

201131011A

厚生労働科学研究費補助金  
食品の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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐淵 英機  
平成24(2012)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

鰐渕 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 -----12

鰐渕 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 -----33

魏 民 (大阪市立大学大学院医学研究科 准教授)

3. 中期発がん性試験に関する研究 -----46

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 -----61

辻内 俊文 (近畿大学理工学部生命科学科 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----63

厚生労働科学研究費補助金(食品の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 23 年度総括研究報告書

研究代表者 鰐渕 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 F344 系 *gpt delta* および F344 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。また、ダンマル樹脂による肝細胞がん発生の分子機構をさらに細胞レベルで明らかにする目的で、ラット肝上皮細胞の細胞運動に対するダンマル樹脂の影響を検索した。さらに、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。加えて、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 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、新規マウス肝発がんリスク評価試験法を開発した。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 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、大腸の前がん病変である aberrant crypt foci (ACF) について検討した結果、IQ 投与群で ACF の有意な増加が認められた。甲状腺ではコウジ酸投与群で甲状腺濾胞腺腫の有意な増加が認められ、その他の臓器ではコウジ酸、IQ ともに有意な発がん促進作用は認められなかった。以上より、IQ の大腸発がん促進作用、およびコウジ酸の甲状腺発がん促進作用が見られた。これまでダンマル樹脂、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用も確認されていることから、本試験法は多臓器発がん性試験法として有用であることが明らかとなった (鰐渕)。さらに、*gpt delta* ラットを用いた変異原性試験では、陽性対照物質である IQ は変異原性が確認され、これまでに発がん促進作用が確認されているが遺伝毒性の有無が明らかではないコウジ酸が変異原性を有しないことを明らかにした (魏)。F344 系 *gpt delta* および F344 ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験法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。
- 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の肝発がん促進作用が認められたが、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)。以上より、18 週間多臓器発がん性試験の試験期間の妥当性が確認された。
- 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) 誘発腎腫瘍のプロテオーム解析結果より、腎腫瘍に高発現する GBP2 蛋白の同定に成功した。(鰐渕)。
- ④ ラット肝上皮細胞の細胞運動に対するダンマル樹脂の影響を検索した結果、ダンマル樹脂で処理した細胞では、未処理の細胞に比して有意な細胞運動能の亢進が見られた。本研究結果より、ダンマル樹脂による細胞運動の亢進作用は、ラット肝発がん機序に関与する可能性が示唆された (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、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。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、40 週において肝腫瘍の発生頻度および数の増加を認めず、ダンマル樹脂および IQ の肝発がん促進作用が認められなかった。したがって、この試験法は肝発がん物質検出法として不適切であることが判明した。

- ② *gpt delta* マウス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、ダンマル樹脂はマウスにおいても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 は変異原性が確認された (魏)。
- ③ マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有する気管支肺胞幹細胞 (BASC) の存在が認められたことにより発がん過程早期において BASC の関与が明らかとなり、早期検出のマーカーとして、BASC における Rev1 蛋白の発現変化が指標となる可能性が示唆された。

## 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、遺伝毒性に関しては、*in vitro* の変異原性試験により遺伝毒性の有無が決められてきたが、偽陽性になるものも多く、特異性が低いという点において現状の試験法では問題がある。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。また、ダンマル樹脂による肝細胞がん発生の分子機構をさらに細胞レベルで明らかにする目的で、ラット肝上皮細胞の細胞運動・浸潤能に対するダンマル樹脂の影響を検索した。さらに、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。加えて、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 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。

## 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 *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)

#### 2.2 コウジ酸および IQ の *gpt delta* および 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% に設定した。

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。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日目から第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。

#### [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。

分担報告書参照(魏)

#### [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]

前年度に作製した腎腫瘍サンプルを用いて追加解析を行った。すなわち、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500ppmの濃度で2週間飲水投与した。投与終了後、KBrO<sub>3</sub>を0, 0.02, 2, 8, 30, 125及び500ppm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包埋標本作製し、病理組織学的解析に供した。

#### [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。KBrO<sub>3</sub>が0及び500ppm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。特に今回は、周辺正常組織と比較し、EHEN単独投与で誘発した腫瘍で1.5倍以上増加した蛋白から選別した。

[免疫組織学的解析]

選別したバイオマーカー候補蛋白に対し、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組織染色を行い、その局在を確認した。

## 2.4 ダンマル樹脂のラット肝上皮細胞の細胞運動・浸潤能に及ぼす影響の検討

分担報告書参照（辻内）

## 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 SpiA アッセイを行った。

分担報告書参照（魏）

### 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]

前年度に作製したマウス肺サンプルを用いて追加解析を行った。すなわち、6 週齢 A/J 雌マウス 30 匹を用いて、NTCU 0.01 M/75μl 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による解析を行った。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。また、同実験プロトコルを施行し、投与開始後 1 週及び 4 週においても肺組織のサンプリングを追加した。

[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、扁平上皮分化マーカーである、CK5/6, CK14, CK19,

podoplanin, p63 について検討した。また、BASC における細胞増殖能、扁平上皮分化能及び Rev1 発現を検討するため、BASC マーカーである Sca-1 と Ki67, p63 及び Rev1 の共発現を二重染色法により確認した。

[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 で肺を固定した。その後、各肺葉を分離し、1 mm<sup>3</sup> 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 の中で 37°C、45 分インキュベートした。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

1x10<sup>6</sup> 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 分インキュベート後、洗浄し 7AAD の染色により死細胞の除去を行った後にフローサイトメトリーに供した。

#### 3 細胞分取

フローサイトメトリー (Moflo XDP: ベックマンコールター) を用いて 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供した。

[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、得られたサンプルから各 4μg 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) を用いて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 posi 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 32 週間多臓器短期発がん性試験

[大腸 ACF、MDF 検索]

ACF については、投与群のほうはずかながら増加していたが、有意差は認められなかった。また、4 個以上の crypt からなる大きな ACF に関しても、同様に増加傾向は見られたものの、有意差はなかった。MDF に関しても、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

[病理学的検査]

大腸の腫瘍性病変としては、腺がんと粘液がんが認められた。いずれも各群 0~4 個の発生であり、群間に有意差はなかった。

腎臓では、尿細管異型過形成、管状腺腫、管状腺がんが認められた他、腎芽腫、移行上皮過形成および移行上皮がんが認められた。腎芽腫は 2%投与群において対照群と比較して有意に減少していた。尿細管異型過形成の平均発生個数が、2%投与群で対照群と比較して有意な低値を示していた。

食道の扁平上皮過形成の発生頻度は対照群と比較して有意に減少していた。その他の臓器に関しては、ダンマル樹脂投与群と対照群の間に有意な変化は見られなかった。

#### 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

[肝臓以外の臓器の病理学的検査]

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について検討した結果、DMBDD 単独処置群と比較して DMBDD→2%コウジ酸投与群で Follicular cell adenoma の有意な発生頻度および個数の上昇が認められた。

腎臓の過形成病変および腫瘍性病変の発生

頻度および個数について検討した結果、DMBDD 単独処置群と比較して DMBDD→0.01%IQ 投与群および DMBDD→2%コウジ酸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について検討した結果、DMBDD 単独処置群と比較して、DMBDD→0.01%IQ 投与群および DMBDD→2%コウジ酸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について検討した結果、DMBDD 単独処置群と比較して DMBDD→0.01%IQ 投与群および DMBDD→2%コウジ酸投与群いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

DMBDD 処置群において ACF の定量解析を行った結果、DMBDD 単独処置群と比較して DMBDD→0.01%IQ 投与群において ACF の有意な増加が認められたが、DMBDD→2%コウジ酸投与群では有意な変化を認めなかった。

#### 3. *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について検討した結果、無処置群と比較して 2.0%コウジ酸投与群では有意な変化が認められなかったが、0.01%IQ 投与群で突然変異頻度の有意な増加を認めた。

*gpt* 遺伝子の変異スペクトラムについて検討した結果、無処置群と比較して 2.0%コウジ酸投与群特異的な有意なスペクトラムの変化を認められなかったが、0.01%IQ 投与群では Transversion 変化である G:C to T:A 変化に特異的な有意な変化を認めた。

#### 4. 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%の信頼区間で 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。今回、この中で、1.5 倍以上発現上昇した蛋白に再注目した結果、新たに endoplasmic reticulum protein 29 (2.3 倍), diazepam binding inhibitor (2.0 倍), guanylate binding protein 2, GBP2 (1.9 倍), copine family member IX (1.9 倍), N-myc

downstream regulated 1 (1.8 倍), prosaposin (1.8 倍), homer homolog 3 (1.6 倍)等が同定された。

今回は、その中で良好な染色結果を得られた GBP2 に注目した。GBP2 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陽性を示した。

## 5. ダンマル樹脂のラット肝上皮細胞の細胞運動・浸潤能に及ぼす影響の検討

低濃度のダンマル樹脂で処理した細胞では、未処理の細胞に比して有意な細胞運動能の亢進が見られた。また、ダンマル樹脂で処理した WB-F344 細胞では未処理の細胞に比して Mmp-2 と Mmp-9 の遺伝子発現上昇と Mmp-2 酵素活性の増加が検出された。

## 6. 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

40 週において、ダンマル樹脂投与群で、肝臓における肝腫瘍の頻度および数は DEN 単独投与群に比較して有意に減少した。また、IQ 投与群では肝腫瘍の頻度および数は DEN 単独投与群との間に有意な差は認められなかった。

## 7. 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

*gpt* 遺伝子の突然変異頻度について検討した結果、無処置群と比較して 2.0%ダンマル樹脂投与群では有意な変化は認められなかったが、0.03%IQ 投与群において突然変異頻度の有意な上昇が認められた。

*gpt* 遺伝子の変異スペクトラムは無処置と比較して 2.0%ダンマル樹脂投与群特異的有意な変化を認めなかったが、0.03%IQ 投与群において Transversion 変化である G:C to T:A 変化に特異的有意な変化を認めた。

Spi アッセイの結果、red/gam 遺伝子の突然変異体頻度が無処置群と比較して 2.0%ダンマル樹脂単独投与群では有意な変化は認められなかったが、0.03%IQ 投与群において突然変異体頻度の有意な上昇が認められた。

## 8. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

前年度に、気管支肺胞幹細胞 (BASC) BASC に対して形態計測を行ったところ、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、本年度は、BASC における細胞増殖能及び扁平上皮分化について二重染色法を用いて検討した。細胞増殖能について、Ki67 染色にて検討した結果、対照群では Ki67 陽性 BASC は認められなかったが、NTCU 処置群で単位気管支あたり 4.7%の割合で Ki67 陽性 BASC を認め、有意に増加していた。また、NTCU 誘発肺扁平上皮がん陽性となる 5 つの扁平上皮分化マーカー (CK5/6, CK14, CK19, p63, podoplanin) について今回のサンプルで検討した結果、NTCU 処置群で p63 のみ陽性細胞を認めたため、二重染色法にて p63 陽性 BASC について検討した結果、対照群では p63 陽性 BASC は認められなかったが、NTCU 処置群で単位気管支あたり 11%の割合で p63 陽性 BASC を認め、こちらも有意に増加していた。以上より、NTCU 処置群において増加が認められた BASC の一部に、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有することが明らかとなった。

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。結果、11 種類の候補蛋白が選別され、その中で、Rev1 蛋白に注目した。免疫染色の結果、BASC の細胞質における Rev1 の発現強度が低いもの (Rev1 low BASC) と高いもの (Rev1 high BASC) の存在が明らかとなり、NTCU 処置群で Rev1 high BASC が増加していた。

## D. 考察

*gpt delta* ラットを用いた 32 週多臓器発がん性試験法では、食道の扁平上皮過形成、腎臓の腎芽腫の発生数について、有意な減少が見られたが、これらの病変の発生は DMBDD 処置に伴うものであり、ダンマル樹脂による有害性変化とは考えられなかった。昨年度報告した肝臓の 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が投与群において増加していたことと、甲状腺の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された。

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、コウジ酸の甲状腺発がん促進作用および IQ の大腸発がん促進作用が認められた。これまで本試験法でダンマル樹脂、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用も確認されたことから、18 週間という試験期間が適切であることと、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。よって、通常の中期多臓器発がん性試験の期間を 32 週間から 18 週間に短縮できることが考えられた。

コウジ酸投与した *gpt delta* ラットでは、*gpt* および Spi アッセイの両方とも、突然変異体の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ることを昨年度報告した。本年度は *gpt* アッセイにおける点突然変異の指標である *gpt* 遺伝子の変異スペクトラについて解析を行ったが、特異的有意な塩基配列の変化は認められなかった。これはコウジ酸が変異原性を有しないことを示している。

また、ダンマル樹脂の *gpt delta* マウスにおける *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。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。これらのことより、ダンマル樹脂はマウス肝臓において *in vivo* 変異原性を示さないことが明らかとなった。

腎発がんの前がん病変マーカーの開発試験で着目した GBP2 は、guanine nucleotides (GMP, GDP, GTP) に結合する蛋白の一種であり、種々の細胞応答に関与することが報告されている。さらに、食道の扁平上皮がんにおいて、GBP2 が p53 関連腫瘍マーカーであることが報告されている。本実験では、GBP2 は腎腫瘍において、その強い発現が認められ、周囲正常尿細管と比較して高い染色強度を示した。このことから、前年度同定した S100A11 と共に腫瘍マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

ダンマル樹脂によるラット肝細胞がん発生に、遺伝子の点突然変異のみならず細胞運動亢進が関与することが細胞培養系を用いた今回の検索結果で明らかとなった。これまで発がん実験系ならびに誘発した病変を用いた遺伝子変異の探索がリスク評価のための主な解析手段であったが、本研究で用いた細胞運動を検索する実験系も有用な評価法のひとつになる可能性が考えられる。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、40 週において予想に反して肝発がん物質であるダンマル投与群では、肝腫瘍の頻度および数は DEN 単独投与群と比較して有意に減少した。また、IQ の肝発がん促進作用が認められなかった。前年度に報告したように 22 週においても、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ことから(平成 22 年度報告書参照)、本試験法は肝発がん物質検出法として不適切であることが判明した。

マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、前年度に扁平上皮系の病変が生じるより以前に、気管支肺胞幹細胞の増生が認められることを明らかにしたが、さらにその中に、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有する BASC が存在することを明らかにした。これらの BASC は正常細気管支で認められるものと質的に異なり、がんの発生母地となる cancer-initiating BASC となりうる可能性が考えられる。さらに、発がん関連因子である Rev1 を強発現する BASC が NTCU 処置群で増加していたことより、すでになんらかの遺伝子変異を有した BASC が存在する可能性が考えられる。以上より発がん過程早期において BASC の関与が明らかとなり、早期検出のマーカーとして、BASC 中における Rev1 蛋白の発現変化が指標となる可能性が示唆された。

## E. 結論

これまでに、*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た。本研究では、コウジ酸の肝および甲状腺に対する発がん促進作用、IQ の肝および大腸に対する発がん促進作用が認められたが、他の臓器に対する発がん促進作用はみられなかった。これらの結果は、これまでの発がん性試験と一致していた。さらに、*gpt delta* ラットを用いた変異原性試験では、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、コウジ酸が非遺伝毒性であることを初めて明らかにした。なお、遺伝毒性発がん物質である IQ の変異原性が確認された。以上の結果より、*gpt delta* および F344 ラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験法が、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、より短期間で検討することができると考えられる。

腎腫瘍で高発現が認められた GBP2 については、新規腎発がん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。

マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有する気管支肺胞幹細胞の存在が認められた。以上より発がん過程早期において BASC の関与が明らかとなり、早期検出のマーカーとして、BASC における Rev1 蛋白の発現変化が指標とな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

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).

Takehashi A, Ishii N, Shibata T, Wei M, Okazaki E, Tachibana T, Fukushima S, 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, Takehashi A, Wei M, Wanibuchi H, Vinitketkumnuan U, Fukushima S. Non-genotoxic mode of action and possible threshold for hepatocarcinogenicity of Kojic acid in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 49, 471-6 (2011).

Hoshi H, Sawada T, Uchida M, Saito H, Iijima H, Toda-Agetsuma M, Wada T, Yamazoe S, Tanaka H, Kimura K, Takehashi A, Wei M, Hirakawa K, Wanibuchi H. Tumor-associated MUC5AC stimulates in vivo tumorigenicity of human pancreatic cancer. *International journal of oncology.* 38, 619-627 (2011).

Ishii N, Wei M, Takehashi A, Doi K, Yamano S, Inaba M, 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).

Kohata Y, Fujiwara Y, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Tanigawa T, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Wei M, Wanibuchi H, Arakawa T. Role of Th-2 cytokines in the development of Barrett's esophagus in rats. *J Gastroenterol.* 46, 883-893 (2011).

Chung K, Nishiyama N, Yamano S, Komatsu H, Hanada S, Wei M, Wanibuchi H, Suehiro S, Takehashi A. Serum AGR2 as an early diagnostic and postoperative prognostic biomarker of human lung adenocarcinoma. *Cancer Biomark.* 10: 101-107(2011).

Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Takehashi A, Mori K, Nishizawa Y, Inaba M, Wanibuchi H. Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephronectin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transpl.* 27, 1889-1897, 2012. (2012).

Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Takehashi A, Mori K, Nishizawa Y, Inaba M and Wanibuchi H. Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephronectin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 27: 1889-1897 (2012) .

Xie XL, Wei M, Takehashi A, Yamano S, Tajiri M and Wanibuchi H. 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) promotes mouse hepatocarcinogenesis by activating transforming growth factor-beta and Wnt/beta-catenin signaling pathways. *Toxicol Sci.* 125: 392-400 (2012).

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

久野 壽也, 竿尾 光祐, 横平 政直, 白井 高利, 岩井 純子, 木田 孝志, 今井田克己, 胆石様胆

道閉塞像を示した原発巣不明胆管内発育型肝細胞がんの1例. 診断病理, 28(3): 186-189, 2011.

Kato K, Fukui R, Okabe K, Tanabe E, Kitayoshi M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Constitutively active lysophosphatidic acid receptor-1 enhances the induction of matrix metalloproteinase-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 (2012) 790-793.

Okabe K, Hayashi M, Kato K, Okumura M, Fukui R, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-3 increases tumorigenicity and aggressiveness of rat hepatoma RH7777 cells. *Mol. Carcinog.* (2012) DOI: 10.1002/mc.21851.

Hayashi M, Okabe K, Kato K, Okumura M, Fukui R, Fukushima N, Tsujiuchi T. Different function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* 2012(316)91-96.

## 2.学会発表

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 p21<sup>Cip/WAF1</sup> AACR 102nd Annual Meeting 2011, Orlando(2011年4月)

Tajiri M, Wei M, Obo Y, Ishii N, Yamano S, Wanibuchi H. Examination of in vivo mutagenicity and carcinogenicity in the gpt delta rat with Dammer resin. AACR 102nd Annual Meeting 2011, Orlando(2011年4月)

小松弘明、丁 奎光、梯アンナ、花田庄司、魏 民、西山典利、鰐淵英機 : QSTAR Elite LC-MS/MSを用いたヒト肺腺がんにおけるプロテオーム解析. 第100回日本病理学会総会、横浜 (2011年4月)

魏 民、山野荘太郎、加藤実、梯アンナ、鰐淵英機 : 膀胱がん新規浸潤因子 Carbonic anhydrase 2の同定. 第100回日本病理学会総会、横浜(2011年4月)

加藤実、魏 民、山野荘太郎、仲谷慎也、梯アンナ、鰐淵英機 : プロテオーム解析による膀胱がんバイオマーカーの検討. 第100回日本病理学会総会、横浜 (2011年4月)

山野荘太郎、石井真美、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100回日本病理学会総会、横浜 (2011年4月)

田尻正喜、魏 民、金川明裕、謝 曉利、豊田武士、鰐淵英機 : ピロリ菌誘発胃炎におけるラファノブラシカの修飾作用. 第100回日本病理学会総会、横浜 (2011年4月)

花田庄司、魏 民、丁 奎光、梯アンナ、西山典利、鰐淵英機 : 肺扁平上皮がんにおけるプロテオーム解析と臨床病理学的検討. 第100回日本病理学会総会、横浜 (2011年4月)

xie xiaoli、魏 民、梯アンナ、山野荘太郎、金川明裕、田尻正喜、鰐淵英機 : Promotion effects of IQ in a two-stage hepatocarcinogenesis model of B6C3F1 mice. 第100回日本病理学会総会、横浜 (2011年4月)

仲谷慎也、魏 民、山野荘太郎、石井真美、梯アンナ、鰐淵英機 : ヒト剖検例の単離糸球体を用いた糖尿病性腎症のプロテオーム解析. 第100回日本病理学会総会、横浜 (2011年4月)

Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Kakehashi A, Mori K, Inaba M, Wanibuchi H. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy. the XLVIII ERA-EDTA Congress, Prague(2011年6月)

魏 民、梯アンナ、福島昭治、鰐淵英機 : 遺伝子毒性発がん物質における閾値の存在. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会、横浜 (2011年7月)

山野荘太郎、魏 民、鰐淵英機 : 肺扁平上皮がんモデルにおける気管支肺胞幹細胞の役割. 第38回日本トキシコロジー学会学術年会、横浜 (2011年7月)

山野荘太郎、魏 民、梯アンナ、鰐淵英機 : 肺扁平上皮がんモデルにおける気管支肺胞幹細胞の関与. 第26回発がん病理研究会、札幌(2011年8月)

加藤実、魏 民、山野荘太郎、鰐淵英機 : DDX39の発現と膀胱がんの浸潤に関する検討. 第70回日本がん学会学術総会、名古屋 (2011年10月)

謝 暁利、魏 民、梯アンナ、田尻正喜、山野 莊太郎、神吉将之、鰐淵英機：マウス肝発がんにおける IQ 促進作用のメカニズムの検討。第 70 回日本がん学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

小松弘明、西山典利、山野 莊太郎、花田庄司、丁 奎光、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：肺大細胞神経内分泌がん(LCNEC)の新たなバイオマーカーの同定。第 70 回日本がん学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

鰐淵英機、魏 民：ヒ素ばく露と発がんリスク—動物モデルを用いた発がん機序の解明—。第 70 回日本がん学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

山野 莊太郎、魏 民、石井真美、梯アンナ、多胡善幸、謝 暁利、鰐淵英機：NASH 関連肝がん発症モデルである STAM マウスの有用性評価。第 70 回日本がん学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

花田庄司、西山典利、山野 莊太郎、小松弘明、丁 奎光、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：肺扁平上皮がんにおけるプロテオーム解析と臨床病理学的検討。第 70 回日本がん学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

魏 民、山野 莊太郎、加藤実、梯アンナ、多胡善幸、鰐淵英機：Carbonic anhydrase 2 は膀胱がんの新規浸潤関連因子である。第 70 回日本がん学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

岡部恭子、山野 莊太郎、魏 民、加藤実、田尻正喜、謝 暁利、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける新規バイオマーカーの同定。第 70 回日本がん学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

田尻正喜、魏 民、岡部恭子、山野 莊太郎、梯アンナ、神吉将之、鰐淵英機：コウジ酸および IQ の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討。第 70 回日本がん学会学術総会、名古屋（2011 年 10 月）

梯アンナ、石井真美、山野 莊太郎、魏 民、岡部恭子、鰐淵英機：ヒト肝臓腫瘍の比較的プロテオーム解析及び新規バイオマーカー候補分子の検討。第 70 回日本がん学会学術総会、名

古屋（2011 年 10 月）

Nakatani S, Ishimura E, Wei M, Mori K, Inaba M, Wanibuchi H. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy –Proteome analysis of isolated glomeruli from autopsy and immunochemical study--。American Society of Nephrology, Kidney Week 2011, Philadelphia(2011 年 11 月)

田尻正喜、魏 民、山野 莊太郎、鰐淵英機：ジフェニルアルシン酸のラットにおける慢性毒性および発がん性の検討。第 17 回ヒ素シンポジウム、つくば（2011 年 11 月）

鰐淵英機、山野 莊太郎：肺扁平上皮がんモデルにおける気管支肺胞幹細胞の関与。第 11 回分子予防環境医学研究会、倉敷（2012 年 1 月）

岡部恭子、山野 莊太郎、魏 民、田尻正喜、謝 暁利、神吉将之、北野光昭、鰐淵英機：ラット腎発がんにおける新規バイオマーカーの同定。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

田尻正喜、魏 民、岡部恭子、山野 莊太郎、福永賢輝、林修次、鰐淵英機：コウジ酸の *in vivo* 変異原性および発がん修飾作用の検討。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

Xiao-Li XIE、魏 民、梯アンナ、田尻正喜、岡部恭子、多胡善幸、鰐淵英機：マウス肝がんにおける IQ 促進作用のメカニズムの検討。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

神吉将之、魏 民、梯アンナ、山野 莊太郎、鰐淵英機：非遺伝毒性肝発がん物質のラット肝臓における遺伝子発現解析。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

梯アンナ、山野 莊太郎、魏 民、謝 暁利、武下正憲、串田昌彦、鰐淵英機：ヒト肝臓がんのプロテオーム解析を用いた新規バイオマーカー候補分子の検索。第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、東京（2012 年 2 月）

横平政直、橋本希、中野裕子、山川けいこ、岸宗佑、二宮英美子、井上達史、竿尾光祐、今井

田克己、胸腔内投与による針状微粒子 TISMO の影響、第 28 回日本毒性病理学会総会(2012.2)

中野裕子、横平政直、橋本希、山川けいこ、井上達史、岸宗佑、二宮芙美子、竿尾光祐、今井田克己、DHPN 誘発肺腫瘍への慢性炎症の影響における系統差—F344 ラットおよび Wister-Hannover ラットの検討—、第 28 回日本毒性病理学会総会(2012.2)

Kishi S, Yokohira M, Hashimoto N, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T, Imaida K, Toxicity and mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers (TISMO) introduced into the left thoracic cavity in A/J female mice. 51<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting & ToxExpo (2012.3)

Nakano Y, Hashimoto N, Yokohira M, Yamakawa K, Kishi S, Ninomiya F, Saoo K, Imaida K, Differential effects of chronic inflammation on DHPN lung carcinogenesis in F344, Wistar-Hannover and SD rats. 51<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting & ToxExpo (2012.3)

加藤紘平、奥村真衣、朴木寛弥、辻内俊文、ハムスター肺管がん培養細胞の悪性能獲得における L P A 受容体の関与第 70 回日本がん学会総会、10 月 3 日-5 日、名古屋、2011 (日本がん学会誌プログラム P-3128, p.271)

<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 23 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：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。前年度まで、ダンマル樹脂、コウジ酸および 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) の肝発がん性、ダンマル樹脂および IQ の変異原性を検討した結果により、*gpt delta* および F344 ラットを用いた 18 週間多臓器発がん性試験法は食品添加物等の遺伝毒性と肝発がん性の包括的検出に有用であることが明らかとなった。本年度では、コウジ酸および IQ の肝臓以外の臓器における発がん性を検討することで本試験法の有用性をさらに検証した。また、前年度に引き続き、ダンマル樹脂および IQ の C57BL/6J マウスにおける発がん性を検討し、新規マウス発がんリスク評価試験法の開発を行った。さらに、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開発を行った。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 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、大腸の前がん病変である aberrant crypt foci (ACF) について検討した結果、IQ 投与群で ACF の有意な増加が認められた。甲状腺ではコウジ酸投与群で甲状腺濾胞腺腫の有意な増加が認められ、その他の臓器ではコウジ酸、IQ ともに有意な発がん促進作用は認められなかった。以上より、IQ の大腸発がん促進作用、およびコウジ酸の甲状腺発がん促進作用が見られた。これまでダンマル樹脂、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用も確認されていることから、本試験法は多臓器発がん性試験法として有用であることが明らかとなった。
- ② 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) 誘発腎腫瘍のプロテオーム解析結果より、腎腫瘍に高発現する GBP2 蛋白の同定に成功した。

### 2. 新規マウス肝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。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、40 週において肝腫瘍の発生頻度および数の増加を認めず、ダンマル樹脂および IQ の肝発がん促進作用が認められなかった。したがって、この試験法は肝発がん物質検出法として不適切であることが判明した。
- ② マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有する気管支肺胞幹細胞の存在が認められたことにより発がん過程早期において BASC の関与が明らかとなり、早期検出のマーカーとして、BASC における Rev1 蛋白の発現変化が指標となる可能性が示唆された。

## 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、遺伝毒性に関しては、*in vitro* の変異原性試験により遺伝毒性の有無が決められてきたが、偽陽性になるものも多く、特異性が低いという点において現状の試験法では問題がある。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。平成22年度まで、ダンマル樹脂、コウジ酸および2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) の肝発がん性、ダンマル樹脂およびIQの変異原性を検討した結果により、*gpt delta* ラットを用いた18週間多臓器発がん性試験法は食品添加物等の遺伝毒性と発がん性の包括的検出に有用であることが明らかとなった。本年度では、前年度に引き続き、同試験法でコウジ酸およびIQの肝臓以外の臓器における発がん性を検討し、その有用性をさらに検証した。また、前年度に引き続き、ダンマル樹脂およびIQのC57BL/6J系 *gpt delta* マウスにおける発がん性を検討し、新規マウス発がんリスク評価試験法の開発を行った。さらに、以上の発がん性試験に加えて、発がん性を検索できるがんの早期発見に必要な不可欠な、新規早期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。

## 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. 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ラットの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、発がん用量である0.01%を設定した。

#### [試験プロトコール]

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。

実験プロトコールを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。一週間の休業期間を置き、実験開始後5日目から第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)。

#### [統計学的解析]

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。

## 2.2 腎発がんの新規前がん病変マーカーの開発

#### [検体]

前年度に作製した腎腫瘍サンプルを用いて追加解析を行った。すなわち、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500ppmの濃度で2週間飲水投与した。投与終了後、KBrO<sub>3</sub>を0, 0.02, 2, 8, 30, 125及び500ppm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包埋標本を作製し、病理組織学的解析に供した。

#### [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。KBrO<sub>3</sub>が0及び500ppm群の各群5個体から10 $\mu$ m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 $\mu$ g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。特に今回は、周辺正常組織と比較し、EHEN単独投与で誘発した腫瘍で1.5倍以上増加した蛋白から選別した。

#### [免疫組織学的解析]

選別したバイオマーカー候補蛋白に対し、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組織染色を行い、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300ppmIQ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 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]

前年度に作製したマウス肺サンプルを用いて追加解析を行った。すなわち、6週齢A/J雌マウス30匹を用いて、NTCU 0.01 M/75 $\mu$ 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による解析を行った。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。また、同実験プロトコルを施行し、投与開始後1週及び4週においても肺組織のサンプリングを追加した。

#### [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、扁平上皮分化マーカーである、CK5/6, CK14, CK19, podoplanin, p63について検討した。また、BASCにおける細胞増殖能、扁平上皮分化能及びRev1発現を検討するため、BASCマーカーであるSca-1とKi67, p63及びRev1の共発現を二重染色法により確認した。



[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/ml) と 1% LMP agarose を各 1 ml ずつ気管から注入し、on ice で肺を固定した。その後、各肺葉を分離し、1 mm<sup>3</sup> 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 の中で 37°C、45 分インキュベートした。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

1x10<sup>6</sup> 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 分インキュベート後、洗浄し 7AAD の染色により死細胞の除去を行った後にフローサイトメトリーに供した。

#### 3 細胞分取

フローサイトメトリー (Aria II :BD) を用いて 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供した。

[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、得られたサンプルから各 4µg 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 posi 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. 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

[肝臓以外の臓器の病理学的検査]

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 1 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→0.01%IQ 投与群で 100%、DMBDD→2% コウジ酸投与群で 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 3.1±2.2、DMBDD→0.01%IQ 投与群で 2.7±2.2、DMBDD→2% コウジ酸投与群で 7.7±2.8 認められた。Follicular cell adenoma においては DMBDD 単独投与群で 46.7%、DMBDD→0.01%IQ 投与群で 33.3%、DMBDD→2% コウジ酸投与群で 100% 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→0.01%IQ 投与群で 0.5±0.7、DMBDD→2% コウジ酸投与群で 5.7±2.6 認められた。Follicular cell adenocarcinoma においては DMBDD 単独投与群で 26.7%、DMBDD→0.01%IQ 投与群で 6.7%、DMBDD→2% コウジ酸投与群で 14.2% 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→0.01%IQ 投与群で 0.1±0.4、DMBDD→2% コウジ酸投与群で 2.0±1.4 認められた。また、Total tumor (follicular cell adenoma + follicular cell adenocarcinoma) では DMBDD 単独投与群で 53.3%、DMBDD→0.01%IQ 投与群で 40.0%、DMBDD→2% コウジ酸投与群で 100% の発生頻度で認められた。DMBDD 単独投与群で 1.0±1.1、DMBDD→0.01%IQ 投与群で 0.5±0.7、DMBDD→2% コウジ酸投与群で 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→2% コウジ酸投与群において follicular cell adenoma の発生の有意な増加が認められた。

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 2 に示した。

Atypical tubule hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD 単 独 投 与 群 で 84.6%、DMBDD→0.01%IQ投与群で53.8%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で35.7%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→0.01%IQ 投 与 群 で 0.6±0.7、DMBDD→2%コウジ酸投与群で0.4±0.6認められた。Renal cell adenomaにおいてはDMBDD単独投与群では認められなかったが、DMBDD→0.01%IQ投与群で7.6%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で15.4%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD→0.01%IQ投与群で0.1±0.3、DMBDD→2%コウジ酸投与群で0.1±0.4認められた。NephroblastomaはDMBDD単独投与群で7.6%認められたが、DMBDD→0.01%IQ投与群およびDMBDD→2%コウジ酸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→0.01%IQ投与群、DMBDD→2%コウジ酸投与群いずれも認められなかった。また、Total tumor (Renal cell adenoma+Renal cell carcinoma) ではDMBDD単独投与群では認められなかったが、DMBDD→0.01%IQ投与群で7.6%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で14.3%の発生頻度で認められた。発生個数については、DMBDD→0.01%IQ 投 与 群 で 0.1±0.3、DMBDD→2%コウジ酸投与群で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→0.01%IQ 投 与 群 お よ び DM BDD→2%コウジ酸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 3に示した。PN hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD単独投与群で30.8%、DMBDD→0.01%IQ投与群で30.8%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で21.4%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→0.01%IQ投与群で0.3±0.5、DMBDD→2%コウジ酸投与群で0.3±0.7認められた。PapillomaにおいてはDMBDD単独投与群で7.6%、DMBDD→0.01%IQ投与群で7.6%認められ、DMBDD→2%コウジ酸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→0.01%IQ投与群で0.1±0.3認められた。Transitional cell carcinoma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、0.01%IQ投与群および2%

コウジ酸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、Total tumor (Papilloma+Transitional cell carcinoma) ではDMBDD単独投与群で20.0%、DMBDD→0.01%IQ投与群で7.6%の発生頻度で認められたが、DMBDD→2%コウジ酸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→0.01%IQ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→0.01%IQ投与群およびDMBDD→2%コウジ酸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 4に示した。Hyperplasiaにおいては発生頻度がDMBDD単独投与群で100%、DMBDD→0.01%IQ投与群で100%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で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 20.2±6.2、DMBDD→0.01%IQ 投 与 群 で 29.1±11.3、DMBDD→2%コウジ酸投与群で25.4±7.6認められた。AdenomaにおいてはDMBDD単独投与群で7.6%、DMBDD→0.01%IQ投与群で46.2%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で14.3%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0.1±0.3、DMBDD→0.01%IQ投与群で0.5±0.8、DMBDD→2%コウジ酸投与群で0.4±0.6認められた。AdenocarcinomaにおいてはDMBDD単独投与群で7.6%、DMBDD→0.01%IQ投与群で7.6%、DMBDD→2%コウジ酸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→0.01%IQ投与群で0.1±0.3認められた。また、Total tumor (Adenoma+Adenocarcinoma) ではDMBDD 単 独 投 与 群 で 13.3%、DMBDD→0.01%IQ投与群で53.8%、DMBDD→2%コウジ酸投与群で14.3%の発生頻度で認められた。DMBDD 単 独 投 与 群 で 0.2±0.4、DMBDD→0.01%IQ 投 与 群 で 0.6±0.8、DMBDD→2%コウジ酸投与群で0.3±0.8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→0.01%IQ投与群およびDMBDD→2%コウジ酸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 5 に示し

た。その発生個数において DMBDD 単独投与群で  $100.7 \pm 11.3$ 、DMBDD $\rightarrow$ 0.01%IQ 投与群で  $144 \pm 17.5$ 、DMBDD $\rightarrow$ 2%コウジ酸投与群で  $119 \pm 14.4$  認められた。DMBDD 処置単独投与群と比較し、DMBDD $\rightarrow$ 0.01%IQ 投与群において ACF の有意な増加が認められたが、DMBDD $\rightarrow$ 2%コウジ酸投与群では有意な変化を認めなかった。

## 2. 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%の信頼区間で 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。今回、この中で、1.5 倍以上発現上昇した蛋白に再注目した結果、新たに endoplasmic reticulum protein 29 (2.3 倍)、diazepam binding inhibitor (2.0 倍)、guanylate binding protein 2, GBP2 (1.9 倍)、copine family member IX (1.9 倍)、N-myc downstream regulated 1 (1.8 倍)、prosaposin (1.8 倍)、homer homolog 3 (1.6 倍)等が同定された。

今回は、その中で良好な染色結果を得られた GBP2 に注目した。GBP2 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陽性を示した(Figure 1)。

## 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

40 週において、ダンマル樹脂投与群で、肝臓における肝腫瘍の頻度および数は DEN 単独投与群と比較して有意に減少した。また、IQ 投与群では肝腫瘍の頻度および数は DEN 単独投与群との間に有意な差は認められなかった(Figure 2)。

## 6. マウス肺扁平上皮がんの前がん病変マーカーの開発

前年度に、BASC に対して形態計測を行ったところ、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、本年度は、BASC における細胞増殖能及び扁平上皮分化について二重染色法を用いて検討した。細胞増殖能について、Ki67 染色にて検討した結果、対照群では Ki67 陽性 BASC は認められなかったが、NTCU 処置群で単位気管支あたり 4.7%の割合で Ki67 陽性 BASC を認め、有意に増加していた(Figure 3)。また、NTCU 誘発肺扁平上皮がん陽性となる 5 つの扁平上皮分化マーカー (CK5/6, CK14, CK19, p63, podoplanin) について今回のサンプルで検討した結果(Figure 4)、NTCU 処置群で p63 のみ陽性細胞を認めたため、二重染色法にて p63 陽性 BASC について検討した結果、対照群では p63 陽性 BASC は認められなかったが、NTCU 処置群で単位気管支あたり 11%の割合で p63 陽性 BASC を認め、こちらも有意に増加していた(Figure 3)。以上より、NTCU 処置群において増加が認められた BASC の一部に、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有することが明らかとなった。

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。結果、11 種類の候補蛋白が選別され、その中で、Rev1 蛋白に注目した。免疫染色の結果、BASC の細胞質における Rev1 の発現強度が低いもの (Rev1 low BASC) と高いもの (Rev1 high BASC) の存在が明らかとなり、NTCU 処置群で Rev1 high BASC が増加していた(Figure 5)。

## D. 考察

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、コウジ酸の甲状腺発がん促進作用および IQ の大腸発がん促進作用が認められた。これまで本試験法でダンマル樹脂、コウジ酸および IQ の肝発がん促進作用も確認されたことから、18 週間という試験期間が適切であることと、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。よって、通常の中期多臓器発がん性試験の期間を 32 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 GBP2 は、guanine nucleotides (GMP, GDP, GTP)に結合する蛋白の一種であり、種々の細胞応答に関与することが報告されている。さらに、食道の扁平上皮がんにおいて、GBP2

が p53 関連腫瘍マーカーであることが報告されている。本実験では、GBP2 は腎腫瘍において、その強い発現が認められ、周囲正常尿細管と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、40 週において予想に反して肝発がん物質であるダンマル投与群では、肝腫瘍の頻度および数は DEN 単独投与群と比較して有意に減少した。また、IQ の肝発がん促進作用が認められなかった。前年度に報告したように 22 週においても、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ことから（平成 22 年度報告書参照）、本試験法は肝発がん物質検出法として不適切であることが判明した。

マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、前年度に扁平上皮系の病変が生じるより以前に、気管支肺胞幹細胞の増生が認められることを明らかにしたが、さらにその中に、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有する BASC が存在することを明らかにした。これらの BASC は正常細気管支で認められるものと質的に異なり、がんの発生母地となる cancer-initiating BASC となりうる可能性が考えられる。さらに、発がん関連因子である Rev1 を強発現する BASC が NTCU 処置群で増加していたことより、すでになんらかの遺伝子変異を有した BASC が存在する可能性が考えられる。以上より発がん過程早期において BASC の関与が明らかとなり、早期検出のマーカーとして、BASC 中における Rev1 蛋白の発現変化が指標となる可能性が示唆された。

## E. 結論

これまでに、*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た。本研究では、コウジ酸の肝および甲状腺に対する発がん促進作用、IQ の肝および大腸に対する発がん促進作用が認められたが、他の臓器に対する発がん促進作用はみられなかった。これらの結果は、これまでの F344 ラットを用いた発がん性試験と一致していた。さらに、*gpt delta* ラットを用いた変異原性試験では、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、コウジ

酸が非遺伝毒性であることを初めて明らかにした（魏分担報告書参照）。なお、遺伝毒性発がん物質である IQ の変異原性が確認された。

以上の結果より、*gpt delta* および F344 ラットラットを用いた 18 週多臓器発がん性試験法が、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、より短期間で検討することができると考えられる。

腎腫瘍で高発現が認められた GBP2 については、新規腎発がん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。

マウス肺扁平上皮がんモデルにおいて、細胞増殖能及び扁平上皮分化能を有する気管支肺胞幹細胞の存在が認められた。以上より発がん過程早期において BASC の関与が明らかとなり、早期検出のマーカーとして、BASC における Rev1 蛋白の発現変化が指標とな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

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).

Takehashi A, Ishii N, Shibata T, Wei M, Okazaki E, Tachibana T, Fukushima S, Wanibuchi H. Mitochondrial prohibitins and septin 9 are implicated in the onset of rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol Sci.* 119, 61-72 (2011).