

Nephrology, Kidney Week 2011, Philadelphia
(2011年11月)

2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

田尻正喜、魏 民、山野荘太郎、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）

岡部恭子、山野荘太郎、魏 民、田尻正喜、謝
曉利、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、山野荘太郎、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、山野荘太郎、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、山野荘太郎、魏 民、謝 曉利、
武下正憲、串田昌彦、鰐淵英機：ヒト肝臓癌
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）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし

Table 1
gpt mutant and mutation frequencies in livers

| Treatment | | Total Population | 6TG ^r Mutants | Mutation Frequency (×10 ⁻⁶) | Average of <i>gpt</i> Mutation Frequency ±S.D. |
|-----------|---------------|------------------|--------------------------|---|--|
| 40 | DMBDD- 0 | 444,000 | 3 | 6.76 | 6.0 ± 4.2 |
| | | 473,750 | 5 | 10.55 | |
| | | 931,000 | 3 | 3.22 | |
| | | 411,500 | 2 | 4.86 | |
| | | 495,000 | 2 | 4.04 | |
| | | 797,000 | 6 | 7.53 | |
| | 0.01% IQ | 521000 | 16 | 30.71 | 41.0± 14.4 * |
| | | 438000 | 12 | 27.40 | |
| | | 830000 | 24 | 28.92 | |
| | | 558000 | 26 | 46.59 | |
| | | 283000 | 18 | 63.60 | |
| | | 718000 | 35 | 48.75 | |
| | 2% Kojic acid | 669,000 | 5 | 7.47 | 6.2 ± 2.4 |
| | | 455,000 | 2 | 4.40 | |
| | | 642,000 | 5 | 7.79 | |
| | | 525,000 | 5 | 9.52 | |
| | | 868,000 | 6 | 6.91 | |
| | | 452,000 | 2 | 4.42 | |

*:Significantly different from non-treatment group

Table2
gpt mutation spectra in livers

| Type of mutation | Treatment | | |
|--------------------------|---|--|---|
| | Non-treatment | 0.01% IQ | 2% Kojic acid |
| DMBDD- Base substitution | | | |
| Transition | | | |
| G:C to A:T | 5 (27.9) ^a 2.5 ± 3.2 ^b | 8 (7.3) ^a 2.9 ± 1 ^b | 8 (40.0) ^a 2.4 ± 0.9 ^b |
| A:T to G:C | 1 (6.6) 0.4 ± 0.5 | 3 (2.7) 1.2 ± 0.4 | 3 (10.0) 0.6 ± 0.8 |
| Transversion | | | |
| G:C to T:A | 8 (39.3) 2.3 ± 1.4 | 62 (56.4) 22.9 ± 8.1 | 10 (21.7) 1.5 ± 0.8 |
| G:C to C:G | 1 (4.7) 0.3 ± 0.7 | 3 (2.7) 1.1 ± 0.4 | 1 (3.3) 0.2 ± 0.3 |
| A:T to T:A | 2 (3.3) 0.1 ± 0.3 | 25 (22.7) 9.3 ± 3.3 | 1 (3.3) 0.2 ± 0.3 |
| A:T to C:G | 0 (0) 0 | 1 (0.9) 0.4 ± 0.1 | 0 (0) 0 ± 0 |
| deletion | | | |
| Single bp | 2 (11.5) 1.0 ± 0.8 | 4 (3.6) 1.5 ± 0.5 | 4 (16.7) 1.1 ± 1.3 |
| Over 2bp | 0 (0) 0 ± 0 | 2 (1.8) 0.7 ± 0.3 | 0 (0) 0 |
| Insertion | | | |
| | 2 (9.6) 0.6 ± 0.5 | 2 (1.8) 0.7 ± 0.3 | 1 (3.3) 0.3 ± 0.4 |
| Total | 21(100) 6.0 ± 4.2 | 110 (100) 41 ± 14.4 | 25 (100) 6.2 ± 2.4 |

^aNumber of mutations (%)

^bMutation frequency ($\times 10^6$)

Table 3
Spi- mutant frequencies in livers

| Treatment | | Total Population | Spi- Mutants | Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$) | Average of Mutant Frequency \pm S.D. |
|-----------|-----------------------|------------------|--------------|---------------------------------------|--|
| 42 | DMBDD- Non- treatment | 304,000 | 3 | 9.87 | 6.9 \pm 2.6 |
| | | 384,000 | 2 | 5.21 | |
| | | 245,000 | 2 | 8.16 | |
| | | 381,000 | 1 | 2.62 | |
| | | 286,000 | 3 | 10.49 | |
| | | 395,000 | 2 | 5.06 | |
| | 0.01% IQ | 281,000 | 8 | 28.47 | 35.5 \pm 11.3* |
| | | 481,000 | 21 | 47.82 | |
| | | 501,500 | 14 | 27.92 | |
| | | 661,000 | 18 | 37.82 | |
| | | 590,500 | 26 | 49.11 | |
| | | 877,000 | 17 | 21.66 | |
| | 2% Kojic acid | 433,000 | 2 | 4.62 | 6.3 \pm 3.5 |
| | | 425,000 | 4 | 9.41 | |
| | | 434,000 | 6 | 13.82 | |
| | | 413,000 | 1 | 2.42 | |
| | | 677,000 | 4 | 5.91 | |
| | | 533,000 | 1 | 1.88 | |

*:Significantly different from control group.

Table 4
gpt mutation frequency in mouse livers

| Treatment | Mouse number | Cm ^R colonies (x 10 ⁵) | Independent <i>gpt</i> mutation | <i>gpt</i> MF (x 10 ⁻⁶) | Mean ± SD |
|--------------------|--------------|--|------------------------------------|--|--------------|
| Control | 11 | 7.80 | 3 | 3.85 | 5.4 ± 2.8 |
| | 12 | 7.08 | 4 | 5.65 | |
| | 13 | 7.29 | 3 | 4.12 | |
| | 14 | 6.27 | 6 | 9.57 | |
| | 15 | 5.64 | 1 | 1.77 | |
| | 16 | 5.40 | 4 | 7.41 | |
| 2% Dammar resin | 21 | 9.60 | 2 | 2.08 | 3.0 ± 1.2 |
| | 22 | 5.52 | 1 | 1.81 | |
| | 23 | 7.48 | 2 | 2.67 | |
| | 24 | 5.10 | 2 | 3.92 | |
| | 26 | 10.96 | 5 | 4.56 | |
| 0.03% IQ | 31 | 6.51 | 14 | 21.51 | 32.5 ± 11.1* |
| | 32 | 5.13 | 19 | 37.04 | |
| | 33 | 6.99 | 22 | 31.47 | |
| | 34 | 6.99 | 17 | 24.32 | |
| | 35 | 6.36 | 18 | 28.30 | |
| | 36 | 5.16 | 27 | 52.33 | |

**p* < 0.01 versus the control group

Table 5
Classification of *gpt* mutations in *gpt* delta mouse livers

| Types of <i>gpt</i> mutation | Control | | 2% Dammar resin | | 0.03% IQ | |
|------------------------------|------------|--|-----------------|--|------------|--|
| | Number (%) | Mutant frequency (x 10 ⁻⁶) | Number (%) | Mutant frequency (x 10 ⁻⁶) | Number (%) | Mutant frequency (x 10 ⁻⁶) |
| Base substitution | | | | | | |
| Transition | | | | | | |
| G:C to A:T | 3 (14.3) | 0.71 ± 0.79 | 5 (41.7) | 1.18 ± 1.19 | 8 (6.8) | 2.25 ± 1.80 |
| A:T to G:C | 2 (9.5) | 0.49 ± 0.77 | 1 (8.3) | 0.39 ± 0.88 | 3 (2.6) | 0.76 ± 1.30 |
| Transversion | | | | | | |
| G:C to T:A | 5 (23.8) | 1.25 ± 1.07 | 3 (25) | 0.68 ± 0.97 | 81 (69.2) | 22.56 ± 7.17* |
| G:C to C:G | 1 (4.8) | 0.24 ± 0.58 | 0 | 0 ± 0 | 7 (6) | 1.92 ± 2.53 |
| A:T to T:A | 0 | 0 ± 0 | 0 | 0 ± 0 | 2 (1.7) | 0.65 ± 1.59 |
| A:T to C:G | 2 (9.5) | 0.57 ± 0.89 | 0 | 0 ± 0 | 1 (0.9) | 0.26 ± 0.64 |
| Deletion | | | | | | |
| Single bp | 2 (9.5) | 0.45 ± 0.70 | 0 | 0 ± 0 | 6 (5.1) | 1.65 ± 1.83 |
| Over 2bp | 1 (4.8) | 0.31 ± 0.76 | 0 | 0 ± 0 | 2 (1.7) | 0.49 ± 0.77 |
| Insertion | 5 (23.8) | 1.36 ± 1.70 | 2 (16.7) | 0.57 ± 0.87 | 6 (5.1) | 1.63 ± 1.59 |
| Others | 0 | 0 ± 0 | 1 (8.3) | 0.18 ± 0.41 | 1 (0.9) | 0.32 ± 0.79 |
| Total | 21 (100) | 5.39 ± 2.78 | 12 (100) | 3.01 ± 1.19 | 117 (100) | 32.49 ± 11.14* |

**p* < 0.01 versus the control group

Table 6
Spi⁻ mutant frequency in mouse livers

| Treatment | Mouse number | Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵) | Plaque within WL95 (P2) | Mutant frequency (x 10 ⁻⁶) | Mean ± SD |
|--------------------|--------------|---|-------------------------|--|--------------|
| Control | 11 | 13.06 | 6 | 4.59 | 6.2 ± 1.1 |
| | 12 | 10.22 | 7 | 6.85 | |
| | 13 | 11.24 | 7 | 6.23 | |
| | 14 | 10.58 | 8 | 7.56 | |
| | 15 | 10.92 | 6 | 5.49 | |
| | 16 | 24.39 | 16 | 6.56 | |
| 2% Dammar resin | 21 | 15.96 | 4 | 2.51 | 5.9 ± 3.0 |
| | 22 | 13.72 | 13 | 9.48 | |
| | 23 | 14.44 | 6 | 4.16 | |
| | 24 | 10.38 | 9 | 8.67 | |
| | 26 | 10.18 | 5 | 4.91 | |
| 0.03% IQ | 31 | 10.16 | 15 | 14.76 | 21.7 ± 10.4* |
| | 32 | 12.24 | 20 | 16.34 | |
| | 33 | 14.26 | 49 | 34.36 | |
| | 34 | 14.12 | 29 | 20.54 | |
| | 35 | 21.68 | 21 | 9.69 | |
| | 36 | 11.04 | 38 | 34.42 | |

**p* < 0.01 versus the control group

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
研究分担研究報告書

中期発がん試験に関する研究

分担研究者 今井田克己 香川大学医学部 腫瘍病理学 教授

研究要旨： 既存添加物名簿に記載されていたダンマル樹脂の発がん修飾作用について検討を行っている。F344 ラットを用いて検討した結果、肝臓と甲状腺に腫瘍性変化をもたらす可能性が示唆された(2010年3月報告)。これを受けて、ダンマル樹脂による各臓器への影響を遺伝子レベルで検索することを目的に、同様の実験を雄 F344 background の *gpt delta* ラットを用いて行った。実験デザインとしては、ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、雄 *gpt delta* ラットに5種類の発がん物質によるイニシエーションを行った後、ダンマル樹脂を0%、0.03%、2%の濃度で混じた飼料を26週間経口投与した。その結果、前年度に報告した肝重量の増加、胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P)陽性細胞巢の面積、個数の有意な増加に加え、病理組織学的検索を行ったが、肝臓においてF344ラット同様、肝細胞癌の発生を認めたものの、その発生頻度に有意差は認められなかった。また、甲状腺に関しては、濾胞細胞過形成の平均発生個数において増加傾向を示したが、腫瘍性病変の促進作用は見られなかった。また、その他の臓器のダンマル樹脂が影響したと考えられる病理組織学的変化は見られなかった。加えて、大腸の aberrant crypt foci (ACF)および mucin-depleted foci (MDF)の個数は、群間に有意差は認められなかった。以上より、ダンマル樹脂は *gpt delta* ラットにおいても高用量群において肝臓での発がんの促進作用を有する可能性が示唆された。しかし、F344 ラットで示唆された甲状腺に対する発がん修飾作用に関しては明らかではなかった。F344 を background とした *gpt delta* ラットは、F344 ラットと比較して、被験物質による反応性がわずかながら異なることが示唆されたものの、被験物質による変異原性の有無を臓器ごとに検討できるだけでなく、同時に、F344 ラットと同様に、発がん性、発がん修飾作用の検討にも応用可能であると考えられた。

A. 研究目的

以前の実験にて、それまで増粘安定剤として食品への使用が認められていたダンマル樹脂の発がん修飾作用について、F344 ラットによるラット多臓器中期発がん試験法を用いて検討した結果、肝臓および甲状腺に腫瘍性変化をもたらす可能性があることが示唆された。これを受けて、各臓器での遺伝子レベルでの検索を行うことができる、F344 background の *gpt delta* ラットを用いて同様の実験を行った。

ダンマル樹脂はマレーシアなど東南アジアで、ラワン属の樹木から採取される軟質の現存樹脂であり、フタバガキ科 (*Shorea wiesneri* SCHRFF.) 又はナンヨウスギ科 (*Agathis dammara* L.C.RICHARD, *Agathis lanceolata* PANCH.) の分泌液より、熱時エタノール又は酢酸エチルで抽出し、ろ液から溶媒を留去し、乾燥して得られたもので、主成分は多糖類である。従来、油絵の保

護ワニスとして使用されており、天然の食品添加物として、厚生労働省の既存添加物名簿収載品目リストに収載されていたが、現在では、リストの一部改正のため、名簿より削除された(平成23年5月6日)。しかし、その発がんリスクや機序に関してはいまだ詳細な検討が行われていないのが現状である。そこで、今回、遺伝毒性を検討するため、F344 background の *gpt delta* ラットによる同様のラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、ダンマル樹脂を経口投与させ、主要臓器における発がん修飾作用を検討した。

B. 研究方法

5週齢の雄 *gpt delta* ラット (F344 background) 45匹を日本エスエルシー株式会社(静岡)より購入し、約1週間の馴化飼育の後、各群15匹ずつ3群に配し、Fig.1に示す実験デザインで動物実験を施行した。全群に実験開

始日に 100mg/kg b.w. diethylnitrosamine (DEN, 東京化成, Cas No. 55-18-5)を腹腔内投与、第2、5、8、11日に20mg/kg b.w. N-methylnitrosourea (MNU, Sigima, Cas No. 684-93-5)を腹腔内投与、第14、17、20、23日に40mg/kg b.w. dimethylhydrazine (DMH, Aldrich, Cas No. 306-37-6)を皮下投与した。さらに、これらの投与と並行して第1~2週に0.05% N-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN, 東京化成, Cas No. 3817-11-6)を、第3~4週に0.1%N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN, ナカライ, Cas No. 53609-64-6)をそれぞれ飲料水投与し(DMBDD 処置)、イニシエーション処置とした。実験開始第5週目から1~3群にそれぞれ26週間、ダンマル樹脂をオリエンタル MF 飼料中に0%、0.03%、2%の濃度で混じて、それを自由に摂取させた。

動物の飼育はバリアシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。被験物質の飼料への添加および固形化をオリエンタル酵母工業株式会社に依頼し、試験に供した。投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重および摂餌量は毎週1回測定した。摂餌量は、毎週1回7日間の摂取量を、飲水量は毎週2回3日または4日間の摂取量をケージ単位で測定し、ケージの収容動物数と日数から1匹あたりの1日平均摂餌量を計算した。

実験開始より31週後に、全生存例を麻酔下で、腹部大動脈から採血後に脱血致死させ、屠殺・剖検を行い、主要臓器を摘出し、病理組織学的検討ならびに肝臓における胎盤型 Glutathione S-transferase (GST-P)の免疫組織化学的検討を行った。さらに、大腸についてはホルマリン固定後、1%アルシアンブルーにて染色し、顕微鏡下で aberrant crypt foci (ACF)および mucin-depleted foci (MDF)の検索を行った。ACFはアルシアンブルー染色にて、周囲より濃染する crypt で1個あるいは複数個の crypt からなるものを foci として数えた。さらに、そのうち特に大腸腫瘍と関連性が高いとされている4個以上の異常 crypt からなる foci も数えた。また、MDFについてはアルシアンブルー染色にて、逆に染色性の低下した crypt を MDF として ACF 同様に数えた。(Fig.2)

統計処理では、対照群(0%投与群)と投与各群について統計学的な有意差検定を行い、危険率

5%($P<0.05$)または1%($P<0.01$)のレベルで判定した。統計学的解析は、病理組織学的検査における甲状腺、大腸、及び腎臓の主要な過形成及び腫瘍性病変について、5%有意水準で、Bartlett 法による等分散検定を行った。等分散の場合は、パラメトリックの Dunnett 法による両側検定を行い、不等分散の場合は、ノンパラメトリックの Steel 法による両側検定を行った。また、病理組織学的検査での発生頻度の差の検定については Fisher の直接確率検定(片側検定)を行い、程度ある病変については Wilcoxon 検定(両側検定)を実施した。

本研究の動物実験は全て香川大学総合生命科学センター、動物実験部門において行われ、動物実験の開始前には実験計画書を香川大学実験動物委員会に提出し、その承諾を得た上で実験動物の愛護上の問題に配慮し行った。

C. 研究結果

一般状態および死亡動物、体重、摂餌・飲水量、血液学的検査および生化学的検査、臓器重量、肝の GST-P 陽性細胞巣については、昨年度報告した通りである。

<大腸 ACF、MDF 検索>

大腸の ACF および MDF の検索結果を Table 1 に示す。ACF については、投与群のほうが増え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>

病理学組織学的所見として、腫瘍性病変の発生数の一覧を Table2 に、非腫瘍性病変の発生数の一覧を Table3 に示す。

肝臓では2%投与群において1例のみ肝細胞癌が観察されたが、対照群と比較して有意差は認められなかった。甲状腺では、被験物質投与群は対照群と比較して、有意な差は見られなかったが、甲状腺の濾胞細胞過形成の発生個数においては、用量依存性の増加傾向が見られた。

さらに、食道の扁平上皮過形成は対照群と比較して有意に減少していた。

腎臓の腎芽腫も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。

その他の臓器に関しては、いずれの病変も対照群と比較して発生頻度に有意差は認められなかった。

また、甲状腺、大腸ならびに腎臓の過形成及び腫瘍性病変の総数及び平均発生個数をそれぞれ Table 4、5、6 に示す。甲状腺で認められた腫瘍性病変としては、Hyperplasia, follicular cell (濾胞上皮過形成)、Adenoma, follicular cell (濾胞上皮腺腫) ならびに Carcinoma, follicular cell (濾胞上皮腺癌) が認められた。それぞれの発生個数の総数と発生頻度に群間での有意差はなかった (Table 4)。大腸の腫瘍性病変としては、Adenocarcinoma (腺癌) と Mucinous carcinoma (粘液癌) 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 (Table 5)。腎臓では、Atypical hyperplasia, tubular cell (尿細管異型過形成)、Adenoma, tubular cell (管状腺腫)、Carcinoma, tubular cell (管状腺癌) が認められた他、Nephroblastoma (腎芽腫)、Hyperplasia, transitional cell (移行上皮過形成) および Carcinoma, transitional cell (移行上皮癌) が認められた。尿細管異型過形成の平均発生個数が、2% 投与群で対照群に比較して有意な低値を示していた。その他で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。

D. 考察

今回、ダンマル樹脂の発がん修飾作用について、*gpt delta* ラットを用いて検討を行った。

病理組織学的検討で、以前に報告した F344 ラットと同様、2% 投与群において、1 例に肝細胞癌が観察されたが、対照群と比較して有意差は認められなかった。また、甲状腺においては濾胞細胞過形成の平均発生個数において有意差はないものの、増加傾向が認められたが、その他の腫瘍性病変の促進作用は観察されなかった。

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、病理組織学的検討を併せて考察すると、*gpt delta* ラットでは、F344 ラットと同様、ダンマル樹脂の高用量群における肝臓に対する発がん促進作用を

有する可能性が示唆されたが、甲状腺に対しては明らかではないと考えられる。

E. 結論

ダンマル樹脂による発がん修飾作用の有無について、F344 background の *gpt delta* ラットを用いて検討した。動物は 5 週齢の雄 *gpt delta* ラットを用い、3 群に分け、全群に発がんイニシエーション目的に DMBDD 処置を行った。実験開始第 5 週目より、1~3 群にダンマル樹脂をそれぞれ 0%、0.03%、2% の濃度で基礎飼料中に混じて経口投与させた。いずれの群も実験開始後 31 週目で屠殺剖検し、血液生化学的検査ならびに主要な臓器の病理組織学的検索を行った。肝臓の絶対重量、相対重量ともに有意な増加が認められ、GST-P 陽性細胞巢の肝臓切片全体の面積に対する面積および発生個数で有意な増加が認められ、0% 投与群と比較したときの増加率は *gpt delta* ラットのほうが F344 ラットより高かった。よって、*gpt delta* ラットのほうが F344 ラットよりも肝発がん促進作用に対する反応性が高いことが示唆された。病理組織学的検討では、肝臓における Foci (area) of cellular alteration および肝細胞癌の発生頻度では有意差は認められず、F344 ラットにおいて有意差が認められた甲状腺における濾胞細胞過形成の発生個数でも有意差は認められなかったが、用量依存性に増加傾向を示していた。したがって、ダンマル樹脂は F344 ラットと同様に *gpt delta* ラットでも肝臓を標的とする発がん促進作用が示唆された。また、F344 を background とした *gpt delta* ラットは、F344 ラットと比較して、被験物質による反応性がわずかながら異なることが示唆されたものの、被験物質による変異原性の有無を臓器ごとに検討できるだけでなく、同時に、F344 ラットと同様に、発がん性、発がん修飾作用の検討にも応用可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

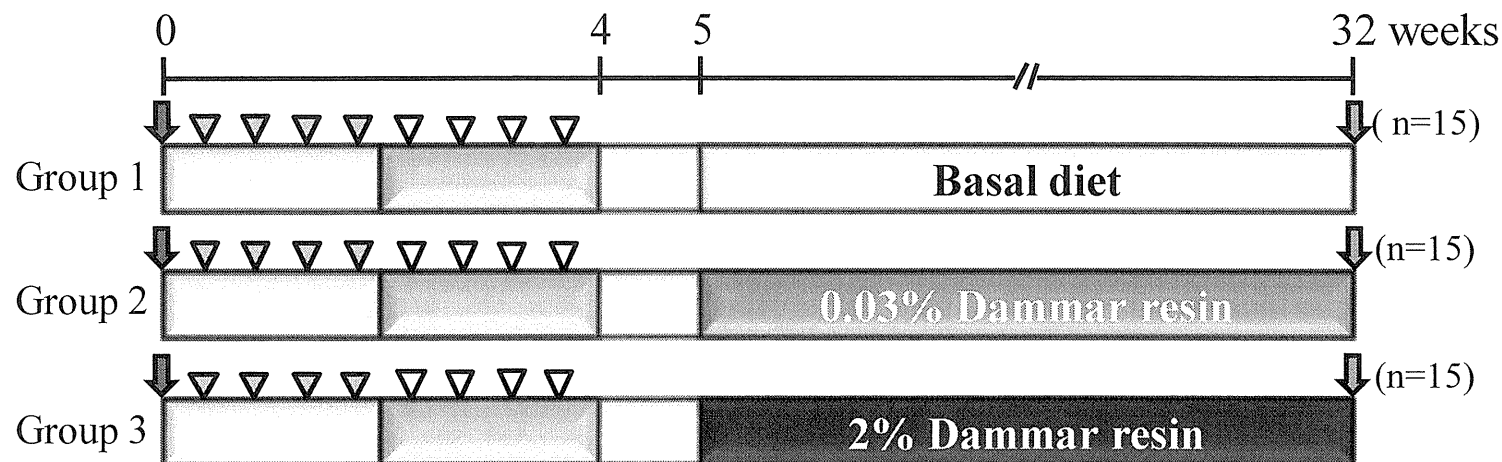
1. 論文発表

1. Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. Lack of modifying effects of intratracheal instillation of quartz or dextran sulfate sodium (DSS) in

- drinking water on lung tumor development initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female A/J mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 22: 179-185, 2009.
2. Hashimoto N, Yachida S, Okano K, Wakabayashi H, Imaida K, Kurokohchi K, Masaki T, Kinoshita H, Tominaga M, Ajiki T, Ku Y, Okabayashi T, Hanazaki K, Hiroi M, Izumi S, Mano S, Okada S, Karasawa V, Maeba V, Suzuki Y. Immunohistochemically detected expression of p27kip1 and skp2 predicts survival in patients with intrahepatic cholangiocarcinomas. *Ann. Surg. Oncol.*, 16: 395-403, 2009.
 3. Matsuda Y, Takeuchi H, Yokohira M, Saoo K, Hosokawa K, Yamakawa K, Zeng Y, Totsuka Y, Wakabayashi K, Imaida K. Enhancing effects of a high fat diet on 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Molecular Medicine Reports*, 2: 701-706, 2009.
 4. Takeuchi H, Saoo K, Matsuda Y, Yokohira M, Yamakawa K, Zeng Y, Kuno T, Kamataki T, Imaida K. 8-Methoxypсорalen, a potent human CYP2A6 inhibitor, inhibits lung adenocarcinoma development induced by 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female A/J mice. *Molecular Medicine Reports*, 2: 585-588, 2009.
 5. Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. A lung carcinogenic bioassay of CuO and TiO₂ nanoparticles with intratracheal instillation using F344 male rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 22: 71-78, 2009.
 6. Yokohira M, Mastuda Y, Suzuki S, Hosokawa K, Yamakawa K, Hashimoto N, Saoo K, Nabae K, Doi Y, Kuno T, Imaida K. Equivocal colonic carcinogenicity of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger at high dose level in a Wistar Hannover rat 2-year Study. *J. Food Sci.*, 74(2): T24-30, 2009.
 7. Yokohira M, Kuno T, Yamakawa K, Hashimoto N, Ninomiya F, Suzuki S, Saoo K, Imaida K. An intratracheal instillation bioassay system for detection of lung toxicity due to fine particles in F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 22: 1-10, 2009.
 8. Yachida S, Imaida K, Yokohira M, Hashimoto N, Suzuki S, Okano K, Wakabayashi H, Maeta H, Suzuki Y. Jun activation domain binding protein 1 is overexpressed from the very early stages of hepatocarcinogenesis. *Surgical Oncol.* 17: 3386-3393, 2010.
 9. Kohno M, Haramoto M, Nakajima O, Yang L, Hinotsu S, Yokohira M, Imaida K, Kawakami K. Antedrug budesonide by intrapulmonary treatment attenuates bleomycin-induced lung injury in rats with minimal systemic adverse effects. *Biol. Pharm. Bull.*, 33:1206-1211, 2010.
 10. Imaida K, Yokohira M, Hashimoto N, Kuno T. Risk analysis of environmental chemicals on lung carcinogenesis. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 11: 9-12, 2010.
 11. Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Imaida K. Potassium octatitanate fibers (TISMO) induce pleural mesothelial cell reactions with iron accumulation in female A/J mice. *Oncol. Lett.*, 1: 273-278, 2010.
 12. Tsuda H, Futakuchi M, Fukamachi K, Shirai T, Imaida K, Fukushima S, Tatematsu M, Furukawa F, Tamano S, Ito N. A medium-term, rapid rat bioassay model for the detection of carcinogenic potential of chemicals. *Toxicol Pathol.*, 38: 182-187, 2010.
 13. Kuno T, Hirose Y, Yamada Y, Imaida K, Tatematsu K, Mori Y, Mori H. Chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic preneoplastic lesions in Fischer rats by 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate, a wasabi derivative. *Oncology Letters*, 1: 273-278, 2010.
 14. Yamakawa K, Kuno T, Hashimoto N, Yokohira M, Suzuki S, Nakano Y, Saoo K, Imaida K. Molecular analysis of carcinogen induced rodent lung tumors-Involvement of microRNA expression and Kras or EGFR mutation. *Molecular Medicine Reports*, 3: 141-147, 2010.

15. Takeuchi H, Saoo K, Yamakawa K, Matsuda Y, Yokohira M, Zeng Y, Kuno T, Totsuka Y, Takahashi M, Wakabayashi K and Imaida K. Tumorigenesis of 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), but not enhancing effects of concomitant high fat diet, on lung carcinogenesis in female A/J mice. *Oncol. Lett.*, 1: 137-142, 2010.
 16. Suzuki S, Yokohira M, Hashimoto N, Saoo K, Matsuda Y, Yamakawa K, Nakano Y, Kuno T, Imaida K. Different threshold levels for 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) initiation of lung and colon carcinogenesis and the effects of an additional initiation by 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A/J mice. *Molecular Medicine Reports*, 3: 301-307, 2010.
 17. 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
 18. 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癌の 1 例. *診断病理*, 28(3): 186-189, 2011.
2. 学会発表
1. Hashimoto N, Yokohira M, Suzuki S, Saoo K, Kuno T, Uchino T, Tokunaga H, Imaida K. Comparison of nano- and micro-sized particles by three different route administrations using a medium-term liver carcinogenesis bioassay in F344 rats. *American Association for Cancer Research, 100th Annual Meeting 2009* (2009.04)
 2. Kuno T, Yokohira M, Hashimoto N, Suzuki S, Saoo K, Imaida K. The establishment of a streptozocin-induced mouse pulmonary tumor model. *American Association for Cancer Research, 100th Annual Meeting 2009* (2009.04)
 3. 橋本希、横平政直、久野壽也、橋本希、竿尾光祐、今井田克己、マウス胸膜中皮腫モデルの検討, 第 98 回日本病理学会総会, 京都 (2009.05)
 4. Hashimoto N, Yokohira M, Yamakawa K, Suzuki S, Saoo K, Kinouchi S, Kuno T, Imaida K. Pleural mesothelial proliferating reaction by TISMO –possible animal model of mesothelioma-. *68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association* (2009.10)
 5. Suzuki S, Yokohira M, Hashimoto N, Kuno T, Yamakawa K, Saoo K, Shiooka T, Imaida K. Overexpressions of liver CYP2A5 and MGMT by the combination treatments of MeIQx and NNK in A/J mice. *68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association* (2009.10)
 6. Kuno T, Yokohira M, Suzuki S, Hashimoto N, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K. Modifying effects of obesity and diabetes in the chemical-induced lung tumorigenesis on *db/db* and *ob/ob* female mice. *68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association* (2009.10)
 7. Yamakawa K, Suzuki S, Yokohira M, Hashimoto N, Saoo K, Kuno T, Imaida K. Aberrant expression of microRNA on NNK or MeIQx-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association* (2009.10)
 8. 鬼松幸子、船本康申、平口貴子、三谷由香利、山川けいこ、横平政直、今井田克己、大森正樹、竿尾光祐、術中迅速診断時に細胞診が有用であった angiomatous meningioma の一例, 第 49 回日本臨床細胞学会秋季大会, 神戸 (2010.11)
 9. Kuno T, Yokohira M, Suzuki S, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano Y, Saoo K, Hara K, Imaida K. Modifying effects of PPAR gamma agonist, Troglitazone in the chemically-induced lung tumorigenesis in A/J female mice, *69th Annual Meeting of the Japanese*

- Cancer Association (2010.9)
10. Yokohira M, Suzuki S, Imaida K, Samuel M. Cohen, 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2010.9)
 11. Nakano Y, Hashimoto N, Yokohira M, Yamakawa K, Kuno T, Suzuki S, Saoo K, Shiooka T, Imaida K, Effect of chronic inflammation on DHPN lung carcinogenesis in F344 and SD rats, 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2010.9)
 12. 横平政直、山川けいこ、二宮芙美子、中野裕子、井上達史、竿尾光祐、今井田克己、Wistar-Hannover GALAS ラットを用いた慢性毒性ならびに長期発がん性評価(キダチアロエ), 第 27 回日本毒性病理学会総会 (2011.1)
 13. 中野裕子、横平政直、橋本希、山川けいこ、井上達史、二宮芙美子、竿尾光祐、今井田克己、ラット気管内投与による nicotine の毒性作用の検討, 第 27 回日本毒性病理学会総会 (2011.1)
 14. Yokohira M, Lora L. Arnold, Karen L. Pennington, Suzuki S, Kakiuchi-Kiyota S, Karen Herbin-Davis, David J. Thomas, Imaida K, Samuel M. Cohen, Severe urinary bladder cytotoxicity and regenerative hyperplasia with dose response induced by arsenite in arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase knockout mice, 50th Anniversary Annual Meeting & ToxExpo (2011.3)
 15. Kishi S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Inoue T, Saoo K, Imaida K, The influences of EGFR, ER and PR to NNK-induced lung tumor growth in female A/J mice. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2011.1)
 16. Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kishi S, Inoue T, Saoo K, Imaida K, The promotion effects of lung tumor by left pulmonary ligation in A/J mice. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2011.1)
 17. Nakano Y, Hashimoto N, Yamakawa K, Inoue T, Ninomiya F, Kinouchi S, Hagiwara A, Yokohira M, Saoo K, Imaida K, Tumor promoting potential of dammer resin in a mediamterm multi-organ carcinogenesis bioassay model in F344 rats. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2011.1)
 18. Inoue T, Nakano Y, Ninomiya F, Yamakawa K, Hashimoto N, Yokohira M, Imaida K, Modifying effects of antagonist of coagulation factor Xa on liver carcinogenesis. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2011.1)
 19. 横平政直、橋本希、中野裕子、山川けいこ、岸宗佑、二宮芙美子、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)
 20. 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)
 21. 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. 51th Anniversary Annual Meeting & ToxExpo (2012.3)
 22. 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. 51th Anniversary Annual Meeting & ToxExpo (2012.3)
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし



◆ Animals : 6-week-old, 45 male gpt delta rats (F344 background)

◆ Test chemical : Dammar in the diet

◆ Basal diet : MF

◆ Treatment

↓ DEN: 100 mg/kg body weight, i.p., single dose, at day 0.

▽ MNU: 20 mg/kg body weight, i.p., 4 times, during weeks 1 and 2.

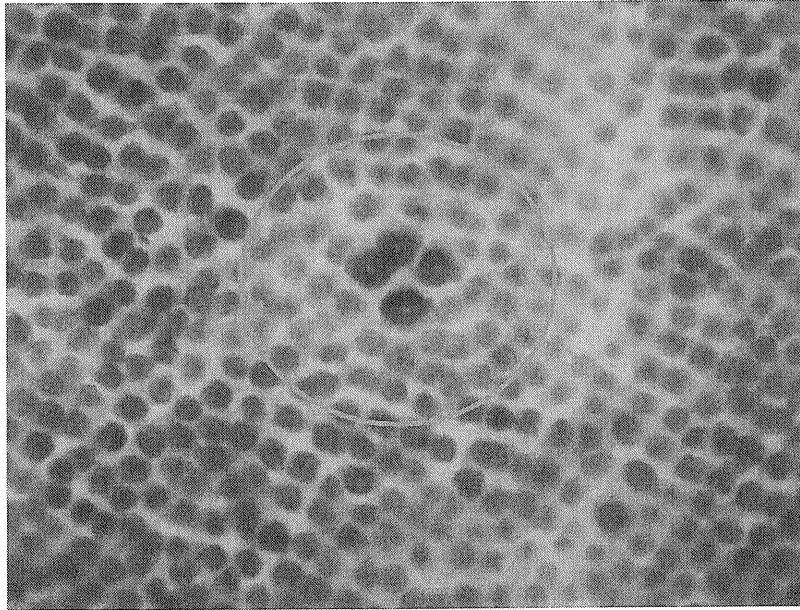
□ BBN: 0.05% in the drinking water, during weeks 1 and 2.

▽ DMH: 40 mg/kg body weight, s.c., 4 times, during weeks 3 and 4.

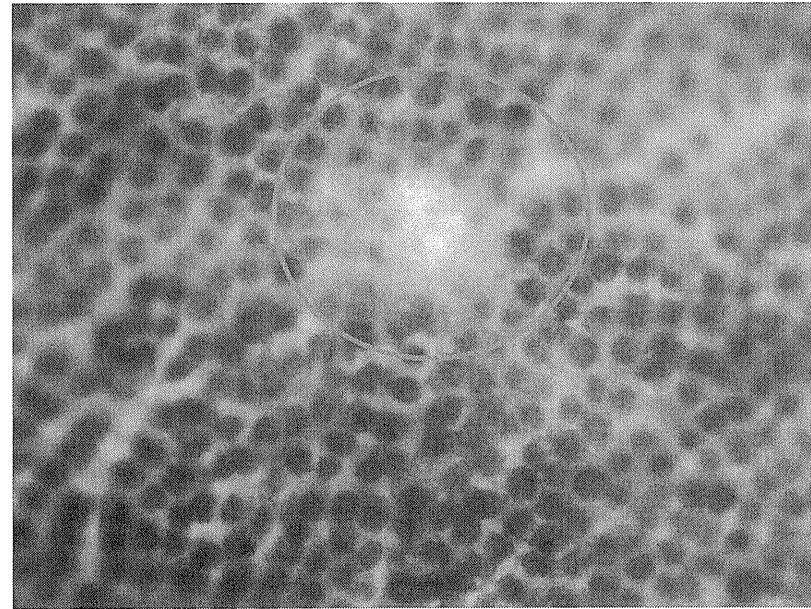
□ DHPN: 0.1% in the drinking water, during weeks 3 and 4.

↓ : Sacrifice

Fig.1 Experimental Design



ACF



MDF

Fig.2 ACF and MDF (Alcian blue staining)

Table 1. ACF and MDF in the colon

| Dammar resin (%) | No. of rats | Total No. of ACF/colon | No. of ACF containing of more than four Acs |
|------------------|-------------|------------------------|---|
| 0 | 14 | 171.07 ± 48.70 | 69.36 ± 20.60 |
| 0.03 | 15 | 185.27 ± 47.74 | 74.73 ± 24.79 |
| 2 | 15 | 187.07 ± 67.06 | 74.47 ± 26.34 |

| Dammar resin (%) | No. of rats | Total No. of MDF/colon | No. of MDF containing of more than four Acs |
|------------------|-------------|------------------------|---|
| 0 | 14 | 33.00 ± 9.66 | 5.43 ± 1.55 |
| 0.03 | 15 | 30.53 ± 9.68 | 5.87 ± 2.56 |
| 2 | 15 | 34.00 ± 6.80 | 5.67 ± 1.88 |

ACF: aberrant crypt foci

MDF: mucin-depleted foci

Acs: aberrant crypts

Table 2. Summary of Preneoplastic or Neoplastic Lesions-1

| | Group No. | 1 | 2 | 3 |
|-------------------------------------|------------------|----|------|-----|
| | Dammar resin (%) | 0 | 0.03 | 2 |
| Organs and Findings | No. of rats | 14 | 15 | 15 |
| Pituitary | | | | |
| Adenoma, pars distalis | | 0 | 1 | 0 |
| Thyroid | | | | |
| Hyperplasia, C-cell | | 1 | 0 | 0 |
| Hyperplasia, follicular cell | | 12 | 15 | 14 |
| Adenoma, follicular cell | | 12 | 13 | 10 |
| Carcinoma, follicular cell | | 8 | 8 | 7 |
| Nasal cavity | | | | |
| Hyperplasia, olfactory epithelium | | 6 | 9 | 10 |
| Hyperplasia, respiratory epithelium | | 1 | 0 | 0 |
| Adenoma, septal gland | | 1 | 0 | 0 |
| Adnoma, respiratory epithelium | | 1 | 0 | 2 |
| Olfactory neuroblastoma | | 3 | 7 | 2 |
| Lung/bronchial | | | | |
| Hyperplasia, bronchiolo-alveolar | | 14 | 15 | 15 |
| Adenoma, bronchiolo-alveolar | | 8 | 9 | 6 |
| Adenocarcinoma, bronchiolo-alveolar | | 2 | 1 | 0 |
| Carcinoma, adenosquamous | | 0 | 1 | 0 |
| Carcinoma, squamous cell | | 1 | 0 | 0 |
| Tongue | | | | |
| Hyperplasia, squamous cell | | 1 | 0 | 0 |
| Esophagus | | | | |
| Hyperplasia, squamous cell | | 9 | 4 * | 3 * |
| Jejunum | | | | |
| Adenoma | | 0 | 1 | 0 |

* : Significantly different from control group at P<0.05.

Table 2. Summary of Preneoplastic or Neoplastic Lesions-2

| | Group No. | 1 | 2 | 3 |
|---------------------------------------|------------------|----|------|----|
| | Dammar resin (%) | 0 | 0.03 | 2 |
| Organs and Findings | No. of rats | 14 | 15 | 15 |
| Colon | | | | |
| Focal atypical hyperplasia | | 2 | 1 | 1 |
| Hyperplasia | | 0 | 1 | 0 |
| Reactive hyperplasia | | 1 | 0 | 0 |
| Adenocarcinoma | | 2 | 1 | 0 |
| Mucinous adenocarcinoma | | 2 | 1 | 1 |
| Liver | | | | |
| Foci (area) of cellular alteration | | 13 | 15 | 14 |
| Carcinoma, hepatocellular | | 0 | 0 | 1 |
| Kidney | | | | |
| Atypical hyperplasia, tubule cell | | 12 | 15 | 11 |
| Hyperplasia, transitional cell | | 0 | 0 | 1 |
| Adenoma, tubule cell | | 8 | 7 | 4 |
| Carcinoma, transitional cell | | 1 | 1 | 1 |
| Carcinoma, tubule cell | | 2 | 3 | 1 |
| Nephroblastoma | | 5 | 5 | 0* |
| Urinary bladder | | | | |
| P/N hyperplasia, transitional cell | | 5 | 7 | 10 |
| Simple hyperplasia, transitional cell | | 13 | 14 | 13 |
| Papilloma, transitional cell | | 7 | 7 | 6 |
| Carcinoma, transitional cell | | 2 | 0 | 0 |
| Prostate | | | | |
| Fibrosarcoma | | 0 | 1 | 0 |
| Prep./ Clit. gland | | | | |
| Adenoma | | | [1]a | |
| Mammary gland | | | | |
| Adenoma | | 0 | 1 | 0 |

a : Numbers in square bracket are for animals examined microscopically.

* : Significantly different from control group at P<0.05.

Table 3. Summary of Congenital or Non-neoplastic Lesions

| | Group No. | 1 | 2 | 3 |
|---|------------------|----|------|----|
| | Dammar resin (%) | 0 | 0.03 | 2 |
| Organ and Findings | No. of rats | 14 | 15 | 15 |
| Parathyroid | | | | |
| Multinucleated syncytial giant cells/(2)a | | 1 | 0 | 0 |
| Adrenal | | | | |
| Cyst/(1)a | | 0 | 0 | 1 |
| Nasal cavity | | | | |
| Inflammation/(2)a | | 0 | 1 | 0 |
| Inflammation/(3)a | | 3 | 0 | 0 |
| Colon | | | | |
| Cellular infiltration, inflammatory cell/(2)a | | 1 | 0 | 0 |
| Pancreas | | | | |
| Atrophy, acinar cell/(1)a | | 2 | 1 | 1 |
| Liver | | | | |
| Cellular infiltration, lymphocyte/(1)a | | 0 | 3 | 1 |
| Cyst, biliary/(2)a | | 0 | 0 | 1 |
| Cystic degeneration/(2)a | | 0 | 0 | 1 |
| Fatty change/(2)a | | 0 | 2 | 0 |
| Kidney | | | | |
| Atypical tubules/(1)a | | 14 | 15 | 13 |
| Urinary bladder | | | | |
| Cellular infiltration, lymphocyte/(1)a | | 3 | 0 | 1 |
| Necrotizing inflammation/(2)a | | 0 | 1 | 0 |

a : Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion : (1) Minimal (2) Slight (3) Moderate (4) Marked (5) Severe

Table 4. Total Number and Multiplicity of Hyperplastic or Neoplastic Lesions in the Thyroid

| Dammar resin (%) | No. of rats | Hyperplasia, follicular cell | | Adenoma, follicular cell | | Carcinoma, follicular cell | | Adenoma or carcinoma follicular cell | |
|------------------|-------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------|----------------------------|--------------|--------------------------------------|--------------|
| | | Total No. | Multiplicity ^a | Total No. | Multiplicity | Total No. | Multiplicity | Total No. | Multiplicity |
| 0 | 14 | 41 | 2.9±1.7 | 53 | 3.8±3.4 | 10 | 0.7±0.7 | 63 | 4.5±3.6 |
| 0.03 | 15 | 58 | 3.9±2.6 | 54 | 3.6±2.4 | 15 | 1.0±1.3 | 69 | 4.6±2.8 |
| 2 | 15 | 91 | 6.1±5.1 | 39 | 2.6±2.6 | 14 | 0.9±1.3 | 53 | 3.5±3.3 |

^a : Average number of lesions ± S.D.