

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究（H23-化学-007）

研究代表者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科 腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

化学物質は毎年新規に開発され、その一部は Ames 試験等の変異原性試験陽性が含まれ、ヒトに対する発がんへの安全性の確認が必要である。そのため、発がん試験には動物による代替実験試験を要するが、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難であるため、本研究では発がん性を検証するために病理組織学的な診断を利用により、変異原性陽性物質に対する少数での動物系での中・短期のバイオアッセイ系を開発することを目的とした。臓器により、病理組織学的に早期の腫瘍性病変を特定できるように検討を始めた(大腸・肺臓・肝臓)。他の臓器でも早期病巣の特定とその特徴解析の検討を準備した。加えて、分担者間での多施設共同として動物臓器供与のシステムの構築に関して検討したが、その輸送などの具体的な実施方法を今後詰めていく必要がある。

A．研究目的

本研究で、短・中期発がん予測バイオアッセイ系を開発し、そのガイドライン設定の方向性への提唱が目的である。既にヨーロッパ・ユーロ圏の諸国での研究施設では、特に化粧品関連物質に関して、法的に動物実験系ができなくなるため、代替実験法が開発が急がれ、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難である。そのため、動物モデルでの評価法は未だに必要不可欠である。しかし、国際的に動物試験に対する 3 R（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）の原則は、動物系実験を肯定的に考えている研究者でさえ、当然の考慮として受け入れられている。この現状のためにも、腫瘍形成を正確に判定し得る病理組織学的な評価を基とした各臓器別の発がん試験として短・中期でのバイオアッセイ系の開発が望まれる。ヒトの場合においても各臓器のがんの早期発見がその治療と予後に重要な関与があることは周知の事実である。実際、ヒトにおける生検標本での病理診断技術の発達は、内視鏡的に病変を認めない場合でも、ランダム生検により、病理組織学的に異型細胞の存在は重要な診断価値があり、その後の精査の対象となっている。しかるに、未知物質の発がん性試験には長期動物実験による肉眼的な腫瘍形成を指標としており、その観察される腫瘍の病理組織学的な検索はあくまでも腫瘍の確定するためのものであった。しかし、動物実験においても従前より前がん病変として種々の早期に発現する病巣の研究がなされてきた。その多くの研究は腫瘍発生の科学的機序の視点でのものであった。このため、本研究では、前がん病変とされてきたもののうち、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものは、その肉眼的な腫瘍形成に関わらず、腫瘍として認められるものを指標として検索できる試験法の開発

を目指すことにした。

B．研究方法

以下のように、主に臓器別に中・短期バイオアッセイ系の確立と新規 *in vitro* 発がん性予測試験を実施した。

1) 中・短期バイオアッセイ系

大腸

(ア) 前がん病変の組織学的検索

4週齢のF344ラットに対し、発癌剤azoxymethane (AOM; 15 mg/kg体重)を投与して大腸発がんを誘発し、5、7、10週で屠殺を行い、大腸粘膜表面における前がん病変に関して検討した。メチレンブルー染色によって大腸変異巣 aberrant crypt foci (ACF)ないしアルシアンブルー染色で粘液涸渇巣 mucin-depleted foci (MDF)を個々に観察し、その後、大腸粘膜に対し水平に薄切したパラフィン包埋組織標本を作製した。大腸粘膜組織標本をHE染色で確認した後、スライドガラスデジタル化装置(パーチャルスライド)により組織標本画像をデータベース化し、インターネットでの観察・閲覧可能な状態を構築した。このパーチャルスライド組織標本を本研究班の病理医に依頼診断してもらい、回答をアンケート形式で募った。

(イ) 前がん病変を構成する細胞起源検索

6週齢のICRマウスに対しAOM (10 mg/kg 体重)を投与した1週間後に1.5% dextran sodium sulfateを1週間飲水投与して大腸増殖性病変を誘発した。実験開始4週間後に屠殺し、大腸を摘出し、粘膜面に対して垂直な病理組織標本を作製した。粘膜内病変をHE染色で確認したのち、Lgr5の免疫染色を行い、染色性と染色パターンを評価した。次に、*Apc^{Min/+}*と*Lgr5-GFP*

knock-in マウスを交配して作製したマウスの大腸腺腫に対し Lgr5, β -catenin, GFP の免疫染色を行い、染色性を評価した。また、*Lgr5-GFP-IRES-creERT2* knock-in; *Rosa26-LacZ* reporter mice と *Apc^{Min/+}* mice を交配し、Lgr5 発現細胞が大腸前がん病変及び腫瘍において幹細胞として機能している可能性を Lineage tracing 法で検討した。

(ウ) 二次胆汁酸によるマウス大腸発がん促進効果の検討

8 週齢の雄性 C57BL6 マウスに対し AOM (10 mg/kg 体重) を 1 回/週、4 週皮下注射した後、2 次胆汁酸である deoxycholate を 0.04, 0.2, 0.5% の濃度でそれぞれ混餌投与した。実験開始 24 週後に大腸を摘出し、粘膜内病変を病理組織学的に評価した。

(エ) 大腸陰窩の分離腺管を利用した遺伝子発現

正常マウスに X 線照射した後の大腸陰窩における遺伝子発現変化をモデルに用いた。大腸陰窩を 30mM EDTA in Hanks' Balance solution にて腺管分離を行い、PAXgene Tissue container (QIAGEN) を用いて、分離腺管の固定を行い、実体顕微鏡下に、陰窩を腺底部から腺開口部まで領域ごとに 3 分割して、PAXgene RNA kit (QIAGEN) を用いて、total RNA の抽出を行った。GAPDH を内部標準として、p21, p53, β -catenin、cyclin D1 の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法により検討した。Quantitect SYBR Green RT-PCR kit を用い Rotor-GeneQ (QIAGEN) を使って定量的に、RT-PCR を行った。加えて、X 線照射に対して発現量が増加あるいは減少するタンパクの同定を試みた。大腸分離腺管から蛋白質を抽出し、得られた可溶性蛋白質を二次元電気泳動法により分離し、非照射群と照射群と比較した。発現量に差異のあるスポットを、MALDI-TOF/TOF タンデム質量分析計によって解析した。同定されたタンパクについて、Western blotting 法および免疫組織化学により発現変動と発現部位を検討した。

肝臓

(実験 1) 遺伝毒性と発がん性を包括的に検出できる肝発がんリスク評価法の開発

in vivo 変異原性の検索が可能な F344 系 *gpt delta* ラット (以下 *gpt delta* ラットと略す) を用いた中期肝発がん性試験法 (伊東法) において、発がん性および変異原性の包括評価における有用性を評価した。具体的に、遺伝毒性肝発がん物質である 2-AAF を用いて、その肝発がん修飾作用、及び *gpt* アッセイおよび Spi アッセイにより *in vivo* 変異原性を検討した。

(実験 2) ジクロロメタンおよびジクロロプロパンの肝胆道系に及ぼす影響の検討

近年、大阪の印刷工場従業員において胆管がんが多発しており、dichloromethane (DCM) 及び dichloropropane (DCP) などを含む有機溶剤への

高濃度・長期間曝露が胆管がん発症の原因として疑われている。本研究では、8 週齢雄性 B6C3F1 マウス及び 8 週齢雄性シリアンハムスターに DCM 及び DCP を 500 mg/kg bw の用量で 1 日 1 回、3 日間強制胃内投与を行い、これらの化学物質の肝胆道系に及ぼす影響を検討した。

肺臓

(実験 1) NNK 誘発マウス肺腫瘍 (腺系腫瘍、16 週) および NTCU 誘発マウス肺扁平上皮異形成 (20 週) DHPN ラット肺腫瘍 (腺系腫瘍、30 週) の固定標本を用い、SP-C (sc-1379, Santa Cruz, CA, USA, 1:50) および Clara cell secretory protein (CCSP, CC10) (sc-9773, Santa Cruz, CA, USA, 1:2000) について二重免疫染色を行い評価した。

(実験 2) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍 (腺系腫瘍、30 週) の固定標本を用い、cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 E12、CK 5/6、SP-A、p53、EGF-R、ER、PR、CEA、p16、PCNA、chromogranin A および synaptophysin について免疫染色を行い評価した。用いた抗体の情報および希釈倍率等に関しては表 1 に示す。

(実験 3) DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍 (過形成、腺系腫瘍、12 週および 30 週) および NNK 誘発 F344 雄ラット肺過形成病変 (12 週および 30 週、NNK 単独群 30 週では病巣がほぼ見られないので、NNK 投与後に 2mg quartz 微粒子/0.2ml 生理的食塩水の懸濁液を気管内投与した NNK+quartz 群について検討した) の固定標本を用い、cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1 および ER について免疫染色を行い評価した。

(実験 4) 微粒子の気管内投与後 28 日後の F344 雄ラット肺の固定標本を用い、Napsin A について免疫染色を行い評価した。微粒子は quartz、NiO および CuO の 3 種類であり、いずれも 2mg/0.2ml 生食の用量で被験微粒子を気管内投与した。

膀胱

種々の DNA 損傷修復酵素の発現動態について、F344 ラットに遺伝毒性膀胱発がん物質である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) を投与し誘発した膀胱の癌組織および正常～過形成粘膜、ならびに、無処置ラット膀胱粘膜において比較検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、2 重鎖切断のマーカーである -H2AX、MRE11、XRCC1、直接損傷修復に関わる MGMT、ミスマッチ修復に関わる MLH1、MSH6、塩基除去修復に関わる APE1、ヌクレオチド除去修復に関わる DDB1、ERCC1、ブルーフリーディング修復に関わる TREX1、細胞周期チェックポイントのマーカーである SMC1 および複製後修復に関わる RAD18 について、免疫組織化学染色を行った。

前立腺

Methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) および 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) の臓器標的性の解析実験から、リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) 発現上昇が前立腺発がん物質をスク

リーニングする指標として有用ではないかと考えられた。そこで、前立腺発がん物質に対する γ -H2AXの特異性について検討すると同時に、マイクロアレイにて抽出した High mobility group box 2 (HMGB2)および Ki-67 についても解析を行った。6週齢 F344 雄ラットに、前立腺発がん物質である N-methyl-N-nitrosourea(MNU)、N-nitrosobis-(2-oxo-propyl)amine (BOP)、前立腺に標的性のない肝・腎発がん物質である Dimethylnitrosamine (DMN)、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoxaline (MeIQx)、大腸発がん物質である 1,2-dimethylhydrazine (DMH)、乳腺発がん物質である 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を単回投与した。投与経路は、それぞれ皮下投与(BOP)、胃内投与(MeIQx、DMBA)もしくは腹腔内投与(MNU、DMN、DMH)を用いた。投与2日後に前立腺、大腸、肺、肝、腎を摘出し、それぞれホルマリン固定および凍結組織を採取した。免疫組織染色を行い、 γ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

2) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

網羅的な DNA 付加体解析法

最近、ジクロロメタンやジクロロプロパン等のハロゲン系炭化水素は職業性胆管がんの原因物質の可能性が示唆されているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。本研究では、遺伝子変異の基となる、ハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析を試みた。ハロゲン系炭化水素はグルタチオン-S-転移酵素(GSTT1)により GSH が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。そこで、ジクロロメタン由来の DNA 付加体の標準品を化学合成し、分析条件の確立を LC-ESI-MS/MS を用いて行なった。また、これら付加体がハロゲン系炭化水素と GSH の共存下で GSTT1 の作用により生成するかについても検討をおこなった。更に、同サンプルを用いて、DNA-アルキル-GSH 付加体以外の生成について、網羅的解析法(アダクトーム法)を用いて検討中である

ヒストン修飾を指標とした解析法

化学物質作用後のヒストン修飾を、H2AX(Ser139)、H3 リン酸化(Ser10, Ser28)、アセチル化(global, Lys9, Lys14)に焦点を絞り検討した。また、ヒストン H3 リン酸化部位でのがん遺伝子発現制御について、ChIP 法にて検討した。

3) 多施設共同システム構築

分担者ごとに動物実験の対象臓器以外の臓器に関して、他施設で研究対象にする臓器を一定の固定・保存状態をするための共通プロトコールを班会議等で議論を開始した。

(倫理面への配慮)

全ての分担者の動物施設においての規程に基づいて、実験計画の許可とともに、遺伝子を利用する場合はそれぞれの施設での組み換え DNA 実験委員会の許可を得、厳正に動物愛護と倫理面を配慮した実験を施行した。また、ヒト検体を検討する場合は、インフォームド・コンセントの得られた検体を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

C. 研究結果

1) 中・短期バイオアッセイ系

大腸

(ア) 前がん病変の組織学的検索

5週目の採取標本において、大腸粘膜表面の観察にて ACF の出現を確認し、同じ領域での組織標本の回答結果は腫瘍性(腺腫)47.4%、過形成病変26.7%、炎症性病変21.1%、病変特定不可15.8%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)20%、過形成病変33.3%、炎症性病変20%、病変特定不可26.3%であった。7週目の採材標本において、ACFでは腫瘍性(腺腫)12.5%、過形成病変75%、炎症性病変12.5%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)38.5%、過形成病変46.2%、炎症性病変0%であった。10週目の採材標本において、ACFでは腫瘍性(腺腫)54.5%、過形成病変18.1%、炎症性病変9%、病変特定不可18.1%であった。MDFでは、腫瘍性(腺腫)77.7%、腫瘍性(癌腫)16.6%、過形成病変5.5%、炎症性病変0%であった。結果として、前がん性病変と考えられている ACF や MDF でも早期腫瘍性病変として病理組織診断が可能であると考えられた。特に10週目の MDF の判定では、腫瘍性と診断される一致率が90%を越えており、発がん性試験として利用できると思われる。

(イ) 前がん病変を構成する細胞の起源

陰窩の複雑な分岐はマウス大腸前がん病変と考えられている β -catenin accumulated crypt の特徴でもあり、萌出部の Lgr5 の発現は大腸前がん病変の発生に関係があると思われる。大腸早期増殖性病変および腺腫に Lgr5 は高発現しており、大腸発がんリスクの評価に用いることが可能と考えられた。Apc^{Min/+} × Lgr5-GFP knock-in mouse に生じた腺腫が Lgr5(+)となったにもかかわらず GFP 陰性となったのは不明であるが、一部の腺腫が Lgr5(-)の stem cell 由来である可能性も考えられた。Lineage tracing 法を用いた検討では大腸 microadenoma のみならず肉眼的に認識可能な腫瘍中にも幹細胞由来として機能する可能性がある Lgr5 陽性細胞を確認した。

(ウ) 二次胆汁酸によるマウス大腸発がん促進効果の検討

マウス大腸粘膜内病変を対象とした系では実験期間 24 週で被験化合物の発がんプロモーション効果の評価が可能であり、deoxycholate の混餌投与は AOM 誘発大腸前がん病変の発生を有意に促進した。

(エ) 大腸陰窩の分離腺管を利用した遺伝子発現

1 腺管あるいは腺底部部分 1、3、10 個を用いて、内部標準に用いる GAPDH と発現変動が期待される p21 に関して定量的に RT-PCR を行った。その結果、腺管あるいは腺底部いずれを用いた場合でも GAPDH、p21 のいずれもほぼ定量的な結果が得られた。p21 mRNA は、腺開口部では恒常的に発現していた。腺底部では、正常では低値であったが、X 腺照射と共に 15 倍程度に発現が上昇した。p53 と cyclin D1 は、腺底部に高値で、腺開口部では低値であった。-catenin レベルはほぼ一定であった。二次元電気泳動によって発現量の上昇するタンパクと減少するタンパクが確認され、Western blotting により 発現変動を確認したところ、ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) および 活性型 phospho-ERM の経時的な上昇、high mobility group protein box 1 (HMGB1) の経時的な減少が確認された。ERM に関して、免疫組織学的に検討したところ、大腸、小腸上皮細胞の核に集積する像が得られた。

肝臓

(実験 1) 遺伝毒性と発がん性を包括的に検出できる肝発がんリスク評価法の開発

ラット肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の数および面積を検討した結果、対照群に比較して 2-AAF 投与群で有意に増加し、2-AAF の肝発がん促進作用が認められた。また、*gpt* アッセイと *Spi* アッセイでは対照群に比較して 2-AAF 投与群で点突然変異頻度および欠失変異頻度の有意な増加が認められ、2-AAF の *in vivo* 変異原性が確認された。これらの結果がこれまでの 2-AAF の肝発がん性および *in vitro* 変異原性に関する報告と一致しており、*gpt delta* ラットを用いた中期肝発がん性試験法は化学物質の肝発がん性と *in vivo* 変異原性を包括的に検出できる発がんリスク評価法として有用であることが考えられた。

(実験 2) ジクロロメタンおよび 1,2-ジクロロプロパンの肝胆道系に及ぼす影響の検討

マウスを用いた投与試験において、病理組織学的には DCM 投与群で異常所見は認められなかったが、DCP 投与群では、5 匹中 4 匹に肝臓の小葉中心性壊死が認められた。しかし、いずれの投与群においても、胆管上皮傷害は認められなかった。DCM の代謝酵素である GST-T1 の免疫組織化学染色解析の結果、対照群のマウスの肝細胞および胆管上皮の細胞質で GST-T1 の発現が認められた。しかし、DCM 投与群における発現増強は認められなかった。なお、DCP 投与群においても GST-T1 発現増強は認められなかった。現在、薬物代謝酵素である P450 の発現を検討中である。

ハムスターを用いた投与試験において、病理組織学的には DCM 投与群で異常所見は認められなかったが、DCP 投与群では、5 匹中全例に肝臓の小葉中心性壊死が認められた。しかし、いずれの投与群においても、胆管上皮傷害は認められなかった。さらに、胆管上皮細胞では GST-T1 の発現は認められず、投与による発現変動は認められなかった。

一方、肝細胞における GST-T1 発現において、DCP 投与群においてのみ明らかな増強が認められた。

以上より、マウスおよびハムスターにおいては、DCP による強い肝毒性が認められた。来年度は、DCP および DCM による代謝酵素誘導および肝障害の用量相関性を明らかにする予定である。本実験は DCM および DCP の胆管発がんリスク評価モデルの開発に有用な基礎データを提供できると期待される。

肺臓

(実験 1) NNK 誘発 A/J 雌マウス肺および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺ではいずれも肺胞上皮過形成病変、腺腫、腺癌が見られた。DHPN 誘発 F344 雄ラット肺では腺癌の結節の一部に扁平上皮化生が見られた。マウスおよびラットともに、肺胞上皮過形成性病変、腺腫、腺癌のいずれも SP-C に強く陽性を示した。肺胞上皮過形成性病変および腺系腫瘍部に CCSP の発現は見られなかった。

一方、NTCU 誘発 A/J 雌マウス扁平上皮異形成、および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腺癌中の扁平上皮化生成分ではいずれも CCSP に陽性を示していた。

(実験 2) DHPN 誘発の肺過形成病変および腺腫に関して、良好に染色された抗体は、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER、CK 34 E12 および CK 5/6 の 7 種類であった。このうち、CK 34 E12 および CK 5/6 に関しては扁平上皮化生を示す部分に陽性像を示していた。しかし、これらは、過形成病変の鑑別には適さないと判断した。以上より、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1 および ER が、さらに詳細な検討を行うべきマーカーの候補として挙げた。

(実験 3) NNK および DHPN 誘発 F344 雄ラット肺病変に対して、Cyclin D1、Napsin A、p27、TTF-1、ER のいずれも病変部が良好に染色された。一方で、DHPN 誘発過形成病変と NNK 誘発過形成病変を比較すると、その発現に差が見られたのは Napsin A および TTF-1 であった。いずれも、DHPN 誘発過形成病変においては、肺胞壁を構成する細胞に強く発現を示したが、NNK 誘発過形成性病変では肺胞壁の細胞の発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内の成分では発現が見られた。また、Napsin A は TTF-1 と比べて染色性が良好であった。以上から、Napsin A のラットの肺胞壁内細胞への高発現は malignant potential を示唆すると考えられた。実験 3 におけるその他の所見は以下の通りである。Napsin A は腫瘍において、悪性度が高いと発現が低下していた。一方で、ER は悪性度が上昇すると発現が上昇する傾向が見られた。TTF-1 は悪性度の違いによる発現の変化は見られなかった。

(実験 4) 炎症により発生する過形成病変は、発癌物質によって誘発される過形成と比べて腫瘍化する可能性は低いと推測される。この炎症性過形成について、Napsin A の肺胞壁内細胞への発現が乏しいのか検討を行った。Quartz、NiO および CuO を F344 雄ラットに気管内投与すると、28 日目には肺に炎症性過形成病変が認められる。Napsin A はこれらの部に実験 3 での NNK 誘発過形成性病変とほぼ同様の染

色性を示した。すなわち、肺胞壁内細胞への発現は乏しく、肺胞内マクロファージ等の肺胞内成分への高発現が認められた。

膀胱

免疫組織化学染色の結果、1) 本研究で検索した DNA 修復酵素の多くは、対照動物の膀胱粘膜上皮にも恒常的に発現しており、BBN 投与による変化は見られなかった。2) MGMT は BBN 投与後の正常様～過形成性粘膜で発現が認められる一方、癌細胞では陰性であった。3) γ -H2AX は対照動物では陰性であるのに対し、BBN 投与後の膀胱では、正常様/増殖性細胞のいずれも核内に顆粒状 focus がみられた。

以上の結果から、BBN による膀胱発がん機序には MGMT および γ -H2AX 発現が関与する可能性が示唆され、今後、BBN 以外の膀胱発がん剤による、 γ -H2AX 発現誘導について検討を行う予定である。

前立腺

前立腺における γ -H2AX 標識率は、MNU では各葉において増加傾向はあるものの有意差はみられなかった。BOP, MeIQx, DMBA, DMN, DMH ではいずれの葉においても対照群に比較して増加傾向、有意差は観察されなかった。HMGB2 標識率は PhIP では腹葉前立腺、DMAB, MNU では腹葉、側葉、背葉のいずれにおいても有意な増加が観察されたが、BOP, MeIQx, DMBA, DMN, DMH では有意差はみられなかった。また、Ki-67 標識率は PhIP, DMAB では腹葉前立腺、MNU は背葉、BOP は側葉で有意な増加が認められたが、前立腺を標的とししない発がん物質である MeIQx, DMBA, DMN, DMH ではいずれも有意な増加がみられなかった。

2) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

網羅的な DNA 付加体解析法

CT-DNA との反応で生成させたジクロロメタン由来の 4 種の GSCH₂-DNA 付加体 (GSCH₂-dG, GSCH₂-dC, GSCH₂-dA, GSCH₂-dT) の生成について調べたところ、GSCH₂-dG がその他の塩基由来の付加体と比べ 40 ~ 1400 倍も多く生成することがわかった。また、マウス、ラット及びヒト由来の GSTT1-1 を含む画である cytosol 存在下で、ジクロロメタン、グルタチオン及び 4 種のデオキシモノヌクレオシドを反応させたところ、反応混液中に GSCH₂-dG に相当するピークのみが観察された。このことから、ジクロロメタン由来の GSH 付加体は GSCH₂-dG がメジャーな付加体であることが推測された。一方、同じサンプルを LC-MS/MS を用いた網羅的解析法 (アダクトーム法) により解析したところ、多数の DNA 付加体が観察されたことから、GSCH₂-dG 付加体以外にも多くの付加体が生成されており、新規の職業性胆管癌リスクのバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

ヒストン修飾を指標とした解析法

化学物質により特異的なヒストン修飾パターンを示した。例えば、formaldehyde、

4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の作用後のヒストン修飾パターンでは、DNA 損傷誘導を示す H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) また、H3 のリン酸化 (Ser10,28) の誘導が両化学物質作用後に認められた。一方、ヒストンのアセチル化は、NNK 作用後に顕著に認められ、クロマチン構造の変化と遺伝子発現の変化が示唆された。ChIP アッセイの結果、*proto-oncogene* である *c-fos*, *c-jun* プロモーター領域で H3(Ser10) のリン酸化は上昇していることから、このヒストン修飾が発がんプロモーションに繋がることが示された。

3) 多施設共同システム構築

各施設、主体とする臓器以外には必ずしも、動物解剖時に保存していないことが判明したために、共通の臓器保存をしていくかを協議した結果、早急に各施設の対象臓器の摘出固定・保存の方法をまとめることが第一課題として準備している。

D. 考察

各臓器別で早期癌病巣を特定できる中短期モデルの開発を目標に進行しているが、大腸では比較的多くの前がん病変が知られており、特に ACF は従来より、がんの化学予防のバイオマーカーとしても利用されるとともに、ヒトにおいても動物で提唱された前がん病変の存在が大腸癌の内視鏡的なマーカーとして認識されている。加えて、MDF は中期(10 週)では腫瘍性と病変として認識される率が 9 割以上であった。そのため、これらの早期の病理組織学的検索が発がん性試験として十分に利用できると考えられた。

また、肺臓での過形成病変を免疫組織学的な検索により、NapsinA の染色性で発がん予測として役立つと考えられ、指標とした代替法の確立を目指すことにした。肝臓は従来からの伊東モデルを変異原性・遺伝毒性を *in vivo* で確認できる gpt-delta ラットを利用することで、変異原性・発癌モデルとして利用できる可能性を示唆したが、経済的な側面での考慮が必要である。

膀胱・前立腺においては免疫組織学的に膀胱で γ -H2AX, 前立腺で γ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 標識率を組織学的な早期病変に加味して検討を進めているが、今後、更なる検討が必要と思われる。

新規系での試験では、新たに LC-TOF MS を用いてアダクトーム法を確立の可能性を示唆され、今後の未知物質に対する検討が必要であり、最近、注目されている環境性因子が示唆されているヒト肝内胆管癌発生の可能性が示唆されているジクロロメタン等の未知物質での検出法としての活用が期待される。また、ヒストン修飾ではヒストン H2AX(Ser139)リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3(Ser10)のリン酸化により前がん遺伝子の発現制御を捉えることが可能であることが明らかになり、*in vitro* 新規発がんリスク評価指標候補として、膀胱・前立腺における動物系との連携で検討することが必要と考えられた。

E. 結論

動物を供する発がん試験における代替法の確立は化

学物質のヒトへの安全性に対して重要である。しかし、動物実験に対する3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則は決して動物を使用しないということではないため、今回の研究目標はその精神に基づいてヒトとしての生体に近い動物での発がんすなわち、腫瘍形成の有無を推測できるシステムの構築の確立を目指すものと位置づけることができ、その観点で、その可能性を示唆できるものと考えている。

F. 健康危険情報

1,2-ジクロロプロパンがマウスおよびハムスターでは肝毒性を示す。ヒトに関しては特定できていないが、1,2-ジクロロプロパンが印刷所で使用されていることと昨今の印刷所での肝内胆管癌の発生を考慮すると、今後、その機序を含め、科学的な検索が必要であると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai E, Yoshimi N et al. Identification of preneoplastic lesions as mucin-depleted foci in patients with sporadic colorectal cancer. *Cancer Sci.* 103: 144-149, 2012.
- 2) Cui C, Yoshimi N et al. The pre-neoplastic lesion, mucin-depleted foci, reveals as *de novo* high-grade dysplasia in rat colon carcinogenesis. *Oncology Reports*, 27: 1365-1370, 2012.
- 3) Takahashi, S. et al. Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer. *Prostate*, 72:1559-1572, 2012.
- 4) Long, N., Takahashi, S. et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Sci.* in press.
- 5) Kobayashi, D., Takahashi, S. et al. Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. *Prostate*, in press.
- 6) Tsukamoto T et al. Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in rodent models. *Semin Immunopathol*, in press.
- 7) Kuno T et al. Organoamnesium suppress inflammation-associated colon carcinogenesis in male Crj:CD-1 mice. *Carcinogenesis*. Epub 2012.
- 8) Kuno T et al. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry*. 3: 156-173. 2012.
- 9) Takamatsu M, Aoki H, Hirose Y, Kobayashi K, Tomita H, Kuno T, Koumura H, Hara A. Teratoma showing the features of retinal structure: A case of sacrococcygeal teratoma. *Oncology Letters*. 3: 1023-26. 2012.
- 10) Xie XL, Wei M, et al. 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ) promotes mouse hepatocarcinogenesis by activating transforming growth factor- and Wnt/ -catenin signaling pathways. *Toxicol Sci*, 125: 392-400, 2012.
- 11) Nakatani S, Wei M, et al. Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephrin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transpl*, 27: 1889-1897, 2012.
- 12) Wei M et al. Lack of Hepatocarcinogenicity of Combinations of Low Doses of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and Diethylnitrosamine in Rats: Indication for the Existence of a Threshold for Genotoxic Carcinogens. *J Toxicol Pathol*, 25: 209-214, 2012.
- 13) Yokohira M et al. Toxicity of nicotine by repeated intratracheal instillation to F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 25:257-263, 2012.
- 14) Yokohira M, et al. Strain differences in pleural mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers (TISMO) infused directly into the thoracic cavity. *Exp. Toxicol. Pathol.*, in press.
- 15) Kato T, Totsuka Y, et al. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay systems. *Nanotoxicology*. Epub 2012.
- 16) Matsubara S, Totsuka Y. et al. Induction of Glandular Stomach Cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian Gerbils by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile, *Int J Cancer*, 130:259-66, 2012.
- 17) Toyooka T, Ibuki Y et al. Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutat. Res.* 741: 57-64, 2012.
- 18) Toyooka T, Ibuki Y et al. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat. Res.* 742: 84-91, 2012.
- 19) Ibuki Y et al. Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 46; 7629-7636, 2012.
- 20) Toyooka T, Ibuki Y et al. UVB irradiation changes genotoxic potential of nonylphenolpolyethoxylates-- remarkable generation of -H2AX with degradation of

chemical structure. Mutagenesis. 28: 7-14, 2013.

2. 学会発表

1. 横平政直, 他 Immunohistochemical characteristics of the lung proliferative lesions in F344 rats., 第71回日本癌学会総会, 2012.
2. Kousuke Ishino, Yukari Totsuka, et al. A comprehensive analysis of metabolic syndrome-related DNA adducts in human leukocytes, 第71回日本癌学総会. 2012.
3. Kousuke Ishino, Yukari Totsuka et al. Analysis of DNA damage induced by nanomaterials using comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) 第3回アジア環境変異原学会. 2012.
4. Yukari Totsuka, Kousuke Ishino, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama, Analysis of DNA adducts derived from dihaloalkanes, 第41回日本環境変異原学会. 2012.
5. Akihiro Sekine, Yukari Totsuka et al. Adductome analysis of DNA adducts in lungs of mice exposed to magnetite (MGT) 第41回日本環境変異原学会. 2012.
6. Kousuke Ishino, Yukari Totsuka et al. Exploration of novel DNA adducts using comprehensive adduct analysis (DNA adductome analysis) 第41回日本環境変異原学会. 2012.
7. 吉田唯真, 豊岡達士、伊吹裕子: ホルムアルデヒドによるヒストン修飾変化とがん原遺伝子発現制御. 第39回日本毒性学会学術年会 (仙台) pp.232, 2012年7月
8. Ikuma Yoshida, Yuko Ibuki et al. Formaldehyde-induced histone modifications and expression of proto-oncogenes. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012.
9. 伊吹裕子他 たばこ副流煙によるヒストン修飾変化. 第39回日本毒性学会学術年会. 2012.
10. 伊吹裕子他 化学物質によるヒストン修飾変化とそれを指標とした毒性評価系の構築. 第27回発癌病理研究会, 2012.
11. 吉田唯真, 伊吹裕子他, -不飽和アルデヒドによるヒストン修飾変化. 第41回日本環境変異原学会, 2012年.
12. 松下実理, 伊吹裕子他 17- β -estradiol によるヒストンアセチル化と紫外線感受性変化. 第41回日本環境変異原学会, 2012.
13. 趙曉旭, 伊吹裕子他 銀は紫外線誘導ヒストン H2AX のリン酸化を増強する. 第41回日本環境変異原学会, 2012.

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得