

201327029A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

畜水産食品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

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成 26(2014)年 5 月

別添 2

目 次

I . 総括研究報告書

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	

II . 分担研究報告書

1. 発がん初期過程の細胞周期解析 -----	12
渋谷 淳	
(資料) 図 1-5	
2. ニトロフラン類の in vivo 遺伝毒性評価 -----	20
梅村 隆志	
(資料) 図 1-3、表 1-3	
3. 肝発がん促進シグナルの解析 -----	24
鈴木 和彦	
(資料) 表 1-5	

研究成果の刊行に関する一覧表 -----	30
----------------------	----

研究成果の刊行物・別刷 -----	31
-------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総括研究報告書（平成 25 年度）

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
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、動物用医薬品の発がん性に関して、①発がん性全般に対応可能な短期予測指標の確立、②ニトロフラン類の遺伝毒性発がん機序の解明、③新たな非遺伝毒性発がん機序の解明を目指す。

発がん初期過程の細胞周期解析研究では、発がん物質により誘導される細胞増殖活性の亢進をはじめとする一連の細胞周期変化の破綻過程の解明を図り、25年度はラットを用いて肝発がん物質と非発がん肝毒性物質の投与初期に誘発される細胞増殖亢進時、および肝部分切除による再生性増殖時に生じる細胞周期関連分子発現の変動を経時的に比較・検討した。次いで、ラットに対して弱い肝発がん性ないし肝発がん修飾作用が指摘されている動物用医薬品のラット 28 日間反復投与による反応性を検討した。細胞周期変化の破綻過程の解析の結果、投与開始後 3 日目では発がん性を問わず肝細胞毒性に対する反応性増殖が生じ、7 日目での G₁/S 期チェックポイント機能による細胞周期停止と細胞死の誘発を経て、28 日目には非発がん物質では細胞増殖性と細胞周期異常が終息するか、終息しない場合でもチェックポイント機構の破綻は伴わないことが示唆された。それに対し、発がん物質では G₁/S 期や M 期チェックポイントの破綻によって細胞増殖が持続し、それによって染色体不安定性を有する細胞が増加し、それが発がんへと関与している可能性が示唆された。動物用医薬品の解析の結果、28 日間反復投与により反応を示すものが認められず、発がんないし発がん促進用量ではなく最大耐量での解析、ないし、より長期の 90 日間反復投与での解析の必要性が考えられた。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価に関する研究では、ラット腎臓に発がん性が報告されているニトロフラントイン (NFT) の遺伝毒性機序を検索するため、C57BL/6J 系統の *Nrf2* 欠損 *gpt delta* マウスを作製した。予備的検討として、このマウスに NFT を 8 週間投与後、*gpt* および *Spi* assay を実施した結果、*gpt* 変異体頻度 (MF) は、何れの遺伝子型マウスでも高値を示し、遺伝子型間の比較では野生型よりホモ欠損型で高かった。従って、*Nrf2* は NFT の遺伝毒性機序に防御的に機能していることが明らかとなり、NFT の遺伝毒性発現機序に酸化ストレスの関与が強く示唆された。一方、*Spi* MF は欠損型のみで軽度上昇した。また、NFT の遺伝毒性に対する抗酸化剤の修飾効果を検討するためのラットを用いた予備試験を実施した結果、抗酸化剤による明らかな毒性影響は見られなかった。

新たな肝発がん促進シグナルの解析研究では、非ミクロソーム ROS 産生源である NADPH oxidase (NOX) に着目して、ラット二段階肝発がんモデルを用い、発がん促進時期で、肝発がん物質である piperonyl butoxide (PBO) を単独あるいは NOX 阻害剤 (Apocynin; APO) あるいは抗酸化剤 (*N*-acetyl cysteine; NAC) との併用効果を検討した。その結果、PBO による発がん促進作用に対して APO および NAC の抑制作用は認められず、PBO の発がん促進による肝前がん病変形成には NOX の関与の可能性は低いと推察された。

渋谷 淳

東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門
教授

梅村 隆志

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

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
准教授

活性の亢進をはじめとする一連の細胞周期変化の破綻過程の解明を図り、ラットを用いて発がん性ないし発がん修飾作用が指摘されている動物用医薬品等の発がん物質を投与した際の細胞周期関連分子発現の変動を経時的に検討する。ニトロフラン類の遺伝毒性発がん機序の解明に関する研究では、ニトロフラン類とその構成物質についてレポーター遺伝子変異原性解析と酸化的 DNA 損傷の定量解析を組み合わせ、化学構造に依存した *in vivo* 変異原性ならびにその発現機序の解明を図る。新たな非遺伝毒性発がん機序の解明に関する研究では、非ミクロソーム ROS 産生源である NADPH oxidase (NOX) に着目して、ラット二段階肝発がん促進時期での NOX シグナルの関与を検討する。以下にそれぞれの目的の詳細を述べる。

発がん初期過程の細胞周期解析

動物用医薬品等の化学物質の発がん性評価手法であるげっ歯類を用いた発がん性試験は、長期間に及ぶ投与のため、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題があり、短期発がん検出系の確立が求められている。殊に評価上問題となることの多い非遺伝

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、動物用医薬品の発がん性に関して、発がん性全般に対応可能な予測指標の確立、ニトロフラン類の遺伝毒性発がん機序の解明、及び新たな非遺伝毒性発がん機序の解明に関する研究を実施する。

発がん性全般に対応可能な予測指標の確立に関する研究では、発がん物質により誘導される細胞増殖

毒性発がん物質に関しては、多数の発がん標的に共通する検出の手立てがなく、有効な手法開発が望まれている。一方、ラットやマウスの肝臓ないし腎臓に発がん性を及ぼす化学物質の投与過程早期において、腫瘍性病変とは異なる巨大核の出現がしばしば見出されており、ゲノムの異数性を反映し、発がん好発部位に一致して、投与期間と共に増加することより、巨大核の出現に至る細胞内の分子過程に発がんの鍵となるものが存在する可能性が強く示唆されている。National Toxicology Program 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)。

研究代表者らは既に、げっ歯類を用いた発がん物質の 28 日間反復投与により、発がん標的性を問わず、標的細胞に増殖活性の亢進と共に、アポトーシスの亢進と G₂/M 期関連分子発現細胞が増加することを見出した。さらに肝発がん物質である thioacetamide (TAA) および腎発がん物質である ochratoxin A (OTA) の投与により、発がん標的細胞に M 期スピンドルチェックポイントで機能する Ubiquitin D (Ubd) の G₂ 期での異常発現を誘発することを見出した (Taniai *et al.*, 2012, Yafune *et al.*, 2013)。このことは発がん物質の投与早期における M 期チェックポイント制御機構の破綻が発がんメカニズムに関与していることを示唆し、細胞増殖性、アポトーシスの誘発、G₂/M 期関連分子発現細胞の増加、及び Ubd の異常発現が短期発がん予測に利用できる可能性を示唆した。また、肝臓、甲状腺、腺胃では、G₁/S 期チェックポイント分子である p21^{cip1} 陽性細胞も増加を示し、このチェックポイントの活性化もこれらの臓器での発がん指標になるものと考えられた。しかし、28 日間の反復投与で細胞増殖活性の亢進を与えない発がん物質での検出性、細胞傷害によって再生性に増殖活性を与える非発がん物質との鑑別には更に検討の余地がある。

本研究では、動物用医薬品等の発がん性全般に対応可能な予測指標の確立を目的として、25 年度は発がん物質により誘導される細胞増殖活性の亢進をはじめとする一連の細胞周期変化の破綻過程の解明を図り、ラットを用いて肝発がん物質と非発がん肝毒性物質の投与初期に誘発される細胞増殖亢進時、および肝部分切除による再生性増殖時に生じる細胞周期関連分子発現の変動を経時的に検討した。次いで、動物用医薬品のうち肝発がん性が疑われる物質とプロモーション作用を有する肝発がん物質に対して、短期発がん予測指標候補分子群の発がん検出性を検討する目的で、28 日間で細胞増殖亢進を誘発される

肝発がん物質を陽性対象として、7 ないし 28 日間反復投与時での反応性を検討した。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

動物用医薬品として使用される合成抗菌剤であるニトロフラン類 (NF 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。その中には遺伝毒性ならびに発がん性が報告されているものもあり、現在、ニトロフラントイン (NFT)、ニトロフラゾン、フラゾリドン、フラルタドンの 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、NF 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。

NF 類の構成物質であるニトロフランとヒドラジド誘導体は、それぞれ酸化的 DNA 損傷と特異的 DNA 付加体生成の可能性が考えられている。これまでに、*gpt delta* ラットを用いて、ラット腎臓に発がん性の報告のある NFT とその構成物質のニトロフルフルール (NAF) およびアミノヒダントイン (AHD) の *in vivo* 変異原性を検索したところ、NFT と NFA で陽性結果を示し、NFT では GC-TA トランスバージョン変異の上昇、腎 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの上昇も確認された。従って本研究では、NFT の *in vivo* 変異原性と酸化ストレスの関連性を検討して、NF 類の酸化ストレスを介した遺伝毒性機序の詳細を明らかにすることを目的とする。25 年度は、NFT の遺伝毒性機序と Nrf2 の関連性を検索する目的で、*nrf2* 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスを作製し、この動物を用いた解析のための予備実験を行った。また、NFT の遺伝毒性に対する抗酸化剤の修飾効果を検討する目的で、NFT と併用投与する抗酸化剤の用量設定のための予備試験を実施した

肝発がん促進シグナルの解析

ヒトや動物は環境汚染物質や食品中の種々の化学物質を経口的に摂取するが、その一部の物質は肝臓の薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) を誘導することにより (以下、CYP inducer と呼ぶ) 肝発がんのリスクを高めると考えられている。研究代表者と分担研究者らの研究グループでは、暴露されるリスクの高い CYP inducer として食品添加物、動物用医薬品、農薬に着目し、それらによる CYP の誘導がミクロソームにおける活性酸素種 (ROS) の産生増加およびそれによる酸化ストレス発現を惹起し、その酸化ストレスにより肝発がん促進作用を示すことを報告してきた (Kuwata *et al.*, 2011; Shimamoto *et al.*, 2011; Morita *et al.*, 2011; Tawfeeq *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2012)。しかし、現時点の発がん機序において活性酸素種 (ROS) との因果関係が明らかなものは酸化的 DNA 損傷に起因する突然変異の誘発のみで、ROS 産生と細胞増殖機構を繋ぐ分子メカニズムについては未だ不明な部分が多い。また、CYP inducer

であってもミクロソームで ROS 産生しない場合やミクロソーム ROS 産生が酸化ストレスの増強に繋がらない場合でも肝発がん促進作用が見られる場合もあり、新たな視点からの機序解明が急務であると考えられる。

細胞内ではミクロソーム以外でも ROS は産生され、その因子の一つとして膜蛋白である NADPH oxidase (NOX) が挙げられる。NOX は細胞膜成分 (gp91^{phox}, p22^{phox}) と細胞質成分 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, Rac 1) からなる複合体で、好中球やマクロファージなどの貪食細胞における抗菌作用を担う中心的な分子として知られている。これら貪食細胞のファゴソーム内にて NADPH を基質として NOX を介して酸素一分子よりスーパーオキシドが産生される。スーパーオキシド自体に抗菌作用はないが、superoxide dismutase により過酸化水素となり、Fenton 反応などを介してヒドロキシラジカルを産生し、また、myeloperoxidase の作用により次亜塩素酸を産生することで抗菌作用を示すことが知られている

(Kalyanaraman, 2013)。肝臓において NOX の関与を示す病態としてエタノール誘発性のアルコール性肝障害 (Thakur et al., 2006) や虚血・再灌流モデル (Liu et al., 2008) が知られており、クッパー細胞の活性化に伴い NOX を介した ROS 産生が亢進することで病態が進行することが示されている。

NOX は ROS 産生源であると同時に細胞内情報伝達因子としての役割も担い、貪食細胞以外の実質細胞においても、TGF- β 1 (Boudreau et al., 2012)、NF κ B (Wang et al., 2011)、Wnt/ β -catenin (Kato et al., 2012) ならびに PI3K/Akt (Huang et al., 2012) などを介した細胞増殖・分化、MAPK 経路や Wnt/ β -catenin/TCF 経路において TCF に対する FOXO による競合反応によるアポトーシスへの関与 (Parody et al., 2009, 2010) が示唆されている。これらの作用により NOX は種々の臓器における腫瘍細胞の増殖やアポトーシスの抑制、血管新生、浸潤、転移などがんの進展に関わる主要経路に関与することが示されている (Block and Gorin, 2012)。

分担研究者らのこれまでの研究において、フタル酸エステル的一种であるフタル酸ジヘプチル (DHP) のラットへの 90 日間投与により、肝臓における細胞増殖、glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性前がん病変の形成ならびに酸化性ストレス指標の変動とともに、NOX2 mRNA レベルならびに NOX2 陽性細胞の増加を確認している。また、別のフタル酸エステルであるフタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) との併用で、DEHP による PPAR α アゴニスト活性亢進に起因すると推測される拮抗作用により、細胞増殖、GST-P 陽性前がん病変の形成ならびに NOX 発現増加がいずれも抑制されることを確認している。これらの知見より NOX が肝発がん過程における前がん病変形成や細胞増殖に関与している可能性が示唆されている。これらのフタル酸エステルは peroxisome receptors-activated receptor α (PPAR α) の agonist であり、そのひとつである

Wy-14643 においてもクッパー細胞における NOX を介する ROS 産生が肝細胞の初期細胞増殖に関与していることが NOX 複合体の一つの構成要素 p47^{phox} の null マウスを用いた実験により示されている

(Rusyn et al., 2000)。しかし、同様の実験系を用いた Wy-14643 の長期間暴露における検討では NOX に関連した細胞増殖の増加は明らかとなっておらず (Woods et al., 2007)、化学物質誘発性の肝発がん過程における NOX の関与はいまだ不明な部分が多い。

本研究では、NOX を介した ROS による酸化ストレスが前がん病変形成を惹起する際の細胞内情報伝達経路である可能性を明らかにすることを目的とし、非遺伝毒性性肝発がん物質である piperonyl butoxide (PBO) を用いて肝中期発がん性試験を実施し、NOX 阻害剤の併用投与の細胞増殖、アポトーシスならびに前がん病変形成に与える影響について検討した。

B. 研究方法

発がん初期過程の細胞周期解析

動物実験

5 週齢の雄性 F344 ラットを日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、粉末基礎飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) と自由飲水にて馴化した。動物はバリア動物室のポリカーボネートケージにて、12 時間の明暗サイクル 23 \pm 3°C で、湿度 50 \pm 20% にて飼育した。

動物実験 1

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=20)、2/3 肝部分切除処置 (PH) 群 (n=22)、mthyleugenole (MEG) 群 (n=22)、thioacetamide (TAA) 群 (n=20)、acetaminophen (APAP) 群 (n=20)、 α -naphthyl isothiocyanate (ANIT) 群 (n=20)、promethazine hydrochloride (PMZ) 群 (n=22) に分けた。無処置対照群、PH 群、MEG 群、PMZ 群は、基礎飼料と水道水にて飼育し、その他の群はそれぞれ、TAA (400 ppm)、APAP (10,000 ppm)、ANIT (1000 ppm \rightarrow 600 ppm) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、MEG (1000 \rightarrow 800 mg/kg body weight) 群と PMZ (200 \rightarrow 100 mg/kg body weight) 群においては、それぞれ MEG と PMZ を毎日強制経口投与した。ANIT および PMZ 投与群では投与開始 3 日後に摂餌量の低下と体重減少が認められたため投与量を変更した。投与開始後 3、7 日後に各群半数ずつ CO₂/O₂ の吸入による深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、肝臓を摘出した。その後追加実験として、動物を無処置対照群 (n=10)、PH 群 (n=11)、MEG 群 (n=11)、TAA 群 (n=10)、APAP 群 (n=10)、ANIT 群 (n=10)、PMZ 群 (n=11) に分け、それぞれ TAA (400 ppm)、APAP (10,000 ppm)、ANIT (600 ppm)、MEG (1000 \rightarrow 800 mg/kg body weight)、PMZ (100 mg/kg body weight) の 28 日間反復投与試験を行い、投与終了後 CO₂/O₂ の吸入による深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、肝臓を摘出した。MEG 投与群で、投与開始 11 日目において自発運動の減少から 1 匹安楽

殺を行い、以後投与量を変更した。MEG および TAA は肝発がん物質として選出し、過去に行われた発がん性試験で肝臓に腫瘍形成が認められる用量を投与量として設定した。

動物実験 2

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=20)、methapyrilene (MP) 群 (n=20)、carbadox (CRB) 群 (n=20)、leucomalachite green (LMG) 群 (n=20)、 β -naphthoflavone (BNF) 群 (n=20)、oxfendazole (OXF) 群 (n=20)、promethazine hydrochloride (PMZ) 群 (n=22) に分けた。無処置対照群、PMZ 群は、基礎飼料と水道水にて飼育し、その他の群はそれぞれ、MP (1000 ppm)、CRB (300 ppm)、LMG (1160 ppm)、BNF (10,000 ppm)、OXF (500 ppm) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、PMZ (100 mg/kg body weight) 群においては、PMZ を毎日強制経口投与した。投与開始後 7、28 日後に各群半数ずつ CO₂/O₂ の吸入による深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、肝臓を摘出した。CRB および LMG は動物用医薬品であり、CRB は肝発がん性が報告されており、LMG は弱い肝発がん性が疑われている。MP、CRB は肝発がん物質として、BNF、OXF は肝発がんプロモーション物質として選出し、過去に行われた発がん性試験ないし二段階発がんモデルを用いた 6 週間のプロモーション後に、肝臓に腫瘍ないし前がん病変の形成が認められる用量を投与量として設定した。

摘出した肝臓は 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定し、4% PFA 固定後、肝臓の外側左葉および内側右左葉の最大断面をパラフィン包埋した。

免疫組織学的検索

免疫組織化学的検索として、採取した肝臓を PFA 固定後、エタノール系列で脱水、パラフィン包埋した後、薄切し、一部はヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を施した。免疫組織学的検索については、次の手順で行った。Ki-67、p21^{Cip1}、Mad2 については、脱パラフィン処理した組織切片を、内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3%過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、Ki-67 はオートクレーブ 121°C で 10 分間、p21^{Cip1} および Mad2 はマイクロウェーブ 95°C で 10 分間にて反応させて抗原の賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて正常ウマ血清でブロッキングし、マウス抗 Ki-67 抗体 (200 倍希釈; Dako, Denmark)、マウス抗 p21 抗体 (1000 倍希釈; Abcam, UK) 及びマウス抗 Mad2 抗体 (100 倍希釈; BD Transduction Laboratories, USA) を用いて 4°C で一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, USA) を用い、3,3'-ジアミノベンチジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。更に TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、 γ H2AX、cleaved caspase 3 の免疫組織学的解析については、次の手順で行った。脱パラフィン処理した肝組織切片を、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、 γ H2AX は 0.1 mmol/l

クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、オートクレーブ 121°C で 10 分間、cleaved caspase 3 は target retrieval solution 3-in-1 (pH 9.0) (Dako) に浸漬し、オートクレーブ 121°C で 10 分間にて反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3%過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、正常ヤギ血清でブロッキングし、ウサギ抗 TopoII α 抗体 (100 倍希釈; Abcam)、ウサギ抗 p-Histone H3 抗体 (100 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA)、ウサギ抗 γ H2AX 抗体 (100 倍希釈; Abcam)、ウサギ抗 Ubd 抗体 (100 倍希釈; Proteintech Group, USA)、ウサギ抗 Cleaved caspase 3 抗体 (100 倍希釈; Cell Signaling Technologies, USA) を用いて一晩反応させた。次いで二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) を用い、3,3'-ジアミノベンチジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

また、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 との免疫二重染色を行い、Ubd は二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) を用い、3,3'-ジアミノベンチジンにより発色させ、TopoII α および p-Histone H3 は二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC-AP kit (Vector Laboratories) を用い、Vector Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories) により発色させた。

免疫組織化学染色に対する解析

肝臓に免疫組織化学染色を施した後、Ki-67、p21^{Cip1}、Mad2、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、 γ H2AX は 200 倍視野で無作為に 10 視野選択して陽性細胞数を視覚的に計数し、cleaved caspase 3 は 100 倍視野で無作為に 5 視野選択して陽性細胞数を視覚的に計数した。そして、総肝細胞数を WinROOF image analysis and measurement software を用いて計数し、陽性肝細胞数の総肝細胞数に対する割合を求めた。

また Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 との免疫二重染色を行った後、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 が共発現する肝細胞数、Ubd もしくは TopoII α ないし p-Histone H3 が単独で発現する細胞数を計数した。

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。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。Bartlett 検定で当分散が認められた場合は Dunnett's multiple comparison test を行った。Bartlett 検定で等分散が認められなかった場合、Steel's test を実施した。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

実験 1: *Nrf2* ホモ欠損 (*Nrf2*^{-/-}) *gpt* delta マウスは、何れも C57BL/6J 系統の *gpt* をホモに導入した個体と *Nrf2* をホモに欠損した個体を交配し、両遺伝子のヘテロ型を作出し、この雌雄の交配により生じた 9 種類の遺伝子型の中から *gpt* をホモに持ち、*Nrf2* をヘ

テロに欠損した雌雄個体をさらに交配して作出した。*Nrf2*^{-/-} *gpt delta* マウスの雄 8 匹に、NFT を methyl cellulose (MC) に懸濁し、最大耐量の 70 mg/kg bw で、4 及び 8 週間、連続 5 日間の強制経口投与を行った。対照群には MC のみを投与した。同腹の野生型 (*Nrf2*^{+/+}) にも NFT を同様に投与した。この *Nrf2*^{+/+} については、今回総計で 5 匹しか作出できなかったため、維持用に継代している C57BL/6J 系 *gpt delta* マウス 11 匹を加え、総数 16 匹を対照群と NFT 投与の各群 8 匹に配した。剖検時は、腎臓を採取し、重量を測定した後、一部をホルマリン固定し、残りを凍結保存した。投与 8 週目の腎臓を用いて、*gpt* および Spi assay を実施した。*gpt* assay 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。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：雄の F344 系ラット、各群 3 匹に NFT をラット腎発がん用量の 125 mg/kg bw で連続 5 日間の強制経口投与を 2 週間行った。NFT は MC に懸濁し、対照群には MC のみを投与した。抗酸化剤の *N*-アセチルシステイン (NAC)、アスコルビン酸 (SAA) 及び α トコフェロール (α -TP) はそれぞれ 1 及び 2% の用量で、NFT 投与の 1 週間前から実験終了まで餌に混じて自由に摂取させた。投与期間中は、連日一般状態の観察を行い、体重及び摂餌量は 4 日ごとに測定した。解剖時、腎重量測定後、一部をホルマリン固定、残りを凍結保存した。対照群と NFT 単独投与群については、腎 DNA 中の 8-OHdG (8-OHdG/10⁵ dG) レベルを HPLC-DECD システム (Coulochem; ESA, Bedford, MA, USA) を用いて測定した。

肝発がん促進シグナルの解析

動物実験

6 週齢の雄性 F344 ラットを用い、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。試験開始時に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 PBO を単独 (15,000 ppm) あるいは NOX 阻害剤 (Apocynin; APO, 250 ppm) あるいは抗酸化剤 (NAC,

3000 ppm) と併用して混餌投与を 8 週間行った。対照群は基礎飼料で維持し、APO および NAC 単独処置群も設定した。動物は定法に従い、試験 3 週目に部分肝切除を行った。PBO は、これまでの実験で前がん病変指標である 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。APO および NAC もすでに報告のある投与用量を設定した。試験期間中、動物の体重、摂餌量および飲水量を毎週測定し、PBO、APO および NAC の試験期間中の平均摂取量を算出した。

投与期間終了後、イソフルランの深麻酔下にて血液を採取後、放血致死させ、肝臓を採取し、重量測定を行った。最終体重をもとに相対肝重量を算出した。血液より血漿を分離して血液生化学検査に供した。血液生化学的検査項目として、総蛋白、アルブミン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、クレアチニン、尿素窒素、グルコース、トリグリセライドおよび総コレステロールを測定した。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 4% パラホルムアルデヒド固定した後、パラフィン包埋を行った。

病理組織学的検査および免疫組織化学染色に対する解析

組織学的検索は薄切後に HE 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 GST-P 並びに細胞増殖活性マーカーである Ki-67、アポトーシスマーカーである active caspase-3 の免疫組織化学染色による観察を実施した。免疫組織学的染色については、次の手順で行った。脱パラフィン処理した組織切片を、内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3% 過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、Ki-67 については、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、active caspase-3 については、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に浸漬し、オートクレーブ 121°C で 10 分間にて反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて正常ウマ血清でブロッキングし、マウス抗 Ki-67 抗体 (50 倍希釈; Dako, Denmark) およびウサギ抗 cleaved caspase-3 (300 希釈; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) を用いて 4°C で一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, USA) を用い、3,3'-ジアミノベンチジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。前がん病変指標としてウサギ抗 GST-P 抗体 (1,000 倍希釈; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, Japan) を用いた。GST-P の染色手順は上記に準じたが抗原賦活処置は行わなかった。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、単位面積当たりの数および面積を算出した。

Ki-67 および active caspase-3 陽性肝細胞はランダムに選んだ領域の 1000 個以上の肝細胞当たりの百分率を求めた。

遺伝子発現解析では、ランダムに選んだ各群 6 例ずつを対象とし real-time RT-PCR 法にて第一相薬物代謝酵素である *Cyp1a1* と *Cyp2b1/2*、抗酸化酵素の *Nqo1* と *Gpx2*、NOX 関連因子 *Cybb* (*gp91phox/Nox2*) および *Rac1* の特異的 primer set を用いて定量解析した。発現量の補正は内部標準遺伝子である β アクチンを用いて実施した。

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。すべてのデータについて多群間比較を用い、Bartlett 検定で等分散を確認した後、一元配置分散分析を行った。有意差が認められた場合は Tukey's multiple comparison test を行った。Bartlett 検定で等分散でなかった場合、Steel-Dwass multiple comparison test を実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は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、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、国立大学法人東京農工大学動物実験小委員会、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、投与実験は混餌ないしは強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべて CO₂/O₂ ないしイン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。

C. 研究結果

発がん初期過程の細胞周期解析

動物実験 1

増殖活性およびアポトーシスの免疫組織学的解析

投与開始後 3 日目

Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した。

投与開始後 7 日目

Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で有意に増加した。

投与開始後 28 日目

Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した。

細胞周期関連分子の免疫組織学的解析

投与開始後 3 日目

TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、ANIT 群で有意に増加し、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。

p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、ANIT 群で有意に増加し、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。

Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、ANIT 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した。

γ H2AX 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、ANIT 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した。

p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群で有意に増加した。

投与開始後 7 日目

TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、MEG 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した。

p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に増加し、PH 群、MEG 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した。

Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、H 群、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した。

γ H2AX 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した。

p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で有意に増加した。

投与開始後 28 日目

TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加し、APAP 群で有意に減少した。

p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した。

Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加し、APAP 群で有意に減少した。

Mad2 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した。

γ H2AX 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した。

p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群、で有意に増加した。

Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色による解析

投与開始後 3 日目

増殖活性亢進が認められた PH 群、TAA 群、ANIT 群について増殖活性と Ubd の発現異常の関与を検討する目的で、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色を行った。その結果、p-Histone H3 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、PH 群で無処置対照群と比較して有意に減少し、Ubd 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は PH 群、ANIT 群で無処置対照群と比較して有意に減少した。また TopoII α 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、TAA 群、ANIT 群で無処置対照群と比較して有意に増加した。

投与開始後 7 日目

投与開始後 3 日目と同様の PH 群、TAA 群、ANIT 群について経時的変化を検討するために、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色を行った。その結果、p-Histone H3 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、各処置群で無処置対照群と比較して変動は認められなかった。TopoII α 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、PH 群、TAA 群、ANIT 群で無処置対照群と比較して有意に増加した。

投与開始後 28 日目

増殖活性の亢進が認められた MEG 群、TAA 群、PMZ 群について増殖活性と Ubd の発現異常の関与を検討する目的で、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色を行った。その結果、p-Histone H3 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、PMZ 群で無処置対照群と比較して有意に増加し、Ubd 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は MEG 群、TAA 群で無処置対照群と比較して有意に減少した。また TopoII α 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、MEG 群、TAA 群で無処置対照群と比較して有意に増加した。

動物実験 2

投与開始後 28 日目の肝臓の免疫組織化学的解析

Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MP 群、PMZ 群で有意に増加した。

TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MP 群で有意に増加した。

p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MP 群、PMZ 群で有意に増加した。

Cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MP 群で有意に増加した。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

実験 1 では、*Nrf2*^{-/-} の NFT 投与群で、開始 2 日目に死亡例が 1 例認められたが、その他の群に投与に起因する死亡は見られなかった。NFT 投与群では、*Nrf2*^{-/-} のみで投与 5 週目から体重の低値が認められた。腎重量では、いずれの遺伝子型でも、NFT 投与群で 4 および 8 週で明らかな変化は見られなかった。投与 8 週目の腎臓における *gpt* および *Spi* assay の結果のうち *gpt* MF は、*Nrf2*^{+/+} では、対照群では 0.77、

NFT 投与群では 1.35 で、対照群より約 1.8 倍増加した。*Nrf2*^{-/-} では、対照群では 0.81、NFT 投与群は 2.30 であり、約 2.8 倍増加した。両遺伝子型間の対照群の *gpt* MF に差異は認められなかったが、NFT 投与群の *gpt* MF は、統計学的有意差はなかったものの *Nrf2*^{-/-} では *Nrf2*^{+/+} に比して高値傾向を示した。一方、*Spi* MF は、NFT 投与により何れの遺伝子型においても軽度な上昇となったが、統計学的には *Nrf2*^{-/-} のみで有意な変化となった。

実験 2 では、抗酸化剤の NAC、SAA 及び α -TP を 1 及び 2% の用量で NFT の投与開始 1 週間前から混餌投与した結果、いずれの抗酸化剤投与群でも、摂餌忌避は示さなかった。NFT 投与 14 日目の体重は、NFT 単独群、NAC の 1% 及び α -TP の 2% 投与群で対照群より低値がみられた。腎相対重量は、対照群と比較して、NAC の 1 および 2%、AsA および α -TP の 2% 投与群で有意に増加した。NFT 単独群と抗酸化剤併用投与群との比較では、NAC の 2% 群で有意に増加した。溶媒対照群と NFT 単独群で、腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを測定した結果、NFT 群で有意に増加した。

肝発がん促進シグナルの解析

試験期間中、肝部分切除に起因して PBO 投与群で 1 匹、NAC 併用群で 2 匹が死亡した。これらの動物の死亡は PBO 処置による影響ではなかった。PBO 単独および併用群において、DEN 単独群と比較して、剖検時に体重の有意な低値が認められた。絶対及び相対肝重量は DEN 単独群と比較して、PBO 単独および併用群において有意に増加した。いずれの項目についても APO あるいは NAC の併用投与による影響は認められなかった。

血液生化学検査では DEN 単独群に比べ、PBO 単独および併用群において総蛋白、アルブミン、尿素窒素および総コレステロールの増加と AST、グルコースおよびトリグリセリドの低下が見られたが、APO あるいは NAC の併用投与による影響は認められなかった。APO および NAC 単独投与群では DEN 単独群に比べ総コレステロールの軽度の増加が認められた。

病理組織学的解析では、各群において変異肝細胞巢 (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 陽性肝細胞巢の数および面積は PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった。Ki-67 陽性細胞率ならびに active caspase-3 陽性細胞率も PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった。

Real-time RT-PCR でも、第一相薬物代謝酵素である *Cyp1a1* と *Cyp2b1/2*、抗酸化酵素の *Nqo1* と *Gpx2* では DEN 単独群に比較して PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった。一方、NOX 関連因子 *Cybb* (*gp91phox/Nox2*) および *Rac1* に有意な変化は見られ

なかった。

D. 考察

発がん初期過程の細胞周期解析

肝発がん物質により誘導される細胞増殖活性の亢進をはじめとする一連の細胞周期変化の破綻過程の解明を目的として実施した研究の結果、投与開始後3日目の時点では、PH群、TAA群、ANIT群でKi-67、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、DNA損傷指標の γ H2AX陽性細胞が無処置対照群と比較して増加し、p21^{Cip1}陽性細胞はTAA群、MEG群、APAP群で無処置対照群と比較して増加し、アポトーシス指標であるcleaved caspase 3陽性細胞はTAA群でのみ無処置対照群と比較して増加した。投与開始後7日目では、PH群、MEG群、TAA群、APAP群、ANIT群でKi-67、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、 γ H2AX陽性細胞が無処置対照群と比較して減少もしくは減少傾向を示し、MEG群、TAA群、APAP群、ANIT群ではp21^{Cip1}およびCleaved caspase 3陽性細胞が共に無処置対照群と比較して増加した。投与開始後28日目では、発がん物質であるMEGおよびTAA、非発がん物質であるPMZの投与によって、Ki-67、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、 γ H2AX、M期チェックポイントであるMad2陽性細胞が無処置対照群と比較して増加したが、p21^{Cip1}およびCleaved caspase 3陽性細胞はMEGおよびTAA投与によって無処置対照群と比較して増加したのに対し、PMZ投与では変化しなかった。

本研究では、投与開始後3日目で肝部分切除および肝発がん物質や非発がん性の肝毒性物質の投与によって、28日目では肝発がん物質や一部の非発がん性の肝毒性物質の投与の投与によって細胞増殖の亢進とともに細胞周期関連分子の発現細胞が増加しており、これらの分子発現パターンは発がん性を問わず細胞増殖を反映するものであることが示唆された。本研究で検討した分子群のうち、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)。また癌遺伝子であるNras^{G12V}を発現させたマウスの肝臓においてp21^{Cip1}を発現した老化細胞が増加し、それらの細胞が免疫反応によって時間とともに除去されていくことが報告されている

(Kang *et al.*, 2011)。本研究では、投与開始後7日目で肝発がん物質や非発がん性の肝毒性物質の投与により細胞増殖活性の低下とアポトーシスがp21^{Cip1}発現細胞の増加と同時に生じていたことから、この時期では発がん性を問わず、化学物質の投与によって傷害を受けた肝細胞が、G₁/Sチェックポイント分子であるp21^{Cip1}を発現することで細胞周期を停止させ、それと同時に損傷の修復が不可能な老化細胞が除去されていることが考えられた。一方で、投与開始後28日目で増殖活性の亢進を示す化学物質のうち発がん物質では、p21^{Cip1}の発現が増加しているにも関わらず、細胞増殖の亢進が持続しており、発がん物質

によって誘発される細胞増殖活性の亢進には細胞周期チェックポイントの破綻が関与していることが示唆された。

また、二重染色による解析の結果、投与開始後3日目では、PH群のみで、Ubdとp-Histone H3が共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して減少し、TAA群およびANIT群でUbdとTopoII α を共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して増加した。投与開始後7日目では、PH群、TAA群、ANIT群でUbdとp-Histone H3が共発現する細胞の割合は変動しないものの、UbdとTopoII α を共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して増加した。投与開始後28日目では、MEG群およびTAA群でUbdとp-Histone H3が共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して減少し、UbdとTopoII α を共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して増加したが、PMZ群ではこれらの変化は認められなかった。TopoII α は、G₂/M期に発現が最も上昇し、p-Histone H3はM期に発現することが知られている(Woessner *et al.*, 1991; Adachi *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004; Beekman *et al.*, 2006)。そのため、TAAおよびANIT投与開始後3日目とTAAおよびMEG投与開始後28日目においてUbdとTopoII α を共発現する細胞が増加したことから、発がん物質投与開始後28日目においてUbdとp-Histone H3を共発現する細胞が減少したことから、UbdがG₂期で発現している可能性が示唆された。

以前の報告より、Ubdが過剰に発現することで、M期スピンドルチェックポイント蛋白であるMad2のキネトコアへの局在を減らし、染色体不安定性をもたらすことが知られている(Lim *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2007)。そのため、化学物質投与初期と発がん物質の28日間反復投与で認められた、UbdのG₂期での異常発現は、M期チェックポイントの破綻による細胞増殖の亢進を反映しているものと考えられた。しかし、28日間の反復投与で増殖活性の亢進を示したPMZではUbdのG₂期での異常発現は認められなかったことから、化学物質の投与開始後28日目以降において、M期チェックポイントの破綻に起因する細胞増殖活性の亢進は発がん物質特異的に生じていることが示唆された。

本研究で、PMZの28日間反復投与によって細胞増殖活性の亢進と細胞周期関連分子の発現が上昇したが、p21^{Cip1}の発現やアポトーシスの亢進、UbdのG₂期での異常発現は認められず、肝部分切除による増殖時と分子発現パターンが類似しており、PMZの投与を続けていくにつれ、肝部分切除の場合と同様に増殖活性の亢進が終息していく可能性が考えられる。そのため、今後はより長期間の投与によってPMZによる増殖活性の亢進が持続するかどうかを検討する必要がある。

本研究の実験2において、増殖活性の亢進と細胞周期関連分子の発現増加はMP投与によってのみ認められ、他の発がん物質では認められなかった。研究代表者らが既に報告している肝発がん物質の28

日間反復投与試験でも発がん物質である piperonyl butoxide は増殖活性の亢進を示しておらず、このことから、本研究で用いている分子群を短期発がん予測指標として応用するためには、発がんしない発がん促進用量ではなく最大耐量での解析、ないし、90日間反復投与での解析の必要性が考えられた。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

実験1では、C57BL/6J系統の *Nrf2*^{-/-} *gpt delta* マウスに NFT を8週間投与し、*gpt* および Spi⁻ assay を実施したところ、何れの遺伝子型ともに、NFT 投与により *gpt* MF が有意に上昇した。また、遺伝子型間の比較で、*Nrf2*^{-/-} で *Nrf2*^{+/+} よりも *gpt* MF が上昇する傾向が見られたことから、*Nrf2* は NFT の遺伝毒性に対し防御的に作用している可能性が示唆された。*Nrf2* は γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GCL)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)、チオレドキシシン (TRX)、ヘム酸素添加酵素 (HO-1) など一連の抗酸化酵素群を制御する転写因子として知られている。今回、*Nrf2*^{-/-} で *gpt* MF の感受性が増強したことや、これまでの実験で、NFT を投与した *gpt delta* ラットの腎臓で 8-OHdG の上昇が確認されていることから、NFT の遺伝毒性には酸化ストレスが関与する可能性が強く考えられた。さらに *Nrf2* はグルタチオン S-転移酵素 (GST) や NF 類が共通して有するニトロ基の還元にも関与する NAD (P) H キノン還元酵素 (NQO1) などの薬物および化学物質などの異物代謝酵素群を制御していることも知られている。従って、NFT の代謝過程において、*Nrf2*^{-/-} ではこれらの反応阻害により蓄積した中間活性化体が、DNA、蛋白質または脂質などに付加するなど、何らかの分子機構を介して、遺伝毒性に対する感受性が増強したことも考えられた。また、これまでの実験では NFT の構成物質でありニトロ基を有する NFA でも遺伝毒性陽性結果が得られ、NFT の遺伝毒性発現機序には化学構造的にニトロ基が重要である可能性も示唆されている。従って今後は、*Nrf2*^{-/-} *gpt delta* マウスに NFT と NFA を投与し、NFT の化学構造依存的な遺伝毒性発現機序を探る実験を行う予定である。具体的には、C57BL/6J 系統の *Nrf2*^{-/-} *gpt delta* マウス、各群5匹に NFT と NFA を8週間、強制経口投与する。用量は今回の用量に低用量群を加え、NFT は70および35 mg/kg bw、NFA は NFT と同モルに相当する量として41.3および17.5 mg/kg bw を投与する。検索項目として、*in vivo* 変異原性試験、酸化的 DNA 損傷の定量解析、*Nrf2* の下流遺伝子の発現解析などを予定しており、現在、動物実験を開始した。

実験2では、NFT のラット腎における遺伝毒性への抗酸化剤の修飾効果を検討するために、その予備試験を実施した。NFT を2週間強制経口投与し、抗酸化剤の NAC、SAA および α -TP を1および2%の用量で NFT の投与1週間前から混餌投与した結果、投与期間中に抗酸化剤添加による明らかな摂餌忌避は見られなかった。最終体重では、NAC の1%及び α -TP の2%群で低値が見られたが、NFT 単独群でも

低値を示した。この3群は同ポイントで摂餌量が低値を示していることから、偶発的に生じた摂餌量の変化に関連した変化であると考えられた。腎相対重量では、溶媒対照群との比較で NAC の1および2%、SAA の2%、NAC の2%で増加した。NFT 単独群と抗酸化剤投与群との比較では NAC の2%のみで有意に増加した。これらの腎重量の変化については、統計学的に有意であるものの、比較的軽微な変化であり、さらに各群3例と動物数が少なかったため、明らかな投与による影響とは判断できなかった。従って、今後予定する試験での抗酸化剤の用量は、今回明らかな摂餌忌避や体重減少が生じなかった1および2%が妥当であると判断した。また、溶媒対照群と NFT 単独群で腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを測定した結果、NFT 単独群で有意に増加したことから、NFT は投与2週目から 8-OHdG レベルを上昇させる可能性が示唆された。しかし、その値は軽微な変動であったことから、抗酸化剤併用投与群での修飾効果の検討には不十分であった。従って、今後は 8-OHdG および *gpt* MF の上昇が明らかとなっている4および13週間に投与期間を延長し、NFT の遺伝毒性への修飾効果を検討する予定である。

肝発がん促進シグナルの解析

PBO は殺虫剤用共力剤であり、それ自体に殺虫効果はないが、他のピレスロイドとの併用によりその効果を高めることが知られており、国内を含め広く使用されている。PBO は肝臓の CYP1A および CYP2B inducers であり、ラットにおいて肝発がん promotion 作用を示すことが明らかとなっている

(Kawai et al., 2010; Morita et al., 2013)。その機序として ROS 産生の関与が示唆されているものの、ROS 産生源としての CYP の関与は明らかにされていない (Hara et al., 2014)。PBO の肝発がん促進過程には PTEN/Akt や TGF- β /Smad シグナルの発現異常が示唆されているため (Tania et al., 2009; Ichimura et al., 2010; Hara et al., 2014)、本研究ではそれらのシグナル伝達に関与する可能性のある非ミクロソーム ROS 産生源である NOX に着目して検討を行った。

その結果、GST-P 陽性巢の数と面積、Ki-67 陽性細胞率、active-caspase 3 陽性細胞率はいずれも PBO により増加した。NOX を介した薬物代謝非依存的な ROS 産生と全般的な ROS 産生の影響を確認する目的で、APO や NAC の併用効果を検討した。しかしながら、前がん病変、細胞増殖およびアポトーシスに対する APO や NAC による増加抑制は見られず、薬物代謝酵素や抗酸化酵素の mRNA 発現レベルも同様であった。また、PBO 投与による NOX 関連因子 *Cybb* (*gp91phox/Nox2*) および *Rac1* に有意な変化は見られなかった。これらの結果は、PBO による肝発がん促進機序には NOX が関与している可能性が低いことを示唆するものであった。*Rac1* 依存性の NOX2 発現は最も普遍的な NOX 活性経路であるが、NOX2 のホモログとして NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, DUOX1, DUOX2 などが知られており、ヒト

の肝細胞癌細胞株では NOX4 依存性の TGF- β 1 誘導性アポトーシスの発現が報告されている

(Carmona-Cuenca et al., 2008)。従って、今後、ラットの二段階発がんモデルにおいても NOX2 以外のホモログの発現についても検討を加える必要がある。なお、肝重量や一部の血液生化学的検査項目に PBO 投与の影響がみられたが、APO あるいは NAC の併用処置による影響は認められなかった。

APO (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) は *Apocynum cannabinum* や *Picrorhiza kurrora* などの植物の茎から分離、抽出された免疫調整物質であり、貪食細胞や非貪食細胞の NOX 活性を抑制することが報告されている (Stefanska and Pawliczak, 2008)。その抑制機序は完全には解明されていないが、p47^{phox} の細胞膜への移行阻害と考えられており、H₂O₂ や MPO の作用により形成された APO ラジカル (APO の 2 量体を含む) が p47^{phox} の thiol 基を酸化することによると考えられている。今回、APO による PBO の肝発がん促進効果が見いだせなかったが、グルタチオンやシステインなどのチオールが存在下では APO の作用が抑制されることが知られており、PBO によるグルタチオンの増加が NOX の効果発現に影響を及ぼした可能性が示唆された。PBO 投与ラットの肝臓におけるグルタチオン含量や GSH/GSSG の比率の検討はこれまでなされていないが、GSH の酸化酵素である *Gpx2* の mRNA レベルの増加が本実験やこれまでの研究で確認されている (Morita et al., 2013)。

APO は NOX 特異的な阻害剤であるが、NAC は一般的には抗酸化剤という区分に属する物質である。NAC はこれまでの報告では PPAR α アゴニスト (CYP4A inducer) による肝発がん促進過程に対しては修飾作用を示さず (Nishimura et al., 2009)、CYP1A inducer (Indole-3-carbinol) には抑制効果を示していた (Shimamoto et al., 2011)。GST-P 陽性肝細胞巣を指標とした Indole-3-carbinol の肝発がん促進作用は NAC 併用処置により軽減されたものの、Cyp1A mRNA 発現レベルやミクロソームの ROS 産生、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の発現レベルについての抑制効果は伴っておらず、Indole-3-carbinol についても CYP の誘導と肝発がん促進機構との関連性は明らかとなっていない。今回、CYP1A inducer である PBO 投与の肝臓において NAC 併用処置による修飾作用を見出せなかったことから、同種の薬物代謝酵素を誘導する薬剤においても発がん促進作用に関与する機序が異なる可能性が示唆された。

PBO 投与による NOX 関連遺伝子の発現が検出できなかった理由とし、PBO そのものが NOX 誘発性を有しなかった可能性に加え、標準的なラット二段階肝発がんモデルでは、試験系や観察期間を含め NOX 関連分子の変動をとらえることが難しかったことが挙げられる。従って、NOX の発現の高い肝内環境を設定するなどの実験系の改善が必要であると考えられる。NOX の関与する肝傷害として脂肪性肝疾患モデルが知られている。動物に高脂肪食を与え

ることで NOX の発現増加に伴って脂質過酸化が増加し (Matsunami et al., 2010)、APO 投与により肝脂肪化が軽減することが知られている (Lu et al., 2006)。高脂肪食摂取による脂肪肝は非アルコール性脂肪性肝疾患と呼ばれ、非アルコール性脂肪肝炎やそれに続く肝線維症を経て肝発がんにいたる進行性疾患として知られている (Sheedfar et al., 2013)。このような NOX 高発現環境下において被験物質の肝発がん性を検討することで、NOX の関与する肝発がん促進過程を明確化できる可能性が考えられる。次年度は、背景的に NOX の発現が高いことが示されている脂肪肝モデルを中期肝発がん性試験に適用し、NOX 高発現環境下において肝がん促進効果を検討する予定である。

E. 結論

発がん初期過程の細胞周期解析

ラットを用いた化学物質の反復投与によって、投与初期では、化学物質によっては発がん性を問わず反応性に肝細胞の増殖活性が亢進し、その後 G₁/S 期チェックポイント機能による細胞周期停止および細胞死を引き起こすことが考えられた。そして非発がん物質では投与を続けると傷害をうけた肝細胞の除去と、化学物質に対する適応から細胞増殖活性と細胞周期異常が回復し、増殖活性が亢進する場合でも細胞周期チェックポイント機構の破綻は伴わないことが示唆された。一方で、発がん物質では投与を続けると、チェックポイント機構の破綻によって G₁/S 期や M 期チェックポイント機能からすり抜ける細胞が出現し、それらの細胞が増殖を持続することで、染色体不安定性を有する細胞が増加し、それが発がんへと導かれている可能性が示唆された。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

NFT は 8 週間の投与で C57BL/6J 系統の *Nrf2*^{-/-} *gpt* delta マウスならびにその野生型の腎 DNA 中の *gpt* MF を有意に上昇させた。また *Nrf2*^{-/-} でより高感受性を示したことから、その遺伝毒性発現機序に酸化ストレスが関与することが強く示唆された。本結果を踏まえ、今後は C57BL/6J 系統の *Nrf2*^{-/-} *gpt* delta マウスに NFT あるいはその構成物質である NFA を 8 週間投与して、NF 類の酸化ストレスを介した遺伝毒性発現機序の詳細を明らかにする。また、F344 ラットに NFT と NAC、SAA 及び α -TP を 1 及び 2% で 2 週間併用投与した結果、この用量での各抗酸化剤投与に起因する明らかな摂餌忌避や毒性影響を示さないことが明らかとなった。今後は投与期間を 4 ならびに 13 週間に延長して、NFT のラット腎における遺伝毒性への抗酸化剤の修飾効果を明らかにする。

肝発がん促進シグナルの解析

肝発がん促進過程における NOX の関与をラット肝二段階発がんモデルを用いて検討したが、PBO の発がん促進過程においては NOX の関与を示唆する知見は得られなかった。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Nakane, F., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Expression patterns of cell cycle proteins in the livers of rats treated with hepatocarcinogens for 28 days. Arch. Toxicol. 87(6): 1141–1153, 2013.

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

Yafune, A., Taniai, E., Morita, R., Akane, H., Kimura, M., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Immunohistochemical cellular distribution of proteins related to M phase regulation in early proliferative lesions induced by tumor promotion in rat two-stage carcinogenesis models. Exp. Toxicol. Pathol. 66(1):1–11, 2014.

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

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

2. 学会発表

八舟宏典、谷合枝里子、盛田怜子、赤根弘敏、Wang Liyun、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳：ラットを用いた様々な発がん標的臓器での発がん促進時早期における細胞周期分子の発現特性。第40回日本毒性学会学術集会、幕張、第40回日本毒性学会学術集会講演要旨集：P-194, p.S363, 6月17-19日, 2013

盛田怜子、八舟宏典、赤根弘敏、板橋 恵、白木彩子、鈴木和彦、渋谷 淳、三森国敏：Phenobarbital (PB) と Piperonyl butoxide (PBO) の併用投与によるラット肝発がんプロモーション作用の修飾に関する研究。第40回日本毒性学会学術集会、幕張、第40回日本毒性学会学術集会講演要旨集：P-67, p.S300, 6月17-19日, 2013

盛田 怜子、林 仁美、勢川 理紗、鈴木 和彦、渋谷 淳、三森 国敏：CYP誘導剤の肝発がん促進作用に対する相互作用。第28回発癌病理研究会、於沖縄、第28回発癌病理研究会プログラム：p. 34(演題19), 8月26-28日, 2013

Reiko Morita, Ayako Shiraki, Megu Itahashi, Kazuhiko

Suzuki, Makoto Shibutani, Kunitoshi Mitsumori: Modification of Combined Administration of CYP Inducers in Rat Liver Tumor Promoting Activity. 11th European Congress of Toxicologic Pathology, Ghent, Belgium, P17, p.80, September 10–13, 2013

盛田怜子、白木彩子、板橋 恵、鈴木和彦、渋谷 淳、三森国敏：CYP誘導剤併用投与の肝発がん促進作用に対する影響。第156回日本獣医学会、岐阜、第156回日本獣医学会学術集会講演要旨集：B65, p.223, 9月20-22日, 2013

木村真之、盛田怜子、阿部 一、田中 猛、鈴木和彦、村上智亮、吉田敏則、渋谷 淳：ラットの発がん物質投与初期に誘発される増殖活性亢進時における細胞周期制御異常の特異性に関する検討。第30回日本毒性病理学会学術集会、徳島、第30回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集：P-42, p.85, 1月30日-1月31日, 2014

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

分担研究報告書（平成 25 年度）

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

分担課題：発がん初期過程の細胞周期解析

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究要旨

我々はこれまでに、発がん標的性の異なる発がん物質をラットに 28 日間反復投与した際に、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、 G_1/S 期のチェックポイント蛋白である $p21^{Cip1}$ と G_2/M 期に機能する Topoisomerase II α と M 期に機能する p-Histone H3 の陽性細胞およびアポトーシスの頻度が増加することを見出した。また、肝ないし腎発がん物質での検索で、M 期チェックポイントを制御する Ubiquitin D の G_2 期からの異常発現を見出した。本研究では動物用医薬品の短期発がん予測系の確立を目的として、今年度は、発がん物質により誘導される細胞増殖活性の亢進をはじめとする一連の細胞周期変化の破綻過程の解明を図り、ラットを用いて肝発がん物質と非発がん肝毒性物質の投与初期に誘発される細胞増殖亢進時、および肝部分切除による再生性増殖時に生じる細胞周期関連分子発現の変動を経時的に検討した。次いで、ラットに対して弱い肝発がん性ないし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指摘されている動物用医薬品のラット 28 日間反復投与による反応性を検討した。細胞周期変化の破綻過程の実験として、ラットに 2/3 肝部分切除 (PH) および肝発がん物質である methyleugenol (MEG)、thioacetamide (TAA)、非発がん肝毒性物質である acetaminophen (APAP)、 α -naphthyl isothiocyanate (ANIT)、promethazine hydrochloride (PMZ) の反復投与を行い、PH 後あるいは投与開始後 3、7、28 日目に肝臓の免疫組織学的解析を実施した。3 日目では、PH 群、TAA 群、ANIT 群では増殖活性と細胞周期関連分子群の発現が増加し、TAA 群と ANIT 群においては G_2 期に Ubd を発現する細胞の割合が増加した。7 日目では、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で増殖活性の抑制および細胞周期関連分子群の発現低下、 $p21^{Cip1}$ の発現増加およびアポトーシスの亢進を示した。28 日目では、MEG 群、TAA 群、PMZ 群において増殖活性の亢進と細胞周期関連分子の発現増加が認められ、そのうち、MEG 群および TAA 群では $p21^{Cip1}$ の発現増加、アポトーシスの亢進および G_2 期に Ubd を発現する細胞の割合が増加した。これらの結果より、3 日目では発がん性を問わず肝細胞毒性に対する反応性増殖が生じ、7 日目での G_1/S 期チェックポイント機能による細胞周期停止と細胞死の誘発を経て、28 日目には非発がん物質では細胞増殖性と細胞周期異常が終息するか、終息しない場合でもチェックポイント機構の破綻は伴わないことが示唆された。それに対し、発がん物質では G_1/S 期や M 期チェックポイントの破綻によって細胞増殖が持続し、それによって染色体不安定性を有する細胞が増加し、それが発がんへと関与している可能性が示唆された。動物用医薬品の解析として、methapyrilene (MP)、carbadox (CRB)、leucomalachite green (LMG)、 β -naphthoflavone (BNF)、oxfendazole (OXF)、promethazine hydrochloride (PMZ) の 28 日間反復投与での解析を行った。CRB および LMG は動物用医薬品であり、CRB は発がん性が報告されており、LMG は発がん性が疑われている。MP、CRB は肝発がん物質として、BNF、OXF は肝発がんプロモーション物質として選出した。Ki-67、TopoII α 、p-Histone H3、cleaved caspase 3 陽性細胞率の解析の結果、動物用医薬品で 28 日間反復投与により反応を示すものが認められず、発がんないし発がん促進用量ではなく最大耐量での解析、ないし、90 日間反復投与での解析の必要性が考えられた。

A. 研究目的

動物用医薬品等の化学物質の発がん性評価手法であるげっ歯類を用いた発がん性試験は、長期間に及ぶ投与のため、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題があり、短期発がん検出系の確立が求められている。殊に評価上問題となることの多い非遺伝毒性発がん物質に関しては、多数の発がん標的に共通する検出の手立てがなく、有効な

手法開発が望まれている。一方、ラットやマウスの肝臓ないし腎臓に発がん性を及ぼす化学物質の投与過程早期において、腫瘍性病変とは異なる巨大核の出現がしばしば見出されており、ゲノムの異数性を反映し、発がん好発部位に一致して、投与期間と共に増加することより、巨大核の出現に至る細胞内の分子過程に発がんの鍵となるものが存在する可能性が強く示唆されている。National

別添 4

Toxicology Program 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)。

我々は既に、げっ歯類を用いた発がん物質の 28 日間反復投与により、発がん標的性を問わず、標的細胞に増殖活性の亢進と共に、アポトーシスの亢進と G₂/M 期関連分子発現細胞が増加することを見出した。さらに肝発がん物質である thioacetamide (TAA) および腎発がん物質である ochratoxin A (OTA) の投与により、発がん標的細胞に M 期スピンドルチェックポイントで機能する Ubiquitin D (Ubd) の G₂ 期での異常発現を誘発することを見出した (Taniai *et al.*, 2012, Yafune *et al.*, 2013)。このことは発がん物質の投与早期における M 期チェックポイント制御機構の破綻が発がんメカニズムに関与していることを示唆し、細胞増殖性、アポトーシスの誘発、G₂/M 期関連分子発現細胞の増加、及び Ubd の異常発現が短期発がん予測に利用できる可能性を示唆した。また、肝臓、甲状腺、腺胃では、G₁/S 期チェックポイント分子である p21^{cip1} 陽性細胞も増加を示し、このチェックポイントの活性化もこれらの臓器での発がん指標になるものと考えられた。しかし、28 日間の反復投与で細胞増殖活性の亢進を与えない発がん物質での検出性、細胞傷害によって再生性に増殖活性を与える非発がん物質との鑑別には更に検討の余地がある。

本研究では、動物用医薬品等の発がん性全般に対応可能な予測指標の確立を目的として、本年度は発がん物質により誘導される細胞増殖活性の亢

進をはじめとする一連の細胞周期変化の破綻過程の解明を図り、ラットを用いて肝発がん物質と非発がん肝毒性物質の投与初期に誘発される細胞増殖亢進時、および肝部分切除による再生性増殖時に生じる細胞周期関連分子発現の変動を経時的に検討した。次いで、動物用医薬品のうち肝発がん性が疑われる物質とプロモーション作用を有する肝発がん物質に対して短期発がん予測指標候補分子群の発がん検出性を検討する目的で、28 日間で細胞増殖亢進を誘発される肝発がん物質を陽性対象として、7 ないし 28 日間反復投与時での反応性を検討した。

B. 研究方法

動物実験

5 週齢の雄性 F344 ラットを日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、粉末基礎飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) と自由飲水にて馴化した。動物はバリア動物室のポリカーボネートケージにて、12 時間の明暗サイクル 23 ± 3°C で、湿度 50 ± 20%にて飼育した。

動物実験 1

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=20)、2/3 肝部分切除処置 (PH) 群 (n=22)、mthyleugenole (MEG) 群 (n=22)、thioacetamide (TAA) 群 (n=20)、acetaminophen (APAP) 群 (n=20)、 α -naphthyl isothiocyanate (ANIT) 群 (n=20)、promethazine hydrochloride (PMZ) 群 (n=22) に分けた。無処置対照群、PH 群、MEG 群、PMZ 群は、基礎飼料と水道水にて飼育し、その他の群はそれぞれ、TAA (400 ppm)、APAP (10,000 ppm)、ANIT (1000 ppm→600 ppm) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、MEG (1000→800 mg/kg body weight) 群と PMZ (200→100 mg/kg body weight) 群においては、それぞれ MEG と PMZ を毎日強制経口投与した。ANIT および PMZ 投与群では投与開始 3 日後に摂餌量の低下と体重減少が認められたため投与量を変更した。投与開始後 3、

別添 4

7 日後に各群半数ずつ CO₂/O₂ の吸入による深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、肝臓を摘出した。その後追加実験として、動物を無処置対照群 (n=10)、PH 群 (n=11)、MEG 群 (n=11)、TAA 群 (n=10)、APAP 群 (n=10)、ANIT 群 (n=10)、PMZ 群 (n=11) に分け、それぞれ TAA (400 ppm)、APAP (10,000 ppm)、ANIT (600 ppm)、MEG (1000 → 800 mg/kg body weight)、PMZ (100 mg/kg body weight) の 28 日間反復投与試験を行い、投与終了後 CO₂/O₂ の吸入による深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、肝臓を摘出した。MEG 投与群で、投与開始 11 日目において自発運動の減少から 1 匹安楽殺を行い、以後投与量を変更した。MEG および TAA は肝発がん物質として選出し、過去に行われた発がん性試験で肝臓に腫瘍形成が認められる用量を投与量として設定した。

動物実験 2

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=20)、methapyrilene (MP) 群 (n=20)、carbadox (CRB) 群 (n=20)、leucomalachite green (LMG) 群 (n=20)、β-naphthoflavone (BNF) 群 (n=20)、oxfendazole (OXF) 群 (n=20)、promethazine hydrochloride (PMZ) 群 (n=22) に分けた。無処置対照群、PMZ 群は、基礎飼料と水道水にて飼育し、その他の群はそれぞれ、MP (1000 ppm)、CRB (300 ppm)、LMG (1160 ppm)、BNF (10,000 ppm)、OXF (500 ppm) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、PMZ (100 mg/kg body weight) 群においては、PMZ を毎日強制経口投与した。投与開始後 7、28 日後に各群半数ずつ CO₂/O₂ の吸入による深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、肝臓を摘出した。CRB および LMG は動物用医薬品であり、CRB は肝発がん性が報告されており、LMG は弱い肝発がん性が疑われている。MP、CRB は肝発がん物質として、BNF、OXF は肝発がんプロモーション物質として選出し、過去に行われた発がん性試験ないし二段階発がんモデルを用いた 6 週間のプロモーション後に、肝臓に腫瘍ないし前がん

病変の形成が認められる用量を投与量として設定した。

摘出した肝臓は 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定し、4% PFA 固定後、肝臓の外側左葉および内側右左葉の最大断面をパラフィン包埋した。

動物実験計画は、国立大学法人東京農工大学の動物実験倫理委員会に提出して承認を受け、動物の取り扱いについても、同大学の実験動物指針を遵守した。

免疫組織学的検索

免疫組織化学的検索として、採取した肝臓を PFA 固定後、エタノール系列で脱水、パラフィン包埋した後、薄切し、一部は HE 染色を施した。免疫組織学的検索については、次の手順で行った。Ki-67、p21^{Cip1}、Mad2 については、脱パラフィン処理した組織切片を、内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3%過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、Ki-67 はオートクレーブ 121°C で 10 分間、p21^{Cip1} および Mad2 はマイクロウェーブ 90°C で 10 分間にて反応させて抗原の賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて正常ウマ血清でブロッキングし、マウス抗 Ki-67 抗体 (200 倍希釈 ; Dako, Denmark)、マウス抗 p21 抗体 (1000 倍希釈 ; Abcam, UK) 及びマウス抗 Mad2 抗体 (400倍希釈 ; BD Transduction Laboratories, USA) を用いて 4°C で一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, USA) を用い、3,3'-ジアミノベンチジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。更に TopoIIα、p-Histone H3、Ubd、γH2AX、cleaved caspase 3 の免疫組織学的解析については、次の手順で行った。脱パラフィン処理した肝組織切片を、TopoIIα、p-Histone H3、Ubd、γH2AX は 10 mmol/l クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に浸漬し、オートクレーブ 121°C で 10 分間、cleaved caspase 3 は target

別添 4

retrieval solution 3-in-1 (pH 9.0) (Dako) に浸漬し、オートクレーブ 121°C で 10 分間にて反応させ抗原賦活化を行い、室温になるまで冷却した。続いて内因性ペルオキシダーゼ処理として 0.3%過酸化水素を含むメタノール液で 30 分間処理した後、正常ヤギ血清でブロッキングし、ウサギ抗 TopoII α 抗体 (400倍希釈; Abcam)、ウサギ抗 p-Histone H3 抗体 (400倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA)、ウサギ抗 γ H2AX 抗体 (1000倍希釈; Abcam)、ウサギ抗 Ubd 抗体 (500倍希釈; Proteintech Group, USA)、ウサギ抗 Cleaved caspase 3 抗体 (500倍希釈; Cell Signaling Technologies, USA) を用いて一晚反応させた。次いで二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) を用い、3,3'-ジアミノベンチジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。

また、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 との免疫二重染色を行い、Ubd は二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) を用い 3,3'-ジアミノベンチジンにより発色させ、TopoII α および p-Histone H3 は二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC-AP kit (Vector Laboratories) を用い、Vector Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories) により発色させた。

免疫組織化学染色に対する解析

肝臓に免疫組織化学染色を施した後、Ki-67、p21^{Cip1}、Mad2、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、 γ H2AX は 200 倍視野で無作為に 10 視野選択して陽性細胞数を視覚的に計数し、cleaved caspase 3 は 100 倍視野で無作為に 5 視野選択して陽性細胞数を視覚的に計数した。そして、総肝細胞数を WinROOF image analysis and measurement software を用いて計数し、陽性肝細胞数の総肝細胞数に対する割合を求めた。

また Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 との免疫二重染色を行った後、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 が共発現する肝細胞数、Ubd もしくは TopoII α ないし p-Histone H3 が単独で発現する

細胞数を計数した。

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。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。Bartlett 検定で当分散が認められた場合は Dunnett's multiple comparison test を行った。Bartlett 検定で等分散が認められなかった場合、Steel's test を実施した。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与と強制経口投与が主体であり、また、動物はすべて深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に抑えた。また、動物飼育、管理に当たっては、東京農工大学の利用規定および米国国立衛生研究所 (NIH) が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

動物実験 1

増殖活性およびアポトーシスの免疫組織学的解析
投与開始後 3 日目

Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した (Fig. 1a)。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した (Fig. 1b)。

投与開始後 7 日目

Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した (Fig. 1c)。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で有意に増加した (Fig. 1d)。

投与開始後 28 日目

Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、

別添 4

MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した (Fig. 1e)。Cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した (Fig. 1f)。

細胞周期関連分子の免疫組織学的解析

投与開始後 3 日目

TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、ANIT 群で有意に増加し、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した (Fig. 2a)。

p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、ANIT 群で有意に増加し、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した (Fig. 2b)。

Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、ANIT 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した (Fig. 2c)。

γ H2AX 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、TAA 群、ANIT 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した (Fig. 2d)。

p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群で有意に増加した (Fig. 2e)。

投与開始後 7 日目

TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、MEG 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した (Fig. 3a)。

p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に増加し、PH 群、MEG 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した (Fig. 3b)。

Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、H 群、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した (Fig. 3c)。

γ H2AX 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、APAP 群、ANIT 群で有意に減少した (Fig. 3d)。

p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で有意に増加した (Fig. 3e)。

投与開始後 28 日目

TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加し、APAP 群で有意に減少した (Fig. 4a)。

p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した (Fig. 4b)。

Ubd 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、PH 群、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加し、APAP 群で有意に減少した (Fig. 4c)。

Mad2 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した (Fig. 4d)。

γ H2AX 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した (Fig. 4e)。

p21^{Cip1} 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、APAP 群、有意に増加した (Fig. 4f)。

Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色による解析

投与開始後 3 日目

増殖活性亢進が認められた PH 群、TAA 群、ANIT 群について増殖活性と Ubd の発現異常の関与を検討する目的で、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色を行った。その結果、p-Histone H3 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、PH 群で無処置対照群と比較して有意に減少し、Ubd 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は PH 群、ANIT 群で無処置対照群と比較して有意に減少した (Fig. 5a)。また TopoII α 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、TAA 群、ANIT 群で無処置対照群と比較して有意に増加した (Fig. 5b)。

投与開始後 7 日目

投与開始後 3 日目と同様の PH 群、TAA 群、ANIT

別添 4

群について経時的変化を検討するために、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色を行った。その結果、p-Histone H3 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、各処置群で無処置対照群と比較して変動は認められなかった (Fig. 5c)。

TopoII α 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、PH 群、TAA 群、ANIT 群で無処置対照群と比較して有意に増加した (Fig. 5d)。

投与開始後 28 日目

増殖活性の亢進が認められた MEG 群、TAA 群、PMZ 群について増殖活性と Ubd の発現異常の関与を検討する目的で、Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の二重染色を行った。その結果、p-Histone H3 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、PMZ 群で無処置対照群と比較して有意に増加し、Ubd 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は MEG 群、TAA 群で無処置対照群と比較して有意に減少した (Fig. 5e)。また TopoII α 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、MEG 群、TAA 群で無処置対照群と比較して有意に増加した (Fig. 5f)。

動物実験 2

投与開始後 28 日目の肝臓の免疫組織化学的解析

Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MP 群、PMZ 群で有意に増加した。

TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MP 群で有意に増加した。

p-Histone H3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MP 群、PMZ 群で有意に増加した。

Cleaved caspase 3 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MP 群で有意に増加した。

D. 考察

肝発がん物質により誘導される細胞増殖活性の亢進をはじめとする一連の細胞周期変化の破綻過程の解明を目的として実施した研究の結果、投与開始後 3 日目の時点では、PH 群、TAA 群、ANIT

群で Ki-67、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、DNA 損傷指標の γ H2AX 陽性細胞が無処置対照群と比較して増加し、p21^{Cip1} 陽性細胞は TAA 群、MEG 群、APAP 群で無処置対照群と比較して増加し、アポトーシス指標である cleaved caspase 3 陽性細胞は TAA 群でのみ無処置対照群と比較して増加した。投与開始後 7 日目では、PH 群、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群で Ki-67、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、 γ H2AX 陽性細胞が無処置対照群と比較して減少もしくは減少傾向を示し、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群では p21^{Cip1} および Cleaved caspase 3 陽性細胞が共に無処置対照群と比較して増加した。投与開始後 28 日目では、発がん物質である MEG および TAA、非発がん物質である PMZ の投与によって、Ki-67、TopoII α 、p-Histone H3、Ubd、 γ H2AX、M 期チェックポイントである Mad2 陽性細胞が無処置対照群と比較して増加したが、p21^{Cip1} および Cleaved caspase 3 陽性細胞は MEG および TAA 投与によって無処置対照群と比較して増加したのに対し、PMZ 投与では変化しなかった。

本研究では、投与開始後 3 日目で肝部分切除および肝発がん物質や非発がん性の肝毒性物質の投与によって、28 日目では肝発がん物質や一部の非発がん性の肝毒性物質の投与の投与によって細胞増殖の亢進とともに細胞周期関連分子の発現細胞が増加しており、これらの分子発現パターンは発がん性を問わず細胞増殖を反映するものであることが示唆された。本研究で検討した分子群のうち、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)。また癌遺伝子である Nras^{G12V} を発現させたマウスの肝臓において p21^{Cip1} を発現した老化細胞が増加し、それらの細胞が免疫反応によって時間とともに除去されていくことが報告されている (Kang *et al.*, 2011)。本研究では、投与開始後 7 日目で肝発がん物質や

別添 4

非発がん性の肝毒性物質の投与により細胞増殖活性の低下とアポトーシスが p21^{Cip1} 発現細胞の増加と同時に生じていたことから、この時期では発がん性を問わず、化学物質の投与によって傷害を受けた肝細胞が、G₁/S チェックポイント分子である p21^{Cip1} を発現することで細胞周期を停止させ、それと同時に損傷の修復が不可能な老化細胞が除去されていることが考えられた。一方で、投与開始後 28 日目で増殖活性の亢進を示す化学物質のうち発がん物質では、p21^{Cip1} の発現が増加しているにも関わらず、細胞増殖の亢進が持続しており、発がん物質によって誘発される細胞増殖活性の亢進には細胞周期チェックポイントの破綻が関与していることが示唆された。

また、二重染色による解析の結果、投与開始後 3 日目では、PH 群のみで、Ubd と p-Histone H3 が共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して減少し、TAA 群および ANIT 群で Ubd と TopoIIα を共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して増加した。投与開始後 7 日目では、PH 群、TAA 群、ANIT 群で Ubd と p-Histone H3 が共発現する細胞の割合は変動しないものの、Ubd と TopoIIα を共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して増加した。投与開始後 28 日目では、MEG 群および TAA 群で Ubd と p-Histone H3 が共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して減少し、Ubd と TopoIIα を共発現する細胞の割合が無処置対照群と比較して増加したが、PMZ 群ではこれらの変化は認められなかった。TopoIIα は、G₂/M 期に発現が最も上昇し、p-Histone H3 は M 期に発現することが知られている (Woessner et al., 1991; Adachi et al., 1997; Lee et al., 2004; Beekman et al., 2006)。そのため、TAA および ANIT 投与開始後 3 日目と TAA および MEG 投与開始後 28 日目において Ubd と TopoIIα を共発現する細胞が増加したことと、発がん物質投与開始後 28 日目において Ubd と p-Histone H3 を共発現する細胞が減少したことから、Ubd が G₂ 期で発現している可能性が示唆された。

以前の報告より、Ubd が過剰に発現することで、M 期スピンドルチェックポイント蛋白である Mad2 のキネトコアへの局在を減らし、染色体不安定性をもたらすことが知られている (Lim et al., 2006; Herrmann et al., 2007)。そのため、化学物質投与初期と発がん物質の 28 日間反復投与で認められた、Ubd の G₂ 期での異常発現は、M 期チェックポイントの破綻による細胞増殖の亢進を反映しているものと考えられた。しかし、28 日間の反復投与で増殖活性の亢進を示した PMZ では Ubd の G₂ 期での異常発現は認められなかったことから、化学物質の投与開始後 28 日目以降において、M 期チェックポイントの破綻に起因する細胞増殖活性の亢進は発がん物質特異的に生じていることが示唆された。

本研究で、PMZ の 28 日間反復投与によって細胞増殖活性の亢進と細胞周期関連分子の発現が上昇したが、p21^{Cip1} の発現やアポトーシスの亢進、Ubd の G₂ 期での異常発現は認められず、肝部分切除による増殖時と分子発現パターンが類似しており、PMZ の投与を続けていくにつれ、肝部分切除の場合と同様に増殖活性の亢進が終息していく可能性が考えられる。そのため、今後はより長期間の投与によって PMZ による増殖活性の亢進が持続するかどうかを検討する必要がある。

本研究の実験 2 において、増殖活性の亢進と細胞周期関連分子の発現増加は MP 投与によってのみ認められ、他の発がん物質では認められなかった。我々が既に報告している肝発がん物質の 28 日間反復投与試験でも発がん物質である piperonyl butoxide は増殖活性の亢進を示しておらず、このことから、本研究で用いている分子群を短期発がん予測指標として応用するためには、発がんないし発がん促進用量ではなく最大耐量での解析、ないし、90 日間反復投与での解析の必要性が考えられた。

E. 結論

ラットを用いた化学物質の反復投与によって、