

201234006A

別添1

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

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

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成 25(2013)年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書	
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 -----	1
渋谷 淳	
II. 分担研究報告書	
1. 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索 -----	12
渋谷 淳	
(資料) 図 1-6	
2. ニトロフラン類の安全性評価法の確立 -----	19
梅村 隆志	
(資料) 図 1-3、表 1-7	
3. CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション 作用の修飾 -----	24
鈴木 和彦	
(資料) 図 1、表 1-8	
4. 牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究 -----	29
九郎丸 正道	
(資料) 図 1-4、表 1-12	
研究成果の刊行に関する一覧表 -----	33
研究成果の刊行物・別刷 -----	34

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）
 総括研究報告書（平成 24 年度）
 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
 研究代表者 渋谷 淳
 東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究要旨：本研究では、動物薬の発がん性に関して、①発がん性全般に対応可能な予測指標の確立、②ニトロフラン類の遺伝毒性発がん機序の解明、③CYP inducer の併用投与による肝発がんプロモーションの修飾作用の解明を、牛海綿状脳症(BSE)の特定危険部位に関しては、背根神経節の完全除去法の確立を目指す。

巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索研究では、昨年度までに得られた発がん予測指標候補分子について、異なる発がん標的に対する発がん促進過程早期における反応性を免疫組織学的に検討した。その結果、肝臓と甲状腺に形成された前がん病変と、膀胱、前胃及び腺胃の過形成病変内で、Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 及び HP1 α の陽性細胞が有意に増加した。一方、p21^{Cip1} 陽性細胞は甲状腺の前がん病変で減少したが、他の臓器の病変では増加した。以上より、前がん病変及び過形成病変では、M 期に停滞して染色体不安定性を増すことが推察された。また、甲状腺前がん病変では細胞周期チェックポイント機能が破綻して発がん促進するのに対して、その他の臓器病変ではチェックポイント機能が保たれて G₁/S 期停止を示す細胞が増加する可能性が示唆された。

ニトロフラン類の安全性評価法の確立研究では、昨年度までに nitrofurantoin (NFT) による遺伝毒性にその代謝過程で生じる酸化ストレスが寄与する結果を得た。本年度の検討により、NFT による雄ラット腎 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの上昇を見出した。また、雄特有の尿中蛋白 α_{2u} -globulin の沈着も認めため、発がん性の認められない雌ラットで *in vivo* 変異原性を検索したところ、雌でも *gpt* 突然変異発生頻度の上昇を認めた。よって、NFT は酸化ストレスを介して遺伝毒性を発揮し、更に雄では α_{2u} -globulin 沈着を介した細胞増殖活性の亢進が発がんに寄与すると推測された。また、*p53* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性試験を行った結果、*p53* 遺伝子の野生型及びホモ欠損型の両遺伝子型で *gpt* MF の上昇傾向が見られたが、遺伝子型の違いによる差異は見られなかった。

CYP1A inducer の複合投与による肝発がん修飾作用の解明研究では、CYP1A inducer である indole-3-carbinol (I3C) と CYP2B/1A inducer である phenobarbital (PB)、あるいは PB と CYP2B inducer である orphenadrine (ORPH) の併用投与によるラット肝発がんプロモーション修飾作用を検討した。その結果、PB と I3C 併用投与によるプロモーション作用の増強は認められなかったが、PB と ORPH の併用投与により相乗的な増強が認められ、その機序に ROS 産生の増加による酸化的ストレスの関与が示唆された。これらより、誘導する酵素の異なる発がん物質の組み合わせではプロモーション作用は増強されないが、CYP2B inducer 同士では増強することが示唆された。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究では、前方 3/4 の脊柱内に位置する神経節のと畜場における完全除去の可否、及び除去率における品種差と性差を検討した。除去率は平均 92% であったが、100% の除去達成は 10% に過ぎず、今後更なる技術改良が必要であると推測された。また、牛の品種別及び牝別別の除去率に差は認められなかった。

渋谷 淳

東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門
教授

梅村 隆志

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

三森国敏

東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門
教授(平成 24 年 3 月 31 日-平成 24 年 6 月 30 日)

鈴木 和彦

東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門
講師(平成 24 年 7 月 1 日-平成 25 年 3 月 31 日)

九郎丸 正道

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

A. 研究目的

本研究では畜水産物の安全性の確保を目的として、動物薬の発がん性に関する研究では、巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索、ニトロフラン類の安全性評価法の確立、及び CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾作用の解明に関する研究を実施し、ならびに牛海綿状脳症(BSE)の特定危険部位である背根神経節の除去法に関する研究を実施する。

巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索研究では、異なる発がん標的に対する発がん促進過程早期における発がん予測指標候補分子の変動を検討し、発がん過程への関与の有無を検討する。ニトロフラン類の安全性評価法の確立に関する研究では、ニトロフラン類に属する物質の発がん機序の解明によるヒトへの安全性の評価法を、*in vivo* 変異原性検出モデルである *gpt delta* 動物を用いて確立する。CYP1A inducer の複合投与によるラット肝発がんイニシエーション・プロモーション作用の修飾解明研究では、ADI などの設定への複数の物質の合算値の適用の可否を検討することを目的として、酵素誘導性の異な

る複数の発がん物質の組み合わせでイニシエーション試験とプロモーション試験を実施する。また、牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究では、BSEの特定危険部位を完全に除去する方法の確立を目指す。以下にそれぞれの目的の詳細を述べる。

巨大核出現に關与する標的遺伝子の探索

動物用医薬品等の化学物質の発がん性評価手法であるげっ歯類を用いた発がん性試験は、長期間に及ぶ投与のため、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題があり、短期発がん検出系の確立が求められている。殊に評価上問題となることの多い非遺伝毒性発がん物質に関しては、多数の発がん標的に共通する検出の手立てがなく、有効な手法開発が望まれている。一方、ラットやマウスの肝臓ないし腎臓に発がん性を及ぼす化学物質の投与過程早期において、腫瘍性病変とは異なる巨大核の出現がしばしば見出されており、ゲノムの異数性を反映し、発がん好発部位に一致して、投与期間と共に増加することより、巨大核の出現に至る細胞内の分子過程に発がんの鍵となるものが存在する可能性が強く示唆されている。National Toxicology Program (NTP) で行われた発がん性試験では、肝発がん性を示す物質の特徴として、ラットなどの亜急性毒性・慢性毒性試験等において、肝重量増加、肝細胞過形成と変性、巨大核の出現、チトクローム P450 酵素誘導の所見が多ければ多いほど、肝発がん性の陽性頻度が高くなることが報告されている (Allen *et al.*, 2004)。特に、肝発がんの初期過程を与える可能性の高い巨大核の出現はゲノムの異数性を示し、遺伝子傷害の蓄積あるいは核分裂機構の障害を反映した前がん病変と位置付ける研究者もいる (Brown *et al.*, 2007; Adler *et al.*, 2009)。このような核異常は非遺伝毒性腎発がん物質でも誘発されるため、核分裂機構の障害を誘発するような分子メカニズムの中に、遺伝子の直接傷害をせずに、間接的に染色体の不安定化を図って発がんに至らしめるものが存在している可能性が高い。また巨大核の出現は、広く発がんとの関連性が指摘され (Lankoff *et al.*, 2002)、最近では G₂/M 期付近での細胞周期関連分子の発現変動が示唆されている (Adler *et al.*, 2009)。

本研究では、巨大核出現に關連する分子標的の同定を出発点として、NTP report で肝発がん性と共に核の巨大化を示すことが報告されている複数の発がん物質を陽性対照として、Allen らの報告の criteria を満たす動物薬を選択して、28 日間の短期投与試験を実施した。次いで、肝以外の発がん標的性に対する *in vivo* 短期スクリーニング指標としての可能性を探る目的で、異なる発がん標的性を有する発がん物質の 28 日間反復投与試験を実施し、肝臓で得られた短期発がん性指標候補分子群の反応性を検討し、短期発がん性予測指標の確立を図った。我々はこれまでに、発がん標的性の異なる発がん物質に反応する発がん性早期指標探索により、巨大核誘発性の有無にかかわらず、増殖活性の亢進を示した発がん物質に共通して M 期異常を示す分子発現変化を見出した。今回、得られた短期発がん性予測指標候補分子群を用いて、これらの分子の発がん過程早期への關与を検討する。

ニトロフラン類の安全性評価法の確立

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、nitrofurantoin、nitrofurazone、furazolidone、furazolidone の 4 種については国内での畜産動物へ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。従って、ニトロフラン類の発がん機序を解明することはこの種の動物用医薬品に対するヒト安全性の確保にとって重要な課題である。

これまでの研究において雄ラット腎臓に発がん性の報告がある nitrofurantoin (NFT) とその代謝物でヒドラジド誘導体の 1-aminohydantoin (AHD) およびニトロフラン類の基本構造を有する 5-nitrofulfural (NFA) について、F344 系 *gpt delta* ラット腎を用いて *in vivo* 変異原性試験を行った。その結果、NFT と代謝過程で酸化ストレスを誘発する可能性がある NFA において *gpt* 突然変異体頻度 (MF) の有意な上昇が認められ、更に NFT 投与で誘発された *gpt* 遺伝子突然変異体のスペクトラム解析から酸化ストレスとの関連性が疑われる GC-TA transversion 変異頻度の有意な上昇が認められた。

そこで本年度は、実験 1-1 として、その関連性を更に検討する目的で、酸化的 DNA 損傷の一つである 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の腎 DNA 中のレベルを測定した。一方、これまでの実験で、NFT 投与により、雄特有の尿中蛋白 α_{2u} -globulin の沈着が認められたことから、実験 1-2 として、発がん性の認められていない雌ラットにおける *in vivo* 変異原性についても検討した。また NFT の遺伝毒性発現機序とがん抑制遺伝子である *p53* 遺伝子の関連性を検索するため、実験 2 として、*p53* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性試験の予備試験を実施した。

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

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

β -naphthoflavone (BNF) や indole-3-carbinol、oxfendazole (I3C) などの CYP1A inducer が、肝発がんプロモーション作用を持ち、かつ、ミクロソーム由来の ROS 産生や 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)、thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) などの酸化的ストレス応答を引き起こすことが実証されている (Dewa *et al.*, 2008; Shimamoto *et al.*, 2011; Dewa *et al.*, 2009)。更に、CYP1A を誘導するプロトンポンプ阻害剤 omeprazole (OPZ) においてもラットで肝発がんプロモーション作用を示すことが明らかになったが、そ

の発がんプロモーション作用に酸化ストレスは関与しないことが示された (Hayashi *et al.*, 2012)。

本研究では、昨年までに OPZ と更に強い CYP1A inducer として知られる BNF を併用投与あるいは BNF と CYP1A/2B inducer である piperonyl butoxide (PBO) を併用投与することで、肝発がんイニシエーションないしプロモーション作用がどのように修飾されるか (相乗作用的な影響が発現するか否か) を検討した。本年度は I3C と CYP2B/1A inducer である PB を併用投与することで、肝発がんプロモーション作用がどのように修飾されるかを検討した。また、昨年度までの成果において CYP1A inducer 同士による併用投与が増強作用を示した (Hayashi *et al.*, 2012) ため、CYP2B inducer 同士の併用投与が肝発がんプロモーション作用に与える影響を、PB と CYP2B inducer であり ROS が関与した肝発がんプロモーション作用をもつ orphenadrine (ORPH) (Morita *et al.*, 2013) を用いて検討した。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究

BSE 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図ることを目的とした。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。更に、品種別及び牝牡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

巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索

動物実験

6 週齢の雄性 F344 ラットを、二段階発がんモデルを用いた発がんプロモーション実験に供した。肝臓は肝中期発がん性試験法を用いて、F344 ラットに *N*-diethylnitrosamine (DEN; 200 mg/kg) を単回腹腔内投与し、その 2 週間後から piperonyl butoxide (PBO) 20,000 ppm (DEN + PBO, 10 匹) ないし methapyrilene (MP) 1,000 ppm (DEN + MP, 11 匹) を 6 週間混餌投与、または基礎飼料 (DEN-alone, 11 匹) で維持した。また、動物は定法に従い、3 週目に 2/3 部分肝切除を実施した。PBO および MP は、同様の実験で前がん病変指標である glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) に陽性を示す前がん病変が誘発される用量を投与用量として設定した。

甲状腺については、F344 ラットに *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN; 2,800 mg/kg) を単回皮下投与し、その 1 週間後から、sulfadimethoxine (SDM) 1,500 ppm (DHPN + SDM, 12 匹) を 4 週間飲水投与、ないし飲料水 (DHPN-alone, 12 匹) で維持した。SDM は、二段階発がんモデルを用いたプロモーション 13 週間後に甲状腺濾胞上

皮細胞癌を誘発する用量を投与用量として設定した。

膀胱については、F344 ラットに *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN; 500 ppm) を 4 週間飲水投与し、その後 phenylethyl isothiocyanate (PEITC) 1,000 ppm (BBN + PEITC, 11 匹) を 8 週間混餌投与、ないし基礎飼料 (BBN-alone, 12 匹) で維持した。PEITC は、二段階発がんモデルを用いたプロモーション 32 週間後に膀胱に移行上皮がんを誘発する用量を投与用量として設定した。

前胃および腺胃については、F344 ラットに 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG; 150 mg/kg) を単回強制経口投与し、その 1 週間後より catechol (CC) 8,000 ppm (MNNG + CC, 12 匹) を混餌投与、ないし基礎飼料 (MNNG-alone, 12 匹) で維持した。CC は、二段階発がんモデルを用いたプロモーション 51 週間後に前胃および腺胃にがんを誘発する用量を投与用量として設定した。

実験終了後、すべての動物は深麻酔下で安楽殺し、標的臓器を摘出した。臓器は 4% パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定し、パラフィン包埋した。臓器は 4% PFA で固定し、パラフィン包埋した。剖検時、膀胱、胃および大腸は 4% PFA を注入し、内部の移行上皮ないし粘膜の固定促進に努めた。4% PFA 固定後、肝臓の外側左葉および内側右左葉の最大割面、左右甲状腺、膀胱の縦断面 (長軸に沿って正中面で半割した両面) そして前胃および腺胃を含む胃の 3 断面を包埋した。

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、甲状腺、膀胱、胃を 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、p21^{Cip1}、Cdc2 については、脱パラフィン処理した組織切片を、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、Ki-67 はオートクレーブ 121°C で 10 分間、p21^{Cip1} はマイクロウェーブ 90°C で 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キングし、マウス抗 Ki-67 抗体 (50 倍希釈; Dako, Denmark)、マウス抗 p21 抗体 (100 倍希釈; Abcam, UK) 及びマウス抗 Cdc2 抗体 (100 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA) 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, USA) 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。更に Aurora B、p-Histone H3、HP1α 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臓組織切片を、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、p-Histone H3 はオートクレーブ 121°C で 10 分間、HP1α はマイクロウェーブ 90°C で 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キングし、ウサギ抗 Aurora B 抗体 (200 倍希釈; Abcam)、ウサギ抗 p-Histone H3 抗体 (50 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology)、ウサ

ギ抗 HP1a 抗体 (200 倍希釈; Cell Signaling Technology, USA) を用いて一晚反応させた。次いで二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) 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。

肝臓と甲状腺については、前がん病変を周囲細胞から識別可能であると考えられる前がん病変指標として以下の抗体を用いた。肝臓についてはウサギ抗 GST-P 抗体 (1,000 倍希釈; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Japan) を用い、甲状腺についてはウサギ抗 phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (Thr202/Tyr204) 抗体 (p-Erk1/2, 400 倍希釈; Cell Signaling Technology) を用いた。賦活化方法は、GST-P は無処置、p-Erk1/2 はオートクレーブ処置を施した。

免疫組織化学染色に対する解析

肝臓の GST-P 陽性前がん病変は以前の報告と同様に、直径 0.2 mm 以上の病変数と面積、そして肝臓の総面積を計測した。甲状腺の p-Erk1/2 陽性 focal follicular cell hyperplasias (FFCHs) は 4 細胞以上から成る病変数と面積、また甲状腺の総面積を計測した。肝臓および甲状腺の評価領域は、400 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに直径 0.2 mm 以上の肝 GST-P 陽性前がん病変ないし 200 細胞以上から成る p-Erk1/2 陽性 FFCHs を 10 病変選択した。免疫組織化学染色はイニシエーション群の前がん病変外についても行った。膀胱の評価領域は、400 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに 5 箇所、BBN-alone 群の移行上皮ないし BBN + PEITC 群の単純性過形成、PN 過形成およびその周囲細胞を選択した。前胃の評価方法は、400 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに 10 箇所、MNNG-alone 群の粘膜上皮ないし MNNG + CC 群の過形成およびその周囲細胞を選択した。腺胃の評価方法は、400 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに 5 個の MNNG-alone 群の増殖帯を除く腺管、MNNG + CC 群については、異常な形態かつ細胞密度が高い 4-10 腺管から成る小過形成や、杯細胞への分化を高率に認める腺管から成る大過形成、そして増殖帯をのぞいた周囲の腺管を選択した。すべての臓器の陽性細胞数は視覚的に計測し、肝臓、甲状腺および腺胃では総細胞数も同様に計測し、陽性細胞率を算出した。また、膀胱および前胃は陽性細胞数を粘膜筋板の単位長さ (1,000 μm) 当たりで表した。

統計解析

定量データについて平均値および標準偏差を求めた。p-Erk1/2 FFCHs の数と面積は、DHPN-alone 群と DHPN + SDM 群で比較し、F-検定で分散の同等性を評価した後、Student's *t*-test ないし Welch's *t*-test を実施した。上記以外はすべて多群間比較を用い、Bartlett 検定で等分散を確認した後、一元配置分散分析を行った。有意差が認められた場合は Tukey's multiple comparison test を行った。Bartlett 検定で等分散でなかった場合、Steel-Dwass multiple comparison test を実施した。

ニトロフラン類の安全性評価法の確立

実験 1-1: 雄 F344 系 *gpt delta* ラットに NFT を腎発

がん用量の 125mg/kg、AHD および NFA をそれぞれ最大耐量の AHD: 80 mg/kg bw, NFA: 50 mg/kg bw で、4 及び 13 週間強制経口投与した前年度の実験から得られた腎臓を用いて、DNA を抽出し、HPLC-ECD システム (Coulochem; ESA, Bedford, MA, USA) を用いて 8-OHdG (8-OHdG/10⁵ dG) レベルを測定した。また、腎臓の病理組織学的検査を目的に、10%緩衝ホルマリン固定した腎臓を定法に従いパラフィン包埋した後、薄切切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。更に、抗ラット $\alpha_{2\mu}$ -globulin 抗体を用いた免疫染色法及びウェスタンブロッティング法にて、 $\alpha_{2\mu}$ -globulin 蛋白の確認ならびに半定量を行った。ウェスタンブロッティング法は、腎臓について 0.25 mg タンパク質を含むサンプルを、15%ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミド (SDS) ゲルで電気泳動し、PVDF 膜に転写した。メンブレンは抗ラット $\alpha_{2\mu}$ -globulin 抗体でインキュベートし、検出試薬で可視化した。

実験 1-2: 雌 F344 系 *gpt delta* ラットに、NFT を雄の腎発がん用量である 125 mg/kg bw で 13 週間強制経口投与した。投与期間中は 1 週間毎に体重および摂餌量を測定し、解剖時には腎重量を測定した。投与 13 週目の腎臓について *gpt* および *Spi* assay 実施した。*gpt* assay では、ファージを大腸菌 YG6020 に感染させ 6-チオグアニン (6-TG) とクロラムフェニコール (Cm) を含む培地上で生育するコロニーを単離後、再度 6-TG と Cm を含むプレートで生育することを確認した。またファージ粒子の懸濁液を適宜希釈した後に YG6020 株に感染させ、Cm のみを含む培地上で生育したコロニー数を計測した。Cm プレートで生育したコロニー数に希釈倍率を掛けて回収した総ファージ数を求めた。6-TG と Cm に耐性となったコロニー数を総ファージ数で除して *gpt* MF を算出した。また、6-TG と Cm に耐性となったコロニーの *gpt* 遺伝子配列を決定して変異部位を同定した。*Spi* assay では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2)株) に感染させ、*Spi* プラークの候補については、更に他の P2 溶原菌 (大腸菌 WL95 株) に感染させ、*red/gam* 遺伝子機能が不活化した真の *Spi* プラークを検出した。また、パッケージング反応後の懸濁液を希釈した後に P2 ファージが溶原化していない大腸菌 XL-1 Blue MRA 株に感染させて、総プラーク数を算出した。真の *Spi* プラーク数を回収した総プラーク数で除して *Spi* MF を算出した。

実験 2: 前年度に、雄の *p53* 遺伝子野生型 (*p53*^{+/+}) 及びホモ欠損型 (*p53*^{-/-}) の *gpt delta* マウスに、NFT を 70 mg/kg bw、AHD を 45 mg/kg bw および NFA を 42 mg/kg bw の用量で 4 および 13 週間強制経口投与した実験を終了した。本年度では、4 および 13 週の腎臓について *gpt* および *spi* assay を実験 1-2 で示した方法にて実施した。

統計学的処理方法

体重、臓器重量 8-OHdG、*gpt* および *Spi* assay での突然変異頻度と *gpt* 変異体のスペクトラムについては、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。

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

実験 1. PB/I3C 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験：6 週齢の雄性 F344 ラットを用い、イニシエーターである *N*-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週後からプロモーターとして PB 0.006%ないし 0.012%飲水投与、I3C 0.25%ないし 0.5%混餌投与、PB 0.006%及び I3C 0.25%の同時併用投与を 6 週間行った（それぞれ PB 低用量群、高用量群 I3C 低用量群、高用量群及び併用投与群）。プロモーター投与 1 週後に 2/3 部分肝切除 (PH) を行った。

実験 2. PB/ORPH 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験：6 週齢の雄性 F344 ラットを用い、イニシエーターである *N*-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週後からプロモーターとして PB 0.006%ないし 0.012%飲水投与、ORPH 0.075%ないし 0.15%混餌投与、PB 0.006%及び ORPH 0.075%の同時併用投与を 6 週間行った（それぞれ PB 低用量群、高用量群、ORPH 低用量群、高用量群及び併用投与群）。プロモーター投与 1 週後に 2/3 部分肝切除 (PH) を行った。

両実験とも投与期間終了後、イソフルランの深麻酔下にて放血致死させ、肝臓を採取し、重量測定を行った。肝臓の一部は遺伝子発現解析・生化学的解析用に分取し、液体窒素で急速凍結した後、検索まで -80°C に保存した。また病理組織学的・免疫組織化学的検索用に 10%緩衝ホルマリン固定した後パラフィン包埋を行った。

組織学的検索は、固定生検材料を常法に従いパラフィン包埋及び薄切後にヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。更に、ラット肝増殖性病変に陽性を示す glutathione-S-transferase placental form (GST-P) 並びに細胞増殖活性マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) もしくは Ki-67、cyclooxygenase-2 (COX-2) の免疫組織化学染色による観察を実施した。

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

統計解析は、対照群と投与群との間では、等分散の場合は Dunnett 検定を、不等分散の場合は Steel 検定をそれぞれ実施し有意水準 5 %または 1%以下を有意差ありとした。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究

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 2012 年 3 月から 2013 年 2 月までの計 166 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)

投与実験は混餌ないしは強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの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留めた。また、ウイルス感染実験、動物飼育、管理にあたっては、国立大学法人東京農工大学動物実験等に関する規定、国立医薬品食品衛生研究所動物実験及び組換え実験に関する指針、米国国立保健研究所(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

巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索

肝臓および甲状腺の前がん病変の病理組織学的解析

肝臓において、PBO ないし MP のプロモーション 6 週間後に、GST-P 陽性前がん病変が誘発され、これらは両群共に、数および面積が DEN-alone 群に比較して有意な増加が認められた。一方、甲状腺の FFCHs は前がん病変と考えられており、また今回 FFCHs が p-Erk1/2 に反応性を示したことより、p-Erk1/2 陽性 FFCHs を前がん病変とみなした。SDM プロモーション 4 週間後に形成された p-Erk1/2 陽性 FFCHs は、数および面積が DHPN-alone 群に比較して有意な増加が認められた。

肝発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

DEN + PBO 群および DEN + MP 群では、GST-P 陽性前がん病変内の Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞率が病変外と比較して有意な増加が認められた。GST-P 陽性前がん病変外においては、DEN + PBO 群の Aurora B と p-Histone H3 陽性細胞率が DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められ、DEN + MP 群の Ki-67、p21^{Cip1}、Aurora B および p-Histone H3 陽性細胞率が DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた。

甲状腺発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

DHPN + SDM 群では、p-Erk1/2 陽性 FFCHs 内の Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞率が病変外と比較して有意な増加が認められたが、p21^{Cip1} 陽性細胞は p-Erk1/2 陽性 FFCHs 内で病変外と比較して有意な減少が認められた。p-Erk1/2 陽性 FFCHs 外においては、DHPN + SDM 群の Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B および HP1 α 陽性細胞率が DHPN-alone 群と比較して有意な増加が認められた。

膀胱発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

PEITC のプロモーション 8 週間後、膀胱の移行上皮に単純性過形成および PN 過形成が誘発された。BBN + PEITC 群内では、Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞数が単純性過形成および PN 過形成で周囲細胞と比較して有意な増加が認められた。また、これらの陽性細胞数は PN 過形成が単純性過形成と比較して有意に増加した。Aurora B 陽性細胞は BBN + PEITC 群の周囲細胞で BBN-alone 群の移行上皮と比較して有意な増加が認められた。

前胃発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

CC のプロモーション 12 週間後、前胃の層状上皮の過角化/錯角化および過形成が形成された。MNNG + CC 群内では、Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞数は過形成が周囲細胞と比較して有意な増加が認められた。Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞数は MNNG + CC 群の周囲細胞で MNNG-alone 群と比較して有意な増加が認められた。

腺胃発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

CC のプロモーション 12 週間後、幽門部腺胃に大小の過形成が誘発された。MNNG + CC 群内では、Ki-67、核局在 Cdc2、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞率は大小過形成が周囲細胞と比較して有意な増加が認められた。これらの陽性細胞率は小過形成が大過形成に比較して有意な増加が認められた。p21^{Cip1} 陽性細胞率は小過形成が大過形成ないし周囲細胞と比較して有意な増加が認められ、Aurora B 陽性細胞率は小過形成が周囲細胞と比較して有意な増加が認められた。また、p21^{Cip1} および Aurora B 陽性細胞率は MNNG + CC 群の周囲細胞が MNNG-alone 群と比較して有意な増加が認められた。

ニトロフラン類の安全性評価法の確立

実験 1-1: 前年度に実施した雄の F344 *gpt delta* ラットに NFT と AHD および NFA を 4 及び 13 週間投与した実験で採材した腎臓を用いて、DNA 中の 8-OHdG レベルを測定し、投与 4 週目から NFT で有意な増加が認められた。更に 13 週目では、対照群に対して 3 倍以上の高値を示した。AHD および NFA では有意な変化は認められなかった。腎臓の病理組織学的検査では投与 4 週目から近位尿細管に好酸性の硝子滴の沈着が認められた。この沈着は 4 および 13 週目の対照群でもごく軽度に認められたが、NFT と NFA 投与群ではその程度が増強する傾向が見られ、投与期間に依存して発現程度が増強した。AHD 投与群では対照群と同様に 4 及び 13 週でごく軽度に認められた。この沈着物はその形態的特徴から $\alpha_2\mu$ -globulin 蛋白の可能性が考えられたため免疫染色法およびウェスタンブロッティング法にて確認を行ったところ、免疫染色法にて対照群と比較し NFT 投与群ではこの蛋白の増強が確認され、更にウェスタンブロッティング法でもその増加が半定量的に確認された。

実験 1-2: 雌の F344 系 *gpt delta* ラットに、NFT を雄の腎臓がん用量である 125 mg/kg bw の用量で 13 週間強制経口投与した。NFT では、体重は投与 3 週目から対照群より低値で推移した。腎重量では、実重量・相対重量ともに有意に増加した。腎臓における *gpt assay* では、NFT の *gpt* MF が有意に増加し、対照群よりも 5 倍以上の高値であった。*gpt* 遺伝子突然変異体のスペクトラム解析結果では、雄と同様に GC-TA および GC-CG transversion 変異が有意に増加した。一方、Spi assay では、対照群と比較し有意な変化は見られなかった。

実験 2: 雄の *p53* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスに NFT、AHD および NFA を 4 および 13 週間投与した腎臓について、*gpt* および Spi assay を実施した。*p53*^{+/+} における *gpt assay* では、4 週目で NFT の *gpt* MF の増加傾向がみられ、13 週目では更に NFA でも増加傾向が見られた。Spi assay では、4 および 13 週目で対照群と被験物質投与群に、Spi MF の明らかな差は見られなかった。一方、*p53*^{+/+} の *gpt assay* では、4 週目で NFT の *gpt* MF の明らかな増加傾向は認められなかったが、13 週目では有意に増加した。Spi assay の結果では、*p53*^{+/+} の結果同様、Spi MF の明らかな差は見られなかった。

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

実験 1. PB/13C 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験: 試験期間を通じて、全ての投与群において、被験物質に起因する死亡や臨床症状の変化は見られなかった。13C 高用量群において、DEN 単独群、PB 低・高用量群と比較して、剖検時に体重の有意な低値が認められた。併用投与群においては、特に有意な低値は認められなかった。

剖検時の絶対及び相対肝重量は、DEN 単独群と比較して、PB 低用量群を除く全ての薬剤投与群で有意に増加した。更に併用投与群においては、PB 低・高

用量群と比較して、絶対及び相対肝重量の有意な増加が認められた。I3C の検体摂取量は、0.25%、0.5% 及び併用投与群 (0.25%) の順に、それぞれ 1,361、2,747 及び 1,319mg/kg/day、PB の検体摂取量は 0.006%、0.012% 及び併用投与群 (0.006%) の順に、4.22、7.64、3.89 mg/kg/day であった。

病理組織学的解析では、変異肝細胞巣 (明細胞性、空胞性、好酸性及び好塩基性) が認められた。免疫組織化学的解析では、DEN 単独群に比べ、GST-P 陽性肝細胞巣の数は全ての薬剤投与群で有意に増加したが、面積は I3C 低・高用量群と併用投与群で有意に増加した。また併用投与群では、GST-P 陽性肝細胞巣の数は PB 低用量と、面積は PB 投与群で有意な差を示した。Ki-67 染色において、Ki-67 陽性細胞率は、併用投与群において I3C 低用量、PB 低・高用量群に比較して増加したが、I3C 高用量群との間に差を認めなかった。

Real-time RT-PCR では、第一相薬物代謝酵素であり AHR に制御される *Cyp1a1* は I3C 低・高用量群、併用投与群で有意に増加し、併用投与群のそれは、PB 低・高用量群に比較して有意に増加した。*Cyp2b1/2*、*CYP3a1/2* では、DEN 単独群に比較して、全ての薬剤投与群で有意に増加し、併用投与群のそれは、PB 低用量群に比較して、有意に増加した。*Nqo1* では DEN 単独群に比較して PB 低用量群を除く全ての薬剤投与群で有意に増加し、併用投与群のそれは、PB 低・高用量群に比較して有意に増加した。

第二相薬物代謝酵素においては、*Gstm3* は DEN 単独群と比較して全ての薬剤投与群で有意に増加し、併用投与群のそれは、PB 低用量群に比較して有意に増加した。*Gpx2* は、DEN 単独群に比較して全ての薬剤投与群で有意に増加し、併用投与群のそれは、PB 低・高用量群に比較して有意に増加した。*Jun* は DEN 単独群に比較して、I3C 高用量群と併用投与群で有意に増加し、併用投与群のそれは、PB 低・高用量群に比較して有意に増加した。*Nfkb1a* では明らかな変化は認められなかった。

ミクロソーム画分における CYP 活性由来の ROS 産生能の測定では、NADPH 非存在下では、全ての群において ROS の産生量に差は認められなかった。しかし、NADPH を添加したところ、DEN 単独群に比較して全ての薬剤投与群で有意に増加したが、併用投与群においては、どの群とも有意な差を示さなかった。CYP 阻害剤である SKF-525A を添加したところ、ROS 産生が低下した。

ROS 産生による細胞への酸化障害を検索するための肝臓中の TBARS 量の測定では、TBARS 量は DEN 単独群に比較して、I3C 低・高用量群、併用投与群で有意に増加したが、併用投与群においては有意な差を示さなかった。

実験 2. PB/ORPH 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験：試験期間を通じて、全ての投与群において、被験物質に起因する死亡や臨床症状の変化は見られなかったが、ORPH 高用量群において DEN 単独群に比較して、剖検時に体重の有意な低値が認められた。

剖検時の絶対肝重量は PB 投与群で、相対肝重量は PB 低・高用量群、ORPH 高用量群及び併用投与群で、DEN 単独群に比較して有意に増加した。更に

併用投与群においては、ORPH 投与群に比較して絶対肝重量が、PB 低・高用量群及び ORPH 低用量群に比較して相対肝重量が有意に増加した。PB の総検体摂取量は、0.006%、0.012% 及び併用投与群 (0.006%) の順に、それぞれ 243.4、447.8 及び 221.8 mg/kg、ORPH の総検体摂取量は 0.075%、0.15% 及び併用投与群 (0.075%) の順に、1797.1、3405.4 及び 1746.1 mg/kg であった。

病理組織学的解析では、変異肝細胞巣 (明細胞性、好酸性及び好塩基性) がすべての投与群で認められた。免疫組織化学的解析では、GST-P 陽性巣の数において、PB 高用量群、ORPH 高用量群及び併用投与群で DEN 単独群に比して有意な増加が認められた。面積は併用投与群でのみ有意に増加した。併用投与群では、数は PB/ORPH 低用量群で比べて、面積は PB 低・高用量群及び ORPH 低用量群に比べて有意に増加した。PCNA 染色においては、PB/ORPH 高用量群および併用投与群で DEN 単独群に比べて有意な陽性細胞率の増加が認められ、併用投与群のそれは PB 高用量群および ORPH 低用量群に比べて有意な増加が認められた。

Real-time RT-PCR では、第一相薬物代謝酵素である *Cyp1a1* は ORPH 投与群で DEN 単独群に比して有意に増加したが、併用投与群のそれは ORPH 高用量群に比較して有意に低下した。*Cyp2b1/2* では、薬剤投与群で、DEN 単独群に比較して有意に増加し、併用投与群のそれも PB/ORPH 低用量群に比較して有意に増加した。

第二相薬物代謝酵素であり、抗酸化酵素である *Gstm3* 及び *Gpx2* は PB 低・高用量群、ORPH 高用量群及び併用投与群で、DEN 単独群に比較して有意に増加した。*Gstm3* は、併用投与群において PB/ORPH 低用量群に比して有意に増加した。また、*Gpx2* も併用投与群において ORPH 低用量群に比較して有意な増加が認められた。

ミクロソーム画分における CYP 活性由来の ROS 産生を測定したところ、薬剤投与群において DEN 単独群に比べて有意な増加が認められ、併用投与群のそれは PB 低・高用量群及び ORPH 低用量群に比べて有意な増加が認められた。

ROS 産生による細胞への酸化障害を検索するため、肝臓中の TBARS 量を測定したところ、ORPH 高用量群及び併用投与群で、DEN 単独群に比較して有意に増加し、併用投与群のそれは PB 低・高用量群及び ORPH 低用量群に比較して有意に増加した。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究

1. 牛の脊柱からの背根神経節の除去

背根神経節の脊柱からの除去率は、2012 年 3 月から 2013 年 2 月の間で平均 92% であった。第 10 胸神経～第 3 腰神経の背根神経節の除去率は低い傾向にあり、特に第 10、第 11 胸神経、第 3 腰神経の背根神経節の除去率の低さが顕著であった。

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

「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、「交雑種牝」がやや低い値を示したもの

の、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%前後の間で推移した。全体として、各グループ間で除去率に差は生じなかった。

D. 考察

巨大核出現に關与する標的遺伝子の探索

本研究で、肝臓、甲状腺、膀胱、前胃および腺胃を標的として、二段階発がんモデルを用いた発がんプロモーション過程早期に対するこれまでに得られた短期発がん性予測指標の変動を解析したところ、免疫組織化学的検索により、前がん病変もしくは過形成病変において特徴的な細胞周期関連分子の発現変動が見出された。

これまでに我々は、発がん標的性の異なる発がん物質をラットに 28 日間反復投与した際に発現変動を示す細胞周期分子の探索により、標的臓器を問わず、高い細胞増殖活性を示す発がん物質では、G₂/M 期に機能する Cdc2 と M 期に機能する Aurora B 及び p-Histone H3 の陽性細胞が増加することを見出した。また、G₁/S 期のチェックポイント蛋白である p21^{Cip1} と M 期分子である HP1 α が標的臓器により異なる反応性を示すことを見出した。そこで、異なる発がん標的に対する発がん促進過程早期におけるこれらの分子の反応性を免疫組織学的な陽性細胞分布により検討した。

その結果、Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞が肝臓の GST-P 陽性前がん病変、甲状腺の p-Erk1/2 陽性 FFCHs で非前がん病変領域と比較して増加することを見出した。一方、p21^{Cip1} 陽性細胞が肝臓の GST-P 陽性前がん病変で増加したが、甲状腺において、p-Erk1/2 陽性 FFCHs で非前がん病変領域と比較して減少することを認めた。また、Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞が、膀胱の PN 過形成、前胃の過形成および腺胃の小過形成で、非過形成病変領域と比較して増加することを見出した。

p21^{Cip1} は CDK (cyclin-dependet kinase) 阻害タンパク質の一つであり、G₁/S 期で細胞周期を制御することが知られている (Sherr and Roberts, 1995)。本研究では、PBO 及び MP で GST-P 陽性細胞巢内において p21^{Cip1} 陽性細胞の増加が認められた。p21^{Cip1} 発現は p53 により制御されているが (Sherr and Roberts, 1995)、本研究では、p53 は PBO および MP に反応を示さなかった (data not shown)。我々は、以前、肝発がん物質 28 日間反復投与試験より、肝発がん物質は p53 非依存的な経路による p21^{Cip1} 発現増加する可能性を示唆している (Yafune *et al.*, 2013)。また、p21^{Cip1} の発現は細胞のストレス応答と密接に関連しており (Gorospe *et al.*, 1999; Rodriguez and Meuth, 2006)、我々は、既に肝発がん物質のプロモーションにより形成された GST-P 陽性巢の多くはリン酸化 p38MAPK に共陽性を示すことを報告している (Ichimura *et al.*, 2010)。p38MAPK はストレス応答に關与するシグナル分子であることを考慮すると (Coulthard *et al.*, 2009)、肝前がん病変における p21^{Cip1} 発現増加は、p53 非依存的な経路に起因した G₁/S チェックポイント機能が亢進している可能性が示唆された。また、膀胱、前胃および腺胃の過形成

病変内においても p21^{Cip1} 発現増加がみられ、過形成病変において G₁ 期停滞する細胞が増加していると考えられた。

一方で、甲状腺の p-Erk1/2 陽性 FFCHs 内で p21^{Cip1} 発現の減少を認めた。以前の報告より、p21^{Cip1} は cyclin D/CDK4/6 複合体や cyclin E/CDK2 複合体への結合を介して、下流の Rb のリン酸化を抑制し、S 期への進行を妨げ細胞周期停止を引き起こすことが知られている (Xiong *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Niculescu *et al.*, 1998)。我々は、以前の研究より、二段階甲状腺発がんモデルにおいて、リン酸化 Rb 陽性細胞が FFCHs 内で増加することを示した (Ago *et al.*, 2010)。それゆえ、甲状腺前がん病変では細胞周期の促進が誘導され、肝前がん病変と異なり、腫瘍形成に至る形質を獲得している可能性が推察された。

本研究では、Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞が肝臓および甲状腺の前がん病変内、膀胱、前胃および腺胃の過形成病変内で、非前がん病変領域もしくは非過形成病変領域と比較して増加することを見出した。以前の研究より、28 日間反復投与例において、肝発がん物質投与により M 期異常を示唆する分子発現変化が生じている (Yafune *et al.*, 2013)。Aurora B の過剰発現は様々ながん細胞で染色体不安定性を引き起こし (Qi *et al.*, 2007)、その過剰発現による p-Histone H3 の増加も染色体不安定性の一因となることが示唆されている (Ota *et al.*, 2002)。Cdc2 の活性型である核局在 Cdc2 陽性細胞は、Cyclin B と共に複合体を形成し、G₂/M 移行期および M 期初期を促進することが知られている (Kawamoto *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999)。HP1 α は分裂期において染色体分離に機能する (Obuse *et al.*, 2004)。これらのことを考慮すると、28 日間反復投与から過形成病変もしくは前がん病変に至る過程において、発がん物質は標的細胞に増殖活性および細胞周期異常を生じ、M 期に停滞する細胞が増加し、染色体不安定性を導いていると考えられた。

結論として、肝臓および甲状腺の前がん病変と膀胱、前胃および腺胃での過形成病変では細胞増殖と M 期タンパク質陽性細胞の増加より、細胞増殖と連動して M 期異常や染色体不安定性を反映する細胞の増加が共通の特性であると考えられた。一方、肝臓および甲状腺の前がん病変内における p21^{Cip1} 発現変動は、前がん病変形成過程でも臓器により細胞周期制御機構の違いを反映しており、腫瘍促進へ影響を及ぼしている可能性が示唆された。

ニトロフラン類の安全性評価法の確立

実験 1: これまでの研究結果を参考に、本年度は NFT、AHD、および NFA を 13 週間投与したラット腎について、DNA 中の 8-OHdG レベルを測定した。その結果、NFT では 4 週目から有意に増加し、13 週目では対照群の 5 倍以上の高値となった。8-OHdG は、活性酸素による酸化ストレスにより生体内で増加することが知られている。従って、本結果は、前年度の結果から示唆された NFT の変異原性発現機序への酸化ストレス関与の可能性を強く支持するものとなった。一方、前年度では NFA についても *in vivo* 変異原性の陽性結果を報告した。NFA はその化学構造

にニトロフラン基を有する物質である。ニトロフランのニトロ基還元では、ニトロアニオンラジカル、ヒドロキシルアミンなど不安定な反応性の高い中間活性体を経て、アミンまで代謝されることが考えられており、更にこの代謝過程では・O₂、H₂O₂、・OHといった種々の活性酸素を発生させる可能性も考えられている。従って、この機序がNFAの*in vivo*変異原性更にはNFAを含有するNFTの遺伝毒性発現に関与することが考えられた。しかし今回、NFAの8-OHdGレベルの明らかな上昇は確認できず、NFA単独での*in vivo*変異原性機序には酸化的DNA損傷以外のメカニズムの関与の可能性も考えられた。しかし、ニトロフラン類が酸化ストレスを介し*in vivo*変異原性を有する可能性は高いことから、今後は抗酸化剤の修飾効果を検索する試験などを実施し、酸化ストレスの関与については更に詳細に検討する予定である。

またNFTでは、腎尿細管内に α_{2u} -globulin蛋白の沈着が確認された。この蛋白の高度な沈着は細胞障害を惹起し、結果として細胞増殖活性の亢進を引き起こすことが知られている。細胞増殖亢進下の細胞は遺伝毒性物質に対して高感受性になることから、前年度に明らかとしたNFTの*in vivo*変異原性が細胞増殖亢進下においてのみ認められた現象である可能性を否定できない。そこで今回、 α_{2u} -globulinを有しない雌の腎臓についてもNFTの*in vivo*変異原性の検討を行った。その結果、体重の低値や腎重量の増加など雄と同様の一般毒性学的な変化を認め、*in vivo*変異原性試験でも雄と同様に明らかな陽性結果を示した。更に認められた*gpt*遺伝子突然変異体ではGC-TAおよびGC-CG transversion変異が増加しており、この結果も雄と一致していた。従って、NFTは α_{2u} -globulin蛋白沈着を起点とした細胞増殖活性亢進の影響に関係なく、ラット腎臓に対して*in vivo*変異原性を示すことが明らかとなった。同様に*in vivo*変異原性を示しながらも雌ラットにおいてはNFTの発がん性は認められないことを考慮すると、NFTの腎発がん機序には、酸化ストレスを介する*in vivo*変異原性に加え、 α_{2u} -globulin沈着による細胞増殖活性の亢進が大きく寄与していることが考えられた。また、雌ラット腎に対しては、NFTは潜在性の発がん物質であると考えられた。これまでの結果から、NFTの発がん機序には遺伝毒性メカニズムの関与が強く示唆され、ヒトに対しても潜在的なリスクを有する可能性があると考えられた。

実験2：NFTの変異原性と*p53*遺伝子の関連性を検索するため、*p53*遺伝子欠損*gpt delta*マウスを用いNFT、AHDおよびNFAの*in vivo*変異原性試験を行うための予備試験を実施した。雄の*p53*遺伝子欠損*gpt delta*マウスにNFT、AHDおよびNFAを13週間投与し、*p53*^{+/+}及び*p53*^{-/-}について、4及び13週目の腎臓の*gpt*およびSpi assayを実施した。今回、*p53*^{+/+}の13週目の結果では統計学的評価を実施できなかったものの、NFTを投与した*p53*^{+/+}と*p53*^{-/-}の両遺伝子型で*gpt* MFが増加する傾向が見出された。しかし、遺伝子型の違いによる変化は認められなかった。今後は、今回得られた結果をもとに本試験を実施し、更に詳細な検討を行う予定である。

CYP1A inducerの複合投与によるラット肝発がんイ

ニシエーション・プロモーション作用の修飾

平成23年度までにCYP1A inducerであるOPZ及びBNFを併用投与することで、ラットにおいて肝発がんプロモーション作用が増強されることが明らかになった。これら2剤を併用投与することでAHRの活性を増強し、*Cyp1a*を始めとしたAhR gene batteryや*Nrf2* gene batteryの発現が増強したが、ミクロソーム由来のROSは減少し、TBARS量の変化は認められなかったことから、発がんプロモーション作用増強に酸化ストレスは関与しない可能性が示唆された。しかし、遺伝子発現解析および免疫染色により、COX-2の発現増加や炎症関連遺伝子の発現増加が認められたことから、併用投与により誘発された炎症がその肝発がんプロモーション作用増強に関与している可能性が考えられた。また、OPZとBNFの併用投与によるイニシエーション作用に対しては明確な修飾作用は誘発されないことが明らかになった。更に、CYP1A inducerであるBNFとCYP1A/2B inducerであるPBOを併用することで、ラットにおいて肝発がんプロモーション作用の明らかな増強は示さなかった。これら2剤を併用することで*Cyp1a1*及び*Cyp2b2*の発現が抑制されたことから、これらがそのメカニズムに関与する可能性が示唆された。

本年度は、CYP1A inducerであるI3CとCYP2B/1A inducerであるPBを併用投与することで、ラットにおいて肝発がんプロモーション作用の明らかな増強は示さなかった。また、CYP2B/1A inducerであるPBとCYP2B inducerであるORPHを併用投与することで、ラットにおいて肝発がんプロモーション作用が増強することが示され、その機序にはROS産生の増加による酸化的ストレスが関与していることが示唆された。各測定値をHasegawaら(1991)およびFutakuchiら(1996)が提唱する同種・異種相加相乗モデルで検定を行ったところ、併用投与による肝発がんプロモーション増強作用は相乗的であると考えられた。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究

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。

E. 結論

巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索

短期発がん性予測指標の発がん過程早期に対する関与を明らかにするために、肝臓、甲状腺、膀胱、前胃および腺胃を標的として、二段階発がんモデルを用いた発がんプロモーション過程早期に形成される前がん病変および過形成病変について免疫組織化学染色を用いて検討した。その結果、Ki-67、核局在Cdc2、Aurora B、p-Histone H3およびHP1 α は標的とした前がん病変内および過形成病変内で増加した。一方、p21^{Cip1}は肝前がん病変内と発がん促進による膀胱、前胃および腺胃の過形成病変内で増加したが、甲状腺の前がん病変内で減少が認められた。以上のことより、前がん病変内及び過形成病変内に共通して、高い細胞増殖活性と共にM期異常を反映する分子発現変化を見出し、M期に停滞し、染色体不安定

性を示す細胞の増加が推察された。一方、肝臓の前がん病変およびその他の臓器の過形成病変内と甲状腺の前がん病変内における p21^{Cip1} の発現の違いに関しては、肝前がん病変では他の臓器の過形成病変と同様にチェックポイント機能が保たれて G₁/S 期停止を示す細胞が増加するのに対し、甲状腺ではその機能が破綻し発がんを促進する可能性が示唆された。

ニトロフラン類の安全性評価法の確立

NFT はラット腎に対して酸化的 DNA 傷害を引き起こすことが明らかとなった。また、雄ラット特有尿中蛋白 α_{2u} -globulin 沈着に引き続き生じる細胞増殖活性の亢進がその発がん機序に寄与していると考えられた。一方、発がん性の認められない雌ラットにおいても同様に *in vivo* 変異原性を有することが明らかとなり、ヒトに対しても潜在的な発がんリスクを有する可能性があると考えられた。

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

CYP1A inducer である I3C と CYP2B/1A inducer である PB と併用した場合には、明らかな増強作用は示さなかった。一方、CYP2B inducer 同士である PB と ORPH の併用投与では、ラットにおいて肝発がんプロモーション作用が増強されることが明らかとなった。これらことから、誘導する酵素の異なる化学物質の併用投与ではラット肝発がんプロモーション作用は増強されないが、CYP2B inducer 同士では増強することが示唆された。今後、発がんプロモーションに対する ROS の関与や誘導する CYP family を考慮し、様々な組み合わせによる CYP inducer 併用の肝発がんに対する影響について更なる検討が必要である。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究

除去率の極端に低い第 10 胸神経以降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。

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

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Nakane, F., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Expression patterns of cell cycle proteins in the livers of rats treated with hepatocarcinogens for 28 days. Arch. Toxicol. in press, 2013.

Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Hayashi, H., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Aberrant activation of M phase proteins by cell proliferation-evoking carcinogens after 28-day administration in rats. Toxicol. Lett. 219(3): 203-210, 2013.

Hayashi, H., Shimamoto, K., Taniai, E., Ishii, Y., Morita, R., Suzuki, K., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Liver tumor promoting effect of omeprazole in rats and its possible mechanism of action. J. Toxicol. Sci. 37(3): 491-501, 2012.

Hayashi, H., Taniai, E., Morita, R., Yafune, A., Suzuki, K., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Threshold dose of liver tumor promoting effect of β -naphthoflavone in rats. J. Toxicol. Sci. 37(3): 517-526, 2012.

Hayashi, H., Taniai, E., Morita, R., Hayashi, M., Nakamura, D., Wakita, A., Suzuki, K., Shibutani, M., Mitsumori, K. Enhanced liver tumor promotion but not liver initiation activity in rats subjected to combined administration of omeprazole and β -naphthoflavone. J. Toxicol. Sci. 37(5): 969-985, 2012.

Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Ishii, Y., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Liver tumor promoting effect of orphenadrine in rats and its possible mechanism of action including CAR activation and oxidative stress. J. Toxicol. Sci. 38(3): 403-413, 2013.

Morita, R., Yafune, A., Shiraki, A., Itahashi, M., Akane, H., Nakane, F., Suzuki, K., Shibutani, M., Mitsumori, K.: Enhanced liver tumor promotion activity in rats subjected to combined administration of phenobarbital and orphenadrine. J. Toxicol. Sci. 38(3): 415-424, 2013.

2. 学会発表

八舟宏典、谷合枝里子、林仁美、盛田怜子、Wang Liyun、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：発がん標的性の異なる発がん物質のラット 28 日間反復投与時の各標的臓器における肝発がん物質反応指標の発現変動、第 39 回日本毒性学会学術集会、仙台、2012 年 7 月

八舟宏典、谷合枝里子、盛田怜子、赤根弘敏、Wang Liyun、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：ラットを用いた異なる発癌標的臓器における発がん促進時早期での細胞周期関連分子の発現特性、第 29 回日本毒性病理学会学術集会、茨城、2013 年 1 月

八舟宏典、谷合枝里子、盛田怜子、木村真之、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：発がん標的性の異なる発がん物質のラット 28 日間反復投与試験での各発がん標的臓器における細胞周期分子指標の発現変動、平成 24 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、2013 年 2 月

木島綾希、石井雄二、高須伸二、松下幸平、黒田 賢、小川久美子、梅村隆志：gpt delta ラットを用いた合成抗菌剤ニトロフラントインおよびその代謝物の *in vivo* 変異原性、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012 年 7 月

木島綾希、石井雄二、高須伸二、松下幸平、黒田 顕、小川久美子、梅村隆志：合成抗菌剤ニトロフラントインの化学構造に依存した *in vivo* 変異原性：第 29 回日本毒性病理学会総会および学術集会、つくば、2013 年 1 月

盛田怜子、林仁美、谷合枝里子、八舟宏典、赤根弘敏、白木彩子、石井雄二、鈴木和彦、渋谷 淳、三森国敏：Orphenadrine (ORPH) のラット肝発がんプロモーション作用に関する研究、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012 年 7 月

Morita, R., Hayashi, H., Suzuki, K., Shibutani, M. and Mitsumori, K.: STUDIES ON LIVER TUMOR PROMOTING EFFECTS OF ORPHENADRINE IN RATS, Joint Meeting for European Society of Toxicologic Pathology & European Society of Veterinary Pathology, 2012, Spain, 2012 年 9 月

盛田 怜子、八舟 宏典、赤根 弘敏、板橋 恵、白木彩子、鈴木 和彦、渋谷 淳、三森 国敏: Phenobarbital と Orphenadrine 併用投与によるラット肝発がんプロモーション作用の修飾に関する研究、第 29 回日本毒性病理学会総会および学術集会、筑波、2013 年 2 月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
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）
分担研究報告書（平成 24 年度）

畜水産食品における動物用医薬品等の安全性確保に関する研究
—巨大核出現に關与する標的遺伝子の探索—

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究要旨

我々はこれまでに、発がん標的性の異なる発がん物質をラットに 28 日間反復投与した際に発現変動を示す細胞周期分子の探索により、標的臓器を問わず、高い細胞増殖活性を示す発がん物質では、G₂/M 期に機能する Cdc2 と M 期に機能する Aurora B 及び p-Histone H3 の陽性細胞が増加することを見出した。また、G₁/S 期のチェックポイント蛋白である p21^{Cip1} と M 期分子である HP1 α が標的臓器により異なる反応性を示すことを見出した。今回、異なる発がん標的に対する発がん促進過程早期におけるこれらの分子の反応性を免疫組織学的な陽性細胞分布の解析により検討した。ラット二段階発がんモデルを用い、プロモーターとして肝臓では piperonyl butoxide 及び methapyrilene、甲状腺では sulfadimethoxine、膀胱では phenylethyl isothiocyanate、前胃及び腺胃では catechol を選択し、標的臓器のイニシエーション処置後に、発がん促進用量の混餌ないし飲水投与を行った。検索の結果、発がん促進により、肝前がん病変指標の glutathione S-transferase placental form 陽性細胞巢ないし甲状腺の前がん病変指標と考えられる phospho-Erk1/2 陽性細胞巢内で、Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 及び HP1 α の陽性細胞が増加した。また、発がん促進により膀胱、前胃、腺胃で形成された過形成病変内でこれらの陽性細胞が増加した。一方、p21^{Cip1} の陽性細胞は肝前がん病変内及び膀胱、前胃、腺胃の過形成病変内で増加したが、甲状腺の前がん病変内で減少した。以上より、前がん病変及び過形成病変内では、高い細胞増殖活性と共に M 期異常を反映する分子発現変化を見出し、M 期に停滞し、染色体不安定性を示す細胞の増加が推察された。一方、肝臓と甲状腺の前がん病変内における p21^{Cip1} の発現の違いに関しては、肝前がん病変では他の臓器の過形成病変と同様にチェックポイント機能が保たれて G₁/S 期停止を示す細胞が増加するのに対して、甲状腺では破綻し発がんを促進する可能性が示唆された。

A. 研究目的

動物用医薬品等の化学物質の発がん性評価手法であるげっ歯類を用いた発がん性試験は、長期間に及ぶ投与のため、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題があり、短期発がん検出系の確立が求められている。殊に評価上問題となることの多い非遺伝毒性発がん物質に関しては、多数の発がん標的に共通する検出の手立てがなく、有効な手法開発が望まれている。一方、ラットやマウスの肝臓ないし腎臓に発がん性を及ぼす化学物質の投与過程早期において、腫瘍性病変とは異なる巨大核の出現がしばしば見出されており、ゲノムの異数性を反映し、発がん好発部位に一致して、投与期間と共に増加することより、巨大核の出現に至る細胞内の分子過程に発がんの鍵となるものが存在する可能性が強く示唆されている。National Toxicology Program (NTP) で行われた発がん性試

験では、肝発がん性を示す物質の特徴として、ラットなどの亜急性毒性・慢性毒性試験等において、肝重量増加、肝細胞過形成と変性、巨大核の出現、チトクローム P450 酵素誘導の所見が多ければ多いほど、肝発がん性の陽性頻度が高くなることが報告されている (Allen *et al.*, 2004)。特に、肝発がんの初期過程を与える可能性の高い巨大核の出現はゲノムの異数性を示し、遺伝子傷害の蓄積あるいは核分裂機構の障害を反映した前がん病変と位置付ける研究者もいる (Brown *et al.*, 2007; Adler *et al.*, 2009)。このような核異常は非遺伝毒性腎発がん物質でも誘発されるため、核分裂機構の障害を誘発するような分子メカニズムの中に、遺伝子の直接傷害をせずに、間接的に染色体の不安定化を図って発がんに至らしめるものが存在している可能性が高い。また巨大核の出現は、広く発がん

の関連性が指摘され (Lankoff *et al.*, 2002)、最近では G₂/M 期付近での細胞周期関連分子の発現変動が示唆されている (Adler *et al.*, 2009)。

本研究では、巨大核出現に関連する分子標的の同定を出発点として、NTP report で肝発がん性と共に核の巨大化を示すことが報告されている複数の発がん物質を陽性対照として、Allen らの報告の criteria を満たす動物薬を選択して、28 日間の短期投与試験を実施した。次いで、肝以外の発がん標的性に対する *in vivo* 短期スクリーニング指標としての可能性を探る目的で、異なる発がん標的性を有する発がん物質の 28 日間反復投与試験を実施し、肝臓で得られた短期発がん性指標候補分子群の反応性を検討し、短期発がん性予測指標の確立を図った。我々はこれまでに、発がん標的性の異なる発がん物質に反応する発がん性早期指標探索により、巨大核誘発性の有無にかかわらず、増殖活性の亢進を示した発がん物質に共通して M 期異常を示す分子発現変化を見出した。今回、得られた短期発がん性予測指標候補分子群を用いて、これらの分子の発がん過程早期への関与を検討する。

B. 研究方法

動物実験

6 週齢の雄性 F344 ラットを、二段階発がんモデルを用いた発がんプロモーション実験に供した

(Fig. 1)。肝臓は肝中期発がん性試験法を用いて、F344 ラットに *N*-diethylnitrosamine (DEN; 200 mg/kg) を単回腹腔内投与し、その 2 週間後から piperonyl butoxide (PBO) 20,000 ppm (DEN + PBO、10 匹) ないし methapyrilene (MP) 1,000 ppm (DEN + MP、11 匹) を 6 週間混餌投与、または基礎飼料 (DEN-alone、11 匹) で維持した。また、動物は定法に従い、3 週目に 2/3 部分肝切除を実施した。PBO および MP は、同様の実験で前がん病変指標である glutathione *S*-transferase placental form

(GST-P) に陽性を示す前がん病変が誘発される用量を投与用量として設定した。

甲状腺については、F344 ラットに *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN; 2,800 mg/kg) を単回皮下投与し、その 1 週間後から、sulfadimethoxine (SDM) 1,500 ppm (DHPN + SDM、12 匹) を 4 週間飲水投与、ないし飲料水 (DHPN-alone、12 匹) で維持した。SDM は、二段階発がんモデルを用いたプロモーション 13 週間後に甲状腺濾胞上皮細胞癌を誘発する用量を投与用量として設定した。

膀胱については、F344 ラットに *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN; 500 ppm) を 4 週間飲水投与し、その後 phenylethyl isothiocyanate (PEITC) 1,000 ppm (BBN + PEITC、11 匹) を 8 週間混餌投与、ないし基礎飼料 (BBN-alone、12 匹) で維持した。PEITC は、二段階発がんモデルを用いたプロモーション 32 週間後に膀胱に移行上皮がんを誘発する用量を投与用量として設定した。

前胃および腺胃については、F344 ラットに 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG; 150 mg/kg) を単回強制経口投与し、その 1 週間後より catechol (CC) 8,000 ppm (MNNG + CC、12 匹) を混餌投与、ないし基礎飼料 (MNNG-alone、12 匹) で維持した。CC は、二段階発がんモデルを用いたプロモーション 51 週間後に前胃および腺胃にがんを誘発する用量を投与用量として設定した。

実験終了後、すべての動物は深麻酔下で安楽殺し、標的臓器を摘出した。臓器は 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定し、パラフィン包埋した。臓器は 4% PFA で固定し、パラフィン包埋した。剖検時、膀胱、胃および大腸は 4% PFA を注入し、内部の移行上皮ないし粘膜の固定促進に努めた。4% PFA 固定後、肝臓の外側左葉および内側右左葉の最大断面、左右甲状腺、膀胱の縦断面 (長軸に沿って正中面で半割した両面) そして前胃および腺胃を含む胃の 3 断面を包埋した。

動物実験計画は、国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物

の取り扱いについても、同大学の実験動物指針を遵守した。

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、甲状腺、膀胱、胃を 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、p21^{Cip1}、Cdc2 については、脱パラフィン処理した組織切片を、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、Ki-67 はオートクレーブ 121°C で 10 分間、p21^{Cip1} はマイクロウェーブ 90°C で 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キングし、マウス抗 Ki-67 抗体 (50 倍希釈; Dako, Denmark)、マウス抗 p21 抗体 (100 倍希釈; Abcam, UK) 及びマウス抗 Cdc2 抗体 (100 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA) 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, USA) 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。更に Aurora B、p-Histone H3、HP1 α 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臓組織切片を、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、p-Histone H3 はオートクレーブ 121°C で 10 分間、HP1 α はマイクロウェーブ 90°C で 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キングし、ウサギ抗 Aurora B 抗体 (200 倍希釈; Abcam)、ウサギ抗 p-Histone H3 抗体 (50 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology)、ウサギ抗 HP1 α 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) 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。

肝臓と甲状腺については、前がん病変を周囲細胞から識別可能であると考えられる前がん病変指標として以下の抗体を用いた。肝臓についてはウサギ抗 GST-P 抗体 (1,000 倍希釈; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Japan) を用い、甲状腺についてはウサギ抗 phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (Thr202/Tyr204) 抗体 (p-Erk1/2, 400 倍希釈; Cell Signaling Technology) を用いた。賦活化方法は、GST-P は無処置、p-Erk1/2 はオートクレーブ処置を施した。

免疫組織化学染色に対する解析

肝臓の GST-P 陽性前がん病変は以前の報告と同様に、直径 0.2 mm 以上の病変数と面積、そして肝臓の総面積を計測した。甲状腺の p-Erk1/2 陽性 focal follicular cell hyperplasias (FFCHs) は 4 細胞以上から成る病変数と面積、また甲状腺の総面積を計測した。肝臓および甲状腺の評価領域は、400 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに直径 0.2 mm 以上の肝 GST-P 陽性前がん病変ないし 200 細胞以上から成る p-Erk1/2 陽性 FFCHs を 10 病変選択した。免疫組織化学染色はイニシエーション群の前がん病変外についても行った。膀胱の評価領域は、400 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに 5 箇所、BBN-alone 群の移行上皮ないし BBN + PEITC 群の単純性過形成、PN 過形成およびその周囲細胞を選択した。前胃の評価方法は、400 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに 10 箇所、MNNG-alone 群の粘膜上皮ないし MNNG + CC 群の過形成およびその周囲細胞を選択した。腺胃の評価方法は、400 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに 5 個の MNNG-alone 群の増殖帯を除く腺管、MNNG + CC 群については、異常な形態かつ細胞密度が高い 4-10 腺管から成る小過形成や、杯細胞への分化を高率に認める腺管から成る大過形成、そして増殖帯をのぞいた周囲の腺管を選択した。すべての臓

器の陽性細胞数は視覚的に計測し、肝臓、甲状腺および腺胃では総細胞数も同様に計測し、陽性細胞率を算出した。また、膀胱および前胃は陽性細胞数を粘膜筋板の単位長さ (1,000 μm) 当たりで表した。

統計解析

定量データについて平均値および標準偏差を求めた。p-Erk1/2 FFCHs の数と面積は、DHPN-alone 群と DHPN + SDM 群で比較し、F-検定で分散の同等性を評価した後、Student's *t*-test ないし Welch's *t*-test を実施した。上記以外はすべて多群間比較を用い、Bartlett 検定で等分散を確認した後、一元配置分散分析を行った。有意差が認められた場合は Tukey's multiple comparison test を行った。Bartlett 検定で等分散でなかった場合、Steel-Dwass multiple comparison test を実施した。

(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

肝臓および甲状腺の前がん病変の病理組織学的解析

肝臓において、PBO ないし MP のプロモーション 6 週間後に、GST-P 陽性前がん病変が誘発され、これらは両群共に、数および面積が DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Table 1)。一方、甲状腺の FFCHs は前がん病変と考えられており、また今回 FFCHs が p-Erk1/2 に反応性を示したことより、p-Erk1/2 陽性 FFCHs を前がん病変とみなした。SDM プロモーション 4 週間後に形成された p-Erk1/2 陽性 FFCHs は、数および面積が

DHPN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Table 2)。

肝発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

DEN + PBO 群および DEN + MP 群では、GST-P 陽性前がん病変内の Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞率が病変外と比較して有意な増加が認められた (Fig. 2)。GST-P 陽性前がん病変外においては、DEN + PBO 群の Aurora B と p-Histone H3 陽性細胞率が DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められ、DEN + MP 群の Ki-67、p21^{Cip1}、Aurora B および p-Histone H3 陽性細胞率が DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 2)。

甲状腺発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

DHPN + SDM 群では、p-Erk1/2 陽性 FFCHs 内の Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞率が病変外と比較して有意な増加が認められたが、p21^{Cip1} 陽性細胞は p-Erk1/2 陽性 FFCHs 内で病変外と比較して有意な減少が認められた (Fig. 3)。p-Erk1/2 陽性 FFCHs 外においては、DHPN + SDM 群の Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B および HP1 α 陽性細胞率が DHPN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 3)。

膀胱発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

PEITC のプロモーション 8 週間後、膀胱の移行上皮に単純性過形成および PN 過形成が誘発された。BBN + PEITC 群内では、Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞数が単純性過形成および PN 過形成で周囲細胞と比較して有意な増加が認められた。また、これらの陽性細胞数は PN 過形成が単純性過形成に比較して有意に増加した (Fig. 4)。Aurora B 陽性細胞は BBN + PEITC 群の周囲細胞で BBN-alone

群の移行上皮と比較して有意な増加が認められた。

前胃発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

CCのプロモーション12週間後、前胃の層状上皮の過角化/錯角化および過形成が形成された。MNNG + CC群内では、Ki-67、p21^{Cip1}、核局在Cdc2、Aurora B、p-Histone H3およびHP1α陽性細胞数は過形成が周囲細胞に比較して有意な増加が認められた (Fig. 5)。Ki-67、p21^{Cip1}、核局在Cdc2、Aurora B、p-Histone H3およびHP1α陽性細胞数はMNNG + CC群の周囲細胞でMNNG-alone群と比較して有意な増加が認められた。

腺胃発がん過程早期に対する短期発がん性予測指標の変動

CCのプロモーション12週間後、幽門部腺胃に大小の過形成が誘発された。MNNG + CC群内では、Ki-67、核局在Cdc2、p-Histone H3およびHP1α陽性細胞率は大小過形成が周囲細胞に比較して有意な増加が認められた (Fig. 6)。これらの陽性細胞率は小過形成が大過形成に比較して有意な増加が認められた。p21^{Cip1}陽性細胞率は小過形成が大過形成ないし周囲細胞に比較して有意な増加が認められ、Aurora B陽性細胞率は小過形成が周囲細胞に比較して有意な増加が認められた。また、p21^{Cip1}およびAurora B陽性細胞率はMNNG + CC群の周囲細胞がMNNG-alone群と比較して有意な増加が認められた。

D. 考察

本研究で、肝臓、甲状腺、膀胱、前胃および腺胃を標的として、二段階発がんモデルを用いた発がんプロモーション過程早期に対するこれまでに得られた短期発がん性予測指標の変動を解析したところ、免疫組織化学的検索により、前がん病変もしくは過形成病変において特徴的な細胞周期関連分子の発現変動が見出された。

これまでに我々は、発がん標的性の異なる発がん物質をラットに28日間反復投与した際に発現変動を示す細胞周期分子の探索により、標的臓器を問わず、高い細胞増殖活性を示す発がん物質では、G₂/M期に機能するCdc2とM期に機能するAurora B及びp-Histone H3の陽性細胞が増加することを見出した。また、G₁/S期のチェックポイント蛋白であるp21^{Cip1}とM期分子であるHP1αが標的臓器により異なる反応性を示すことを見出した。そこで、異なる発がん標的に対する発がん促進過程早期におけるこれらの分子の反応性を免疫組織学的な陽性細胞分布により検討した。

その結果、Ki-67、核局在Cdc2、Aurora B、p-Histone H3およびHP1α陽性細胞が肝臓のGST-P陽性前がん病変、甲状腺のp-Erk1/2陽性FFCHsで非前がん病変領域と比較して増加することを見出した。一方、p21^{Cip1}陽性細胞が肝臓のGST-P陽性前がん病変で増加したが、甲状腺において、p-Erk1/2陽性FFCHsで非前がん病変領域と比較して減少することを認めた。また、Ki-67、p21^{Cip1}、核局在Cdc2、Aurora B、p-Histone H3およびHP1α陽性細胞が、膀胱のPN過形成、前胃の過形成および腺胃の小過形成で、非過形成病変領域と比較して増加することを見出した。

p21^{Cip1}はCDK (cyclin-dependent kinase) 阻害タンパク質の一つであり、G₁/S期で細胞周期を制御することが知られている (Sherr and Roberts, 1995)。本研究では、PBO及びMPでGST-P陽性細胞巢内においてp21^{Cip1}陽性細胞の増加が認められた。p21^{Cip1}発現はp53により制御されているが (Sherr and Roberts, 1995)、本研究では、p53はPBOおよびMPに反応を示さなかった (data not shown)。我々は、以前、肝発がん物質28日間反復投与試験より、肝発がん物質はp53非依存的な経路によるp21^{Cip1}発現増加する可能性を示唆している (Yafune *et al.*, 2013)。また、p21^{Cip1}の発現は細胞のストレス応答と密接に関連しており (Gorospe *et al.*, 1999; Rodriguez and Meuth, 2006)、我々は、既に肝発がん物質のプロモーションにより形成されたGST-P陽性巢の多くはリン酸化p38MAPKに共

陽性を示すことを報告している (Ichimura *et al.*, 2010)。p38MAPK はストレス応答に関与するシグナル分子であることを考慮すると (Coulthard *et al.*, 2009)、肝前がん病変における p21^{Cip1} 発現増加は、p53 非依存的な経路に起因した G₁/S チェックポイント機能が亢進している可能性が示唆された。また、膀胱、前胃および腺胃の過形成病変内においても p21^{Cip1} 発現増加がみられ、過形成病変において G₁ 期停滞する細胞が増加していると考えられた。

一方で、甲状腺の p-Erk1/2 陽性 FFCHs 内で p21^{Cip1} 発現の減少を認めた。以前の報告より、p21^{Cip1} は cyclin D/CDK4/6 複合体や cyclin E/CDK2 複合体への結合を介して、下流の Rb のリン酸化を抑制し、S 期への進行を妨げ細胞周期停止を引き起こすことが知られている (Xiong *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Niculescu *et al.*, 1998)。我々は、以前の研究より、二段階甲状腺発がんモデルにおいて、リン酸化 Rb 陽性細胞が FFCHs 内で増加することを示した (Ago *et al.*, 2010)。それゆえ、甲状腺前がん病変では細胞周期の促進が誘導され、肝前がん病変と異なり、腫瘍形成に至る形質を獲得している可能性が推察された。

本研究では、Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞が肝臓および甲状腺の前がん病変内、膀胱、前胃および腺胃の過形成病変内で、非前がん病変領域もしくは非過形成病変領域と比較して増加することを見出した。以前の研究より、28 日間反復投与例において、肝発がん物質投与により M 期異常を示唆する分子発現変化が生じている (Yafune *et al.*, 2013)。Aurora B の過剰発現は様々ながん細胞で染色体不安定性を引き起こし (Qi *et al.*, 2007)、その過剰発現による p-Histone H3 の増加も染色体不安定性の一因となることが示唆されている (Ota *et al.*, 2002)。Cdc2 の活性型である核局在 Cdc2 陽性細胞は、Cyclin B と共に複合体を形成し、G₂/M 移行期および M 期初期を促進することが知られている (Kawamoto *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999)。HP1 α は分裂期におい

て染色体分離に機能する (Obuse *et al.*, 2004)。これらのことを考慮すると、28 日間反復投与から過形成病変もしくは前がん病変に至る過程において、発がん物質は標的細胞に増殖活性および細胞周期異常を生じ、M 期に停滞する細胞の増加し、染色体不安定性を導いていると考えられた。

結論として、肝臓および甲状腺の前がん病変と膀胱、前胃および腺胃での過形成病変では細胞増殖と M 期タンパク質陽性細胞の増加より、細胞増殖と連動して M 期異常や染色体不安定性を反映する細胞の増加が共通の特性であると考えられた。一方、肝臓および甲状腺の前がん病変内における p21^{Cip1} 発現変動は、前がん病変形成過程でも臓器により細胞周期制御機構の違いを反映しており、腫瘍促進へ影響を及ぼしている可能性が示唆された。

E. 結論

短期発がん性予測指標の発がん過程早期に対する関与を明らかにするために、肝臓、甲状腺、膀胱、前胃および腺胃を標的として、二段階発がんモデルを用いた発がんプロモーション過程早期に形成される前がん病変および過形成病変について免疫組織化学染色を用いて検討した。その結果、Ki-67、核局在 Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α は標的とした前がん病変内および過形成病変内で増加した。一方、p21^{Cip1} は肝前がん病変内と発がん促進による膀胱、前胃および腺胃の過形成病変内で増加したが、甲状腺の前がん病変内で減少が認められた。以上のことより、前がん病変内及び過形成病変内に共通して、高い細胞増殖活性と共に M 期異常を反映する分子発現変化を見出し、M 期に停滞し、染色体不安定性を示す細胞の増加が推察された。一方、肝臓の前がん病変およびその他の臓器の過形成病変内と甲状腺の前がん病変内における p21^{Cip1} の発現の違いに関しては、肝前がん病変では他の臓器の過形成病変と同様にチェックポイント機能が保たれて G₁/S 期停止を示す細胞が増加するのに対して、甲状腺では

その機能が破綻し発がんを促進す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

Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Nakane, F., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Expression patterns of cell cycle proteins in the livers of rats treated with hepatocarcinogens for 28 days. Arch. Toxicol. in press, 2013.

Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Hayashi, H., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Aberrant activation of M phase proteins by cell proliferation-evoking carcinogens after 28-day administration in rats. Toxicol. Lett. 219(3): 203-210, 2013.

2. 学会発表

八舟宏典、谷合枝里子、林仁美、盛田怜子、Wang Liyun、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：発がん標的性の異なる発がん物質のラット 28 日間反復投

与時の各標的臓器における肝発がん物質反応指標の発現変動、第 39 回日本毒性学会学術集会、仙台、2012.7.17-18

八舟宏典、谷合枝里子、盛田怜子、赤根弘敏、Wang Liyun、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：ラットを用いた異なる発癌標的臓器における発がん促進時早期での細胞周期関連分子の発現特性、第 29 回日本毒性病理学会学術集会、茨城、2013.1.31-2.1

八舟宏典、谷合枝里子、盛田怜子、木村真之、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：発がん標的性の異なる発がん物質のラット 28 日間反復投与試験での各発がん標的臓器における細胞周期分子指標の発現変動、平成 24 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、2013.2.6-7

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