別添 4

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 IIα 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、TopoIIα、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

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 G_2/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 G_2 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、G_2/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、G_1/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、

7 日後に各群半数ずつ CO_2/O_2 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 CO_2/O_2 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 CO_2/O_2 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割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尊守した。

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 はマイクロウエーブ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

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 TopoIIα 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 γH2AX 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 TopoIIα 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、TopoIIα 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、TopoIIα、p-Histone H3、Ubd、γH2AX 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 TopoIIα ないし p-Histone H3 との免疫二重染色を行った後、Ubd と TopoIIα ないし p-Histone H3 が共発現する肝細胞数、Ubd もしくは TopoIIα 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、

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

TopoIIα 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)。

γH2AX 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

TopoIIα 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)。

γH2AX 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

TopoIIα 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)。

γH2AX 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、で有意に増加した（Fig. 4f)。

Ubd と TopoIIα 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 TopoIIα 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 群で無処置対照群に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 TopoIIα 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

群について経時的変化を検討するために、Ubd と TopoIIα 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）。TopoIIα 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 TopoIIα 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 群で無処置対照群に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 TopoIIα 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。

TopoIIα 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、TopoIIα、p-Histone H3、Ubd、DNA 損傷指標の γH2AX 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、TopoIIα、p-Histone H3、Ubd、γH2AX 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、TopoIIα、p-Histone H3、Ubd、γH2AX、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、p21Cip1 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、G_1/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、G_2/M 期に発現が最も上昇し、p-Hitone 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 G_2 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 G_2 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 G_2 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 G_2 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、

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 G_1/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 G_1/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