

Fig. 1 Experimental design

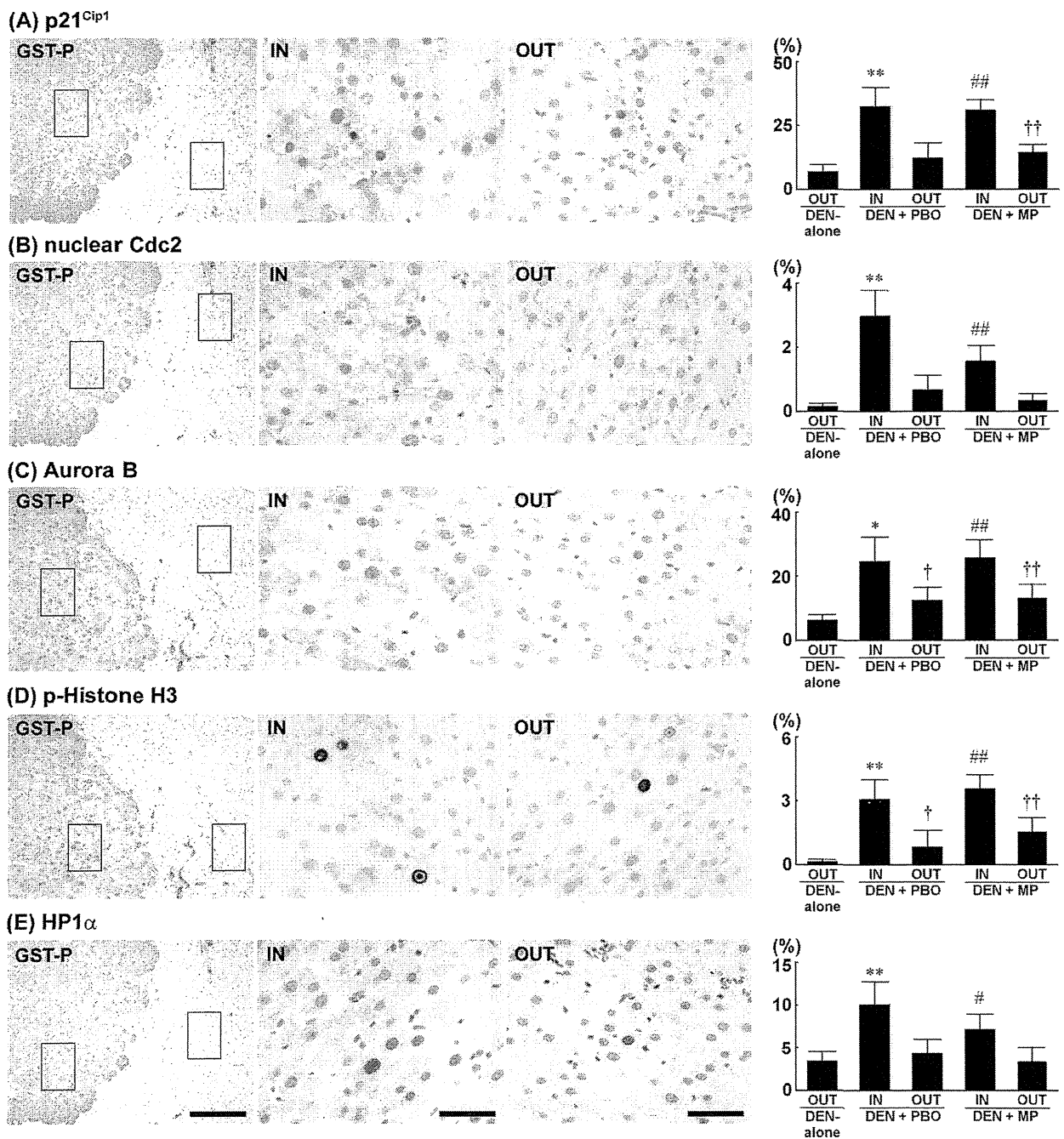


Fig. 2 Distribution of Ki-67⁺, p21^{Cip1}⁺, nuclear Cdc2⁺, Aurora B⁺, p-Histone H3⁺ and HP1α⁺ cells in early hepatocarcinogenesis. Photomicrographs show the cellular distributions of markers inside and outside the GST-P⁺ foci in the DEN + PBO group. The graphs show positive cell ratios (%) of liver cells inside (IN) and outside (OUT) the GST-P⁺ foci in the DEN + PBO and DEN + MP groups, and the outside the GST-P⁺ foci in the DEN-alone group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p21^{Cip1}, (C) nuclear Cdc2, (D) Aurora B, (E) p-Histone H3, and (F) HP1α. Bar = 200 μm (GST-P), Bar = 50 μm (IN, OUT). *, ** *P* < 0.05, 0.01 vs. OUT in the DEN + PBO group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test). #, ## *P* < 0.05, 0.01 vs. OUT in the DEN + MP group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test). †, †† *P* < 0.05, 0.01 vs. OUT in the DEN-alone group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

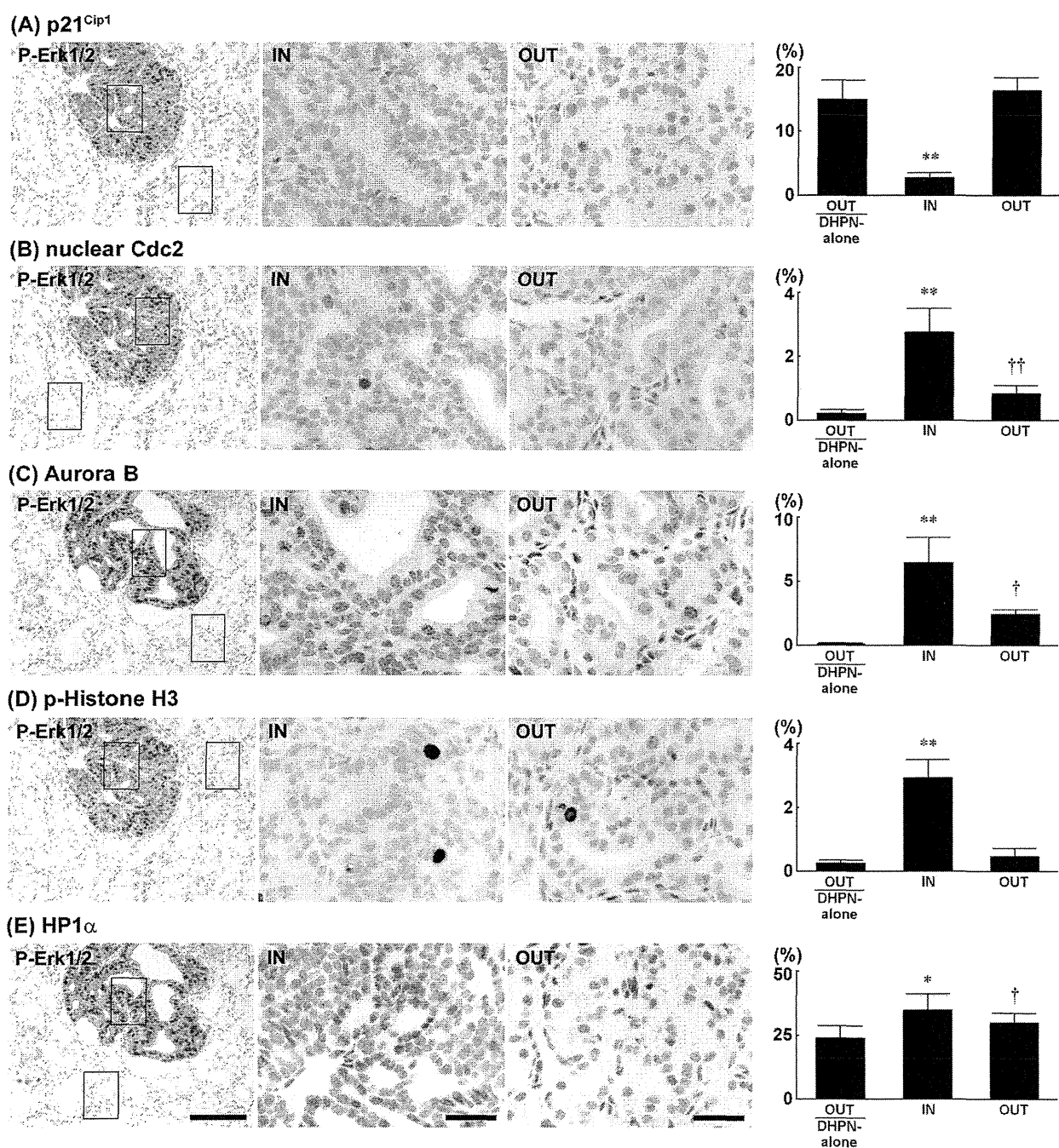


Fig. 3 Distribution of Ki-67⁺, p21^{Cip1}⁺, nuclear Cdc2⁺, Aurora B⁺, p-Histone H3⁺ and HP1α⁺ cells in early thyroid carcinogenesis. Photomicrographs show the cellular distributions of markers inside or outside the p-Erk1/2⁺ FFCHs in the DHPN + SDM group. The graphs show positive cell ratios (%) of thyroid follicular cells inside (IN) or outside (OUT) the p-Erk1/2⁺ FFCHs in the DHPN + SDM group, and the outside the p-Erk1/2⁺ FFCHs in the DHPN-alone group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p21^{Cip1}, (C) nuclear Cdc2, (D) Aurora B, (E) p-Histone H3, and (F) HP1α. Bar = 100 μm (p-Erk1/2), Bar = 30 μm (IN, OUT). *, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. OUT in the DHPN + SDM group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test). †, †† $P < 0.05, 0.01$ vs. OUT in the DHPN-alone group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

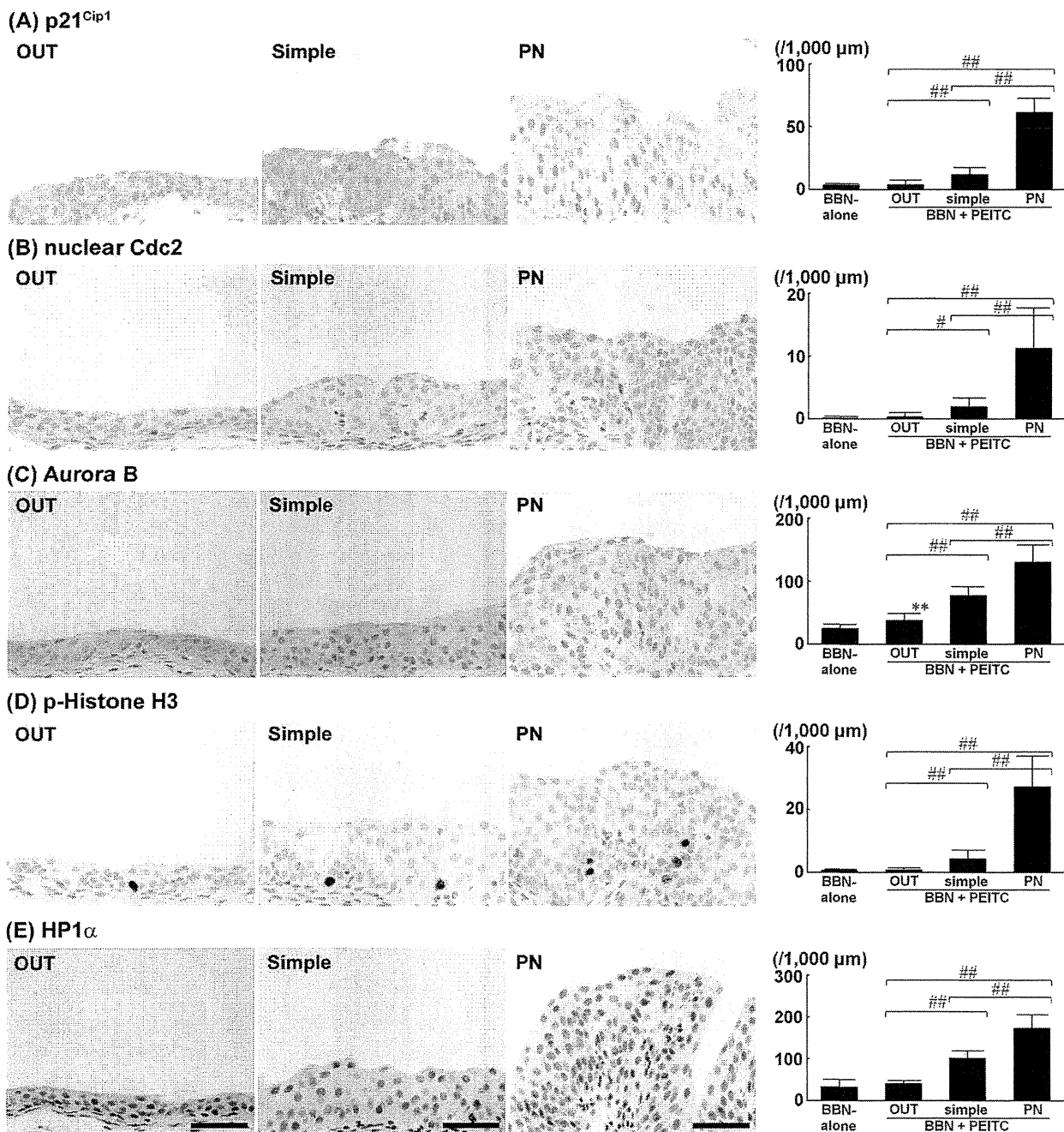


Fig. 4 Distribution of Ki-67⁺, p21^{Cip1}⁺, nuclear Cdc2⁺, Aurora B⁺, p-Histone H3⁺ and HP1α⁺ cells in early urinary bladder carcinogenesis. Photomicrographs show the cellular distributions of markers in simple hyperplastic foci, PN hyperplastic foci and surrounding epithelial cells in the BBN + PEITC group. The graphs show positive cells per unit muscularis mucosae length (1,000 μm) of the urothelium in the BBN-alone group, and of surrounding urothelium (OUT), and simple or PN hyperplastic foci in the BBN + PEITC group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p21^{Cip1}, (C) nuclear Cdc2, (D) Aurora B, (E) p-Histone H3, and (F) HP1α. Bar = 50 μm. ** $P < 0.01$ vs. the BBN-alone group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test). #, ## $P < 0.05, 0.01$ between the groups for comparison (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

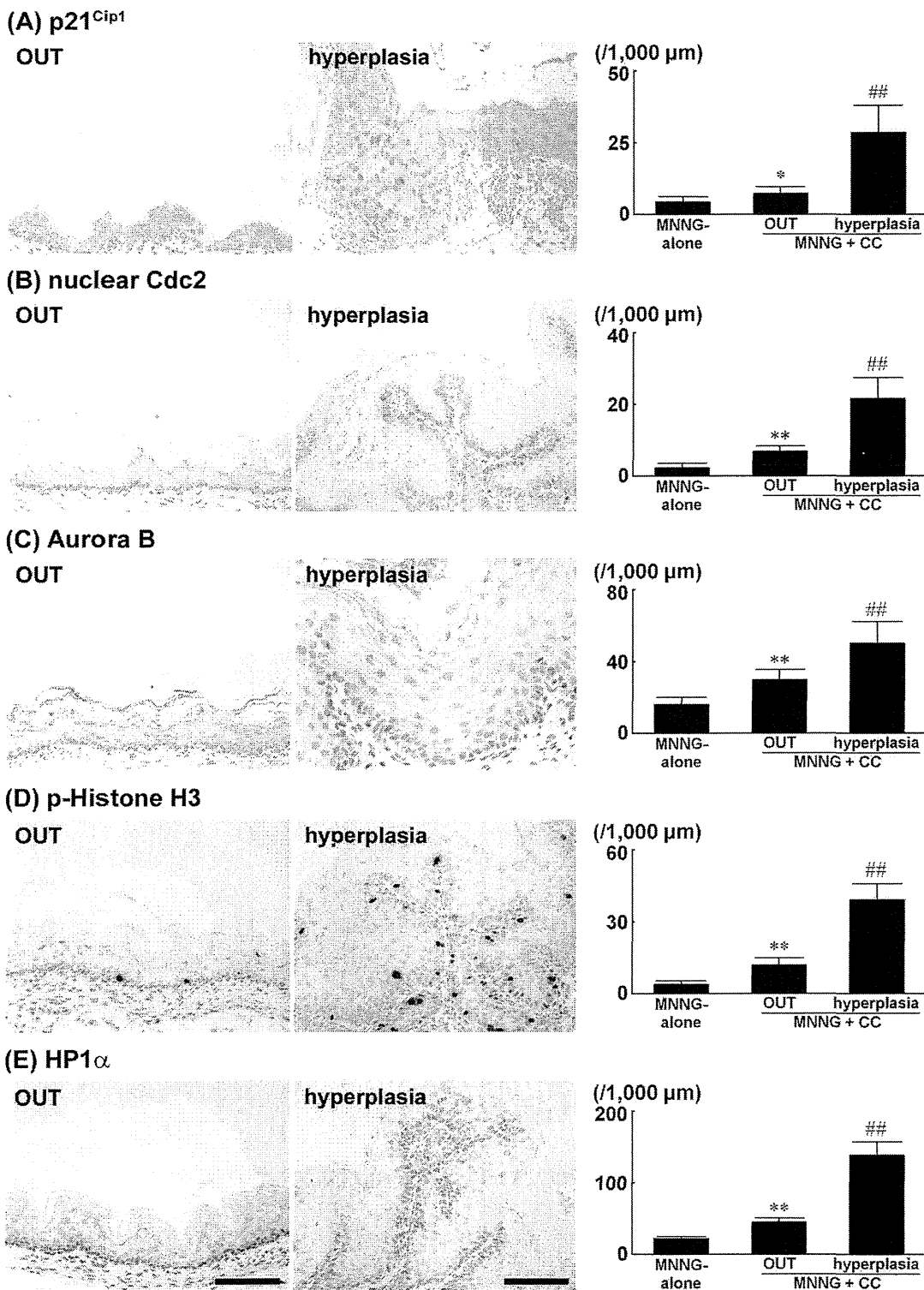


Fig. 5 Distribution of Ki-67⁺, p21^{Cip1}⁺, nuclear Cdc2⁺, Aurora B⁺, p-Histone H3⁺ and HP1α⁺ cells in early forestomach carcinogenesis. Photomicrographs show the cellular distributions of markers in hyperplasias and surrounding cells in the MNNG + CC group. The graphs show positive cells per unit muscularis mucosae length (1,000 μm) of the mucosa in the MNNG-alone group, and of surrounding mucosa (OUT) and hyperplasias in the MNNG + CC group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p21^{Cip1}, (C) nuclear Cdc2, (D) Aurora B, (E) p-Histone H3, and (F) HP1α. Bar = 100 μm. *,** *P* < 0.05, 0.01 vs. the MNNG-alone group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test). ## *P* < 0.01 vs. OUT in the MNNG + CC group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

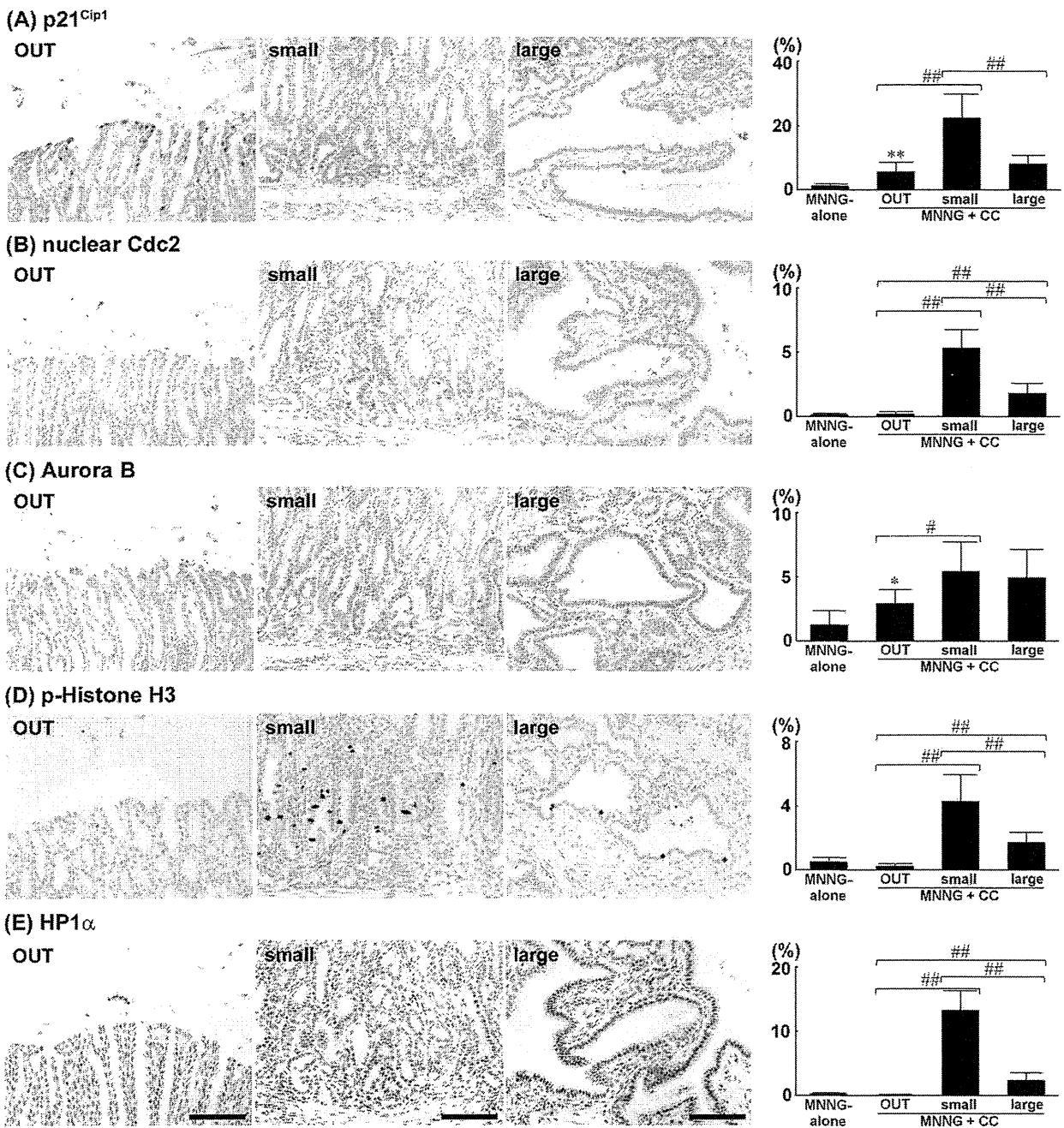


Fig. 6 Distribution of Ki-67⁺, p21^{Cip1}⁺, nuclear Cdc2⁺, Aurora B⁺, p-Histone H3⁺ and HP1 α ⁺ cells in early glandular stomach carcinogenesis. Photomicrographs show the cellular distributions of markers in small hyperplastic foci, large hyperplastic foci and surrounding glandular epithelial cells in the MNNG + CC group. The graphs show positive cell ratios (%) of epithelial cells of the pyloric gland epithelia in the MNNG-alone group, and of surrounding glandular epithelial cells (OUT), and in small and large hyperplastic foci in the MNNG + CC group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p21^{Cip1}, (C) nuclear Cdc2, (D) Aurora B, (E) p-Histone H3, and (F) HP1 α . Bar = 100 μ m. *, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. the MNNG-alone group (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test). #, ##, ### $P < 0.05, 0.01$ vs. between the groups for comparison (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

畜水産食品における動物用医薬品等の安全性確保に関する研究

—ニトロフラン類の安全性評価法の確立—

分担研究者 梅村 隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 第一室長

研究要旨

本研究はこれまでに、ニトロフラン類の化学構造に依存する発がん機序を探ることを目的とし、ラットの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である 1-Aminohydantoin (AHD) 及びニトロフラン類の基本構造を有する 5-nitrofulfural (NFA) の雄ラット腎臓の *in vivo* 変異原性試験を行った。その結果、NFT ならびに NFA 投与群において *gpt* 遺伝子突然変異体頻度 (MF) の増加が見られた。NFA はニトロフラン基を有するため、代謝過程で酸化ストレスを誘発する可能性が考えられ、さらに NFT 投与により生じた *gpt* 変異体のスペクトラム解析で GC-TA transversion 変異の増加が見られたことから、NFT の遺伝毒性機序に酸化ストレスの関与の可能性が示唆された。そこで本年度ではさらにその関連性を追求するため、腎 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを測定した。その結果、NFT では投与 4 週目から有意に上昇し、13 週目では対照群の 3 倍以上の高値を示した。また、NFT 投与群で雄特有の尿中蛋白 α_{2u} -globulin の沈着が確認されたことから、発がん性の認められない雌ラットにおける *in vivo* 変異原性について検索した。その結果、NFT の 13 週間投与で雌でも雄同様に *gpt* MF の有意な上昇が認められた。従って、NFT は酸化ストレスを介して遺伝毒性を発揮し、さらに雄では 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考えられた。また、NFT の遺伝毒性発現機序と *p53* 遺伝子の関連性を検索するため、*p53* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* 変異原性試験の予備試験を行った。その結果、NFT では *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。

A. 研究目的

合成抗菌剤であるニトロフラン類は、ニトロフランを基本骨格に隣接するヒドラジド誘導体の違いにより多くの種類が知られている。その中には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。

我々はこれまで、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、さらに 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、その関連性をさらに検討する目的で、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。

B. 研究方法

実験 1-1 : 本年度は、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 (Coulchem; ESA, Bedford, MA, USA) を用いて 8-OHdG ($8\text{-OHdG}/10^5$ 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 (HE) 染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。さらに、抗ラット α_{2u} -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、 α_{2u} -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 α_{2u} -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、さらに他の 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 週目の腎臓について *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

実験 1 および 2 における、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。

(倫理面への配慮)

本試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規定」に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会による審査を受けた後、実施した。また、DNA 組み換え動物の使用についても、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組み換え実験安全管理規定」に従い、遺伝子組み換え執権計画書を作成し、審査を受けた。また、本研究における動物への投与実験は、全て強制経口投与で行ったが、投与は短時間で行い、動物にあたる苦痛を最小限に抑えた。また、解剖時はイソフルラン深麻酔下で疼痛を軽減させ放血致死させた。

C. 研究結果

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 および 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 レベルを測定した。その結果を Fig. 1 に示す。投与 4 週目から NFT で有意な増加が認められた。さらに 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結果を Table 1 に示す。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 および 13 週でごく軽度認められた。この沈着物はその形態的特徴から α_{2u} -globulin 蛋白の可能性が考えられ、免疫染色法およびウェスタンブロットリング法にて確認を行った。その結果を Fig. 2 および 3 に示す。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、さらにウェスタンブロットリ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 (Fig. 4)。腎重量では、実重量・相対重量ともに有意に増加した (Table 2)。腎臓について *gpt* assay および Spi⁻ assay を行った。その結果を Table 3 に示す。*gpt* assay で、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 (Table 4)。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*^{+/-} の 4 および 13 週の結果を Table 5 および 6 示す。*gpt* assay では、4 週目で NFT の *gpt* MF の増加傾向がみられ、13 週ではさらに NFA でも増加傾向が見られた。Spi⁻ assay では、4 および 13 週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。*p53*^{-/-} の 4 および 13 週の結果を Table 7 および 8 に示す。*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。

D. 考察

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、さらにこの代謝過程では $\cdot O_2^-$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 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*変異原性さらには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さらに詳細に検討する予定である。

またNFTでは、腎尿管管内に 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。さらに認められた*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、さらに詳細な検討を行う予定である。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

1) 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

2) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

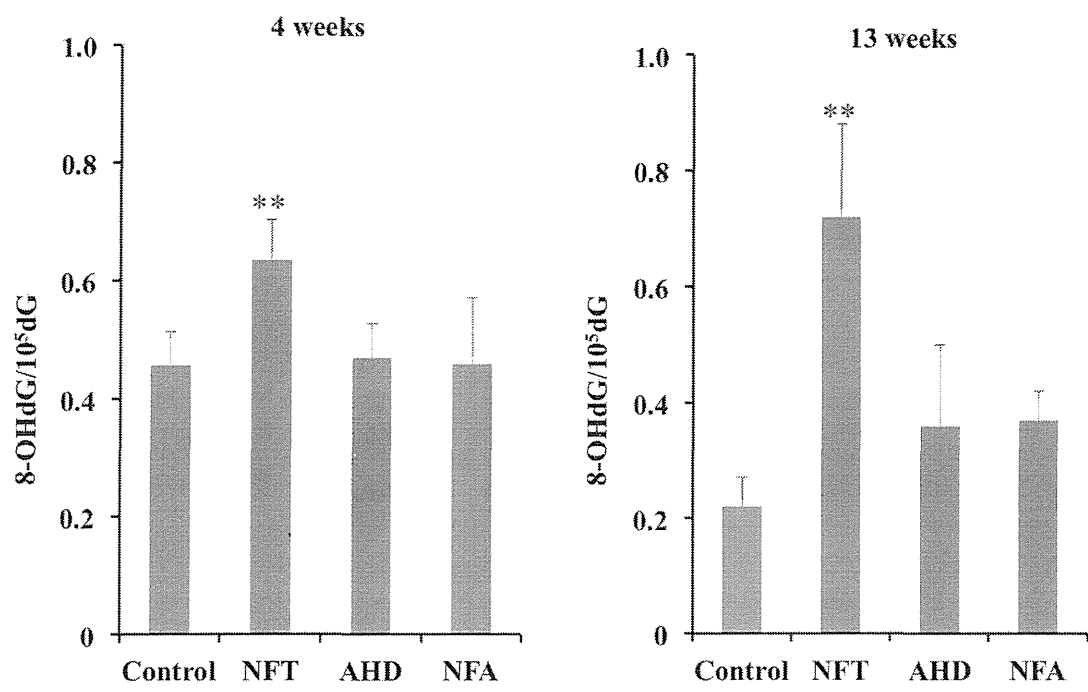


Fig. 1. 8-OHdG levels in the kidneys of male F344 *gpt* delta rats given NFT, AHD or NFA. Values are means ±SD. **: significantly different from the control group at p<0.01.

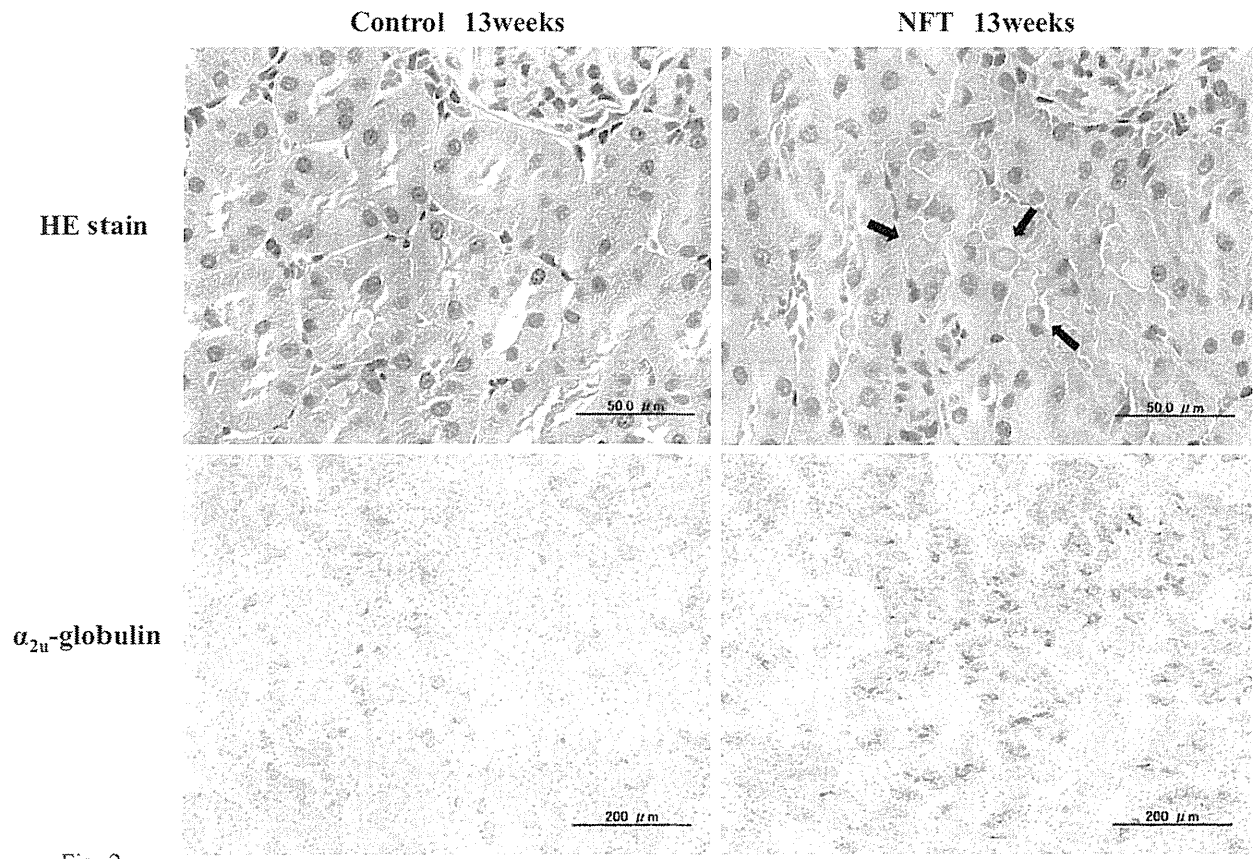


Fig. 2. Histopathological features in the kidneys of male F344 *gpt* delta rats given NFT. Hyaline droplets were positively stained by α_{2u} -globulin immunostaining.

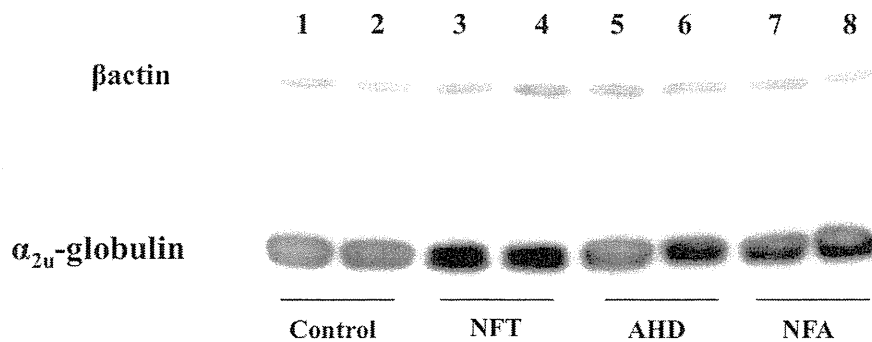


Fig. 3. Western blot analysis of α_{2u} -globulin from the kidneys of male F344 *gpt* delta rats given basal diet (lane 1,2), NFT(lane 3,4), AHD (lane 4,5), AHD (lane 5,6) or NFA(lane 7,8) for 13weeks, respectively. α_{2u} -globulin accumulation is more prominent in NFT-treated group as compared to the controls.

Table 1. Histopathological findings observed in the kidneys of male F344 *gpt* delta rats given NFT, AHD or NFA.

group	4 weeks				13 weeks			
	Control	NFT	AHD	NFA	Control	NFT	AHD	NFA
No. of animals	5	4	5	4	5	4	5	5
Grade								
\pm	5	-	5	1	5	-	5	1
Hyaline droplet, proximal tubule								
+	-	3	-	3	-	-	-	4
++	-	1	-	-	-	4	-	-

\pm : Very slight, +: Slight, ++: Moderate, +++: Severe

Table 2.
gpt and *Spi*^r MFs in the kidneys of female F344 *gpt* delta rats given NFT for 13 weeks.

Treatment	Animal no.	gpt assay			Mean ± SD	Spi ^r assay			Mean ± SD
		Cm ^R colonies (x 10 ⁻⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)		Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within XL-1 Blue MRA(P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	
Control	1	3.11	6	1.93		7.47	4	0.54	
	2	8.10	5	0.62		9.09	3	0.33	
	3	5.36	6	1.12		7.56	6	0.79	
	4	2.97	3	1.01		6.75	1	0.15	
	5	5.99	4	0.67	1.07 ± 0.53	8.46	4	0.47	0.46 ± 0.24
NFT	8	2.88	22	7.64		4.14	5	1.21	
	9 [#]	0	0	-		3.69	2	0.54	
	11	1.89	13	6.88		6.30	3	0.48	
	12	5.04	27	5.36		6.30	2	0.32	
	13	2.97	17	5.72	6.40 ± 1.05 **	5.04	2	0.40	0.59 ± 0.36
Positive control (Tamoxifen)	-	5.18	371	71.69		6.30	34	5.40	

[#] No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded from the calculation of MF.

** Significantly different from the control group at p<0.01.

Table 3.
Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in the kidneys of female F344 *gpt* delta rats given NFT for 13 weeks.

	Control		NFT	
	Number (%)	Specific mutation frequency	Number (%)	Specific mutation frequency
Base substitution				
Transversions				
GC-TA	3 (12.0)	0.10 ± 0.15	12 (22.6)	1.01 ± 1.0 *
GC-CG	1 (4.0)	0.06 ± 0.14	14 (26.4)	1.18 ± 0.5 *
AT-TA	1 (4.0)	0.04 ± 0.08	2 (3.8)	0.26 ± 0.5
GC-AT	3 (12.0)	0.14 ± 0.14	2 (3.8)	0.26 ± 0.5
Transitions				
GC-AT	8 (32.0)	0.31 ± 0.08	10 (18.9)	0.91 ± 0.5
AT-GC	2 (8.0)	0.10 ± 0.15	4 (7.5)	0.39 ± 0.3
Deletion	0		0	
Single bp	6 (24.0)	0.25 ± 0.27	5 (9.4)	0.52 ± 0.5
over 2bp	0		0	
Insertion	0		1 (1.9)	0.05 ± 0.1
Complex	1 (4.0)	0.06 ± 0.14	3 (5.7)	0.22 ± 0.3
	25	1.08	53	4.81

* Significantly different from the control group at p<0.05.

Table 4.

gpt and *Spiⁱ* MFs in the kidneys of male *p53^{+/+}gpt* delta mice given NFT for 4 weeks.

Treatment	Animal no.	gpt assay				Spi ⁱ assay			
		Cm ^R colonies (x 10 ⁻⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within XL-1 Blue MRA(P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	W1	26.1	15	0.58		26.7	29	1.08	
	W2	16.5	6	0.36		16.8	11	0.65	
	W3	16.8	9	0.54		41.3	28	0.68	
	W101	30.0	11	0.37		29.9	9	0.30	
	W102	27.2	10	0.37	0.44 ± 0.10	25.4	7	0.28	0.60 ± 0.33
NFT	W4	13.2	13	0.99		11.8	11	0.93	
	W6	7.8	9	1.15		13.9	13	0.94	
	W103	36.3	20	0.55		39.1	16	0.41	
	W105	18.0	12	0.67	0.84 ± 0.28 *	7.7	5	0.65	0.73 ± 0.25
AHD	W7	16.1	12	0.75		27.2	22	0.81	
	W8	22.0	13	0.59		34.6	18	0.52	
	W9	29.7	16	0.54		38.8	31	0.80	
	W106	11.4	6	0.53		8.3	5	0.60	
	W107	10.9	11	1.01	0.68 ± 0.20	5.9	2	0.34	0.62 ± 0.20
NFA	W11	18.4	11	0.60		31.6	14	0.44	
	W12	14.5	8	0.55		15.3	6	0.39	
	W108	18.3	9	0.49		12.1	6	0.50	
	W109	17.3	7	0.40		8.8	6	0.68	
	W110	5.8	2	0.35	0.48 ± 0.10	5.1	2	0.39	0.48 ± 0.12

* Significantly different from the control group at p<0.05.

Table 5.

gpt and *Spiⁱ* MFs in the kidneys of male *p53^{+/+}gpt* delta mice given NFT for 13 weeks.

Treatment	Animal no.	gpt assay				Spi ⁱ assay			
		Cm ^R colonies (x 10 ⁻⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within XL-1 Blue MRA(P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	W1301	4.1	3	0.73		1.3	0	0.00	
	W1302	26.3	14	0.53		31.1	11	0.35	
	W1303	2.3	2	0.89		3.4	0	0.00	
	W1304	14.3	7	0.49	0.66 ± 0.19	21.0	2	0.10	0.11
NFT	W1305	14.8	14	0.95		31.8	8	0.25	
	W1307	20.6	46	2.23	1.59	17.5	7	0.40	0.33
AHD	W1308	8.8	0	0.00		15.4	1	0.06	
	W1309 [#]	0	0	-		0.1	0	0.00	
	W1310	8.1	8	0.99	0.50	14.0	6	0.43	0.16
NFA	W1311	22.2	34	1.53		38.7	9	0.23	
	W1312	10.2	22	2.16		19.3	3	0.16	
	W1313	7.9	8	1.02		15.0	7	0.47	
	W1314	17.6	23	1.30	1.50 ± 0.49	17.3	2	0.12	0.24 ± 0.16

[#] *gpt* MF of Animal no.9 was undetectable because the error of kidney DNA extraction was occurred.

Table 6.

gpt and Spi⁻ MFs in the kidneys of male *p53^{-/-}gpt* delta mice given NFT for 4 weeks.

Treatment	Animal no.	gpt assay			Spi ⁻ assay				
		Cm ^R colonies (x 10 ⁻⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within XL-1 Blue MRA(P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	Ho1	23.9	14	0.58		24.3	11	0.45	
	Ho2	10.6	11	1.04		7.9	3	0.38	
	Ho3	14.3	10	0.70		13.1	6	0.46	
	Ho4	29.9	17	0.57		19.8	14	0.71	
	Ho5	33.3	16	0.48	0.67 ± 0.22	42.4	14	0.33	0.47 ± 0.15
NFT	Ho9	16.0	14	0.88		14.4	2	0.14	
	Ho10	24.6	17	0.69		21.9	7	0.32	
	Ho101	20.7	16	0.77		23.2	7	0.30	
	Ho102	17.7	24	1.35	0.92 ± 0.30	26.2	14	0.53	0.32 ± 0.16
AHD	Ho11	9.6	9	0.94		11.6	6	0.52	
	Ho12	17.8	59	3.32		25.7	9	0.35	
	Ho13	8.7	11	1.27		15.6	3	0.19	
	Ho14	17.8	9	0.51		18.1	6	0.33	
	Ho15	22.5	12	0.53	1.31 ± 1.16	26.1	5	0.19	0.32 ± 0.13
NFA	Ho16	20.6	10	0.49		26.3	7	0.27	
	Ho17	20.1	11	0.55		18.8	8	0.43	
	Ho18	23.3	13	0.56		22.6	8	0.35	
	Ho19	11.5	10	0.87		11.8	6	0.51	
	Ho20	16.2	16	0.99	0.69 ± 0.22	23.8	6	0.25	0.36 ± 0.11

Table 7.

gpt and Spi⁻ MsF in the kidneys of male *p53^{-/-}gpt* delta mice given NFT for 13 weeks.

Treatment	Animal no.	gpt assay			Spi ⁻ assay				
		Cm ^R colonies (x 10 ⁻⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within XL-1 Blue MRA(P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
Control	Ho1301	23.3	16	0.69		19.3	7	0.36	
	Ho1302	19.4	8	0.41		24.4	8	0.33	
	Ho1303	18.3	9	0.49		21.7	14	0.65	
	Ho1304	19.1	4	0.21	0.45 ± 0.20	8.4	3	0.36	0.42 ± 0.15
NFT	Ho1306	17.7	15	0.85		23.4	14	0.60	
	Ho1307	19.7	16	0.81		15.0	4	0.27	
	Ho1308	18.5	25	1.35	1.00 ± 0.30 *	17.6	11	0.62	0.50 ± 0.20
AHD	Ho1309	33.0	16	0.49		23.2	11	0.47	
	Ho1310	30.7	18	0.59		28.2	10	0.35	
	Ho1311	23.6	27	1.15	0.74 ± 0.36	13.2	3	0.23	0.35 ± 0.12
NFA	Ho1312	19.3	7	0.36		8.6	4	0.46	
	Ho1313	20.2	13	0.64		12.3	7	0.57	
	Ho1314	8.4	9	1.08		8.5	11	1.30	
	Ho1315	15.3	13	0.85	0.73 ± 0.30	12.0	10	0.84	0.79 ± 0.37

* Significantly different from the control group at p<0.05.

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
—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—

分担研究者 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

研究要旨

動物薬の一部には、肝発がん過程に活性酸素種 (ROS) が関与するものがあることが明らかにされている。それらの中には CYP1A を誘導する物質 (CYP1A inducer) も含まれている。本研究ではこれら CYP1A inducer の同時暴露により、肝発がんイニシエーションないしプロモーション作用がどのように修飾されるかを明確にする。平成 23 年度までに動物薬として胃酸分泌阻害剤である omeprazole (OPZ)、また強い CYP1A inducer である β -naphthoflavone (BNF)、CYP1A/2B inducer である piperonyl butoxide (PBO) を用い OPZ と BNF、BNF と PBO の併用投与実験およびを行った。本年度は CYP1A inducer である Indole-3-carbinol (I3C)、CYP2B/1A inducer である phenobarbital (PB)、CYP2B inducer である orphenadrine (ORPH) を用い、6 週齢の雄性 F344 ラットを用いて以下の実験を行った。(3)PB/I3C 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験：*N*-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週間後から I3C 0.25%ないし 0.5%の混餌投与、PB 0.006%ないし PB 0.012%の飲水投与、I3C 0.25%及び PB 0.006%の同時併用投与を 6 週間行った。プロモーター投与 1 週間後に部分肝切除 (PH) を行った。実験終了後、採取した肝臓について病理組織学的検索、免疫組織化学的解析、遺伝子の発現変動解析及び酸化的損傷マーカーの測定を行った。その結果、PB 及び I3C 併用投与による肝発がんプロモーション作用の増強は認められなかった。平成 23 年度までに行った実験結果から、CYP1A inducer 同士の併用投与ではそのラット肝発がんプロモーション作用が増強することが示唆されたことと本年度の結果をふまえ、CYP2B inducer である ORPH を用い PB/ORPH 併用投与によるプロモーション修飾作用の実験を同様の方法で行った。その結果、PB 及び ORPH 併用投与により肝発がんプロモーション作用の相乗的な増強が認められ、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。これらのことより、CYP1A inducer 同士の併用投与ではそのラット肝発がんプロモーション作用が増強することが示唆され、さらに CYP2B inducer 同士でも増強されることが示された。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おける 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。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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。一部の肝臓は遺伝子発現解析・生化学的解析用に分取し、液体窒素で急速凍結した後、検索まで -80°C に保存した。また病理組織学的・免疫組織化学的検索用に 10% 緩衝ホルマリン固定した後パラフィン包埋を行った。

組織学的検索は、固定生検材料を常法に従いパラフィン包埋及び薄切後にヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。さらに、ラット肝増殖性病変に陽性を示す glutathione-S-transferase placental form (GST-P) 並びに細胞増殖活性マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 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。さらにそのデータをもとに mRNA について、各群 6 例ずつ real-time RT-PCR 法（補正は内部標準遺伝子である β アクチンを用いて実施）を用いて定量解析した (Table 1)。また、肝 DNA については、HPLC-ECD 法により酸化 DNA 損傷指標である 8-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。さら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。

(倫理面への配慮)

本研究は、投与実験は混餌による経口投与が主体であり、また、動物はすべてエーテルもしくは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抑えた。また、動物飼育管理に当たっては、国立大学法人 東京農工大学の実験動物取り扱い倫理規定及び米国国立衛生研究所 (NIH) が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

(3) PB/I3C 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。I3C 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 (Table 2)。

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。さら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 (Table 2)。

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 1,319 mg/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、変異肝細胞巢（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 陽性肝細胞巢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 陽性肝細胞巢の数は PB 低用量と、面積は PB 投与群で有意な差を示した (Table 3)。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 (Table 3)。

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 (Table 4)。

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 (Table 4)。

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 (Table 5)。

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 (Table 5)。(4)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 (Table 6)。

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。さら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 (Table 6)。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、変異肝細胞巢 (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 陽性巢の数において、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 (Fig. 1)。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 (Fig. 1)。PCNA 染色においては、PR/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 (Table 6)。

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 (Table 7)。

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。 (Table 7)。

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。 (Table 8)。

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。

D. 考察

平成 23 年度までに、(1)①の実験では、

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、(1)②の実験では、OPZ と BNF の併用投与によるイニシエーション作用に対しては明確な修飾作用は誘発されないことが明らかになった。さらに、(2)の実験では 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。

本年度行った (3) の実験では、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、(4) の実験では、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。

E. 結論

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。これらのことから、誘導する酵素の異なる発がん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おける 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。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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