

201327024A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

食品添加物等における遺伝毒性・
発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鰐渕 英機

平成26 (2014)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究 ----1

鰐淵 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)

II. 分担研究報告

1. 新規前がん病変マーカーの開発に関する研究 -----15

鰐淵 英機 (大阪市立大学大学院医学研究科 教授)

2. *gpt delta*ラットを用いた *in vivo*変異原性試験-----43

魏 民 (大阪市立大学大学院医学研究科 准教授)

3. 遺伝子のメチル化異常に関する研究 -----53

辻内 俊文 (近畿大学理工学部 教授)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----57

食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究

研究代表者 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

これまでに、我々は平成 21-23 年度厚生労働科学研究で、食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究において、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットと前がん病変を指標とした二段階発がん性試験を組み合わせた包括的短期発がんリスク評価試験法を開発した。本研究では、この試験法がリスク評価システムにおいて有用であることをさらに検証するため、肝臓、膀胱、甲状腺及び腎臓において発がん性・変異原性を有する食品添加物あるいは食品中化学物質についてできる限り多くの物質について検索し、データを蓄積する。また、短期に発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発を膀胱、肺などの臓器においてもさらに進める。本年度で得られた研究成果を以下にまとめる。

1. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法の確立

gpt delta ラット短期発がんリスク評価試験法を用いて、*in vitro* 変異原性試験では陰性であるが、*in vivo* 変異原性はまだ検討されていない肝発がん物質である 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性を検討した。その結果、1,4-ジオキサンが *in vivo* においては変異原性陽性であることが初めて明らかとなった。さらに、*gpt delta* および F344 ラットともに 1,4-ジオキサンの肝発がん性が認められ、本試験法の有用性が確認された（鰐淵、魏）。

2. 膀胱発がんの早期前がん病変マーカーの開発

BBN および DMA 誘発膀胱がんサンプルと、7 種類の膀胱発がん物質、2 種類の膀胱発がん促進物質および 3 種類の非膀胱発がん物質をそれぞれ 4 週投与したラット膀胱粘膜サンプルにおける mRNA 発現を検索した結果、すべての膀胱発がん物質について、oncomodulin (OCM) と matrix metalloproteinase-3 (MMP3) 両者とも、膀胱がんサンプルおよび膀胱粘膜サンプルにおいて共通に過剰発現を示した。さらに、OCM だけがすべての膀胱発がん促進物質について膀胱粘膜サンプルでの過剰発現を認めた。加えて、いずれの非膀胱発がん物質でも、膀胱粘膜サンプルにおける OCM の異常発現は認められなかった。以上より、OCM と MMP3 を組み合わせて使用することにより、化学物質の膀胱発がん性を予測できる可能性が強く示唆さ

れた（鰐淵）。

3. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

ダンマル樹脂を4週間投与したラット肝臓サンプルを用いて、マイクロアレイ解析によるDNAメチル化ターゲット遺伝子のスクリーニング、およびバイオインフォマティクス解析によるDNAメチル化異常候補遺伝子の選定を行った。その結果、ダンマル樹脂投与群で発現低下がみられた遺伝子から、DNAメチル化異常候補遺伝子として16遺伝子を選定した。さらに、*de novo*メチル化に関与するDNMT3bおよびヒストンの脱アセチル化を誘導するHDACの発現減少が認められ、エピジェネティック修飾機構の異常が認められた（鰐淵）。

4. 細胞培養系を用いた食品中に含まれる化学物質の安全性評価系の開発

ラット肝細胞を内分泌かく乱物質であるbisphenol A (BPA)と4-nonylphenol (4-NP)で処理した結果、細胞運動能は、BPAで処理した細胞では抑制し4-NPでは促進された。LPA受容体遺伝子発現は、BPAで処理した細胞においてLPA1発現が上昇、4-NPではLPA3発現が上昇した。本研究より、細胞内シグナル伝達経路の変化を指標とする細胞培養を用いた安全性評価法の有用性が示唆された（辻内）。

研究分担者

魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科

辻内 俊文 近畿大学理工学部

A. 研究目的

食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は2年間必要であり、その莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの化学物質に対応することが困難なためである。これまでに、我々は平成21-23年度厚生労働科学研究で、食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究において、*in vivo*変異原性を検索できる*gpt delta*ラットとF344ラットを用いて、前がん病変を指

標とした二段階発がん性試験である包括的短期発がんリスク評価試験法を開発した。

本研究では、この試験法がリスク評価システムにおいて有用であることをさらに検証するため、肝臓、膀胱、甲状腺及び腎臓において発がん性・変異原性を有する食品添加物あるいは食品中化学物質についてできる限り多くの物質について検索し、データを蓄積する。また、短期に発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発を肝以外にも、膀胱、肺、腎などの臓器においてもさらに進める。

本年度では、*in vitro*変異原性試験では陰性であるが、*in vivo*変異原性はまだ検討されていない肝発がん物質である1,4-ジオキサンの*in vivo*変異原性およ

び発がん性を検討した。遺伝毒性については *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 評価系を用い、発がん性については肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の評価を行った。

また、発がん性を検索できる新規早期前がん病変マーカー開発を目的とし、複数の膀胱発がん性物質で誘発された膀胱病変を対象とし、膀胱発がん性の早期検出バイオマーカーの同定を試みた。

さらに、エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発を目的とし、ダンマル樹脂投与によるエピジェネティック修飾機構の変化について評価を行った。これまでに、我々は1年間慢性毒性試験および2年間発がん性試験を実施し、ダンマル樹脂はラット肝発がん性を有することを明らかにしてきた(平成18-20年度厚生労働科学研究)。また、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットを用いて、ダンマル樹脂が *in vivo* 変異原性陰性であったことから非遺伝毒性肝発がん物質であることを明らかにした(平成21-23年度厚生労働科学研究)。これらの結果から、ダンマル樹脂は非遺伝毒性的な発がんメカニズムを介して肝発がん作用を示す可能性が考えられた。非遺伝毒性的発がんメカニズムとして、酸化ストレスの惹起、核内受容体の活性化を介した細胞増殖シグナルの発現異常、遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドにおける DNA のメチル化異常などが知られている。しかし、ダンマル樹脂の非遺伝毒性メカニズムに上記の分子機序

が関与するかについては未だ不明である。そこで、本研究ではダンマル樹脂誘発ラット肝発がん過程における DNA メチル化異常候補遺伝子の選定を行った。さらに、酸化ストレスの誘導および核内受容体の活性化の有無を検討した。

加えて、細胞培養系を用いた食品に含まれる化学物質の安全性評価系の確立を試みた。本年度の研究では、内分泌かく乱物質を細胞処理し、細胞運動能に対する影響と LPA 受容体発現誘導の有無を検索し、LPA 受容体を介する LPA シグナル伝達経路が細胞を用いた発がん性評価の有用性を検討した。

B. 研究方法

1. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法を用いた 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性の検討

[実験 1]

6週齢の雄性 F344 系 *gpt delta* ラットに 1,4-ジオキサンをそれぞれ 0, 200, 1000, 5000 ppm の濃度で蒸留水に希釈し、16週間飲水投与を行った。投与終了後、肝前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の定量的評価を行った。また、点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイおよび *gpt* 遺伝子のシーケンス解析を行い、変異頻度および変異スペクトラを検討した。

[実験 2]

3 週齢の雄性 F344 ラット 180 匹を 6 群 30 匹ずつに分け、それぞれ 1,4-ジオキサンを 0, 2, 20, 200, 2000, 5000 ppm の濃度で飲水投与を 16 週間行った。投与終了後、肝臓における GST-P 陽性細胞巢の発生および BrdU 標識率の評価定量的解析を行った。

2. 膀胱発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発

[実験 1] マイクロアレイを用いた膀胱がんて異常発現する遺伝子の同定

発がん機序が異なると思われる膀胱発がん物質、すなわち、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 誘発ラット膀胱がんと、dimethylarsinic acid (DMA) 誘発ラットの膀胱がんに対し Affymetrix GeneChip を用いて遺伝子の mRNA 発現解析を行った。対照群としての同週齢の無処置ラット膀胱粘膜を用いた。

[実験 2] 膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子の同定

実験 1 で同定した膀胱がんて異常発現する遺伝子の中で BBN により誘発された早期増殖性病変においても過剰発現する遺伝子を同定し、膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子とした。実験は、6 週齢雄 F344 ラットに 0.05%BBN を 2, 4, 8 週投与し、リアルタイム RT-PCR をもち誘発した膀胱病変における mRNA 発現を検索した。

[実験 3] 他の膀胱発がん物質あるいは膀胱を標的にしない発がん物質を短期投

与した膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子の発現の検討

実験 2 で同定した 12 種類候補遺伝子について、7 種類の膀胱発がん物質 (BBN, DMA, 2-acetylaminofluorene, phenethyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, sodium *ortho*-phenylphenate, uracil) および 3 種類の非膀胱発がん物質である (肝発がん物質 diethylnitrosamine、腎発がん物質 *N*-ethyl-*N*-hydroxyethyl nitrosamine および大腸発がん物質 1,2-dimethylhydrazine) をそれぞれ 4 週投与した F344 ラット膀胱粘膜における mRNA 発現を検索した。

[実験 4] 膀胱発がん促進物質を短期投与した膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子の発現の検討

Oncomodulin (OCM) と matrix metalloproteinase-3 (MMP3) について、膀胱発がん促進物質である Sodium ascorbate (NaAsc) および Propolis をそれぞれ 4 週投与した F344 ラット膀胱粘膜における mRNA 発現を検索した。

3. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

5 週齢の雄性 F344 ラット 12 匹を 1 週間の馴化飼育後、6 匹ずつ 2 群に分け、それぞれにダンマル樹脂を 0, 2 % の濃度で混餌投与を 4 週間行った。飼育期間終了後、麻酔下にて腹部大動脈切断による安楽殺を行い、直ちに肝臓を採取して液体窒素で凍結させた。DNA メチル化やヒストン修

飾に代表されるエピジェネティックな修飾による遺伝子発現変化を評価するために、マイクロアレイによる遺伝子網羅的発現量解析を行い、得られたデータについて Ingenuity Pathway analysis (IPA) software にて遺伝子パスウェイ解析を行った。quantitative RT-PCR 法を用いて P450 関連遺伝子およびメチル化関連酵素の発現変動について検討した。

4. 細胞培養系を用いた食品中に含まれる化学物質の安全性評価系の確立

培養細胞は、ラット肝上皮(WB-F344)細胞を用いた。細胞には、内分泌かく乱物質である bisphenol A (BPA) と 4-nonylphenol (4-NP)を 0.1 および 1.0mM の濃度で 48 時間 (1 回/24 時間) 計 2 回処理した。細胞運動能の検索には、Cell Culture Insert を使い、upper chamber には BPA および 4-NP で処理した細胞を播き、lower chamber には FBS 含有培地を加え、16 時間培養後に lower chamber に移動した細胞をギムザ染色後に計測した。水平方向への細胞運動能への影響は、BPA および 4-NP を 1.0mM の濃度で 48 時間処理した後、scrape 法を用いて検索した。遺伝子発現解析には、BPA および 4-NP (1.0mM) で処理した細胞より RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法を行った。さらに、遺伝子発現と細胞運動能の関連を検索する目的で、標的となる遺伝子に対する shRNA を組み込んだ Vector を遺伝子導入し、puromycin で selection を行うことによりノックダウン細胞を作成し、BPA と

4-NP に対する効果を検索した。

5. 統計学的解析

統計学的解析に、StatLight2000 (C) の多群の検定を用い、各検定の有意水準は 5% とした。剖検時における最終体重、肝臓の絶対重量および相対重量、GST-P 陽性細胞巢および BrdU 標識率について、統計学的検定法については、まず各群の分散比を Bartlett 検定で検定し、等分散の場合は Dunnett 検定 (両側検定) により、不等分散の場合は Steel 検定により比較した。mRNA 発現量については、まず各群の分散比を F 検定で検定し、等分散の場合は Student's t 検定 (両側検定) により、不等分散の場合は Welch's t 検定により比較した。

6. 倫理面への配慮

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないために麻酔下にて実施した。

C. 研究結果

1. *gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法を用いた 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性の検討

[実験 1]

gpt delta ラット肝臓における 1,4-ジオキサンの *in vivo* 変異原性および発がん性を検討した結果、肝臓の前癌病変マ

一カーである GST-P 陽性細胞巢(2 細胞以上)の単位肝臓面積あたりの数が 5000 ppm 投与群で有意に増加した。*gpt* 遺伝子の突然変異頻度は、無処置群と比較して、5000 ppm 投与群において有意な増加がみられた。また、AT to TA トランスバージョンの頻度が 200ppm で増加傾向、1000 および 5000 ppm 群で、A:T to G:C 5000 ppm 群で有意な増加が認められた。

[実験 2]

1, 4-ジオキサンの F344 ラットにおける肝発がん性を検討した結果、

GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの数について定量的評価を行った結果、無処置群と比較して 200 ppm 投与群より有意な増加が用量相関的にみられた。また、細胞増殖能の指標である BrdU の標識率について定量的評価を行った結果、5000 ppm 投与群で有意な増加がみられ、またそのほかの用量についても用量相関的な増加傾向を示した。

2. 膀胱発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発

[実験 1] マイクロアレイ解析の結果、BBN 誘発膀胱がん と DMA 誘発膀胱がん で共通に発現量が 2 倍以上の差を示した遺伝子が 139 種類認められた。これらのうち、過剰発現量上位 10 遺伝子と Ingenuity パスウェイ解析によりがん発生に重要な役割を担っていると思われる 13 遺伝子 (3 遺伝子が共通であった) (合計 20 遺伝子を膀胱発がん早期検出マーカー

候補として選抜した。

[実験 2] 実験 1 で選抜した 20 遺伝子の発現量を検討した結果、BBN 投与 2 週から連続して発現量が有意に上昇した 12 種類の遺伝子を同定した。これらの遺伝子を膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子とした。

[実験 3 および 4] 12 種類の遺伝子のうち 2 種類 (Oncomodulin、MMP3) の mRNA 発現量は無処置膀胱粘膜に比較して全ての発がん物質において有意に増加した。一方、すべての膀胱発がん促進物質では Oncomodulin の有意な増加が認められたが、MMP3 の異常発現は認められなかった。さらに、非膀胱発がん物質である DEN (肝発がん物質)、ENEN (腎発がん物質) および DMH (大腸発がん物質) をそれぞれ 4 週間投与した膀胱粘膜における Oncomodulin と MMP3 の mRNA 発現量を検索したところ、MMP3 の発現量は ENEN および DMH の投与により有意に増加したが、Oncomodulin の発現量はいずれの投与群においても有意な変動はみられなかった。

3. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

マイクロアレイによる網羅的発現量解析および IPA 解析により、ダンマル樹脂投与によって発現量比(log 比)が 2 倍以上発現減少のみられたがん関連遺伝子 16 種類を DNA メチル化異常候補遺伝子として選定した。また、qPCR 法による CYP 関連遺伝子の定量的発現量解析を行った結果、無処置群と比較して *cyp1a1*, *2b1*, *2e1*,

3a2, 3a3 で有意な発現上昇がみられた。また、de novo メチル化関連遺伝子である DNMT3b およびヒストン脱アセチル化酵素 HDAC がダンマル樹脂投与群で発現減少がみられたため、DNMT1, 3a, 3b および HDAC1, 2, 3 について qPCR 法にて遺伝子発現量を評価した結果、DNMT1, HDAC1, 2 で減少傾向が、DNMT3b で有意な減少がみられた。IPA パスウェイ解析の結果、異物代謝酵素誘導系、PXR/RXR activation および Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 誘導系が有意に誘導されていることが示唆された。

4. 細胞培養系を用いた食品中に含まれる化学物質の安全性評価系の確立

細胞運動能は、BPA で処理した細胞では抑制し 4-NP では促進された。LPA 受容体遺伝子発現は、BPA で処理した細胞において LPA1 発現が上昇、4-NP では LPA3 発現が上昇した。本研究より、細胞内シグナル伝達経路の変化を指標とする細胞培養を用いた安全性評価法の有用性が示唆された。

D. 考察

1,4-ジオキサンはラット肝臓における *in vivo* 変異原性および発がん性について明らかにすることを目的として、*gpt* delta ラットを用いた包括的試験を行った。*gpt* アッセイによって、1,4-ジオキサンがラット肝臓において変異原性を有することを始めて明らかとし、またそれらが 5000 ppm 投与群ではじめて生ずることを明らかとした。また、その変異スペ

クトラについても 5000 ppm 投与群有意な増加を示す変異スペクトラが存在することから、1,4-ジオキサンによる変異原性には A:T to G:C および A:T to T:A 塩基置換が特徴であると推測される。しかし、1,4-ジオキサンの変異原性は 5000 ppm ではじめて有意な変化を示すものの、その値は非常に小さいため、その遺伝毒性は非常に弱いと考えられる。

BBN および DMA 誘発膀胱がんサンプルと、7 種類の膀胱発がん物質、2 種類の膀胱発がん促進物質および 3 種類の非膀胱発がん物質をそれぞれ 4 週投与したラット膀胱粘膜サンプルにおける mRNA 発現を検索した結果、すべての膀胱発がん物質について、OCM と MMP3 両者とも、膀胱がんサンプルおよび膀胱粘膜サンプルにおいて共通に過剰発現を示した。さらに、OCM だけがすべての膀胱発がん促進物質について膀胱粘膜サンプルでの過剰発現を認めた。加えて、いずれの非膀胱発がん物質でも、膀胱粘膜サンプルにおける OCM の異常発現は認められなかった。以上より、OCM と MMP3 を組み合わせて使用することにより、化学物質の膀胱発がん性を予測できる可能性が強く示唆された。

遺伝毒性を有さないが肝発がん性を有するダンマル樹脂の発がんメカニズムについて検討した結果、異物代謝酵素誘導系である *cyp1a1* の発現がダンマル樹脂投与群で有意に上昇していることが qPCR、マイクロアレイ双方で確認できた。また、パスウェイ解析によってダンマル樹脂投与群で異物代謝誘導系、PXR/RXR

activation および AhR 関連誘導系が有意に誘導されていることが示され、qPCR 法の結果においても cyp1a1, 3a2, 3a3 の発現上昇がみられることから、ダンマル樹脂による発がんメカニズムには異物代謝誘導系の異常が関与している可能性が示唆された。IPA pathway analysis によって、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC の有意な発現減少が IPA によって予測されたため、qPCR 法で HDAC および DNA メチル化に関与する DNMT の発現について解析した結果、HDAC1, 2 および DNMT1 では減少傾向が、DNMT3b では有意な減少がみられた。したがって、ヒストン修飾や DNA メチル化によって本来発現が抑制されるべき遺伝子の発現誘導が起きていることが示唆され、がん遺伝子の過剰な発現誘導が起きている可能性が考えられる。DNA メチル化異常候補遺伝子として選定した 19 遺伝子について今後検討する予定である。

内分泌かく乱物質は環境中に存在し、日常生活の中で曝露する可能性のある外因性の化合物である。内分泌かく乱物質は、生殖器系の異常、発がん、肥満、心血管系疾患など身体に様々な影響を及ぼす。これらの作用には、種々の細胞内・核内シグナルを介し細胞内ホルモン調節機構ならびに恒常性の維持に変化をもたらすことが要因のひとつと考えられている。本研究では、細胞運動能を指標とし、BPA と 4-NP を肝上皮細胞に処理することで誘発される細胞運動能に LPA シグナル伝達経路が関与することが判明した。さ

らに、これまでの研究で用いたエストロゲン化合物や過酸化水素と同様に、内分泌かく乱物質の種類により異なる LPA 受容体が作用することわかった。今後は、培養細胞にイニシエーション・プロモーション作用を有する化学物質を処理し、細胞運動能に及ぼす影響と LPA 受容体パターンを検索し、被検物質の細胞に対する作用との相関性を明らかにする必要がある。

E. 結論

1,4-ジオキサンが *in vivo* 変異原性を有し、さらに肝発がん性も有することが明らかとなった。この成果は 1,4-ジオキサンのリスク評価・管理に寄与するものであると考えられた。また、*gpt delta* ラット短期発がんリスク評価試験法が包括的短期発がんリスク評価試験法としての有用性が確認された。

Oncomodulin と MMP3 は膀胱がん性の早期検出マーカーとして有用であるから、これらを利用することにより、膀胱発がん物質検出のスクリーニングシステム確立に有用であると考えられた。

内分泌かく乱物質である BPA と 4-NP による肝上皮細胞の細胞運動能は、異なる LPA 受容体によって制御されることが判明した。本研究より、細胞培養を用いた細胞内シグナル伝達経路の変化を指標とする短期発がんリスク評価法の有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*, 42, 1034-1039, 2013.
2. Xie XL, Kakehashi A, Wei M, Yamano S, Takeshita M, Yunoki T, Wanibuchi H. l-Leucine and l-isoleucine enhance growth of BBN-induced urothelial tumors in the rat bladder by modulating expression of amino acid transporters and tumorigenesis-associated genes. *Food Chem Toxicol*, 59, 137-144, 2013.
3. Hanada S, Nishiyama N, Mizuguchi S, Yamano S, Kakehashi A, Wei M, Inoue H, Komatsu H, Chung K, Suehiro S, Wanibuchi H. Clinicopathological significance of combined analysis of cytokeratin19 expression and preoperative serum CYFRA21-1 levels in human lung squamous cell carcinoma. *Osaka City Med J*, 59, 35-44, 2013.
4. Komatsu H, Kakehashi A, Nishiyama N, Izumi N, Mizuguchi S, Yamano S, Inoue H, Hanada S, Chung K, Wei M, Suehiro S, Wanibuchi H. Complexin-2 (CPLX2) as a potential prognostic biomarker in human lung high grade neuroendocrine tumors. *Cancer Biomark*, 13, 171-180, 2013.
5. Wei M, Yamada T, Yamano S, Kato M, Kakehashi A, Fujioka M, Tago Y, Kitano M, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 1-9, 2013.
6. Kakehashi A, Hagiwara A, Imai N, Nagano K, Nishimaki F, Banton M, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: Evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*, 273, 390-400, 2013.
7. Tago Y, Yamano S, Wei M, Kakehashi A, Kitano M, Fujioka M, Ishii N,

- Wanibuchi H. Novel medium-term carcinogenesis model for lung squamous cell carcinoma induced by N-nitroso-tris-chloroethylurea in mice. *Cancer Sci*, 104, 1560-1566, 2013.
8. Hanada S, Kakehashi A, Nishiyama N, Wei M, Yamano S, Chung K, Komatsu H, Inoue H, Suehiro S, Wanibuchi H. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate as a prognostic biomarker in human primary lung squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*, 13, 289-298, 2013.
 9. Takahashi K, Tanaka M, Inagaki A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Nagayama K, Shiota M, Iwao H. Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line. *Int J Oncol*, 43, 1985-1991, 2013.
 10. Kakehashi A, Wei M, Fukushima S, Wanibuchi H. Oxidative stress in the carcinogenicity of chemical carcinogens. *Cancers*, 5, 1332-1354, 2013.
 11. Kato M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Evaluation of the modifying effect of inhalation of mainstream cigarette smoke on mouse bladder carcinogenesis. *J Toxicol Pathol*, 26, 447-451, 2013.
 12. Takada J, Hoshi M, Oebisu N, Ieguchi M, Kakehashi A, Wanibuchi H, Nakamura H. A Comparative Study of Clinicopathological Features Between Simple Bone Cysts of the Calcaneus and the Long Bone. *Foot Ankle Int*, 35, 374-382, 2014.
 13. Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Tanaka M, Shiota M, Osada-Oka M, Nakamura Y, Wei M, Wanibuchi H, Iwao H, Yoshiyama M. Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 445, 327-333, 2014.
 14. 藤岡正喜、山野莊太郎、魏 民、鰐 浏英機. 免疫組織染色の定量法. *細胞工学*, 学研メディカル秀潤社, 33(3), 316-322, 2014.
 15. Dong Y, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cell motile and invasive activities of human sarcoma cell lines. *Mol Cell Biochem* 2014, in press.
 16. Dong Y, Hirane M, Araki M, Fukushima N, Tsujiuchi T. Lysophosphatidic acid receptor-5 negatively regulates cellular responses in mouse fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 446, 585-589, 2014.

17. Tsujiuchi T, Nakae D, Konishi Y. Multi-step lung carcinogenesis model induced by oral administration of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2014 (66) 81-88.
18. Tsujiuchi T, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Diverse effects of LPA receptors on cell motile activities of cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res* 2014, in press.
19. Dong Y, Araki M, Hirane M, Tanabe E, Fukushima N, Tsujiuchi T. Effects of bisphenol A and 4-nonylphenol on cellular responses through the different induction of LPA receptors in liver epithelial WB-F344 cells. *J Recept Signal Transduct Res* 2013,
20. Tsujiuchi T, Araki M, Hirane M, Dong Y, Fukushima N. Lysophosphatidic acid receptors in cancer pathobiology. *Histol Histopathol* 2014 (29) 313-321.
21. Hirane M, Araki M, Dong Y, Honoki K, Fukushima N, Tsujiuchi T. Inhibitory effects of LPA1 on cell motile activities stimulated by hydrogen peroxide and 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in fibroblast 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 (441) 47-52.
22. Tanaka J, Yamaguchi K, Ishikura H, Tsubota M, Sekiguchi F, Seki Y, Tsujiuchi T, Murai A, Uemura T, Kawabata A. Bladder pain relief by HMGB1 neutralization and soluble thrombomodulin in mice with cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuropharmacology* 2014 (79) 112-118.
23. Honoki K, Tsujiuchi T. Senescence bypass in mesenchymal stem cells: a potential pathogenesis and implications of pro-senescence therapy in sarcomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2013(13) 983-996.
24. Kuwata S, Ohkubo K, Kumamoto S, Yamaguchi N, Izuka N, Murota K, Tsujiuchi T, Iwamori M, Fukushima N. Extracellular lipid metabolism influences the survival of ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 (439) 280-284.
25. Tanabe E, Kitayoshi M, Hirane M, Araki M, Dong Y, Fukushima N, Tsujiuchi T. Downregulation of activation factors of endothelia and fibroblasts via lysophosphatidic acid signaling in a mouse lung cancer LL/2 cell line. *J Recept Signal Transduct Res* 2013 (33) 286-290.
26. Inoue S, Tanabe E, Shibata A, Hirane M, Araki M, Dong Y,

- Fukushima N, Tsujiuchi T.
Ethionine regulates cell motile activity through LPA receptor-3 in liver epithelial WB-F344 cells. Mol Cell Biochem 2013 (383) 173-177.
2. 学会発表
1. 鰐渕英機：膀胱癌の病理診断の基礎知識. 第 101 回泌尿器科学会総会「卒業教育プログラム」, 札幌 (2013 年 4 月)
 2. Nakatani S, Ishimura E, Mori K, Wanibuchi H, Inaba M. Nephronectin is a novel protein associated with diabetic nephropathy. the 50th ERA-EDTA Congress, Istanbul, Turkey (2013 年 5 月)
 3. 鰐渕英機, 桑江優子, 魏 民, 若狭研一, 梯アンナ：ヒト肝細胞癌における特異的候補分子の機能解析. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌 (2013 年 6 月)
 4. 鰐渕英機, 魏 民, 梯アンナ, 山野莊太郎, 藤岡正喜：ヒ素発がん性の機序の解明. 第 20 回日本がん予防学会, 東京 (2013 年 7 月)
 5. 梯アンナ, 萩原昭裕, 今井則夫, 長野嘉介, 西牧富久美, 魏 民, 福島昭治, 鰐渕英機：ラットにおける 2 - エトキシ - 2 - メチルプロパンの肝臓発腫瘍性機序の解明. 第 28 回発癌病理研究会, 沖縄県南城市 (2013 年 8 月)
 6. Okumura M, Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Oncomodulin is a novel early marker of urinary bladder carcinogenesis in F344 rats. The European Cancer Congress 2013, Amsterdam, the Netherlands (2013 年 9~10 月)
 7. 魏 民, 山野莊太郎, 藤岡正喜, 加藤 実, 武下正憲, 梯アンナ, 鰐渕英機：1, 2 - ジクロロプロパンのマウスおよびハムスターの肝臓における代謝および毒性発現機序の検討. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
 8. 藤岡正喜, 魏 民, 山野莊太郎, 奥村真衣, 下村衣里, 梯アンナ, 鰐渕英機：gpt delta ラットを用いた DMA(V), iAs(III)の変異原性および遺伝子変化の検討. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
 9. 梯アンナ, 桑江優子, 加藤 実, 山野莊太郎, 神吉将之, 魏 民, 若狭研一, 鰐渕英機：ヒト肝細胞癌における新規特異的候補分子ターゲットの機能解析. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
 10. 山野莊太郎, 魏 民, 藤岡正喜, 多胡善幸, 北野光昭, 三島胡桃, 鰐渕英機：内因性 NADPH オキシダーゼインヒビターであるアポサイニンはラット腎発がんにおいて発がん抑制作用を有する. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)

11. 奥村真衣、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、魏 民、鰐淵英機：ラット中期多臓器発がん性試験法を用いた DPAA(diphenyl arsenic acid)の発がん修飾作用の検討. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013 年 10 月)
12. 鰐淵英機、奥村真衣、藤岡正喜、魏 民：多臓器発がん性試験法を用いたラットにおけるジフェニルアルシン酸の発がん性の検討. 第 19 回ヒ素シンポジウム, 福岡 (2013 年 11 月)
13. Yamano S, Wei M, Wanibuchi H. Cancer initiating cell of lung squamous cell carcinoma in mice might be derived from of the bronchiolar alveolar stem cell. 第 18 回日韓がんワークショップ, 岐阜 (2013 年 11 月)
14. 魏 民、山野荘太郎、藤岡正喜、梯アンナ、下村衣里、神吉将之、鰐淵英機：シリアンハムスターにおける 1, 2 - dichloropropan の強制経口投与による肝毒性とその発現機序の検討. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
15. 梯アンナ、石井真美、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：肝発がんにおける LC-Ms/Ms 及び *in vitro* 機能解析を用いた新規特異的候補分子の検討. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
16. 山野荘太郎、尾崎清和、武田周二、串田昌彦、井澤武史、山手丈至、平田暁大、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機：EHEN 投与ラットの前腸由来臓器への分化多能性を示す肝芽腫の一例. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
17. 藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、下村衣里、三島胡桃、福永賢輝、鰐淵英機：ラット膀胱におけるプロポリスの発がん促進作用及びその機序の検討. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
18. 奥村真衣、藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、三島胡桃、多胡善幸、鰐淵英機：ラット中期多臓器発がんモデルを用いた DPAA(diphenyl arsenic acid)の発がん修飾作用の検討. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
19. 三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏 民、北野光昭、鰐淵英機：EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
20. 下村衣里、藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、梯アンナ、串田昌彦、鰐淵英機：DMA^Vおよび iAs^{III}ラット膀胱、肝臓における変異原性の解析. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 徳島 (2014 年 1 月)
21. 梯アンナ、魏 民、福島昭治、鰐淵英機：ラット肝発がんにおける Valerian の予防効果. 第 13 回分子

- 予防環境医学研究会, 和歌山 (2014年1~2月)
22. 三島胡桃、山野莊太郎、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 : EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する. 第13回分子予防環境医学研究会, 和歌山 (2014年1~2月)
23. Wei M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Wanibuchi H : Diphenylarsinic acid, a chemical warfare-related neurotoxicant, promotes liver carcinogenesis via activation of aryl hydrocarbon receptor signaling and consequent induction of oxidative DNA damage in rats. 平成25年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ, 大津 (2014年2月)
24. 山野莊太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機 : ラット腎発がんにおけるNADPH oxidase (NOX) の役割. 平成25年度個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ, 大津 (2014年2月)
25. Honoki K, Fujii H, Kido A, Tsukamoto S, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Receptor type-specific role of lysophosphatidic acid signaling for migration and invasion in sarcoma cells. 第72回日本癌学会総会, 横浜 (2013年10月)
26. 石井章一、辻内俊文、福嶋伸之. LPA1の変異は小胞体への蓄積と情報伝達の異常を生じる. 第86回日本生化学大会, 横浜 (2013年9月)
27. 福嶋伸之、辻内俊文、岩森正男. 脂肪酸による卵巣がん細胞HNOAの細胞死抑制機構. 第86回日本生化学大会, 横浜 (2013年9月)
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

新規前がん病変マーカーの開発に関する研究

研究分担者 鱒渕 英機 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

本年度では、水道水に微量ながら含まれている 1,4-ジオキサンについて、F344 ラットを用いて 16 週間飲水投与を行い、肝発がん性の評価を行った。また、様々な膀胱発がん性物質で誘発された膀胱病変を対象とし、発がん性の早期検出バイオマーカーの同定を行った。さらに、DNA メチル化異常を指標とする発がん性評価法を開発するために、非遺伝毒性肝発がん物質であるダンマル樹脂を 4 週間投与したラット肝臓サンプルを用いて、マイクロアレイ解析による DNA メチル化異常候補遺伝子の選定を行った。本年度で得られた研究成果を以下にまとめる。

1. 1,4-ジオキサンの F344 ラットにおける肝発がん性の検討

F344 ラットに 1,4-ジオキサンを 0, 2, 20, 200, 2000, 5000 ppm の用量で 16 週間飲水投与した。その結果、肝前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の発生は、対照群に比較して 200 ppm 投与群より有意な増加が用量相関的にみられた。以上のことから、1,4-ジオキサンはラット肝臓において発がん性を有することが示唆された。

2. 膀胱発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発

BBN および DMA 誘発膀胱がんサンプルと、7 種類の膀胱発がん物質、2 種類の膀胱発がん促進物質および 3 種類の非膀胱発がん物質をそれぞれ 4 週投与したラット膀胱粘膜サンプルにおける mRNA 発現を検索した結果、すべての膀胱発がん物質について、oncomodulin (OCM) と matrix metalloproteinase-3 (MMP3) 両者とも、膀胱がんサンプルおよび膀胱粘膜サンプルにおいて共通に過剰発現を示した。さらに、OCM だけがすべての膀胱発がん促進物質について膀胱粘膜サンプルでの過剰発現を認めた。加えて、いずれの非膀胱発がん物質でも、膀胱粘膜サンプルにおける OCM の異常発現は認められなかった。以上より、OCM と MMP3 を組み合わせて使用することにより、化学物質の膀胱発がん性を予測できる可能性が強く示唆された。

3. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

ダンマル樹脂投与群で発現低下がみられた遺伝子から、DNA メチル化異常候補遺伝子として 16 遺伝子を選定した。さらに、de novo メチル化に参与する DNMT3b およびヒストンの脱アセチル化を誘導する HDAC の発現減少が認められ、エピジェネティック修飾機構の異常が認められた。

A. 研究目的

食品中化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は2年間必要であり、その莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの化学物質に対応することが困難なためである。これまでに、我々は平成21-23年度厚生労働科学研究で、食品添加物等における遺伝毒性・発がん性の短期包括的試験法の開発に関する研究において、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットと F344 ラットを用いて、前がん病変を指標とした二段階発がん性試験である包括的短期発がんリスク評価試験法を開発した。

本研究では、この試験法がリスク評価システムにおいて有用であることをさらに検証するため、肝臓、膀胱、甲状腺及び腎臓において発がん性・変異原性を有する食品添加物あるいは食品中化学物質についてできる限り多くの物質について検索し、データを蓄積する。また、短期に発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発を肝以外にも、膀胱、肺、腎などの臓器においてもさらに進める。

本年度では、*in vitro* 変異原性試験では陰性であるが、*in vivo* 変異原性はまだ検討されていない肝発がん物質である1,4-ジオキサンの*in vivo* 変異原性および発がん性を検討した。1,4-ジオキサンは、医薬品・化粧品（シャンプー）などの抽出・精製・反作用溶剤として用いられる合成

有機化合物であり、浄水処理においては除去されないため、水道水にも残留している。1,4-ジオキサンの遺伝毒性については *in vitro* 試験では、Ames 試験で陰性、姉妹染色分体交換試験では弱陽性が報告されており、*in vivo* 試験では小核試験陰性、伴性劣性致死試験陽性であり、弱い遺伝毒性作用を持つ可能性があると考えられる。また国際がん研究機関 (IARC) では1,4-ジオキサンは「ヒトに対する発がん性の可能性あり (グループ 2B)」と評価されている。1,4-ジオキサンは微量ながらも水道水中に存在することから、*in vivo* 遺伝毒性および発がん性について早急に明らかとする必要がある。遺伝毒性については *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 評価系を用い (魏分担報告)、発がん性については肝臓の前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞巢の評価を行った。

また、発がん性を検索できる新規早期前がん病変マーカー開発を目的とし、複数の膀胱発がん性物質で誘発された膀胱病変を対象とし、膀胱発がん性の早期検出バイオマーカーの同定を試みた。

さらに、ダンマル樹脂の発がんメカニズムを解明することを目的として、ダンマル樹脂投与によるエピジェネティック修飾機構の変化について評価を行った。ダンマル樹脂はフタバガキ科又はナンヨウスギ科の分泌液より、熱時エタノール又は酢酸エチルで抽出し、ろ液から溶媒を留去後、乾燥して得られたものである。

ダンマル樹脂の主成分は多糖類であり、飲料、冷菓、チューインガムなどの多くの飲食物に、天然食品添加物質（増粘安定剤、ガムベース）として使用されている。これまでに、我々は1年間慢性毒性試験および2年間発がん性試験を実施し、ダンマル樹脂はラット肝発がん性を有することを明らかにしてきた（平成18-20年度厚生労働科学研究）。また、*in vivo* 変異原性を検索できる *gpt delta* ラットを用いて、ダンマル樹脂が *in vivo* 変異原性陰性であったことから非遺伝毒性肝発がん物質であることを明らかにした（平成21-23年度厚生労働科学研究）。これらの結果から、ダンマル樹脂は非遺伝毒性的な発がんメカニズムを介して肝発がん作用を示す可能性が考えられた。非遺伝毒性的な発がんメカニズムとして、酸化ストレスの惹起、核内受容体の活性化を介した細胞増殖シグナルの発現異常、遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドにおける DNA のメチル化異常などが知られている。しかし、ダンマル樹脂の非遺伝毒性メカニズムに上記の分子機序が関与するかについては未だ不明である。そこで、本研究ではダンマル樹脂の発がんメカニズムを解明することを目的とし、DNA メチル化異常候補遺伝子の選定を行った。加えて、ダンマル樹脂誘発ラット肝発がん過程において、酸化ストレスの誘導および核内受容体の活性化の有無を検討した。

B. 研究方法

1. 1,4-ジオキサンの F344 ラットにおける肝発がん性の検討

[材料]

3週齢の雄性 F344 ラット 180匹を6群30匹ずつに分け、それぞれ1,4-ジオキサンを0, 2, 20, 200, 2000, 5000 ppmの濃度で飲水投与を16週間行った。なお、1,4-ジオキサンは蒸留水で混和し、基礎試料として CE-2(日本チャールズリバー)を与えて試験に供した。なお、動物実験については、大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリエーションシステムの動物室にて、室内の環境条件は温度 22 ± 2 度、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12時間蛍光灯照明、12時間消灯の条件下で行った。また、紙の床敷を入れたプラスチック製ケージに、3匹に分けて飼育し、ケージおよびチップを週1回交換した。屠殺までの実験期間中は、体重、摂餌量、摂水量を週1回測定した。

[GST-P 陽性細胞巢の評価]

試験期間終了後、麻酔下にて安楽殺を行い、肝臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定を行った。得られた肝臓組織から1スライドあたり3切片ずつ用いて評価を供した。GST-P 免疫組織化学染色標本は陽性細胞巢を構成する細胞が2個以上のものについて集計し、肝臓切片の面積で除して定量的評価を行った。

[BrdU 標識率の評価]

肝臓における1,4-ジオキサンの細胞増殖能を評価するために剖検の1時間前に

生理食塩水で希釈した 40 mg/ml BrdU を 100 mg/kgB.W. の用量で腹腔内投与した。剖検後、BrdU について免疫染色を行い、BrdU 陽性細胞の数を標本上の全肝細胞の数で除した標識率について定量的評価を行った。

2. 膀胱発がん性を検索できる早期前がん病変マーカーの開発

[実験 1] マイクロアレイを用いた膀胱がんで異常発現する遺伝子の同定

発がん機序が異なると思われる膀胱発がん物質、すなわち、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 誘発ラット膀胱がん、dimethylarsinic acid (DMA) 誘発ラットの膀胱がんに対し Affymetrix GeneChip を用いて遺伝子の mRNA 発現解析を行った。対照群としての同週齢の無処置ラット膀胱粘膜を用いた (図 1)。

[実験 2] 膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子の同定

実験 1 で同定した膀胱がん発現する遺伝子の中で BBN により誘発された早期増殖性病変においても過剰発現する遺伝子を同定し、膀胱がん早期検出マーカー候補遺伝子とした。実験は、6 週齢雄 F344 ラットに 0.05%BBN を 2、4、8 週投与し、リアルタイム RT-PCR をもち誘発した膀胱病変における mRNA 発現を検索した。

[実験 3] 他の膀胱発がん物質あるいは膀胱を標的にしない発がん物質を短期投

与した膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子の発現の検討

実験 2 で同定した 12 種類候補遺伝子について、7 種類の膀胱発がん物質 (BBN, DMA、2-acetylaminofluorene、phenethyl isothiocyanate、benzyl isothiocyanate、sodium *ortho*-phenylphenate、uracil) および 3 種類の非膀胱発がん物質である (肝発がん物質 diethylnitrosamine、腎発がん物質 *N*-ethyl-*N*-hydroxyethyl nitrosamine および大腸発がん物質 1,2-dimethylhydrazine) をそれぞれ 4 週投与した F344 ラット膀胱粘膜における mRNA 発現を検索した。

[実験 4] 膀胱発がん促進物質を短期投与した膀胱粘膜におけるマーカー候補遺伝子の発現の検討

Oncomodulin (OCM) と matrix metalloproteinase-3 (MMP3) について、膀胱発がん促進物質である Sodium ascorbate (NaAsc) および Propolis をそれぞれ 4 週投与した F344 ラット膀胱粘膜における mRNA 発現を検索した。

3. エピジェネティック異常を誘発する化学物質の検出法の開発

[検体]

5 週齢の雄性 F344 ラット 12 匹を 1 週間の馴化飼育後、6 匹ずつ 2 群に分け、それぞれにダンマル樹脂を 0、2 % の濃度で混餌投与を 4 週間行った。なお飼育期間中の飲料水については水道水を与え、餌水とともに 24 時間自由摂取させた。なお、動