assay ( Kidney ,4weeks )

Treatment	Number of animals	Animal No,	Cm <sup>R</sup> colonies	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant Frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	5	1	1066500	5	0.47	0.20 ± 0.15
		2	1777500	3	0.17	
		3	2754000	2	0.07	
		4	1566000	3	0.19	
		5	1674000	2	0.12	
NFT	4	11	1341000	13	0.97	0.63 ± 0.29 *
		12	1147500	3	0.26	
		14	2394000	15	0.63	
		15	1480500	10	0.68	
AHD	5	21	796500	7	0.88	0.60 ± 0.37
		22	1215000	5	0.41	
		23	2916000	7	0.24	
		24	2205000	8	0.36	
		25	1188000	13	1.09	
NFA	4	31	1629000	3	0.18	0.37 ± 0.32
		32	1422000	5	0.35	
		34	1557000	2	0.13	
		35	1084500	9	0.83	

\*, \*\*: p<0.05, 0.01vs. Control group

Table. 4 *Spi* assay ( Kidney ,4weeks )

Treatment	Number of animals	Animal No,	Plaques within XL-1 Blue MRA	Plaques within XL-1 Blue MRA(P2)	Mutant Frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	5	1	1107000	6	0.54	0.53 ± 0.23
		2	1233000	4	0.32	
		3	1305000	12	0.92	
		4	765000	3	0.39	
		5	657000	3	0.46	
NFT	4	11	1809000	5	0.28	0.46 ± 0.21
		12	1035000	4	0.39	
		14	1440000	11	0.76	
		15	693000	3	0.43	
AHD	5	21	1107000	6	0.54	0.53 ± 0.60
		22	972000	2	0.21	
		23	1332000	2	0.15	
		24	1044000	2	0.19	
		25	702000	11	1.57	
NFA	4	31	864000	3	0.35	0.74 ± 0.60
		32	1170000	7	0.60	
		34	558000	9	1.61	
		35	522000	2	0.38	

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  
－ 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究－

研究分担者 九郎丸 正道 東京大学 教授

研究要旨 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

牛海綿状脳症の特定危険部位である牛の背根（脊髄）神経節は、脊柱管内の奥に位置することから、脊柱からの分離が困難であり、本来安全な脊柱も現在、背根神経節とともに廃棄されている。本研究では、と畜場において前方3/4の背根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有効活用をはかることを目的としている。具体的作業としては、と畜場において脊髄除去後に脊柱に残る硬膜とこれに付随する脊髄神経を、断面となった脊柱管の内側から、背根神経節ができるだけ脊柱に残らないように特殊なナイフで引き剥がし、背根神経節がどの程度硬膜側に残存しているかを算出することによって、前方3/4の脊柱から背根神経節がどの程度除去されているか（除去率）を調べた。さらに、品種別及び牝牝別の除去率についても比較し、除去率に差があるか否か検討した。

## B. 研究方法

1. 牛の脊柱からの背根神経節の除去  
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。

硬膜周辺から脂肪を除去して、付随する背根神経節を明らかにし、頸椎部（C）、胸椎部（T）、及び腰椎部（L）について、脊柱からの背根神経節の除去率を算出した。算出に用いた牛の硬膜は2010年3月から2011年2月までの計238検体である。算出方法は、背根神経節の全体が付随しているものを1とし、背根神経節の大部分が付随しているものを2/3、背根神経節の半分程度が付随しているものを1/2、背根神経節の一部が付随しているものを1/3、背根神経節が全く付随していないものを0として合計し、C1からL3までの背根神経節の数24個（片側）に対する割合を求めた。背根神経節の大きさの判定は、目視によるから必ずしも厳密なものではなく、また、約1/3個分が除

去率の百分率の1%分に相当する。したがって、除去率は小数点以下の数値に意味はないと考え、有効数字は1の位までとした。

## 2. 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

1. と同じ試料、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.」の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. 研究結果と D. 考察

### 1. 牛の脊柱からの背根神経節の除去

月別の除去率は文末及び付表1～12に示した。なお、付表1（2010年3月分）～12（2011年2月分）において、○は背根神経節の全体（1）が付随していたものを表し、□は背根神経節の大部分（2/3）が付随していたものを、△は背根神経節の半分程度（1/2）が付随していたものを、▲は背根神経節の一部（1/3）が付随していたものを、×は背根神経節が全く（0）付随していなかったものを表す。表の最も左の欄の数字は検体番号を示している。また、除去率の月別推移を図1に、神経節毎の除去率を図2に、牛の品種別及び牝牝別の除去率の月別推移を図3に、牛の品種別及び牝牝別の年間を通しての除去率を図4に示した。

背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（図1）。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（図2）。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。

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。

### 2. 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

牛の品種別及び牝牝別に脊柱からの背根神経節の除去率を調べた（図3、4）。「交雑種去勢牝」、「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.」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。各グループ別の除去率は月毎にも調べたが、多少のバラツキはあるものの、どのグループの除去率も概ね90%以上の間で推移した。全体として、各グループ間で除去率に差は生じなかった。

## E. 結論

1. では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。