

別添 4

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受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。

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.

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

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. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

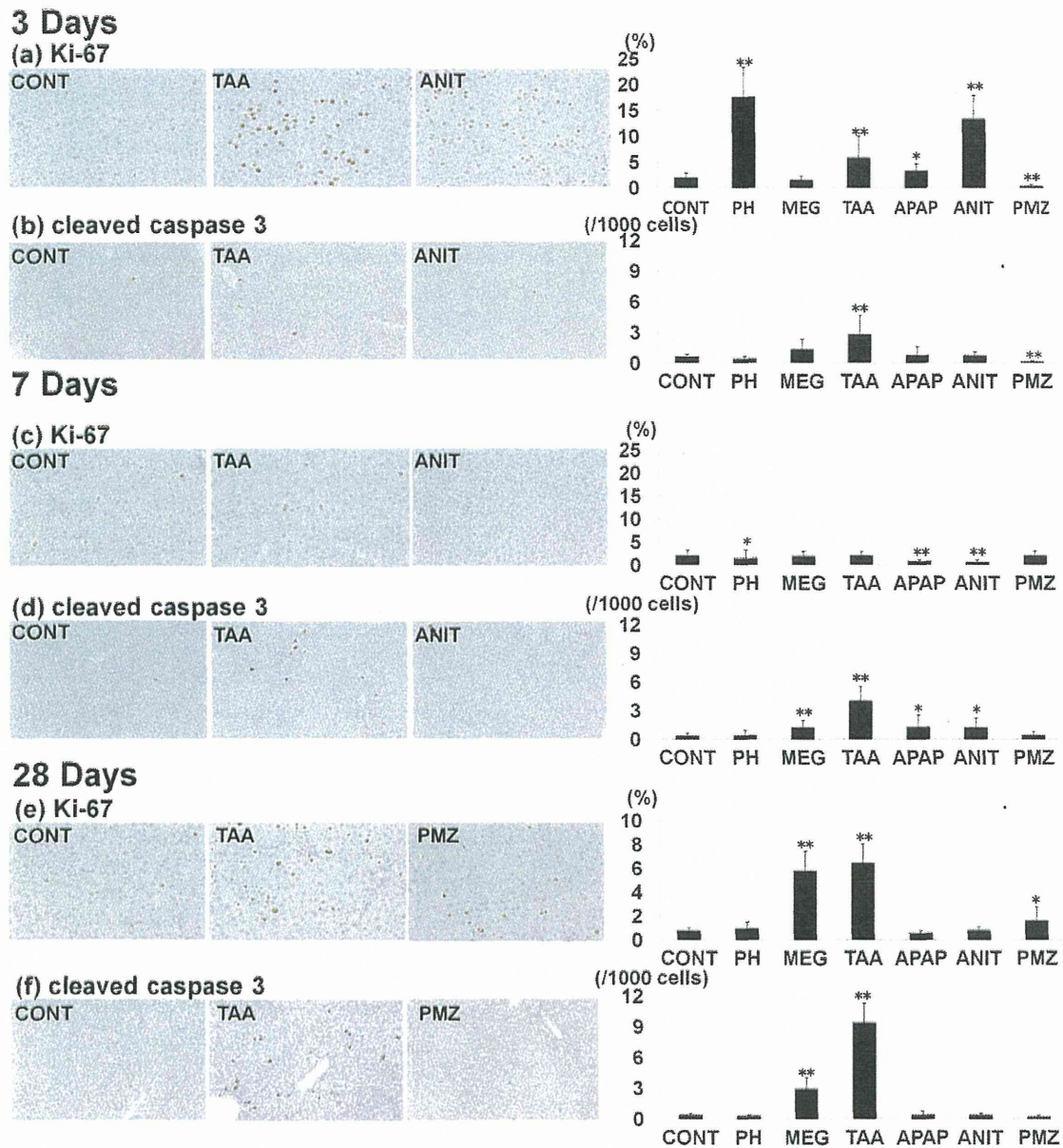


Fig. 1

Fig. 1. Distribution of Ki-67⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver in rats after 3, 7 or 28 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ki-67⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver of the representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or ANIT (a, b, c, d) and treated with TAA or PMZ (e and f). The graph show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (a) Ki-67 (after 3 days), (b) cleaved caspase 3 (after 3 days), (c) Ki-67 (after 7 days), (d) cleaved caspase 3 (after 7 days), (e) Ki-67 (after 28 days), (f) cleaved caspase 3 (after 28 days). * , ** $P < 0.05, 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

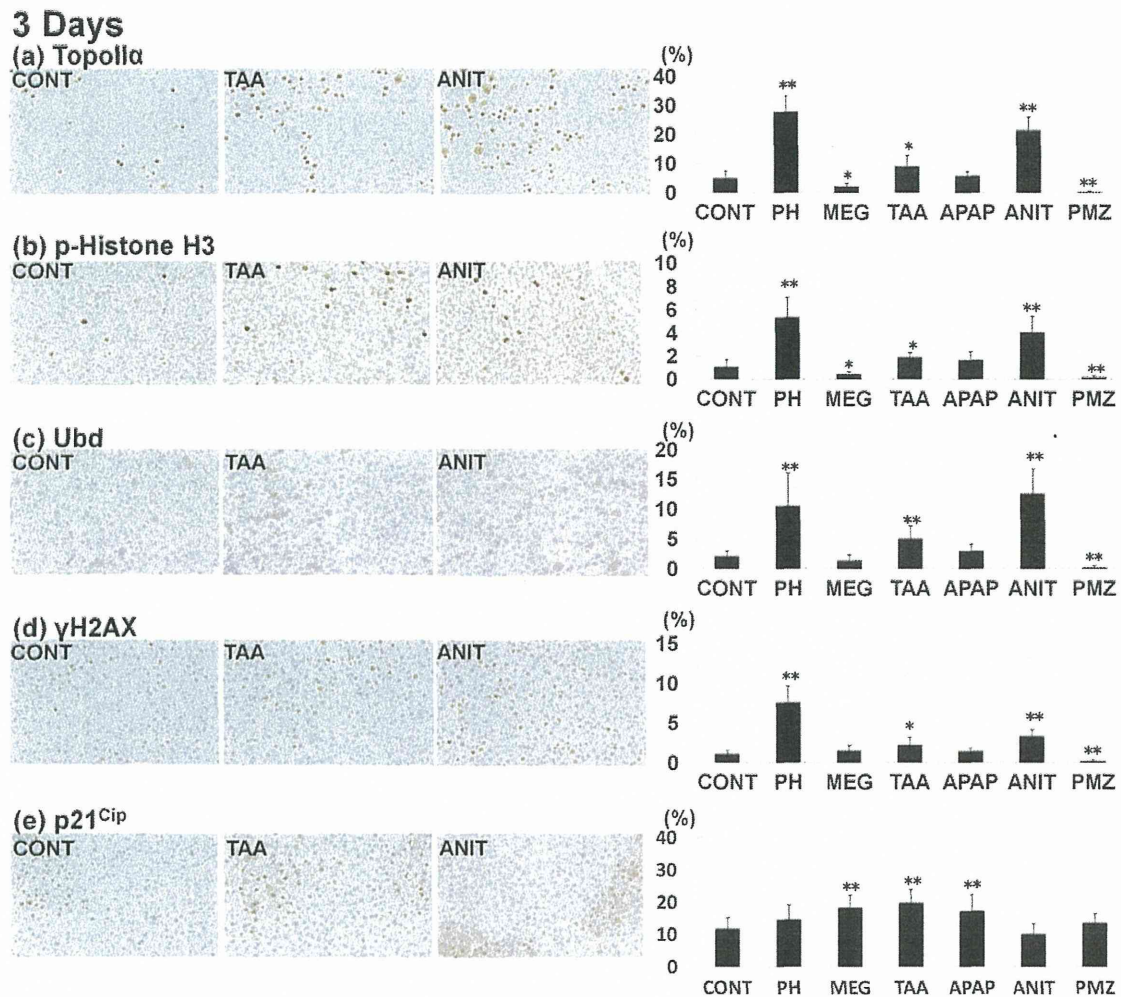


Fig. 2

Fig. 2. Distribution of TopoII α ⁺, p-Histone H3⁺, Ubd⁺, γ H2AX⁺ and p21^{Cip1}⁺ cells in the liver in rats after 3 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of TopoII α ⁺, p-Histone H3⁺, Ubd⁺, γ H2AX⁺ and p21^{Cip1}⁺ cells in the liver of the representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or ANIT. The graph show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (a) TopoII α , (b) p-Histone H3, (c) Ubd, (d) γ H2AX, (e) p21^{Cip1}. *,** $P < 0.05$, 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

7 Days

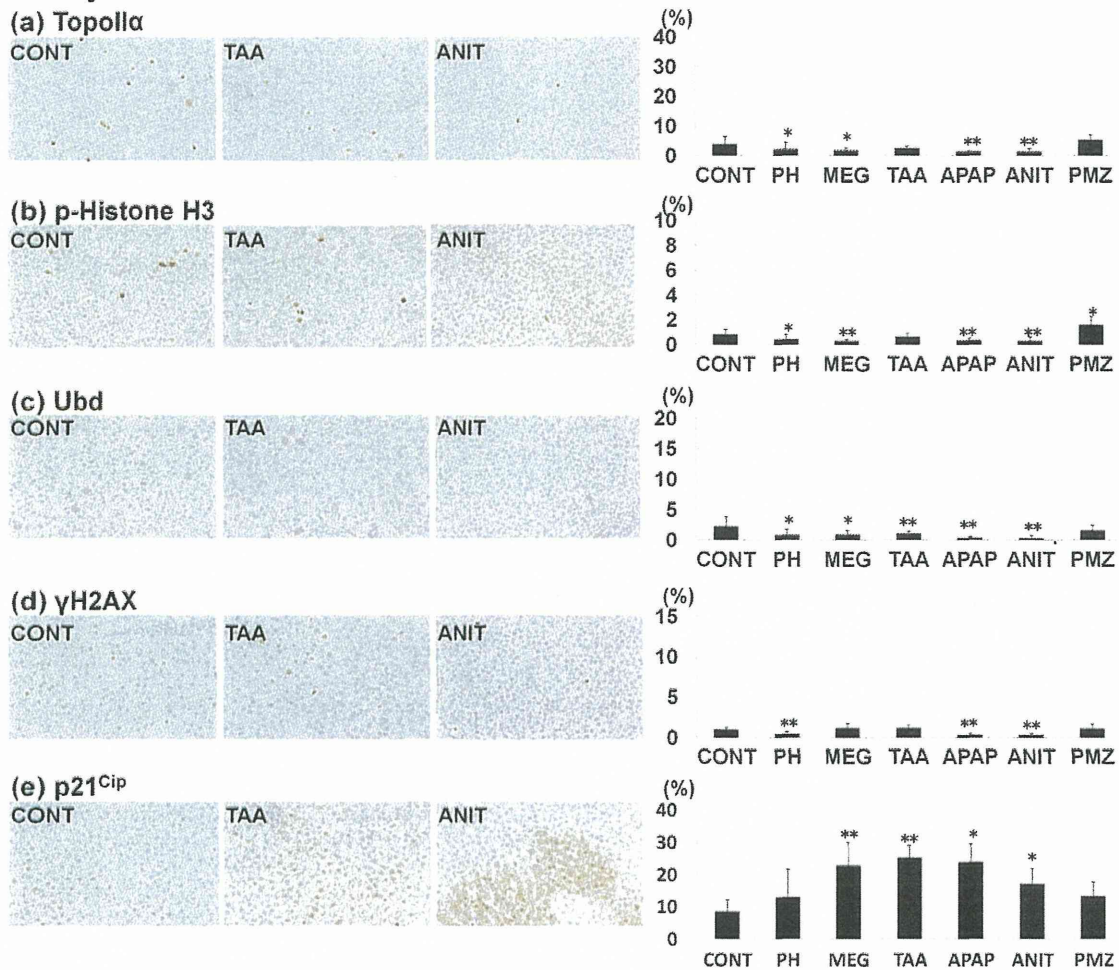


Fig. 3

Fig. 3. Distribution of TopoII α ⁺, p-Histone H3⁺, Ubd⁺, γ H2AX⁺ and p21^{Cip1+} cells in the liver in rats after 7 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of TopoII α ⁺, p-Histone H3⁺, Ubd⁺, γ H2AX⁺ and p21^{Cip1+} cells in the liver of the representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or ANIT. The graph show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (a) TopoII α , (b) p-Histone H3, (c) Ubd, (d) γ H2AX, (e) p21^{Cip1}. *, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

28 Days

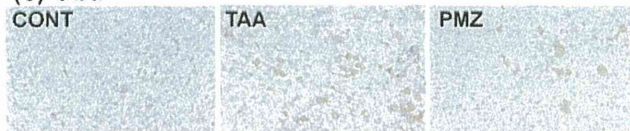
(a) TopoII α



(b) p-Histone H3



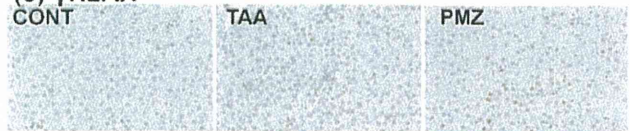
(c) Ubd



(d) Mad2



(e) γ H2AX



(f) p21^{Cip1}

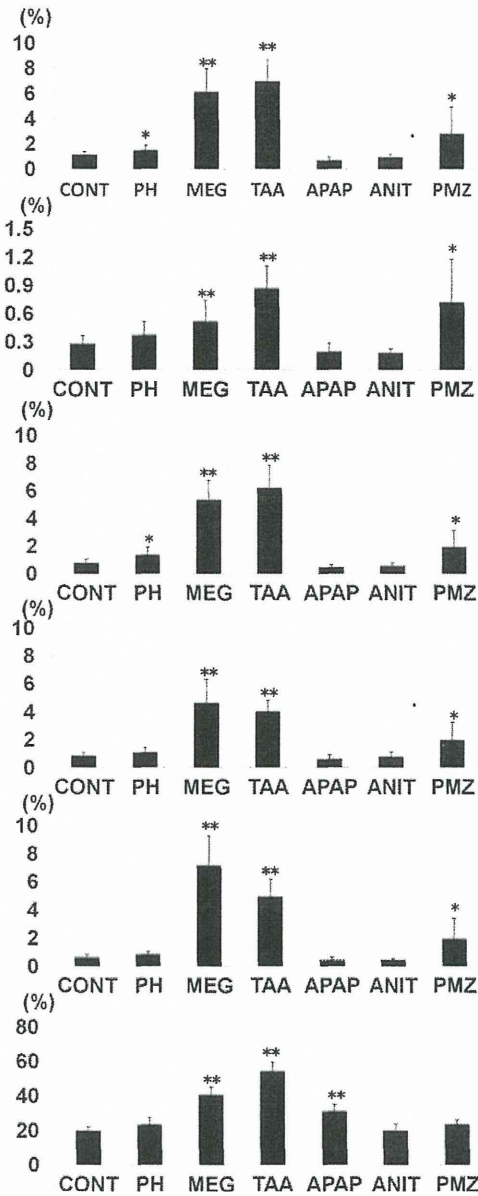
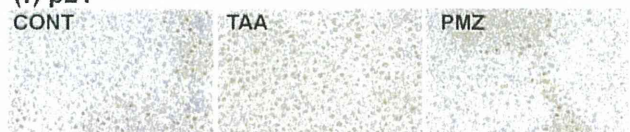
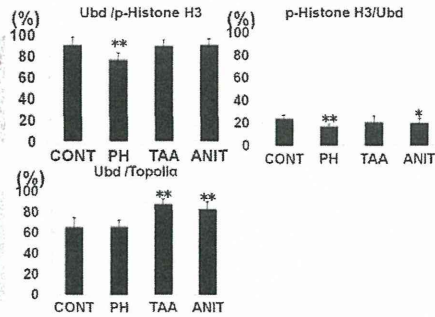
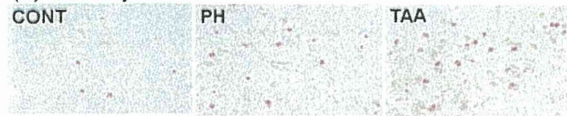


Fig. 4

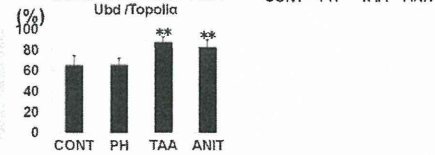
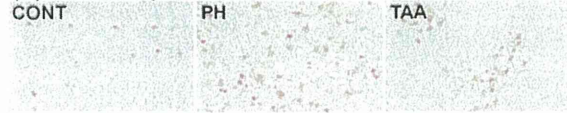
Fig. 4. Distribution of TopoII α ⁺, p-Histone H3⁺, Ubd⁺, Mad2, γ H2AX⁺ and p21^{Cip1+} cells in the liver in rats after 28 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of TopoII α ⁺, p-Histone H3⁺, Ubd⁺, γ H2AX⁺ and p21^{Cip1+} cells in the liver of the representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or PMZ. The graph show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (a) TopoII α , (b) p-Histone H3, (c) Ubd, (d) Mad2, (e) γ H2AX, (f) p21^{Cip1}. *,** $P < 0.05, 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

3 Days

(a) Ubd + p-Histone H3

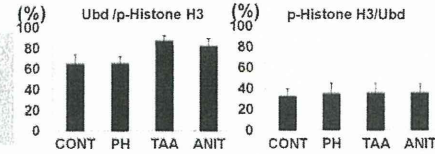


(b) Ubd + TopoII α

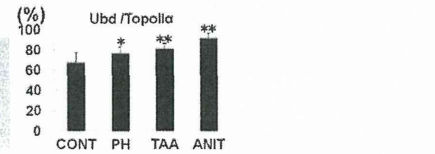
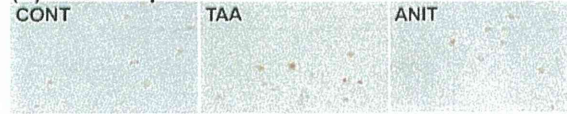


7 Days

(c) Ubd + p-Histone H3

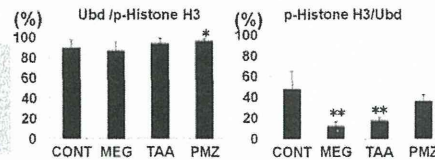
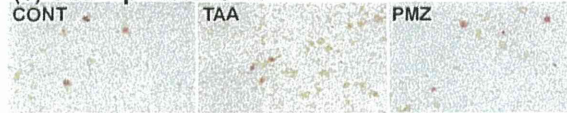


(d) Ubd + TopoII α



28 Days

(e) Ubd + p-Histone H3



(f) Ubd + TopoII α

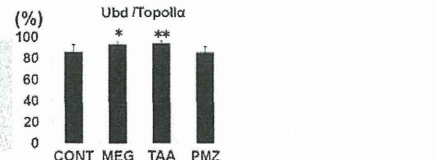


Fig. 5

Fig. 5. Distribution of immunoreactive cell population of p-Histone H3 co-expressing Ubd (Ubd/p-Histone H3), Ubd co-expressing p-Histone H3 (p-Histone H3/Ubd) or TopoII α co-expressing Ubd (Ubd/ TopoII α) in the liver rats after 3, 7 or 28 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ubd/p-Histone H3, p-Histone H3/Ubd, Ubd/ TopoII α in the liver in untreated controls and animals treated with TAA or ANIT (a, b) and treated with TAA or ANIT (c, d) and treated with TAA or PMZ (e, f). Immunoreactivity of Ubd (cytoplasm) and p-Histone H3 (nucleus) or TopoII α (nucleus) is visualized as brown and red, respectively. The graphs show Ubd-positive cell ratio (%) of proximal hepatocytes per total cells immunoreactive with p-Histone H3 or TopoII α , p-Histone H3-positive cell ratio (%) of proximal hepatocytes per total cells immunoreactive with Ubd counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (a) Ubd/p-Histone H3 or p-Histone H3/Ubd (after 3 days), (b) Ubd/ TopoII α (after 3 days), (c) Ubd/p-Histone H3 or p-Histone H3/Ubd (after 7 days), (d) Ubd/ TopoII α (after 7 days), (e) Ubd/p-Histone H3 or p-Histone H3/Ubd (after 28 days), (f) Ubd/ TopoII α (after 28 days). *,** $P < 0.05, 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

平成 25 年度 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

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：ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

分担研究者 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 第一室長

研究要旨

合成抗菌剤ニトロフラン類 (NF 類) は、発がん性が報告されているものもあり、現在国内での動物用医薬品としての使用は禁止されているが、側鎖のヒドラジド誘導体を替えた新規合成抗菌剤の報告は現在も続いている。NF 類を構成するニトロフルフラール (NFA) 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。本研究では *gpt delta* 動物を用いて NF 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、NF 類の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を解明し、NF 類の包括的安全性評価法の確立を目指す。本年度は、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 *Sp1* 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においてもそれぞれの対照群に比して有意な高値を示し、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は酸化ストレスの関与が強く示唆された。一方、*Sp1* MF は欠損型のみで軽度上昇した。これらの結果に基づき、各群の動物数を増やし、NFA 投与群も加えた本試験を実施する。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予備試験を実施した。F344 ラットに NFT を強制経口投与し、同時に *N*-アセチルシステイン、アスコルビン酸あるいは α -トコフェロールを 1 及び 2% の濃度で餌に混じて 2 週間併用投与した結果、抗酸化剤による明らかな毒性影響は見られなかった。この結果を参考に、今後はこの用量で F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と抗酸化剤のそれぞれを 4 および 13 週間投与し、NFT が引き起こす遺伝毒性に対する抗酸化剤の修飾効果を検討する。

A. 研究目的

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ラール (NFA) 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。本年度は、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(実験 1)。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(実験 2)。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

実験 1: *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。(Fig. 1)。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 (Table 1)。投与 8 週目の腎臓における *gpt* および *Sp1* assay の結果を Table 2 に示す。*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、*Sp1* 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 : 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 (Fig. 2)。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 (Fig. 2)。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 (Table 3)。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 (Fig. 3)。

D. 考察

実験 1 : C57BL/6J 系統の *Nrf2*^{-/-} *gpt delta* マウスに NFT を 8 週間投与し、*gpt* および *Sp1* 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 : 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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表

なし

G-2. 発表論文

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

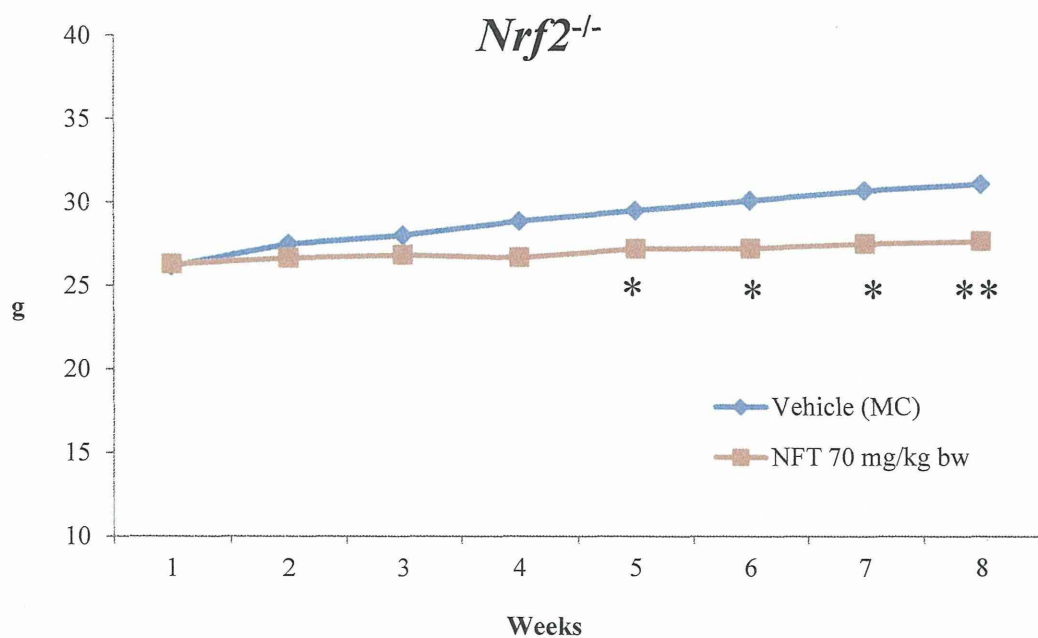
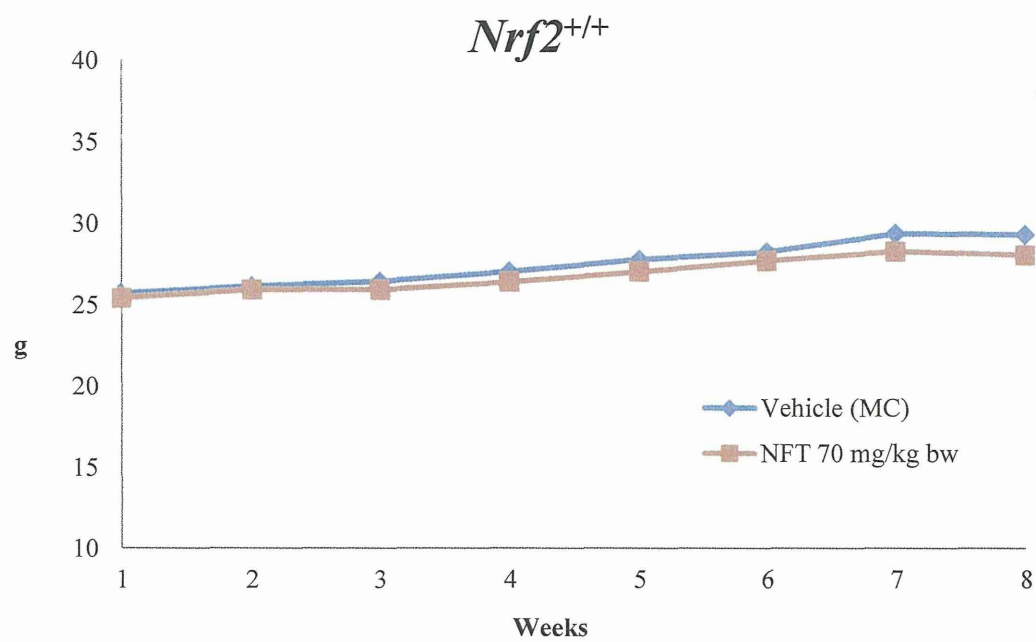
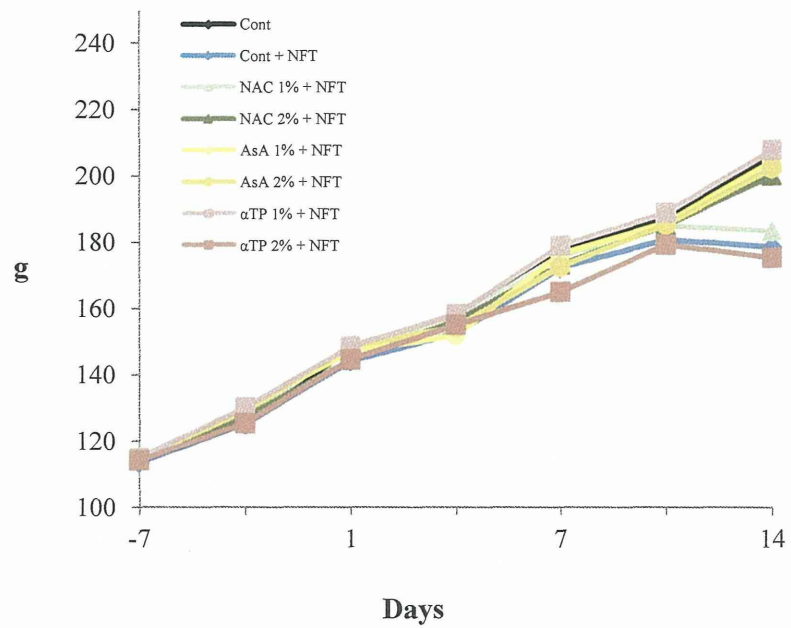


Fig. 1. Growth curves for male *nrf2*-deficient *gpt* delta mice treated with NFT for 8 weeks.

*,** : Significantly different from the control group at $p < 0.05, 0.01$.

Growth curves



Food consumption

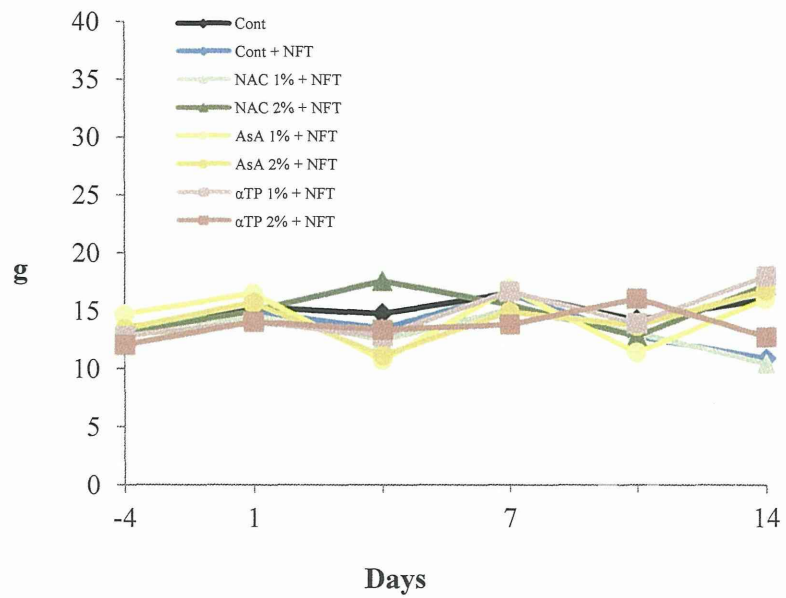


Fig. 2. Growth curves and food consumption for male F344 rats of combined administration of NFT with antioxidants for 2 weeks.

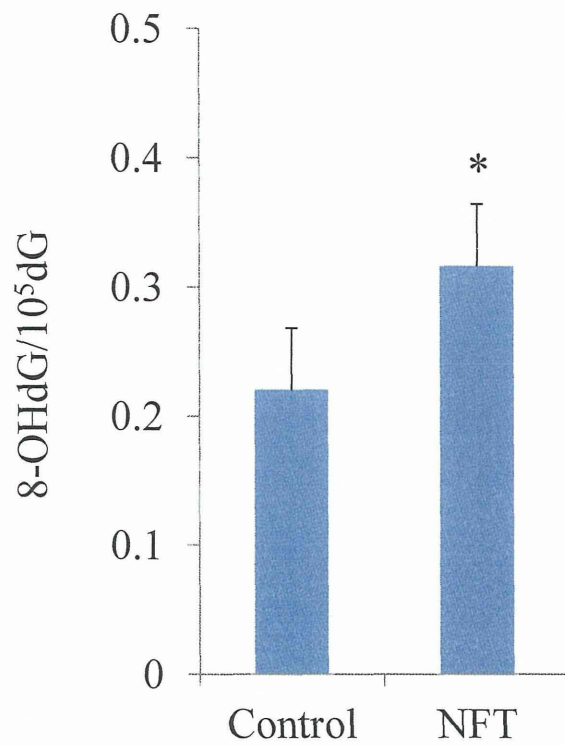


Fig. 3. 8-OHdG levels in the kidneys of male F344 rats given NFT for two weeks.

Values are means \pm SD.

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

Table 1.**Body and kidney weights of *nrf2*-deficient *gpt* delta mice given NFT for 8 weeks.**

	<i>Nrf2</i> ^{+/+}		<i>Nrf2</i> ^{-/-}	
	Control	NFT	Control	NFT
(4 weeks)				
No. of animals	4	4	4	3
BW	26.98 ± 0.93	26.64 ± 1.85	28.9 ± 1.7	27.47 ± 2.57
Kidneys; absolute (g)	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.05
relative (g%)	1.13 ± 0.01	1.16 ± 0.05	1.23 ± 0.13	1.27 ± 0.07
(8 weeks)				
No. of animals	4	4	4	4
BW	31.26 ± 0.92	29.06 ± 1.41 *	31.59 ± 1.62	28.76 ± 0.78 *
Kidneys; absolute (g)	0.36 ± 0.05	0.36 ± 0.05	0.36 ± 0.06	0.33 ± 0.03
relative (g%)	1.15 ± 0.16	1.24 ± 0.10	1.16 ± 0.17	1.17 ± 0.14

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

Table 2.

***gpt* and Spi⁻ MFs in the kidneys of *nrf2*-deficient *gpt* delta mice given NFT for 8 weeks.**

Genotype	Treatment	Animal No.	<i>gpt</i> assay				Spi ⁻ -assay			
			Cm ^R colonies (x 10 ⁵)	6-TG ^R and Cm ^R colonies	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 ⁵)	Plaques within XL-1 Blue MRA(P2)	Mutant Frequency (x 10 ⁻⁵)	Mean ± SD
<i>Nrf2</i> ^{+/+}	Control	W2	14.09	15	1.06		24.57	2	0.08	
		W104	9.86	6	0.61		6.39	1	0.16	
		W105	64.17	30	0.47		53.01	14	0.26	
		W106	10.49	10	0.95	0.77 ± 0.28	10.17	2	0.20	0.17 ± 0.08
	NFT	W4	6.44	10	1.55		10.17	3	0.29	
		W5	11.70	19	1.62		12.51	1	0.08	
		W110	38.43	42	1.09		29.16	7	0.24	
		W111	12.42	14	1.13	1.35 ± 0.28 *	17.37	4	0.23	0.21 ± 0.09
<i>Nrf2</i> ^{-/-}	Control	Ho5	17.87	12	0.67		18.99	2	0.11	
		Ho6	9.72	12	1.23		8.19	1	0.12	
		Ho7	12.56	9	0.72		12.60	2	0.16	
		Ho8	16.38	10	0.61	0.81 ± 0.29	18.18	2	0.11	0.12 ± 0.02
	NFT	Ho9	9.99	31	3.10		21.51	4	0.19	
		Ho10	10.67	31	2.91		21.33	5	0.23	
		Ho11	14.81	18	1.22		12.69	2	0.16	
		Ho12	9.14	18	1.97	2.30 ± 0.88 *	17.37	4	0.23	0.20 ± 0.04 *
	MeIQx	P1	8.24	60	7.29		7.47	10	1.34	

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

Table 3.
Body and kidney weights of male F344 rats of combined
administration of NFT with antioxidants for 2 weeks.

Treatment	No. of animals	Body weights (g)	Kidneys	
			Absolute (g)	Relative (g%)
Basal diet + Vehicle (MC)	3	205.9 ± 10.2	1.46 ± 0.11	0.71 ± 0.02
Basal diet + NFT	3	178.7 ± 3.78 **	1.34 ± 0.03	0.75 ± 0.00
NAC 1% + NFT	3	183.6 ± 8.78 *	1.42 ± 0.04	0.78 ± 0.03**
NAC 2% + NFT	3	200.2 ± 6.56 #	1.62 ± 0.10	0.81 ± 0.03**,###
SAA 1% + NFT	3	204.5 ± 7.5 #	1.49 ± 0.04	0.73 ± 0.01
SAA 2% + NFT	3	202.4 ± 11.9 #	1.58 ± 0.10	0.78 ± 0.01**
αTP 1% + NFT	3	207.9 ± 7.73 ##	1.55 ± 0.07	0.75 ± 0.03
αTP 2% + NFT	3	175.4 ± 11.8 **	1.39 ± 0.12	0.79 ± 0.01**

* , ** Significantly different from the control group at p<0.05, 0.01.

, ### Significantly different from the NFT-treated group at p<0.05, 0.01.

研究要旨

我々はこれまでに、動物用医薬品の中で、CYP inducer により産生される活性酸素種(ROS)が肝発がん促進過程に関与する可能性を示してきた。しかし、CYP inducer であってもミクロソームで ROS 産生しない場合や 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ことがあり、その機序は明確になっていない。そこで本研究は、非ミクロソーム ROS 産生源である NADPH oxidase (NOX)に着目して、肝発がんないし発がん促進過程において細胞増殖亢進を来たす非遺伝毒性発がん機序への NOX の関与を検討することを目的として実施した。25 年度はラット二段階肝発がんモデルを用い、*N*-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週後から 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 cystein; NAC)と併用して混餌投与を 8 週間行った。プロモーター投与 1 週間後に部分肝切除を行った。実験終了後、肝臓については病理組織学的検索、免疫組織化学的解析、遺伝子の発現変動解析を行った。検索の結果、PBO の投与により肝前がん病変指標の glutathione *S*-transferase placental form 陽性細胞数、Ki-67 陽性細胞率ならびに active caspase-3 陽性細胞率が増加したが、APO および NAC の併用によりそれらの増加は抑制されなかった。また、real-time RT-PCR にて、薬物代謝酵素および抗酸化酵素も PBO により増加したが、APO および NAC の併用によりそれらの増加は抑制されなかった。以上より、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。

A. 研究目的

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 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ゾーム内にて 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 dimutase 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)。

我々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

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 週間後から 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(*N*-acetyl cystein; 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ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。さらに、ラット肝増殖性病変に陽性を示す 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 (Table 1)。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)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、また、動物はすべて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

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 (Table 2)。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 (Table 3)。

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 (Table 4)。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 (Table 4)。

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 (Table 5)。

D. 考察

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

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