

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 22 年度～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告書

畜水産食品中に含まれる動物用医薬品等の安全性確保に関する研究----- 1

渋谷 淳

(資料) 図 1 -31

表 1 -22

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 22

III. 研究成果の刊行物・別刷----- 23

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）
 畜水産食品中に含まれる動物用医薬品等の安全性確保に関する研究
 総合研究報告書（平成 22-24 年度）

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、背根神経節の除去法に関する研究では、BSE の特定危険部位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では、巨大核出現メカニズムを起点として肝臓における短期発がん性予測指標の探索を 28 日間毒性試験の枠組みで行ない、p21^{Cip1}、Aurora B、Incenp、p53、核局在 Cdc2、p-Histone H3 および HP1 α が得られた。これらを異なる発がん標的臓器を対象に検討した結果、核局在 Cdc2、Aurora B および p-Histone H3 の有用性が示唆された。更にこれらの指標候補の発がん過程早期に対する関与を検討した結果、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。以上の結果から、これらの分子の変動は、発がん初期過程へのエントリーを示唆し、28 日間毒性試験の枠組みの中で、発がん物質の早期スクリーニング指標となり得る可能性が示唆された。

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解明研究では、ラット肝二段階発がんモデルを用いて、複数の CYP inducer の組合せでの発がん修飾作用を検討した。その結果、共に CYP1A inducer の omeprazole (OPZ) 及び β -naphthoflavone (BNF) の併用投与ではイニシエーションの増強はしないが、プロモーション作用を増強した。しかし BNF と CYP1A/2B inducer の piperonyl butoxide (PBO)、または CYP1A inducer の indole-3-carbinol (I3C) と CYP2B/1A inducer である phenobarbital (PB) と併用した場合には、明らかな増強は認めなかった。加えて、CYP2B inducer 同士である PB と orphenadrine (ORPH) の併用投与では、プロモーション作用の増強が明らかとなった。これらのことから、誘導する CYP が同じ発がん物質同士の組み合わせでは増強するものの、異なる場合は修飾作用のないことが明らかとなった。

ニトロフラン類の安全性評価法の確立研究では、ニトロフラン類の化学構造に依存した発がん機序解明を目的とし、*gpt delta* ラットおよび遺伝子障害修復機構に関与する *p53* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを用いて、*in vivo* 変異原性を検索した。その結果、雄ラット腎臓に発がん性の報告がある nitrofurantoin (NFT) は酸化ストレスを介して雌雄ラットの腎臓に遺伝毒性を発揮し、更に雄では α_2u -globulin 沈着を介した細胞増殖活性の亢進が加わることで発がんに至ると考えられた。また、変異原性には *p53* 遺伝子型の違いによる差異は見られなかった。

牛脊柱からの背根神経節の除去に関する研究では、牛海綿状脳症の特定危険部位である牛の背根神経節のうち、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。平均除去率は 92% であったが、完全除去率は 10% 程度で、除去率が極端に低い部位が存在するため、今後更なる技術の改良が必要である。

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

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)

梅村 隆志
 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

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、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、ニトロフラン類の安全性評価法の確立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した。

巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索研究では、肝発がん標的性で見出された発がん予測指標候補分子の、28 日間反復投与試験の枠組みでの異なる発がん標的に対する有用性の有無を検討し、更に異なる発がん標的を対象として、発がん促進により誘発さ

れた前がん病変や過形成性病変での発現変動を検討し、発がん過程早期への関与の有無を検討した。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作用の解明に関する研究では、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した。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。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した。以下に各課題の詳細を述べる。

1. 巨大核出現に関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。これまでに代替試験法として、トランスジェニック動物や遺伝子ノックアウト動物を用いた短期試験系 (Eastin, 1998)、肝中期発がん性試験法や多臓器中期発がん性試験のような二段階発がんモデル (Tamano, 2010) が開発されているが、これらもまた高コストを必要とし、標的臓器も限定される。従って、短期間で合理的に諸臓器全般にわたる発がん性を予測し得る指標を確立することが必要とされている。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、平成 22 年度に、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。平成 23 年度に、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、肝臓で得られた発がん短期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。平成 24 年度には、28 日反復投与試験で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促進過程早期における反応性を検討した。

2. 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有り、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取していることから、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 (I3C)、oxfendazole などのいくつかの CYP1A inducer が、肝発がんプロモーション作用を持ち、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、OPZ と更に強い CYP1A inducer として知られる BNF 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。更に BNF と CYP1A/2B inducer である piperonyl butoxide (PBO) を併用投与、また 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。その中で 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。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立

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。主に抗菌剤として動物およびヒト医薬品として使用されていたが、その中には発がん性が報告されているものもあり、国内での畜産動物への使用が原則禁止されている。しかし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ことから、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。そこで本研究では、*gpt delta* ラットおよび遺伝子障害修復機構に関与する *p53* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを用いて、DNA 修飾の定量的解析とレポーター遺伝子突然変異解析を組み合わせ、ニトロフラン類の化学構造に依存した *in vivo* 変異原性を解明するとともにニトロフラン類の包括的安全性評価法の確立を目指した。

4. 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、品種別及び牝牝別の除去率についても比較し、除去率に差があるか否か検討した。

B. 研究方法

1. 巨大核出現に関与する標的遺伝子の探索

(1) 肝臓における巨大核出現に関連する発がん早期予測分子標的の同定

動物実験

6 週齢の雄性 F344 ラット（日本 SLC 株式会社）を各群 10 匹に分け、以下の化学物質を 28 日間反復投与した (Fig. 1)。肝発がん物質については、肝発がん性ないし発がんプロモーター用量を設定し、thioacetamide (TAA; 400 ppm)、fenbendazole (FB; 3,600 ppm) および piperonyl butoxide (PBO; 20,000 ppm) は混餌投与を、methyleugenol (MEG; 1,000 mg/kg) は強制経口投与を行った。発がん陰性対照群として設定した非発がん肝毒性物質である acetaminophen (APAP) および α -naphthyl isothiocyanate (ANIT) は 13 週間ないし 16 週間投与で肝毒性を誘発する用量を設定した。APAP (12,500 ppm) および ANIT (1,000 ppm) は混餌投与で開始したが、ANIT は動物の健康状況の悪化に伴い、その後段階的に 800 ppm (14 日間)、600 ppm (7 日間) と用量を低下させた。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。実験終了後、すべての動物は深麻酔下で安楽殺し、肝臓を摘出し、重量を測定後、各葉に分割した。4%パラフォルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (PFA) で固定し、パラフィン包埋した。

RNA 抽出およびマイクロアレイ発現解析

巨大核誘発肝発がん物質の遺伝子プロファイリングを得るため、核の巨大化が顕著な TAA 群を選択し、無処置対照群と合わせて計 2 群でマイクロアレイ発現解析を行った。結果は無処置対照群と比較した ($n = 4$ /群)。

各個体の採取したサンプルより RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した後、Superscript™ Double-Stranded cDNA Synthesis kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いて、二本鎖 cDNA を合成した。Cy3 によりラベ

ル化した 4 µg の cDNA を *Rattus norvegicus* Roche NimbleGen microarray for Gene Expression (Roche NimbleGen: Euk Expr 4x72K Catalog Arr Del, 26,208 targets; Roche Applied Science, Penzberg, Germany) と共にハイブリダイゼーションした。Innoscan7000 (Inopsys, Carbonne, France) にてシグナルデータを取り込んで定量後、各データの robust multi-array average normalization method (Irizarry *et al.*, 2003) を行い、TAA 群で無処置対照群に比して発現変動した遺伝子について、Student's *t*-test を実施し、有意差水準 5%以下を選別した。このうち、TAA 群が無処置対照群と比較して 2 倍以上発現上昇した遺伝子群が選別された。遺伝子情報の検索は、National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) を用いて実施した。

Real-time RT-PCR

マイクロアレイ発現解析によって TAA 群で無処置対照群と比較して有意な発現上昇が認められた遺伝子について、real-time RT-PCR により mRNA 発現の定量解析を実施した。すなわち、TAA 群、FB 群および無処置対照群を対象に、抽出した 2 µg の total RNA より cDNA を合成した (n=6/群)。PCR 反応は SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA) を用い、Step OnePlus[™] Real-time PCR System (Applied Biosystems Inc.) にて、製造元のプロトコールに従って実施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Applied Biosystems, Inc.) を用いて設計し、Table 1 に示した。各遺伝子の mRNA 発現量は、無処置対照群での発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとして *β-actin* の検量線を求め、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) にて算出した。

病理組織学的解析および免疫組織化学染色

パラフィン固定した肝臓を 3 µm の厚さに薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫組織化学的解析に供した。遺伝子発現解析より選別された分子群と共に、既に知られている主要な細胞周期分子群について、免疫組織化学的解析を実施した。用いた抗体、賦活化方法および抗体希釈条件は Table 2 に示した。シグナル検出は VECTASTAIN[®] Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ を用いて可視化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。

TUNEL 染色

発がん物質投与早期のアポトーシス誘導性の有無を検討するために TUNEL 染色を実施した (Taniai *et al.*, 2012)。シグナル検出は、ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Billerica, MA, USA) のプロトコールに従い、反応を進め、免疫染色と同様の手順で染色を施した。

免疫組織化学染色に対する解析

肝臓の評価領域は、200 倍の倍率で、1 個体当たりランダムに 10 視野選択した。陽性細胞数は視覚的にカウントし、総細胞数は画像解析ソフト WinROOF (三谷商事、東京) を用いて定量化し、陽性細胞率を算出した。免疫組織化学染色の評価方法は、二段階に分け、一段階目はスクリーニング解析とし、各群 5 個体における評価を行った。ここで無処置対照群ないし非発がん物質と発がん物質間に有意な変化が認められた場合、二段階目として残る 5 個体の解析を同様に行い、一段階目のスクリーニング解析と合算した総合値を算出した。

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。体重、肝臓重量、Real-time RT-PCR および免疫組織化学染色の多群間比較は、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 Dunnett's test を行った。Bartlett 検定で等分散でなかった場合、Steel's test を行った。APAP 群及び ANIT 群に比しては、無処置対照群を除外した全群の Dunnett's/ Steel's test を行った。なお、有意水準 5%以下を有意差ありとした。

(2) 肝臓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の探索 動物実験①

6 週齢の雄性 F344 ラットに、巨大核を誘発する発がん物質の ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA; 5-10 mg/kg body weight、腹腔内)、ochratoxin A (OTA; 210 µg/kg body weight、強制経口) 及び monuron (MON; 3,000 ppm、混餌)、巨大核を誘発するが非発がん性の *p*-nitrobenzoic acid (PNBA; 10,000 ppm、混餌) を用いた。また、巨大核を誘発しない発がん物質として tris (2-chloroethyl) phosphate (TRCP; 350 mg/kg body weight、強制経口) 及び potassium bromate (KBrO₃; 500 ppm、飲水)、巨大核を誘発しない非発がん性の腎毒性物質 acetaminophen (APAP; 12,500 ppm、混餌) のそれぞれについて、巨大核誘発発がん用量ないし

腎毒性用量を 28 日間投与した (Fig. 2)。実験終了後、すべての動物は深麻酔下で安楽殺し、腎臓を摘出し、4% PFA で固定し、腎中心から長軸に直角に分割後、パラフィン包埋した。

動物実験②

6 週齢の雄性 F344 ラットを各群 10 匹に分け、以下の化学物質を 28 日間反復投与した。甲状腺の sulfadimethoxine (SDM; 1,000 ppm) は飲水投与で、膀胱の phenylethyl isothiocyanate (PEITC; 1,000 ppm)、前胃の butylated hydroxyanisole (BHA; 20,000 ppm)、腺胃の catechol (CC; 8,000 ppm)、大腸の chenodeoxycholic acid (CDCA; 1,000 ppm) および 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP; 400 ppm) は混餌投与で実施した。SDM および CDCA は発がんプロモーター用量を、PEITC、BHA、CC および PhIP は発がん性用量を用いた。肝臓以外の臓器に対する発がん陰性対照群として用いた遺伝毒性非発がん物質である caprolactam (CL) は、発がん性の報告がない最大用量の 10,000 ppm を混餌投与で実施した。実験デザインを Fig. 3 に示すように動物実験を実施し、無処置対照群および発がん陰性対照群を設定した。無処置対照群は基礎飼料および飲料水で維持した。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% 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、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)、前胃および腺胃を含む胃の 3 断面、そして大腸の結腸上行部、横行部および下行部の横断面を包埋した。

病理組織学的解析および免疫組織化学染色

パラフィン固定した各臓器は肝臓と同様に薄切後、HE 染色および免疫組織化学的解析に供した。免疫組織化学染色に用いた抗体は、平成 22 年度の実験で短期肝発がん性予測指標として得られた分子の内、Ki-67、p21^{Cip1}、Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α を用いた。賦活化方法、希釈条件は Table 2 と同様の条件で実施し、染色を施した。

免疫組織化学染色に対する解析

腎臓は、400 倍の倍率で 1 個体あたり 8 視野をランダムに選択した。反応性近位尿細管上皮細胞をカウントし、間質細胞や遠位尿細管上皮細胞を含む総細胞数は、WinROOF を用いて解析した。8 視野の陽

性細胞率はそれぞれの個体で評価した。2 段階式の評価方法を採用し、発がん物質投与による細胞分布に注目した抗原反応性の解析を実施した。最初のスクリーニングでは、各群 5 個体の腎臓から髄質外帯 (OSOM) 領域評価を行った。無処置対照群ないし非発がん物質群と発がん物質群間に有意な変化が認められたら、残る 5 個体の解析も同様にを行い、これを第 2 のスクリーニングとした。2 段階目のスクリーニングでは皮質領域 (cortex) +OSOM 評価も行った。

甲状腺および膀胱の評価領域は、400 倍 (甲状腺) および 200 倍 (膀胱) の倍率で、1 個体当たりランダムに 8 視野 (4 視野/組織片側) 選択した。前胃の評価領域は、200 倍の倍率で、Ki-67、Aurora B および HP1 α 陽性細胞が基底細胞層に限局性に分布したため、基底膜基部から粘膜方向にかけての陽性細胞分布を 1 個体当たりランダムに 10 箇所計測した。p21^{Cip1}、Cdc2 および p-Histone H3 陽性細胞は散在性に分布したため、上記の他臓器と同様に 1 個体あたりランダムに 10 視野選択した。腺胃の評価方法は、200 倍の倍率で、1 個体あたりランダムに 10 腺管選択した。大腸の評価方法は、200 倍の倍率で、1 個体当たり粘膜筋板に近い横断像の 10 陰窩を選択した。陽性細胞数は視覚的にカウントし、甲状腺、膀胱、腺胃および大腸においては、総細胞数は画像解析ソフト WinROOF (三谷商事、東京) を用いて定量化し、陽性細胞率を算出した。前胃では、粘膜内の Ki-67、Aurora B および HP1 α 陽性細胞分布を μm 単位で表した。一方、p21^{Cip1}、Cdc2 および p-Histone H3 陽性細胞は上皮の単位長さ (1,000 μm) 当たりの個数で表した。

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。腎臓の免疫組織化学染色の多群間比較は、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 Dunnett's test を行った。Bartlett 検定で等分散でなかった場合、Steel's test を行った。PNBA 群及び APAP 群に比しては、無処置対照群を除外した全群の Dunnett's/Steel's test を行った。有意水準 5% 以下を有意差ありとした。甲状腺、膀胱、前胃、腺胃および大腸においては、Student's t-test を実施し、それぞれの臓器において Bonferroni 法で補正した値を有意水準とした。

(3) 短期発がん性予測指標候補分子群の発がん

促進過程早期における反応性

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. 4)。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 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、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 BBN (500 ppm) を4週間飲水投与し、その後 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 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% PFA で固定し、パラフィン包埋した。それぞれの臓器は、上記の動物実験で実施した方法と同様に処理した。

免疫組織化学染色

パラフィン固定した各臓器は平成22年度と同様に薄切後、HE染色および免疫組織化学的解析に供した。免疫組織化学染色に用いた抗体は、短期発が

ん性予測指標である Ki-67、p21^{Cip1}、Cdc2、Aurora B、p-Histone H3 および HP1 α を用いた。賦活化方法、希釈条件は共に Table 2 と同様の条件で実施し、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 GST-P (rabbit polyclonal antibody; 1:1,000; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Nagoya, Japan) を用い、甲状腺については phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (Thr202/Tyr204) (p-Erk1/2; rabbit monoclonal antibody; 1:400; Cell Signaling Technology, Inc.) 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 (Ichimura et al., 2010)。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 μ m) 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。

2. 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

(1) ① OPZ/BNF によるプロモーション修飾作用 動物実験

イニシエーターである *N*-diethylnitrosamine (DEN) を6週齢の雄性 F344 ラットに腹腔内投与し、2週後から OPZ 138 mg/kg ないし 276 mg/kg を1日1回強制経口投与、0.125%ないし 0.25% BNF を混餌投与、もしくは OPZ 138 mg/kg 及び BNF 0.125% の併用投与を6週間行った (それぞれ OPZ 低用量群、高用量群、BNF 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 (Fig. 5)。

② OPZ/BNF によるイニシエーション修飾作用

OPZ 138 mg/kg ないし 276 mg/kg を1日1回強制経口投与、BNF 0.03%ないし 0.06%混餌投与、OPZ 138 mg/kg 及び BNF 0.125% の同時併用投与1週後に PH を施し、12時間後にイニシエーターとして 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) を単回投与した。PH2週後から 2-acetylaminofluorene 混餌投与を10日間行い、更に開始3週間後には四塩化炭素を強制経口投与し、実験開始6週後に剖検を行った (Fig. 5)。

(2) BNF/PBO によるプロモーション修飾作用

動物実験

実験(1)①と同様に行った。プロモーターとして BNF 0.125%ないし 0.25%混餌投与、PBO 0.125%ないし 0.25%混餌投与、BNF 0.125%及び PBO 0.125% の同時併用投与を行った (それぞれ BNF 低用量群、高用量群、PBO 低用量群、高用量群及び併用投与群)。

(3) PB/I3C によるプロモーション修飾作用

動物実験

実験(1)①と同様に行った。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)。

(4) PB/ORPH によるプロモーション修飾作用 動物実験

実験(1)①と同様に行った。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)。

各実験とも投与期間終了後、エーテルもしくは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。

組織学的及び免疫組織化学的検索

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 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

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 (Table 3)。

酸化ストレス指標測定

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、ミ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

対照群と投与群の間では、等分散の場合は Dunnett's test を、不等分散の場合は Steel's test 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。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立

雄 F344 系 *gpt delta* ラットに NFT を腎発がん用量の 125 mg/kg、AHD および NFA はそれぞれの最大耐量の 80 mg/kg bw および 50 mg/kg bw の用量で 4 及び 13 週間強制経口投与した。腎臓について *gpt* および *Sp1* assay を実施し、*gpt* assay で認められた *gpt* 遺伝子変異体についてはスペクトラム解析を行った。また、酸化ストレスの指標として、腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを測定した。また腎臓の病理組織学的検査を実施し、 α_2 -globulin 蛋白の蓄積を免疫組織化学染色法及びウェスタンブロッティング法により確認した。更に、雌 F344 系 *gpt delta* ラットに NFT を雄ラットと同用量の 125 mg/kg の用量で 4 及び 13 週間強制経口投与し、腎臓について *in vivo* 変異原性試験を実施した。また、雄の *p53* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスに NFT を最大耐量である 80 mg/kg、AHD および NFA はそれぞれ NFT と同モル量 45 mg/kg bw および 42 mg/kg bw の用量で 4 及び 13 週間強制経口投与し、腎臓について *gpt* および *Sp1* assay を実施した。

4. 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 腰椎神経までの脊髄神経・背根神経節の、脊柱からのそれぞれの除去率を調べた。

硬膜周辺から脂肪を除去して、付随する背根神経節を明らかにし、頸椎部(C)、胸椎部(T)、及び腰椎部(L)について、脊柱からの背根神経節の除去率を算出した。算出に用いた牛の硬膜は 2010 年 3 月から 2013 年 2 月までの計 602 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

1. 巨大核出現に關与する標的遺伝子の探索

(1) 肝臓における巨大核出現に關連する発がん早期予測分子標的の同定

体重および肝臓重量

体重は TAA 群、PBO 群、MEG 群、APAP 群および ANIT 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた (Table 4)。絶対肝重量は TAA 群、APAP 群および ANIT 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められ、PBO 群および MEG 群で有意な増加が認められた。一方、FB 群は有意な変動は認められなかった。相対肝重量はすべての投与群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた。

病理組織学的解析

TAA 群は、核の大小不同、有糸分裂異常およびアポトーシスと共に、“cytomegaly” がび漫性に認められた。また、胆管増生および oval cell 増生も軽度の間質線維化と共に小葉辺縁性に認められた。FB 群は小葉中心性に“hypertrophy”と呼ばれる肝細胞肥大が認められ、cytomegaly も小葉辺縁性に散在性に認められた。PBO 群はすりガラス状変性と hypertrophy がび漫性に認められた。MEG 群は、cytomegaly がび漫性に、肝細胞壊死が小葉中心性に認められた。APAP 群は肝細胞の細胞質好酸性化およびすりガラ

ス状変性が認められた。ANIT 群は胆管増生が小葉辺縁性に、肝細胞壊死および微小肉芽腫が散在性に認められた。

マイクロアレイ発現解析および mRNA 発現解析

マイクロアレイ発現解析より、TAA 群において、無処置対照群と比較して2倍以上発現上昇した1681遺伝子と、2倍以上発現低下を示した1207遺伝子が得られた。このうち、発現上昇が見られた1681遺伝子の中で細胞周期関連遺伝子を Table 5 に示した。本研究で実施されたマイクロアレイデータは NCBI Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) の Series ナンバー GSE43066 にアクセスすることが可能である。

Table 5 に示した遺伝子のうち、13 遺伝子の mRNA 発現を real-time RT-PCR により検証した (Table 6)。 *Cdkn2b*, *Cdkn1a*, *Ccnd1*, *Ccna2*, *Ccne2*, *Cdr2*, *Wee1*, *Tpx2*, *Gadd45a*, *Cdk1*, *Ccnb1*, *Aurkb* および *Aurka* は TAA 群で無処置対照群と比較して有意な発現上昇が認められ、そのうち、*Cdkn2b*, *Cdkn1a*, *Ccnd1*, *Ccne2*, *Cdr2* および *Cdk1* は FB 群でも有意な発現上昇が認められた。

細胞増殖活性とアポトーシス

Ki-67 陽性細胞率は、TAA 群、FB 群および MEG 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 6A)。また、TAA 群および MEG 群で、APAP 群および ANIT 群と比較して Ki-67 陽性細胞率の有意な増加が認められた。一方、PBO 群では Ki-67 陽性細胞率の増加は認められなかった。

TUNEL 陽性細胞は、TAA 群および MEG 群で、無処置対照群もしくは非発がん物質群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 6B)。また、FB 群で、APAP 群と比較して TUNEL 陽性細胞率の有意な増加が認められた。一方、PBO 群では TUNEL 陽性細胞率の増加は認められなかった。

G1 期および S 期関連分子の変動

p21^{Cip1} は肝細胞の核に局在が認められた。p21^{Cip1} 陽性細胞率が、すべての肝発がん物質投与群で無処置対照群および非発がん物質群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 7A)。

p16^{Ink4a} および p27^{Kip1} は肝細胞の核に局在し、弱～中等度の陽性が認められた。TAA 群では p16^{Ink4a} は核および細胞質に局在し、強度の陽性が認められた。一方、他の発がん物質投与群および非発がん物質投与群では核の局在のみが認められたが、発現変動は

認められなかった (Fig. 8A)。p27^{Kip1} 陽性細胞率は、無処置対照群もしくは非発がん物質群と比較して有意な変動は認められなかった (Fig. 8B)。

G2/M 期関連分子の変動

Cdc2 の局在性は今回、核、細胞質、そして核および細胞質の3パターンが認められた。Cdc2 が有糸分裂初期に Cyclin B1 と共に核に局在する活性型と、細胞質に局在する非活性型に分けられることより (Chan et al., 1999)、核への局在を示す活性型について解析した。結果、核局在 Cdc2 陽性細胞率は、TAA 群、FB 群および MEG 群で無処置対照群および APAP 群および ANIT 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 7B)。一方、PBO 群では核局在 Cdc2 陽性細胞率の発現変動は認められなかった。

Phosphorylated-Wee1 (p-Wee1) は、核への局在性、弱～中等度の陽性が認められたが、p-Wee1 陽性細胞は肝発がん物質に特徴的な細胞数の変動を示さなかった (Fig. 8C)。

M 期関連分子の変動

Aurora B 陽性細胞率は、すべての発がん物質群で無処置対照群および APAP 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 7C)。ANIT 群との比較では、FB 群、PBO 群および MEG 群で有意な増加が認められた。Incenp 陽性細胞率は、無処置対照群および ANIT 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 7D)。一方、APAP 群との比較では、変動は認められなかった。Phosphorylated-Histone H3 (p-Histone H3) 陽性細胞率は、すべての発がん物質群で無処置対照群および APAP 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 7E)。ANIT 群との比較では、TAA 群、FB 群および MEG 群で有意な増加が認められた。HP1α 陽性細胞率は、TAA 群および MEG 群で非発がん物質群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 7F)。一方、FB 群で有意な変動は認められず、PBO 群では反応を示さなかった。

p53 の mRNA 発現解析と変動

Tp53 は TAA 群で無処置対照群と比較して有意な発現上昇が認められた (Fig. 9A)。*Tp53* の制御タンパク質である *Mdm2* は TAA 群および FB 群で無処置対照群と比較して有意な発現上昇が認められた。

p53 陽性細胞率は、TAA 群、FB 群および MEG 群で無処置対照群および非発がん物質群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 9B)。一方、PBO 群では p53 陽性細胞率の増加は認められなかった。

Ndr1 および Klf6 の mRNA 発現解析

N-myc downstream regulated gene 1 (*Ndr1*) は TAA 群で無処置対照群に比較して有意な発現上昇が認められた (Fig. 10)。Kruppel-like factor 6 (*Klf6*) は TAA 群、PBO 群および MEG 群で無処置対照群に比較して有意な発現上昇が認められた (Fig. 10)。一方、FB 群では発現変動を示さなかった。

(2) 肝臓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の探索 病理組織学的解析

Fe-NTA 群は、Cortex および OSOM の近位尿細管上皮細胞において、変性および壊死と共に、巨大核出現を伴う再生性変化が限局性に認められた。また、リンパ球主体の炎症細胞浸潤も同領域に散在性に認められた。OTA 群および MON 群の近位尿細管上皮細胞には、巨大核出現が認められ、OTA 群では OSOM のみに、MON 群では主に Cortex への分布を示した。PNBA 群は Cortex の近位尿細管上皮細胞に再生性変化と共に、わずかな巨大核の出現が認められた。APAP 群は Cortex の近位尿細管上皮細胞に再生性変化が認められた。TRCP 群は Cortex および OSOM の近位尿細管上皮細胞に再生性変化が散在性に認められた。KBrO₃ 群は Cortex の近位尿細管上皮細胞に硝子滴変性と壊死を伴う限局性散在性の再生性変化が認められた。

SDM 群は、甲状腺にコロイド液および甲状腺濾胞細胞の増生を伴う小胞形成が認められた。PEITC 群は、膀胱の移行上皮の単純性過形成ないし結節状および乳頭状過形成 (PN 過形成) が認められた。BHA 群は、前胃に過角化/錯角化および層状上皮の過形成が認められた。CC 群は、幽門部腺胃に過形成が認められた。CDCA 群および PhIP 群は共に大腸に著変を示さなかった。発がん陰性対照の CL 群も、甲状腺、膀胱、前胃、腺胃および大腸に著変を示さなかった。

腎臓における短期発がん性予測指標の変動

Ki-67 陽性細胞は巨大核に関係なく全ての発がん物質で、無処置対照群に比較して両領域で有意に増加した (Fig. 11A)。Ki-67 陽性細胞は Fe-NTA 群、OTA 群、TRCP 群および KBrO₃ 群で PNBA 群に比較して OSOM で有意に増加した。しかし、MON 群では有意な増加は認めなかった。また、OTA 群、TRCP 群および KBrO₃ 群で APAP 群に比較して OSOM で有意に増加した。Cortex+OSOM では、Ki-67

陽性細胞は巨大核に関係なく全ての発がん物質で、無処置対照群、PNBA 群及び APAP 群に比して有意な増加を示した。核局在型 Cdc2 陽性細胞は OTA 群と MON 群で無処置対照群に比較して両領域ともに有意に増加した (Fig. 11B)。非発がん物質との比較では、OTA 群と MON 群で APAP 群に比較して両領域共に、MON 群で PNBA 群に比較して cortex+OSOM で有意な増加を示した。p-Histone H3 は発がん物質群と APAP 群を除く非発がん物質で無処置対照群に比較して有意な増加を示した。非発がん物質について、p-Histone H3 陽性細胞は OTA 群と KBrO₃ 群で APAP 群に比較して有意な増加を示した (Fig. 12A)。p21^{Cip1}、Aurora B 及び HP1 α は巨大核の有無を問わず発がん物質で無処置対照群や非発がん物質群に比較して特徴的な発現変化を示さなかった (Fig. 12B-D)。

甲状腺における短期肝発がん性予測指標の変動

SDM 群は無処置対照群、CL 群および標的以外の発がん物質投与群に比較して Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2 および p-Histone H3 陽性細胞率の有意な増加が認められた (Fig. 13A-D)。一方、BHA 群、CC 群及び PhIP 群は無処置対照群に比較して Ki-67 陽性細胞の有意な減少が、CC 群が無処置対照群と比較して核局在 Cdc2 陽性細胞の有意な減少が、BHA 群が無処置対照群と比較して p-Histone H3 陽性細胞の有意な減少が認められた。また、SDM 群は Aurora B 陽性細胞率が、CL 群および標的以外の発がん物質投与群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 13E)。SDM 群は BHA 群のみに比較して HP1 α 陽性細胞の有意な増加が認められた (Fig. 13F)。

膀胱における短期腎発がん性予測指標の変動

PEITC 群は無処置対照群、CL 群および標的以外の発がん物質投与群に比較して Ki-67、核局在 Cdc2、p-Histone H3 および Aurora B 陽性細胞率の有意な増加が認められた (Fig. 14A, B, D, E)。一方、PEITC 群は BHA 群に比較して p21^{Cip1} 陽性細胞の有意な減少が認められたのを除いて、p21^{Cip1} および HP1 α 陽性細胞の変動は認められなかった (Fig. 14C, F)。

前胃における短期腎発がん性予測指標の変動

BHA 群は無処置対照群、CL 群および標的以外の発がん物質投与群に比較して Ki-67、核局在 Cdc2、p-Histone H3、Aurora B および HP1 α 陽性細胞率の有意な増加が認められた (Fig. 15A, C-F)。一方、p21^{Cip1} 陽性細胞率の変動は認められなかった (Fig. 15B)。

腺胃における短期腎発がん性予測指標の変動

CC 群は無処置対照群、CL 群および標的以外の発がん物質投与群と比較して Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、p-Histone H3 および Aurora B 陽性細胞率の有意な増加が認められた (Fig. 16A-E)。一方、PhIP 群は無処置対照群と比較して p21^{Cip1} 陽性細胞の有意な増加が、CL 群は無処置対照群と比較して Aurora B 陽性細胞の有意な増加が認められた。CC 群は BHA 群と比較して HP1 α 陽性細胞率の有意な減少が認められた (Fig. 16F)。

大腸における短期腎発がん性予測指標の変動

CDCA 群および PhIP 群は無処置対照群、CL 群および標的以外の発がん物質投与群と比較して Ki-67、p21^{Cip1}、核局在 Cdc2、p-Histone H3、Aurora B および HP1 α 陽性細胞率の増加を示さなかった (Fig. 17A-F)。

(3) 短期発がん性予測指標候補分子群の発がん促進過程早期における反応性

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 7)。一方、甲状腺の FFCHs は前がん病変と考えられており、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 8)。

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. 18A-F)。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 (Fig. 19A-F)。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 (Fig. 20A-F)。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。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 (Fig. 21A-F)。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 (Fig. 22A, C, D, F)。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 (Fig. 22B)、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 (Fig. 22E)。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。

2. 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

(1) OPZ/BNF によるプロモーション修飾作用

試験期間を通じて、全ての投与群について、被検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。OPZ 投与群、BNF 高用量群及び併用投与群において、DEN 単独群と比較して、剖検時体重の有意な低値が認められた。また併用投与群においては、全ての薬剤投与群と比較して、体重の低値が認められた (Table 9)。

剖検時の絶対及び相対肝重量は、DEN 単独群と比較して全ての薬剤投与群で有意に増加した。更に併用投与群においては、他の薬剤投与群と比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた (Table 9)。BNF の検体摂取量は、0.125%、0.25%及び併用投与群 (0.125%)の順に、それぞれ 0.08、0.17 及び 0.09 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) が薬剤投与群で有意に増加した。免疫組織化学的解析では、GST-P 陽性巢の数及び面積は薬剤投与群で有意に増加した (Table 4)。特に数においては、併用投与群で、他の薬剤投与群と比較して有意に増加し、面積においては、併用投与群で OPZ 投与群と比較して有意に増加した (Table 9)。併用投与群で有意な PCNA 陽性細胞率の増加が認められ、併用投与群は OPZ 低用量群と比較して有意に増加していた (Table 9)。

cDNA マイクロアレイ解析を行い、BNF 低用量群、OPZ 低用量群及び併用投与群で DEN 単独群と比較して 2 倍以上もしくは 1/2 倍以下に変動した肝臓の遺伝子発現の変化を解析した。その結果、6644 個の遺伝子転写産物で変動が認められた。転写産物が増加した遺伝子の中で、薬物代謝酵素に着目すると、第一相薬物代謝酵素である *Cyp1a1* 及び第二相薬物代謝酵素である *Gpx2*、*Me1* が認められた。

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*、*Cyp1a2*、*Cyp1b1*、*Ugt1a6* 及び *Nqo1* が全ての薬剤投与群で、DEN 単独投与群に比較して有意に増加した。そのうち *Cyp1a2*、*Cyp1b1*、*Ugt1a6* 及び *Nqo1* では、併用投与群が単剤低用量群に比較して有意に増加し、*Cyp1a1* では増加傾向を示した (Table 10)。また、*Aldh1a1* 及び *Cyp2b2*

は OPZ 投与群で有意に増加したが、併用投与群では、OPZ 投与群と比較して減少傾向を示した。一方 *Aldh3a1* は BNF 投与群で有意に増加し、併用投与群では、それぞれ単剤投与群と比較し有意に増加した。更に *Ahrr* は BNF 投与群で有意に増加し、併用投与群ではそれぞれ単剤投与群と比較して有意な増加を示した。

第二相薬物代謝酵素においては、*Akr7a3*、*Gstm1*、*Gpx2*、*Yc2* 及び *Me1* が、薬剤投与群で DEN 単独投与群に比較して有意に増加した。そのうち *Gpx2* 及び *Yc2* は、併用投与群で、それぞれ単剤低用量群に比較して有意に増加した。また *Akr7a3*、*Gstm1* 及び *Me1* は、増加傾向を示した (Table 10)。

炎症関連遺伝子においては、*Cox2*、*Serpine1*、*Mmp12* 及び *Fgf21* が、BNF 投与群で DEN 単独投与群に比較して有意に増加し、更に併用投与群では、単剤投与群に比較して、有意な増加もしくは増加傾向を示した。*Il-6* においては、併用投与群で増加傾向を示した。*Nfkb* 及び *Nfkb1a* では明らかな変化は認められず、*Tnf21* は BNF 高用量群でのみ有意な増加が認められた (Table 10)。

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 (Table 9)。CYP のモノオキシゲナーゼ活性は NADPH からの還元力が必要であるため、ROS 産生を NADPH 存在下・非存在下にて比較した。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、OPZ 投与群、BNF 高用量群及び併用投与群で有意な低下が認められた。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 9)。

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 (Table 9)。TBARS 量は全ての群において差は認められなかった。

COX-2 陽性細胞は肝臓中の類洞内に多数認められた (Fig. 23)。COX-2 陽性細胞はやや大きく、肝臓内のクッパー細胞と考えられた。DEN 単独群では、COX-2 陽性細胞は小葉辺縁性に多く、BNF 投与群及び併用投与群においては、小葉全体に増加していた。COX-2 陽性細胞の面積率においても DEN 単独群に比べ、併用投与群では有意に増加した (Fig. 23)。

(2) OPZ/BNF によるイニシエーション修飾作用

剖検時の最終体重は、顕著な差は認められなかった。肝臓の絶対重量においては、DEN+BNF 0.25%投与群で有意な増加が認められ、相対重量においては、DEN+BNF 0.25%投与群及び併用投与群において有

意な増加が認められた。免疫組織化学的には、DEN+BNF 0.125%投与群で、GST-P 陽性巢の数及び面積の有意な増加が認められたが、他の群では認められなかった(Table 11)。

(2) BNF/PBO によるプロモーション修飾作用

試験期間を通じて、全ての投与群について、被検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。BNF 高用量群及び併用投与群において、DEN 単独群と比較して、剖検時体重の有意な低値が認められた。また併用投与群においては、BNF 低用量群及び PBO 投与群と比較して、体重の低値が認められた(Table 12)。

剖検時の絶対及び相対肝重量は、DEN 単独群と比較して全ての薬剤投与群で有意に増加した。更に併用投与群においては、BNF 低用量群及び PBO 投与群と比較して、絶対及び相対肝重量の有意な増加が認められた (Table 12)。BNF の検体摂取量は、0.125%、0.25%及び併用投与群 (0.125%) の順に、それぞれ 0.10、0.18 及び 0.07 mg/kg、PBO の検体摂取量は 0.125%、0.25%及び併用投与群 (0.125%) の順に、0.08、0.15 及び 0.07 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) が認められた。免疫組織化学的解析では、GST-P 陽性巢の数及び面積は薬剤投与群で有意に増加した (Table 12)。陽性巢数は併用投与群で他の BNF/PBO 低用量群と比較して有意に増加したが、面積では明らかな変化は認められなかった (Table 12)。Ki-67 陽性細胞数は、投与群で有意な差は認められなかった (Table 12)。

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* は薬剤投与群で有意に増加したが、併用投与群は、BNF 投与群と比較して有意に減少した。*Cyp1a2*、*Cyp1b1* 及び *Ugt1a6* では、併用投与群で BNF 低用量群及び PBO 投与群と比較して有意に増加し、*Nqo1* では PBO 投与群と比較して有意に増加した (Table 13)。

第二相薬物代謝酵素においては、*Akr7a3* 及び *Gpx2* が、薬剤投与群で DEN 単独投与群と比較して有意に増加した。また *Yc2* は PBO 高用量群及び併用投与群で有意に増加した (Table 13)。

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。全ての群において差は認められなかった (Table 12)。

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 (Table 12)。TBARS 量は PBO 高用量群で、DEN 単独群と比較し

て、有意に増加した。

(3) PB/I3C によるプロモーション修飾作用

試験期間を通じて、全ての投与群において、被検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 14)。

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 (Table 14)。

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 15)。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 15)。

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 16)。

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。*Nfkbia* では明らかな変化は認められなかった (Table 16)。

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 17)。

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 17)。

(4) PB/ORPH によるプロモーション修飾作用

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 18)。

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 (Table 18)。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 (Fig. 25)。併用投与群では、数は PB/ORPH 低用量群でに比べて、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. 25)。PCNA 陽性細胞率は、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 18)。

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 19)。

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 19)。

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 20)。

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。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立

NFT、NFA および AHD を雄の F344 系 *gpt delta* ラットに 4 及び 13 週間強制経口投与し、腎臓の *in vivo* 変異原性試験を実施したところ、投与 4 週目から NFT 投与群で *gpt MF* の上昇傾向が見られ、13 週目では NFT と NFA 投与群で有意に増加した (Table 21)。しかし、AHD 投与群では有意な変化は認められなかった。更に、NFT 投与群で認められた *gpt* 遺伝子変異体を用いたスペクトラム解析において GC-TA transversion 変異が有意な頻度で増加した。また同群では、酸化ストレスの指標である 8-OHdG レベルが腎 DNA 中で有意に増加し、対照群に比して 3 倍以上の高値を示した (Fig. 26)。病理組織学的検査の結果、NFT 投与群で腎臓近位尿管細胞質内に好酸性の硝子滴の沈着が認められた。この硝子滴は、免疫組織化学染色法とウェスタンブロッティング法により α_{2u} -globulin 蛋白であることが確認された (Fig. 27)。 α_{2u} -globulin を有しない雌に NFT を雄と同用量で 13 週間強制経口投与し、腎臓の *in vivo* 変異原性を検討した結果、雌の腎臓でも *gpt MF* が有意に増加し (Table 22)、*gpt* 遺伝子変異体のスペクトラム解

析で GC-TA transversion 変異頻度の有意な増加が認められた。また、雄の *p53* 遺伝子欠損およびその野生型 *gpt delta* マウスに NFT、AHD および NFA を 4 および 13 週間強制経口投与し、4 及び 13 週目の腎臓の *gpt* および Spi⁺ assay を実施した。その結果、両遺伝子型の NFT 投与群で *gpt* MF の増加傾向が見られたが、遺伝子型の違いによる変化は認められなかった。

4. 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率

背根神経節の脊柱からの除去率は、2010 年 3 月から 2013 年 2 月の間で平均 92% であった (Fig. 28A-C)。第 10 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 (Fig. 29A-C)。

(2) 牛の品種別及び牝牝別の脊柱からの背根神経節の除去率

牛の品種別及び牝牝別に脊柱からの背根神経節の除去率を調べた (Fig. 30 A-C, 31A-C)。「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毎月にも調べたが、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、全体として除去率に差は生じなかった。

D. 考察

1. 巨大核出現に關与する標的遺伝子の探索

(1) 肝臓における巨大核出現に關連する発がん早期予測分子標的の同定

遺伝子発現解析から選別された分子群および既に知られている主要な細胞周期関連分子を肝臓がん物質の 28 日間反復投与例を用いて、免疫組織化学的解析および TUNEL 染色を通じて解析した。その結果、巨大核誘発性の有無に関わらず、G₁/S 期チェックポイントに機能する p21^{Cip1}、M 期分子である Aurora B および Incenp 細胞細胞の増加が、すべての肝臓がん物質において認められた。また、増殖指標である Ki-67 陽性細胞の増加を示した発がん物質においては、p53、核局在 Cdc2、p-Histone H3、HP1 α 陽性細胞の増加が認められた。

本研究では、核局在 Cdc2 陽性細胞は TAA 群、FB 群および MEG 群で Ki-67 陽性細胞と同様の増加傾向を示した。Cdc2 の活性型である Cdc2 核局在陽性

細胞 (Chan *et al.*, 1999) 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)。また、二段階甲状腺発がんモデルを用いた増殖性病変において、Ki-67 陽性細胞と相関して核局在 Cdc2 陽性細胞が増加した (Ago *et al.*, 2010)。細胞増殖活性を示す発がん物質で、M 期で機能する p-Histone H3 とその会合分子である HP1 α 陽性細胞の増加を見出した。p-Histone H3 および HP1 α は細胞増殖を反映することが報告されている (De *et al.*, 2009; Aune *et al.*, 2011)。我々の過去の研究と一致して、細胞増殖活性を示した発がん物質は不適な G₂/M チェックポイントからの脱出と M 期停滞の細胞集団の増加を引き起こしている可能性が示唆された。

核局在 Cdc2 と同様に、p-Histone H3 および HP1 α 、Aurora B と会合分子である Incenp は M 期関連タンパク質である。Aurora B と Incenp 複合体は染色体付着を校正する機能を有している (Ruchaud *et al.*, 2007)。すべての検証した肝臓がん物質において、細胞増殖の誘導性に関わらず、Aurora B もしくは Incenp 陽性細胞の増加が無処置対照群および APAP 群もしくは ANIT 群に比較して見出された。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)、Incenp の異常発現はヒトがん乳腺細胞において異常分離もしくは染色体不安定性を引き起こす可能性が示唆されている

(Nguyen and Ravid, 2006)。それゆえ、肝臓がん物質は肝臓がん早期過程において染色体不安定性を引き起こし、増殖活性を示した発がん物質は M 期停滞の細胞集団の増加することが示唆された。

本研究において、p21^{Cip1} 陽性細胞は肝臓がん物質に特異的に増加を示した。一方で、他の CDK 阻害機能を示す p16^{Ink4a} および p27^{Kip1} 陽性細胞率は変動を示さなかった。p21^{Cip1} 発現は G₁ 停止を介する p53 によって制御されている (Sherr and Roberts, 1995)。p53 発現は p21^{Cip1} と同様に TAA 群、FB 群および MEG 群で増加を示したが、PBO 群では反応しなかった。p21^{Cip1} 発現誘導には p53 非依存的な経路が存在することが報告されている (Abbas and Dutta, 2009)。本研究では、マイクロアレイ発現解析より p21^{Cip1} の発現を誘導する *KLF6* および *NDRG1* 遺伝子発現の上昇が確認され、RT-PCR 解析より *KLF6* は無処置対照群と比較して、TAA 群、PBO 群および MEG 群で上昇することが認められた。このことから、肝臓がん物質の 28 日間反復投与では、p53 非依存的な経路による p21^{Cip1} 発現増加に起因する G₁ 停滞の細胞集団が増加している可能性が示唆された。

本研究では、p53 および *Mdm2* の遺伝子発現が TAA 群で有意な上昇が認められた。また、p53 陽性細胞数は細胞増殖を示した肝発がん物質で増加した。p53 は DNA 損傷応答でアポトーシスを誘導することが知られ (Gotz and Montenarh, 1995)、我々は過去に、増殖活性を示した肝発がん物質が肝細胞にアポトーシスを誘導することを示した (Taniai *et al.*, 2012)。このことより、増殖活性を示した肝発がん物質は、アポトーシスと共に G₁ もしくは M 期停滞に反応する p53 シグナル伝達経路を活性化する可能性が示唆された。また、*Mdm2* の遺伝子発現の増加は、p53 の代謝回転の促進を反映する可能性が示唆される (Fuchs *et al.*, 1998)。

結論として、肝発がん物質は、巨大核誘発性の有無に関わらず、p21^{Cip1}、Aurora B および Incenp 陽性細胞が増加することより G₁ 期停滞もしくは染色体不安定性を示す細胞集団の増加を反映していることが示唆された。更に、増殖活性を示した肝発がん物質は、p53、核局在 Cdc2、p-Histone H3 および HP1 α 陽性細胞が増加したことより細胞周期の促進がアポトーシスを伴う M 期停滞を引き起こしていると考えられた。従って、本研究の分子の組み合わせがラット 28 日間反復投与試験における肝発がん物質の予測指標となる可能性が示唆された。

(2) 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の探索

平成 22 年度の肝発がん物質の 28 日間反復投与実験で得られた短期発がん性指標候補分子群が標的臓器の異なる発がん性にも対応可能かどうかを検討するために、複数の標的臓器を対象にした発がん物質の 28 日間反復投与実験を実施した。その結果、腎臓において、細胞増殖指標 Ki-67 は巨大核の有無にかかわらず発がん物質で増加が、核局在 Cdc2 は巨大核誘発発がん物質で増加が認められた。甲状腺、膀胱、前胃および腺胃において、細胞増殖指標 Ki-67、M 期関連分子の核局在 Cdc2、p-Histone H3 および Aurora B の増加が認められた。一方、大腸の 2 発がん物質では細胞増殖活性の亢進は認められず、これらは M 期関連分子の増加も示さなかった。

腎臓では、Ki-67 は巨大核の有無にかかわらず発がん物質で特異的な反応を示し、核局在 Cdc2 は巨大核誘発発がん物質に特異的な反応を示した。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)。腎発がん物質は細胞増殖性

が亢進し、これらのうち巨大核誘発発がん物質は M 期停滞する細胞数を増加する可能性が示唆された。

甲状腺、膀胱、前胃および腺胃においては、核局在 Cdc2、p-Histone H3 および Aurora B 陽性細胞の有意な増加が、甲状腺、膀胱、前胃および腺胃で認められた。p-Histone H3 は細胞分裂期で染色体凝集と分離に重要な役割を担い (Nowak and Corces, 2004)、Aurora B は染色体の集合と分離において機能していることが知られている (Meraldi *et al.*, 2004)。また、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)。更に、前中期に留まっている細胞が Cdc2 を過剰発現することが報告されている (Choi *et al.*, 2011)。以上の事から、細胞増殖活性を示した発がん物質は、標的臓器に関わりなく、M 期に停滞もしくは染色体不安定性を示唆する細胞数を増加していると考えられた。

p21^{Cip1} 発現の増加は、p53 非依存的に G₁ 停止およびアポトーシスにリンクする可能性が示唆されている (Liu *et al.*, 2011)。我々は以前、ラット 28 日間反復投与試験において、アポトーシスと共に細胞増殖活性を示した発がん物質が p53 活性化に関わる可能性を示唆した (Yafune *et al.*, 2013)。従って、細胞増殖活性に関わらず、発がん物質の短期発がん性予測指標と考えられた。しかし、本研究において、細胞増殖活性を示した PEITC および BHA は各々の標的臓器で p21^{Cip1} 陽性細胞の増加を示さなかった。このことは以前の報告と一致し、発がん過程における増殖性病変において、p21^{Cip1} 発現と細胞増殖活性の間の明確な相関性は見出せなかった (Lu *et al.*, 1999)。

BHA のみが前胃上皮における HP1 α 陽性細胞の増加を誘導した。一方、増殖活性を示した SDM、PEITC および CC は各々の標的臓器で、HP1 α 陽性細胞の変動は認められなかった。HP1 α は細胞分裂中に染色体凝集に重要な役割を果たし (Obuse *et al.*, 2004)、そのリン酸化が遺伝子の安定性に必須であることが知られている (Hiragami-Hamada *et al.*, 2011)。以上の事から、HP1 α を発現する細胞集団よりリン酸化の細胞集団が染色体維持の機能を反映しているかもしれない。

結論として、28 日間反復投与実験で細胞増殖活性の高い発がん物質では、標的臓器の有無を問わず、細胞周期破綻を反映した M 期タンパク質の異常発現が誘導され、M 期停滞もしくは染色体不安定性を

示す細胞集団が増加することが考えられた。一方、細胞増殖活性を亢進しなかった発がん物質ではこれらの変化を引き起こさないことが見出された。これらの結果より、発がん物質の28日間反復投与後に細胞増殖活性が高い発がん物質の早期指標候補分子の組み合わせとして、細胞増殖指標のKi-67、M期分子の核局在Cdc2、Aurora Bおよびp-Histone H3が機能し得る可能性が示唆された。

(3) 短期発がん性予測指標候補分子群の発がん促進過程早期における反応性

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。そこで、肝臓、甲状腺、膀胱、前胃および腺胃を標的として、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。

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。この結果は、ラットにおける肝発がん過程に関連した前がん病変および腫瘍性病変においてp21^{Cip1}発現増加と一致している(Galand *et al.*, 1988)。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

ている(Gorospe *et al.*, 1999; Rodriguez and Meuth, 2006)。我々は、既にPBOを含む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、以前の研究で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Cdc2核局在陽性細胞は、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、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

膵、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。

2. 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OPZ及びBNFの併用投与で、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。一方、OPZとBNFの併用投与は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しないことが明らかになった。

CYP1A inducerであるBNFとCYP1A/2B inducerであるPBO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。

また、CYP1A inducerであるI3CとCYP2B/1A inducerであるPBの併用投与でも、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。

CYP2B/1A inducerであるPBとCYP2B inducerであるORPHを併用投与では、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。また、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。

3. ニトロフラン類の安全性評価法の確立

雄F344系*gpt delta*ラット腎臓におけるNFT、NFAおよびAHDの*in vivo*変異原性試験の結果、NFT及びニトロフラン類としての基本骨格であるNFA投与群で*gpt MF*が有意に増加した。一方、ヒドラジド誘導体であるAHD投与群に有意な変化は認められなかったことから、NFTの*in vivo*変異原性にはニトロフラン骨格が重要であることが示唆された。また、NFT投与により誘導された*gpt*変異体のスペクトラム解析の結果、酸化ストレスで増加することが知られているGC-TA transversion変異頻度が有意に増加した。NFTを構成するニトロフラン骨格中のニトロ基は代謝過程において還元され、活性酸素を生じる可能性が考えられることから、NFTの*in vivo*変異原性には酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。そこで、酸化的DNA損傷の一つである8-OHdGの腎DNA中レベルを測定したところ、NFT投与群で顕著に増加した。従って、NFTが誘導する*in vivo*変異原性に酸化ストレスの関与の可能性が強く示唆された。しかし、NFA投与群では*in vivo*変異原性は認められたものの、8-OHdGレベルに変化は認められなかった。側鎖の差異がニトロフラン誘導体の酸化還元電位に影響を与えている可能性も考えられるが、何れにしても、NFA単独での*in vivo*変異原性機序には酸化的ストレス以外のメカニズムの関与が考えられた。今後、ニトロフラン類の*in vivo*変異原性への酸化ストレス関与については、抗酸化剤の修飾効果を検索する試験を実施して、詳細に検討する予定である。

また、NFTでは腎尿細管内に雄ラット特有の α_{2u} -globulin蛋白の沈着が確認され、その後生じる細胞増殖活性の亢進がNFTの雄ラット腎発がんに関与する可能性が考えられた。しかし、細胞増殖活性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、NFTの*in vivo*変異原性に対して細胞増殖活性の亢進が促進的に作用している可能性も考えられた。そこで、 α_{2u} -globulin蛋白を有しない雌の腎臓についてもNFTの*in vivo*変異原性を検討したところ、雄と同様に*gpt MF*が増加した。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。また、雌ラットの腎臓では*in vivo*変異原性を有しながらも発がん性は認められないことから、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ものと考えられた。