

201426018A

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成 27(2015)年 5月

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 ----- 15
渋谷 淳
(資料) 図 1-8、表 1-2

2. ニトロフラン類の in vivo 遺伝毒性評価 ----- 26
梅村 隆志
(資料) 図 1-3、表 1-4

3. 肝発がん促進シグナルの解析 ----- 31
吉田 敏則
(資料) 図 1-4、表 1-2

研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 37

研究成果の刊行物・別刷 ----- 38

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 26 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、ラットを用いて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 年度に肝発がん物質の最長 28 日間の投与で、投与開始後 28 日目における肝発がん物質特異的な M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を示す反応性を見出したが、26 年度は同じサンプルでの検討で、28 日目に肝発がん物質特異的な G₁/S ポイント機能の破綻を示唆する結果が得られた。また、細胞増殖誘導性に乏しい肝発がん物質・肝発がんプロモーターは最長 90 日間の反復投与によっても M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を示唆する反応性を示さず、投与期間の延長による有効性は見出せなかった。更に、腎発がん物質の最長 28 日間の反復投与でも、28 日目に M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を示す腎発がん物質の他に、動物薬ニトロフラントイン (NFT) は細胞周期障害性を伴わないで細胞増殖を促す発がん機序を推定させる結果となった。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価に関する研究では、NFT の遺伝毒性発現機序への酸化ストレスの関与の解明を目的として、26 年度は *Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスとその野生型に NFT 並びにニトロフルフラール (NAF) を 13 週間投与し、*in vivo* 変異原性試験を実施した。その結果、*Nrf2* ホモ欠損マウスの NFT 投与群のみで *gpt* 変異体頻度が有意に上昇したことから、NFT の遺伝毒性発現機序には酸化ストレスの関与が示唆され、NRF2 が NFT の遺伝毒性に防御的に機能していることが示唆された。一方、NFA は何れの遺伝子型マウスにおいても遺伝毒性を示さず、NFT の遺伝毒性発現機序にはニトロフラン骨格の側鎖構造が大きく影響することが示唆された。また、NFT の *in vivo* 変異原性への抗酸化剤による修飾効果を検討するため、F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と抗酸化剤の *N*-アセチルシステイン (NAC)、アスコルビン酸 (SAA) あるいは α -トコフェロールをそれぞれ 4 週間併用投与する実験を終了した。

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 オキシダーゼ (NOX) のラット肝発がん促進過程への関与を検討した。ラット肝二段階発がんモデルである肝中期発がん性試験法に従い、ポストイニシエーション時期にプロモーターとして動物薬のマラカイトグリーン (MG) を単独あるいは NOX 阻害剤 (アポシニン; APO) あるいは抗酸化剤 (酵素処理イソクエルシトリン; EMIQ) と併用投与を 8 週間行った。試験期間中、高 NOX 環境を構築するため高脂肪飼料を給餌した。その結果、MG 投与により増加した肝前がん病変の GST-P 陽性肝細胞巢数と、GST-P 陽性巢内の Ki-67 陽性細胞率および active caspase-3 陽性細胞率が、APO の併用により抑制ないし抑制傾向を示した。GST-P 陽性巢内で NOX 複合体構成成分の p22phox 及び p47phox 陽性細胞率が APO 投与により抑制ないし抑制傾向を示し、MG による肝前がん病変形成には NOX、特に p22phox の関与が示唆された。

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

吉田 敏則

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

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。

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

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、短期発がん予測・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のある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、発がん標的部位に一致して、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 (NTP) 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、増殖活性の亢進と共に、アポトーシスの亢進および G₂/M 期関連分子発現細胞の増加を誘発することと、肝発がん物質の thioacetamide (TAA) と腎発がん物質の ochratoxin A に共通して、M 期スピンドルチェックポイント制御分子である Mad2 のキネトコアへの局在を阻止する Ubiquitin D (Ubd) の G₂ 期からの異常発現を誘発することを見出している。このことは、発がん物質の投与早期から、M 期スピンドルチェックポイント制御機構からすり抜ける細胞と共に、G₂/M 期停止やアポトーシスに陥る細胞の増加を招いていることを示唆し、発がん過程早期のメカニズムとして短期発がん予測系への応用が期待される (Tanai *et al.*, 2012, Yafune *et al.*, 2013)。しかし、M 期スピンドルチェックポイント以外の細胞周期制御機構の傷害の有無や、28 日間投与で細胞増殖活性亢進を示さない発がん物質・発がんプロモーターの長期間投与した際の反応性の変化、肝発がん物質で認められた細胞周期制御障害の肝臓とは異なる発がん標的臓器での反応性については未検討である。

平成 25 年度は、ラットに 2/3 肝部分切除及び肝発がん物質、非発がん肝毒性物質の反復投与を実施し、切除後ないし投与開始後 3、7 ないし 28 日間での細胞増殖性と細胞周期関連分子の発現及びアポトーシスの誘発性を経時的に解析し、発がん物質に特異的な反応の出現時期を検討した。その結果、投与開始後 28 日目で、肝発がん物質特異的に M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻が生じる可能性が示

唆された。平成 26 年度は、25 年度に解析を実施した肝臓を標的とした実験サンプルを用いて、発がん物質の短期間投与による M 期スピンドルチェックポイント以外の細胞周期制御機構、特に G₁/S ポイントにおける制御異常の可能性の有無を検討した。また、28 日間投与で細胞増殖活性亢進を示さない発がん物質・発がんプロモーターを長期間投与した際の反応性を検討する目的で、典型的な肝発がんプロモーター物質と共に、肝発がん性が指摘されているものの増殖活性などが検討されていない動物用医薬品をラットに対して最大 90 日間反復投与した。その際、28 日間投与で細胞増殖亢進が確認できている肝発がん物質を陽性対象として実施した。さらに、28 日間反復投与によって生じた肝発がん物質に特異的な細胞周期制御障害が異なる発がん標的臓器でも認められるかを検討する目的で、腎発がん物質と非発がん腎毒性物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与を実施した。これらの肝臓ないし腎臓の発がん標的組織について、免疫組織化学手法による細胞増殖指標、アポトーシス指標および細胞周期関連分子群の発現分布と免疫二重染色法による Ubd の G₂ 期における発現の変化、real-time RT-PCR 方による細胞周期チェックポイント関連遺伝子ないし DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の変化を解析した。

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、フラズリドン、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使用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。分担研究者らのこれまでの研究で、*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 とその構成物質でありニトロフラン骨格を有するニトロフルフルール (NAF) およびヒドラジド誘導体の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 でレポーター遺伝子突然変異頻度が上昇した。また NFT では G:C:T:A トランスバージョン変異の上昇、腎 DNA 中の

8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルの上昇が確認され、NFT の遺伝毒性発現機序には酸化ストレスの関与する可能性が示唆された。従って本研究では、NFT の *in vivo* 変異原性と酸化ストレスとの関連性について、さらなる検討を行い、NF 類の遺伝毒性発現機序の詳細を明らかにする。

平成 26 年度は、NFT の遺伝毒性に対する NRF2 の役割を検討するため、*Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスに NFT あるいは NFA を 13 週間投与し、*in vivo* 変異原性試験を実施した (実験 1)。また、NFT の遺伝毒性への抗酸化剤の修飾効果を検討する目的で、F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と 3 種類の抗酸化剤をそれぞれ 4 週間併用投与する動物実験を実施した (実験 2)。

肝発がん促進シグナルの解析

動物医薬品などの化学物質は、生体内に摂取されると、肝臓における第 I 相の酸化を触媒する cytochrome P450 (CYP) により親電子性の反応代謝物に変換され、これによる蛋白、脂質、核などに対する様々な分子学的異常が肝発がんの発生に関連することが古典的に知られている。分担研究者の所属する研究グループでは、薬物代謝酵素誘導剤 (以下、CYP inducer という) 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すること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、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生じるなど、CYP 誘導、ROS 産生および酸化ストレスが必ずしも分子学的連動性を示さないことも明らかとなり、ROS に曝露された肝細胞の細胞増殖機転に繋がる新たな視点からの分子細胞学的機序の解明が求められている。

細胞内における ROS 産生源としてミクロソームやミトコンドリアが広く知られているが、膜蛋白である NADPH oxidase (NOX) と発がんとの関連性が近年、注目されている (Block and Gorin, 2012)。NOX2 (gp91^{phox}) が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 1999 年に報告されて以来、NOX2 のホモログ (NOX1、3、4、5 並びに DUOX1 および 2) が相次いで発見され、がん細胞における ROS 産生源としての役割が明らかになりつつある。一部の NOX の触媒サブユニットは細胞膜に加えて、小胞体、ミトコンドリアおよび核膜にも分布し、当初の概念よりも幅広く分布かつ機能していることが明らかとなっている (Choi et al., 2015)。さらに、NOX は調整サブユニットとして細胞膜成分 (p22^{phox}) と細胞質成分 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, Rac 1) を合わせ持ち、これら触媒および調整サブユニットの種々の組み合わせにより NOX 複合体が構成され、様々な細胞において標的分子の酸化反応を調節している。

一般に、NOX は NADPH を基質として酸素一分子よりスーパーオキシドを産生し、superoxide dismutase により過酸化水素とし、Fenton 反応などを介してヒドロキシラジカルを産生し、また、好中球由来の myeloperoxidase の作用により次亜塩素酸を産生する

(Kalyanaraman, 2013)。NOX はこのような 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) あるいは PI3K/Akt (Huang et al., 2012) などを通して、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として機能していることが示されている (Block and Gorin, 2012)。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)、虚血・再灌流モデル (Liu et al., 2008) および脂肪性肝疾患モデル (Chatterjee et al., 2012) 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。脂肪性肝疾患モデルは動物に高脂肪飼料を与えることで NOX の発現増加に関連して脂質過酸化を増加させ (Matsunami et al., 2010)、NOX 阻害剤である apocynin (APO) 投与により肝脂肪化が軽減することも明らかとなっている (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おり、近年その発生頻度の増加がヒトの肝がんのリスクとなることが懸念されている (Sheedfar et al., 2013)。NOX が関連する化学物質投与の影響としては、peroxisome receptors-activated receptor α (PPAR α) の agonist である Wy-14643 がクッパー細胞における NOX 介在性の ROS 産生により肝細胞の初期細胞増殖を誘導することが 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)、また、PPAR α agonist 以外の化学物質誘発性の肝発がん過程における NOX の関与は検討されていないため、化学発がんにおける NOX の関与についての戦略的な研究推進が期待される。

25 年度の研究において、CYP1A および CYP2B inducers である piperonyl butoxide (PBO) をラット肝二段階発がんモデルに適用して検討したところ、NOX の関与する前癌病変の形成は検出できなかった。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、標準的なラット肝二段階発がんモデルでは、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。このような背景を鑑み、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ことを仮説とし、本年度は脂肪肝モデルをラット肝二段階発がんモデルに適用し、肝発がん物質であ

る malachite green (MG) による肝発がん促進作用における NOX 阻害剤の併用投与による細胞増殖、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±3°C で、湿度 50±20%にて飼育した。

(1) 肝発がん物質投与に起因する G₁/S ポイント制御異常の検討

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)、methyleugenole (MEG) 群 (n=22)、TAA 群 (n=20)、acetaminophen (APAP) 群 (n=20)、 α -naphthyl isothiocyanate (ANIT) 群 (n=20)、promethazine (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、400 ppm (TAA)、10,000 ppm (APAP)、1000 ppm ~600 ppm (ANIT) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、MEG (1000 mg/kg 体重) 群と PMZ (200 ~100 mg/kg 体重) 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 日後に摂餌量の減少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 400 ppm (TAA 群)、10,000 ppm (APAP 群)、600 ppm (ANIT 群)、1000~800 mg/kg 体重 (MEG 群)、100 mg/kg 体重 (PMZ 群) の混餌ないし強制経口投与を 28 日間行った。MEG 投与群で、投与開始後 11 日目において全身状態の悪化から 1 匹安楽殺を行い、以後投与量を変更した。MEG および TAA は肝発がんの陽性対照物質として選択し、過去に行われたラットを用い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 (Becker, 1983; NTP, 2000)。

(2) 肝発がん物質・肝発がんプロモーターの最大 90 日間反復投与での反応性の検討

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=20)、methapyrilene (MTP) 群 (n=20)、carbadox (CRB) 群 (n=20)、leucomalachite green (LMG) 群 (n=20)、 β -naphthoflavone (BNF) 群 (n=20)、oxfendazole (OX) 群 (n=20)、promethazine (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、1000 ppm (MTP 群)、300 ppm (CRB 群)、1160 ppm (LMG 群)、10,000 ppm (BNF 群)、500 ppm (OX 群) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、PMZ (100 mg/kg 体重) 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 日目に各群半数ずつ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 28 日間の反復投与で増殖活性の亢進を示さない肝発がん物質・肝発がんプロモーターの反応性を検討する目的で、動物を無処置対照群 (n=10)、MTP 群 (n=11)、TAA 群 (n=11)、CRB 群 (n=10)、TAA 群 (n=10)、LMG 群 (n=10)、BNF 群 (n=10)、OX 群 (n=10)、PMZ 群 (n=11) に分け、それぞれ 1000 ppm (MTP 群)、400 ppm (TAA 群)、300 ppm (CRB 群)、1160 ppm (LMG 群)、10,000 ppm (BNF 群)、500 ppm (OX 群)、10,000 ppm (APAP 群)、100 mg/kg 体重 (PMZ 群) の 90 日間反復投与を行った。CRB および LMG は動物用医薬品として選択した。CRB は設定用量で肝発がん性が報告されており (Sykora & Vortel, 1986)、LMG は肝発がん性が疑われており、2 年間の発がん性試験で肝腺腫の発生頻度が増加傾向を示した投与濃度の倍の濃度を設定した (Culp et al., 2006)。MTP (Lijinsky & Kovatch, 1986)、TAA (NTP, 2004) は肝発がんの陽性対照物質として、BNF (Dewa et al., 2009)、OX (Shoda et al., 2000) は肝発がんプロモーターとして選択し、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 (Shoda et al., 2000; Dewa et al., 2009)。

(3) 腎発がん物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与における腎臓での反応性の検討

1 週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=30)、nitrofurantoin (NFT) 群 (n=33)、1-amino-2,4-dibromoantraquinone (ADAQ) 群 (n=33)、1,2,3-trichloropropane (TCP) 群 (n=33)、1-chloro-2-propanol (CPN) 群 (n=30)、triamterene (TAT) 群 (n=30)、carboxin (CBX) 群 (n=30) に分けた。無処置対照群、TCP 群は、基礎飼料と蒸留水にて飼育し、投与群はそれぞれ、5000~3000 ppm (NFT 群)、25,000 ppm (ADAQ 群)、1200 ppm (TAT 群)、2000 ppm (CBX 群) を混ぜた飼料と蒸留水にて飼育し、CPN 群は 3300 ppm を混ぜた蒸留水と基礎飼料にて飼育した。また、TCP 群においては、TCP を 125 mg/kg 体重の割合で毎日強制経口投与した。NFT 投与群では投与開始後 10 日目に摂餌量の減少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、28 日後に各群全動物数の 3 分の 1 ずつ深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、腎臓を摘出した。NFT は動物用医薬品であり、腎発がん性が報告されている (NTP, 1989)。ADAQ、TCP は腎発がん物質として選択し、過去に行われた発がん性試験にて、腎臓に腫瘍の形成が認められる用量を投与量として設定した (NTP, 1993; NTP

1996)。

それぞれの動物実験で採取した肝臓および腎臓は、4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で固定し、その後パラフィン包埋し、免疫組織化学的解析に供した。また、肝臓組織については、臓器摘出後液体窒素により直ちに凍結し、解析に使用するまで -80°C の環境下にて保存した。

免疫組織学的解析及びアポトーシスの解析

免疫組織化学的検索として、採取した肝臓ないし腎臓を 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}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} はマイクロウェーブ $\cdot\cdot^{\circ}\text{C}$ で $\cdot\cdot$ 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 (200 倍希釈; Dako, Denmark)、マウス抗 p21^{Cip1} 抗体 (1000 倍希釈; Abcam, UK) 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'-ジアミノベンジ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 phosphorylated-histone H3 (p-Histone H3)、topoisomerase II alpha (TopoII α)、Ubd、cleaved caspase 3、phosphorylated-Mdm2 (p-Mdm2) 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臓組織切片を、p-Histone H3、TopoII α 、Ubd は $\cdot\cdot$ 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 および p-Mdm2 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 p-Histone H3 抗体 ($\cdot\cdot\cdot$ 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA)、ウサギ抗 TopoII α 抗体 ($\cdot\cdot\cdot$ 倍希釈; Abcam)、ウサギ抗 Ubd 抗体 ($\cdot\cdot\cdot$ 倍希釈; Proteintech Group, USA)、ウサギ抗 cleaved caspase 3 抗体 ($\cdot\cdot\cdot$ 倍希釈; Cell Signaling Technologies, USA)、p-Mdm2 (400 倍希釈; Cell Signaling Technologies) 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'-ジアミノベンジ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。

また腎臓組織については、更にアポトーシスの程度を検討するために、ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, MA, USA) を用いて TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

検出法による解析を行った。脱パラフィンした組織を 20 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K で 15 分間室温に静置した。内在性のペルオキシダーゼ活性は 3.0% 過酸化水素で抑制した。発色および対比染色は免疫組織化学染色と同様に行った。

また、腎臓について、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'-ジアミノベンジ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。

陽性細胞の組織形態学的解析

肝臓に免疫組織化学染色を施した後、Ki-67、p-Histone H3、TopoII α 、Ubd、p21^{Cip1}、p-Mdm2 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。また、腎臓に Ki-67、p-Histone H3、TopoII α 、Ubd の免疫組織化学染色ないし TUNEL アッセイを施した後、400 倍視野で左右腎臓の髄質外帯 (OSOM) から無作為に 5 視野ずつ選択して陽性尿細管上皮細胞数を視覚的に計数した。そして、総細胞数を WinROOF image analysis and measurement software を用いて計数し、陽性細胞数の総細胞数に対する割合を求めた。

また、腎臓を用いて、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 が共発現する尿細管上皮細胞数、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。

Real-time RT-PCR による mRNA 発現の定量解析

肝発がん物質に誘導される G₁/S ポイント制御異常の検討のための動物実験において、平成 25 年度での解析により、投与開始後 28 日目で増殖活性の亢進が認められた MEG、TAA、PMZ 群について、各投与期間で各群 6 匹の動物を無作為に選出し、real-time RT-PCR による解析を行った。肝臓組織は -80°C から取り出し、RNeasy Mini kit によって total RNA を抽出後、2 μg の total RNA より cDNA を合成した。PCR 反応は SYBR[®]Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用い、Step OnePlus[™] Real-time PCR System (Life Technologies) にて、製造元のプロトコールに従って実施した。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Life Technologies) を用いて設計した。各遺伝子の mRNA 発現量は、無処置対照群での発現値に対する相対値として求め、内因性コントロールとして *Hprt1* の検量線を求め、 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) にて算出した。

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 多重比較検定を行った。Bartlett 検定で等分散が認められなかった場合、Steel 検定を実施した。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

実験 1 :

6 週齢、雄の C57BL/6J 系統 *Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウス並びにその野生型に、NFT および NFA を methyl cellulose (MC) に懸濁し、各群 6 例に、連続 5 日間の強制経口投与を 13 週間行った。投与用量は、NFT は最大耐量の 70 mg/kg 体重 およびその 1/2 量である 35 mg/kg 体重、NFA は NFT と同モル相当量の 41 および 21 mg/kg 体重の用量に、それぞれ設定した。対照群には MC のみを投与した。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。

凍結したサンプルを用いて、*gpt* および *Spī* 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* 変異体頻度 (MF) を算出した。*Spī* assay では、ファージは P2 lysogen (大腸菌 XL-1 Blue MRA(P2) 株) に感染させ、*Spī* 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 *Spī* 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 *Spī* プラーク数を回収した総プラーク数で除して *Spī*MF を算出した。

実験 2 :

6 週齢、雄の F344 系 *gpt delta* ラット、各群 5 例に、NFT と抗酸化剤の *N*-アセチルシステイン (NAC)、アスコルビン酸 (SAA) あるいは α トコフェロール (α -TP) をそれぞれ 4 週間併用投与した。NFT は MC に懸濁し、ラット腎臓がん用量の 125 mg/kg 体重の用量で、連続 5 日間、強制経口投与した。NAC、SAA 及び α -TP はそれぞれ 1% の用量で、NFT 投与開始の 1 週間前から実験終了まで粉末基礎飼料に混じて自由に摂取させた。対照群には MC のみを投与した。また NFT と抗酸化剤 3 種については、単剤での影響を確認するため、それぞれの単剤投与群を設けた。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 1 週間ごとに測定した。解剖時は、腎臓を採取し、重量を測定した後、長軸にそって切断し、弓状動脈を境界に皮質部と髄質部を分離した。採材した皮質および髄質部のそれぞれ一部をホルマリン固定し、残りを凍結保存した。

肝臓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、脂肪肝モデルを併用した二段階がんモデルによる発がんプロモーション実験を行った。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 週間から MG を単独 (100 ppm) あるいは NOX 阻害剤 (Apocynin; APO, 2000 ppm) あるいは抗酸化剤 (酵素処理イソクエルシトリン; EMIQ, 15,000 ppm) と併用して混餌投与を 8 週間行った。試験期間中、高脂肪飼料 (D12451、Natural Diet 社製) を動物に給餌し、対照群には高脂肪飼料のみを与えた。動物は定法に従い、試験 3 週目に 2/3 部分肝切除を行った。MG は、DEN 飲水投与ラットで肝プロモーション効果を示した用量を設定した (Sundarrajan et al., 2000)。APO (Chirino et al., 2008) および EMIQ (Hara et al., 2014) 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、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)、グルコース (GLU)、総コレステロール (T.CHOL) およびトリグリセライド (TG) を測定した。一部の肝臓は病理組織学的・免疫組織化学的検査用に 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、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

組織学的検査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 glutathione-S-transferase placental form (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、cytchrome b-245 light chain (p22phox)、p47phox 並びに NOX4 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 および p22phox 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

ープ 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)、ウサギ抗 cytochrome b-245 light chain 抗体 (200 倍; Bioss Inc., Woburn, MA, USA)、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, USA)を用い、3,3'-ジアミノベンジ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。残りの NOX 複合体関連分子として抗 p47phox 抗体 (1000 倍; Bioworld Technology, MN, USA)および抗 NOX4 抗体 (1000 倍; Bioworld Technology, MN, USA)、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。p47phox、NOX4 および 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 (Hara et al., 2014)、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、active caspase-3、p22phox、p47phox および NOX4 陽性肝細胞は GST-P 陽性巣の内部、Ki-67 および active caspase-3 陽性肝細胞はランダムに選んだ GST-P 陽性巣以外の領域の 1000 個以上の肝細胞当たりの百分率を求めた。

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 多重比較検定を行った。Bartlett 検定で等分散でなかった場合、Steel-Dwass 多重比較検定を実施した。

(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 ないしイソ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

(1) 肝発がん物質投与に起因する G₁/S ポイント制

御異常の検討

i) mRNA 発現

無処置対照群、MEG 群、TAA 群、PMZ 群から、各投与期間で各群 6 匹ずつ選び、real-time RT-PCR 法による解析を行った。投与開始後 3 日目では、G₁/S ポイント関連分子のうち、*Cdkn1a* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加し、PMZ 群で有意に減少した。*Cdkn2a*、*Rbl1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Rbl2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に減少した。*Tp53*、*Mdm2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Tp53* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka*、*Bub1*、*Plk1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。*Aurkb* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Mad11l1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に減少した。*Mad21l1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。DNA 損傷関連遺伝子のうち、*Atm*、*Chek1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。*Brcal* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Brcal*、*Chek2*、*Escol1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。*Brcac3* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。*Escol1*、*Rad17* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Gadd45a* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群、PMZ 群で有意に増加した。*Rad50* の mRNA レベル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。

投与開始後 7 日目では、G₁/S ポイント関連分子のうち、*Cdkn1a*、*Mdm2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に増加した。*Cdkn1a* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、PMZ 群で有意に減少した。*Cdkn2a*、*Tp53* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、PMZ 群で有意に減少した。*Tp53* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、TAA 群で有意に増加した。*Rbl1*、*Rbl2* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka*、*Mad21l1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群で有意に減少した。*Aurkb*、*Bub1*、*Plk1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群で有意に減少した。*Mad11l1* の mRNA レベルは無処置対照群と比較して、MEG 群、TAA 群、PMZ 群で有意に減少した。DNA 損傷関連遺伝子のうち、*Brcal* の mRNA レベルは無処置

対照群と比較して、MEG群、TAA群で有意に減少した。*Brca2*、*Chek1*、*Chek2*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群で有意に減少した。*Brcc3*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群、TAA群、PMZ群で有意に減少した。*Esco1*、*Rad17*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群、PMZ群で有意に減少した。*Esco1*、*Gadd45a*、*Rad17*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、TAA群で有意に増加した。*Gadd45a*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、PMZ群で有意に減少した。*Rad50*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群で有意に減少した。*Atm*のmRNAレベル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。

投与開始後28日目では、G₁/Sポイント関連分子のうち、*Cdkn1a*、*Mdm2*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群、TAA群で有意に増加した。*Cdkn1a*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、PMZ群で有意に減少した。*Cdkn2a*、*Tp53*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、TAA群で有意に増加した。*Rbl2*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群、TAA群で有意に減少した。*Rb1*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、TAA群、PMZ群で有意に減少した。M期スピンドルチェックポイントおよびM期関連遺伝子のうち、*Aurkb*、*Mad211*、*Plk1*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群、TAA群で有意に増加した。*Aurka*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、TAA群で有意に増加した。*Mad111*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、TAA群で有意に減少した。*Bub1*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群で有意に増加した。DNA損傷関連遺伝子のうち、*Chek1*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群、TAA群で有意に増加した。*Esco1*、*Gadd45a*、*Rad17*、*Rad50*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、TAA群で有意に増加した。*Atm*、*Esco11*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、MEG群で有意に減少した。*Esco1*、*Rad17*のmRNAレベルは無処置対照群と比較して、PMZ群で有意に減少した。*Brca1*、*Brca2*、*Chek2*のmRNAレベル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。

ii) 免疫組織化学染色による分子分布

投与開始後3日目では、p-Mdm2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。投与開始後7日目では、p-Mdm2陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MEG群、TAA群、APAP群、PMZ群で有意に増加した。投与開始後28日目では、p-Mdm2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。

(2) 肝発がん物質・肝発がんプロモーターの最大90日間反復投与での反応性の検討

i) 免疫組織化学染色による分子分布

投与開始後7日目では、Ki-67陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP群で有意に増加し、CRB群、LMG群、OX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、CRB群、OX群で有意に減少した。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP群で有意に増加し、CRB群、OX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、MTP群で有意に増加し、CRB群、LMG群、OX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、MTP群、CRB群、LMG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、MTP群で有意に増加した。

投与開始後28日目では、Ki-67陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP群、PMZ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、MTP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、MTP群で有意に増加し、CRB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、MTP群、PMZ群で有意に増加し、CRB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、CRB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、MTP群で有意に増加した。

投与開始後90日目では、Ki-67陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP群、TAA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、MTP群、TAA群で有意に増加し、CRB群、APAP群で有意に減少した。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、MTP群、TAA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、MTP群、TAA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、TAA群、CRB群、LMG群、OX群、APAP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、MTP群、TAA群、OX群で有意に増加した。

(3) 腎発がん物質の3、7ないし28日間反復投与における腎臓での反応性の検討

i) 免疫組織化学染色による分子分布

投与開始後3日目では、Ki-67陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT群、TCP群、CBX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、NFT群、TCP群で有意に増加し、TAT群で有意に減少した。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT群、TCP群、CPN群、CBX群で有意に増加し、ADAQ群、TAT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、NFT群、TCP群、CBX群で有意に増加し、ADAQ群、TAT群で有意に減少した。TUNEL陽性細胞率は、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。

投与開始後7日目では、Ki-67陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT群、TCP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、NFT 群で有意に増加し、CPN 群で有意に減少した。TopoII α 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、TCP 群で有意に増加し、ADAQ 群、TAT 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、TCP 群で有意に増加し、ADAQ 群、TAT 群で有意に減少した。TUNEL 陽性細胞率は、NFT 群、TCP 群で有意に増加した。

投与開始後 28 日目では、Ki-67 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、NFT 群、ADAQ 群、TCP 群、CBX 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、NFT 群、CBX 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、ADAQ 群、TCP 群、CBX 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、ADAQ 群、TCP 群、CBX 群で有意に増加した。TUNEL 陽性細胞率は無処置対照群と比較して、CBX 群で有意に増加した。

ii) Ubd と TopoII α ないし p-Histone H3 の共発現細胞の分布

投与開始後 28 日目で増殖活性亢進が認められた NFT 群、ADAQ 群、TCP 群、CBX 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、TopoII α 陽性細胞のうち Ubd を共発現する細胞の割合は、NFT 群、TCP 群、CBX 群で無処置対照群と比較して有意に増加した。一方で、Ubd 陽性細胞のうち TopoII α 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。また、Ubd 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は ADAQ 群、TCP 群で無処置対照群と比較して有意に減少した。一方で、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。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

実験 1 :

Nrf2 ホモ欠損 *gpt delta* マウスとその野生型マウスに、NFT を 35 および 70 mg/kg 体重、NFA を NFT の同モル相当の 21 および 41 mg/kg 体重で 13 週間強制経口投与した結果、投与期間中、*Nrf2* ホモ欠損マウスに死亡例が認められた。NFA 高用量群で開始 1 週目に 1 例、NFA 低用量群で 9 週目に 1 例、NFT 高用量群で 10 週目以降に 2 例の死亡動物が認められた。一方、野生型ではいずれの群でも投与に起因する死亡例は生じなかった。

体重および摂餌量は、いずれの遺伝子型でも、全ての投与群において対照群と同様に推移し、NFT および NFA の投与による影響は認められなかった。また、腎重量についても、いずれの遺伝子型でも、NFT および NFA の 13 週間の投与による明らかな変化は見られなかった。

腎臓における *gpt* および Spi assay の結果、*Nrf2*

野生型マウスにおける *gpt* MF は、対照群 0.50、NFT 投与群では低用量群 0.55、高用量群 0.82、NFA 投与群では、低用量群 0.38、高用量群 0.48 であり、統計学的有意差は無いものの NFT 高用量群のみで対照群より上昇する傾向が見られた。Spi MF は、いずれの投与群でも対照群と比較し明らかな変化は認められなかった。一方、*Nrf2* ホモ欠損マウスにおける *gpt* MF は、対照群 0.83、NFT 投与群では低用量群 0.69、高用量群 1.65、NFA 投与群では、低用量群 1.09、高用量群 0.83 であり、NFT 高用量群では対照群の約 2 倍の高値となり、統計学的にも有意な変化となった。Spi MF はいずれの投与群においても対照群と比較して、明らかな変化は認められなかった。また、遺伝子型間での比較では、*Nrf2* ホモ欠損マウスの高用量群の *gpt* MF は野生型と比較して統計学的に有意に高かった。

実験 2 :

F344 系 *gpt delta* ラットに、NFT と抗酸化剤 NAC、SAA 及び α -TP をそれぞれ 4 週間併用投与した結果、NFT の投与開始から 3 週目以降で、NFT 単独群、NFT/NAC および NFT/SAA 併用群において、溶媒対照群に比べて体重の低値が認められ、これらの群では最終体重では溶媒対照群に対し約 10%程度減少した。摂餌量は全ての投与群で溶媒対照群と同様の推移を示した。

腎重量は、相対重量において NFT 単独群、NFT/NAC、NFT/SAA および NFT/ α -TP 併用群で、溶媒対照群より有意に増加した。各抗酸化剤の単独群では、NAC 単独群のみで腎相対重量が増加した。

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対照群の 2 匹、MG+APO 併用投与群で 1 匹が死亡した。MG+APO 併用群の動物の死亡は MG あるいは APO 処置による影響ではなかった。MG 単独および併用群において、対照群と比較して、試験期間中および剖検時に体重に有意な変化は認められなかった。絶対及び相対肝重量は対照群と比較して、MG 単独および併用群において増加傾向を示し、相対重量は EMIQ 併用群において有意に増加した。

血液生化学検査では対照群に比べ、MG 単独群において ALP および T.CHOL が有意に減少した。EMIQ 併用群では、MG 単独群に比較しても両項目が有意に減少した。EMIQ 併用群では、MG 単独群に比較して TG の低下傾向がみられた。正常値と比較すると (Kojima et al., 2009)、本試験の対照群の TG および T.CHOL はそれぞれ 7.5 倍および 2 倍の高値を示していた (TG の正常値 42 ± 8 mg/dL に対し本試験の対照群 316 ± 128 mg/dL ; T.CHOL の正常値 44 ± 2 mg/dL に対し本試験の対照群 90 ± 10 mg/dL)。

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。肝細胞脂肪化が種々の程度 (軽度から中等度) に発生したが、明らかな群間の差はなかった。

免疫組織化学的解析では、対照群に比べ、GST-P 陽性肝細胞巢の数が MG 単独群、APO 併用群および EMIQ 併用群では有意に増加したが、APO 併用群においては MG 単独群に比較し、有意に減少した。GST-P 陽性巢の面積に有意な変化はなかったが、MG 単独群では対照群に比べ増加傾向を示し、APO 併用群については対照群と同程度に留まった。EMIQ 併用群は MG 単独群と同程度であった。GST-P 陽性巢内の肝細胞の Ki-67 陽性細胞率は、有意な変動はなかったものの、MG 単独群では対照群に比べ、増加傾向を示した。APO 併用群については対照群と同程度に留まった。GST-P 陽性巢以外の肝細胞の Ki-67 陽性細胞率には各処置の影響はみられなかった。GST-P 陽性巢内の肝細胞の active caspase-3 陽性細胞率も対照群に比較し MG 単独群で増加傾向を示し、APO 併用群において増加抑制が見られた。EMIQ 併用群では、対照群および APO 併用群に比べ、有意に増加した。GST-P 陽性巢以外の肝細胞の active caspase-3 陽性細胞率にも同様の影響が見られた。NOX 複合体の構成成分である p22phox、p47phox 及び NOX4 の発現を検討したところ、GST-P 陽性巢内の p22phox 及び p47phox 陽性細胞率に MG 投与の明らかな影響はなかったが、APO 投与によりそれらは有意な抑制ないし抑制傾向が認められた。NOX4 の発現に明らかな投与の影響はなかった。

D. 考察

発がん初期過程の細胞周期解析

(1) 肝発がん物質投与に起因する G₁/S ポイント制御異常の検討

平成 25 年度の解析の結果、ラットに対して化学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解析した結果、肝発がん物質特異的に、増殖活性の亢進とともに、G₁/S ポイント機能の活性化とそれに伴うアポトーシスの増加、M 期スピンドルチェックポイント制御の破綻を示唆する結果が得られた。平成 26 年度は、G₁/S ポイント関連遺伝子、M 期スピンドルチェックポイント関連遺伝子および DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の定量解析を行うとともに、Rb 蛋白や p53 の分解を促進するリン酸化 Mdm2 の分布解析を行い、肝発がん物質特異的に誘発される細胞周期制御異常とそれに伴う DNA 損傷の蓄積について検討した。

解析の結果、肝発がん物質は全ての投与期間で、Rb ファミリー蛋白の 1 つである *Rbl2* の転写レベルが減少した (Cobrinik et al., 1996; Cobrinik, 2005)。しかしながら、非発がん肝毒性物質である PMZ も、7 日目の時点で *Rbl2* の転写レベルの減少をもたらしており、投与開始後 28 日目より早い時期における *Rbl2* の発現減少は発がん物質特異的なものではないことが示唆された。PMZ は 28 日目の時点で増殖活性の亢進を示したが、この時点において *Rbl2* の転写レベルの減少は生じなかった。これらの結果から、肝発がん物質特異的に G₁/S ポイント機能の破綻が

もたらされることで、G₁ 期にとどまらず S 期に進行してしまう細胞が増加し、それは反復投与開始後 28 日目で生じることが示唆された。*Rbl2* の発現減少は人の乳癌や子宮内膜癌で認められている (Milde-Langosch et al., 2001)。本研究では、肝発がん物質反復投与により投与開始後 3 日目から、p53 カスケードの下流に存在し、Rb 蛋白および p53 の分解を促進する *Mdm2* (Bhattacharya and Ghosh, 2014; Honda et al., 1997; Uchida et al., 2005) の発現増加および増加傾向を示した。肝発がん物質はさらに投与開始後 3 日目から、活性化型であり細胞質から核内に移行することで p53 を分解するリン酸化 Mdm2 (Ser166) (Malmlöf et al., 2007; Mayo and Donner, 2002) に陽性を示す肝細胞数の増加が、*Mdm2* の mRNA 発現増加と同様に認められた。一方で、非発がん物質である APAP および PMZ も 7 日目においても p-Mdm2 陽性細胞数の増加が認められたが、28 日目では認められなかった。投与開始後 28 日目では肝発がん物質特異的に *Mdm2* の mRNA 発現と核内におけるリン酸化 Mdm2 の発現を増加させ、素の活性化による p53 や Rb 蛋白の分解の促進が示唆された。p53 は遺伝子の損傷にตอบสนองして発現が増加し、損傷を修復するために p21^{Cip1} などの分子を誘導することで G₁ 期において細胞周期を停止させる (Bartek and Lukas, 2001; Speidel, 2015)。本研究では、肝発がん物質特異的に p21^{Cip1} 陽性細胞の増加とともに p21^{Cip1} をコードする *Cdkn1a*、*Brcal* に活性化され DNA 損傷を修復する *Brcc3* (Chen et al., 2006) と DNA 損傷にตอบสนองする G₂/M 期チェックポイント遺伝子である *Chk1* (Patil et al., 2013) の mRNA 発現を増加させており、p53 の分解促進に関連して DNA 損傷の蓄積が生じたことが考えられた。

また、3 日目および 7 日目の時点では、MEG、TAA および PMZ はいずれも M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子の mRNA 発現を減少させるか変化させなかった。一方、28 日目の時点で MEG は *Aurkb*、*Bub1*、*Mad2l1* および *Plk1* の発現を、TAA は *Aurka*、*Aurkb*、*Mad2l1* および *Plk1* の発現を増加させたが、PMZ はこれらの遺伝子の発現を増加させなかった。M 期スピンドルチェックポイントは有糸分裂時に染色体の不接合が生じた際に、全ての動原体が有糸分裂紡錘体と結合するまで細胞周期を停止させ、娘細胞に染色体の異数性が生じないようにしている (Weaver and Cleveland, 2005)。M 期関連遺伝子の過剰発現は、乳癌や膀胱癌、胃癌などのがんで認められ、この過剰発現は染色体不安定性や悪性化に関連していると考えられている (Honma et al., 2014; Yamamoto et al., 2006; Yuan et al., 2006; Zhang et al., 2012)。本研究で示された M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子の mRNA 発現増加は、M 期スピンドルチェックポイント機能が破綻した細胞の増加に加え、染色体の異常を是正するために M 期で細胞周期が停止している細胞が増加していることが考えられた。

(2) 肝発がん物質・肝発がんプロモーターの最大90日間反復投与での反応性の検討

ラットに28日間の投与で細胞増殖亢進を誘導する肝発がん物質を陽性対照として、動物用医薬品のうち肝発がん性が疑われる物質と肝発がんプロモーション作用を示す物質の7,28ないし90日間反復投与実験を実施し、免疫組織化学的解析を行った。その結果、投与開始後7日目では発がん物質特異的な反応は認められず、陽性対照物質であるMTPおよびTAAは28日目以降で、細胞増殖活性の亢進とともにp-Histone H3、TopoII α およびUbd陽性細胞数の増加とアポトーシスの増加を示し、今回検討した分子群の発がん物質に対する反応性が確認された。しかしながら、動物用医薬品で発がん性が指摘されているCRBおよびLMG、肝発がんプロモーターであるBNFおよびOXでは最長90日間の反復投与によっても反応性を示さなかった。今後は、今回検討した物質のうち、細胞増殖誘導性に乏しい発がん物質およびプロモーターを用いて、発がんイニシエーション後の発がん促進早期での解析を行い、通常の投与では細胞増殖活性の亢進を伴わない場合での反応性の検討を行う。

(3) 腎発がん物質の3,7ないし28日間反復投与における腎臓での反応性の検討

肝発がん物質の28日間反復投与によって生じた細胞周期制御異常の異なる標的臓器間での普遍性を検討する目的で、腎発がん物質と非発がん腎毒性物質の3,7ないし28日間反復投与を実施し、免疫組織化学的解析を行った。その結果、投与開始後3日目では、腎発がん物質であるNFTおよびTCPと非発がん腎毒性物質であるCBXにより腎尿細管上皮細胞の増殖活性が亢進し、7日目ではNFTおよびTCPのみで増殖活性が亢進した。28日目では、腎発がん物質であるNFT、ADAQおよびTCPと非発がん腎毒性物質であるCBXで増殖活性の亢進が認められた。その中で、ADAQとTCPのみがTopoII α およびUbd陽性細胞数の増加を示したが、NFTではp-Histone H3陽性細胞数のみの増加を示した。いずれの腎発がん物質もアポトーシスの増加を示さなかった。さらに、28日間の反復投与によって増殖活性の亢進が認められた、これらの群について免疫二重染色による解析を行った結果、ADAQ、TCPでは、Ubd陽性細胞でのp-Histone H3の発現割合が減少したが、NFT、CBXでは変動を認めなかった。このことは、腎発がん物質であるADAQおよびTCPでは28日間反復投与によりM期にあるUbd陽性細胞の減少を誘発していることを示唆しており、肝発がん物質の28日間反復投与と同様にM期スピンドルチェックポイント機能の破綻を伴いながら増殖活性の亢進の生じている可能性が考えられた。しかし、これらの物質ではp-Histone H3の発現細胞やアポトーシスが增加していないことから、細胞周期障害性は強くないと判断された。一方、NFTは投与初期から持続的に細胞増殖活性を亢進するものの、28日目では

Ubdの異常発現を示さないことより、細胞周期障害性を伴わない発がん機序が推定された。

ニトロフラン類の*in vivo* 遺伝毒性評価

実験1において、NFTとその構成物質でありニトロフラン骨格を共有するNFAをC57BL/6J系統の*Nrf2*ホモ欠損*gpt delta*マウスおよびその野生型に13週間強制経口投与したところ、両遺伝子型共にNFTの70 mg/kg体重の投与でレポーター遺伝子突然変異頻度が上昇する傾向がみられた。その程度は、*Nrf2*野生型マウスでは上昇傾向を示す程度に留まったが、*Nrf2*ホモ欠損マウスでは2倍程度上昇し、統計学的にも有意な変化となった。また、遺伝子型間での比較でも、*Nrf2*ホモ欠損マウスで野生型よりも統計学的に有意な高値を示していたことから、NFTの遺伝毒性にNRF2は防衛的に機能している可能性が示唆され、そ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、NFAの投与では、両遺伝子型共にレポーター遺伝子突然変異頻度の上昇は認められず、ラットとマウスで異なる結果となった。化学構造の視点では、ニトロフラン骨格の5位にアゾメチン結合を介して側鎖としてアミノヒダントインを有するNFTと、5位にアルデヒド基を有するNFAでは、今回の遺伝毒性試験で異なる結果を示した。NFTの遺伝毒性機序に酸化ストレスの大きく関与している可能性を考慮に入れると、NFTの酸化ストレス産生機序にはニトロフラン骨格の側鎖が大きく影響していることが示唆された。次年度では、*gpt*変異体の変異スペクトラムおよび8-OHdGレベルを測定し解析を行う。また、NRF2はheme oxygenase (HO-1)、NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、 γ -glutamylcysteine ligase (γ -GCL)、glutathione peroxidase (GPx)、thioredoxin (TRX)などの様々な酸化酵素群および薬物代謝酵素群を制御する転写因子である。従って、今後NRF2制御下のこれら酵素群のmRNA発現解析および蛋白発現解析を実施する。これらの解析により、NFTの遺伝毒性発現への酸化ストレス関与の詳細を検討する予定である。

実験2において、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検討するために、NFTと抗酸化剤のNAC、SAAあるいは α -TPを1%の用量でそれぞれ4週間併用投与した。その結果、NFTの単独投与では、溶媒対照群に対して、約10%程度の体重減少および腎相対重量の増加が認められ、これまでに実施したNFTをラットに投与した実験と同様な結果が得られた。抗酸化剤との併用投与群では、NFT/NACおよびNFT/SAAでNFT単独群と同程度の体重減少および腎相対重量の増加が見られ、NFT投与による影響と考えられた。一方、NFT/ α -TP群では体重減少は認められなかったが腎相対重量は増加した。各抗酸化剤の単独投与では、全ての単独群で体重に変化は認められなかったが、腎相対重量はNAC投与群のみ溶媒対照群より増加した。*gpt delta*ラットにNFTを4週間投与すると、体重および腎重量に影響を与える他、腎DNA中の8-OHdG

レベルを有意に上昇させ、レポーター遺伝子突然変異頻度が上昇傾向を示すことが確認されている。また、*gpt delta* ラットへ NFT を発がん用量で 13 週間混餌投与した実験において、腎皮質部位でより顕著にレポーター遺伝子突然変異頻度が上昇することも確認されている。従って、今後は採取した腎皮質部位における 8-OHdG レベルの測定および *in vivo* 変異原性試験を実施し、NFT の遺伝毒性への抗酸化剤による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

脂肪肝モデルを肝二段階発がんモデルに適用したところ、ラットは明らかな高脂血症を示し、肝臓には軽度から中等度の脂肪化が観察された。これにより脂肪肝モデルが成立していることが確認された。肝二段階発がんモデルにおいて高脂肪飼料を適用した研究はこれまで報告がないが、高脂肪飼料を無処置ラットに与えて継時的に観察した研究では、肝臓の脂肪化は摂取開始 2 週後に正常の 2 倍程度に増加し、その後、6 週ごろまでにいったん減少し、17 週までにわずかに増加することが報告されている (Gauthier et al., 2006)。また、肝臓の脂肪化についてラットの個体差も同時に観察されている。従って、今回観察された脂肪化の程度は摂取期間 (8 週間) を反映したものであり、軽度から中等度の脂肪化のばらつきはおそらく脂肪代謝の差に起因した個体差を反映したものと考えられる。また、肝臓における明らかな炎症性変化は認められないことから非アルコール性脂肪肝炎の前段階である非アルコール性脂肪性肝疾患の病態を再現していると判断される。

今回、被験物質として用いた MG は緑色の合成色素で、工業的に繊維等の染色に使用され、また、抗菌活性を示すことから、水産業界において水カビ病の治療薬等として広く使用されていた (Srivastava et al., 2004)。しかし、発がん性が懸念されているため、欧州等の諸外国において養殖水産動物への使用は禁止されている。米国 National Toxicology Program (NTP) で実施された MG に対するラットの 2 年間発がん性試験では、雌において肝細胞腺腫及び甲状腺濾胞細胞腺腫・腺癌、乳腺腺癌の発生頻度に軽度の増加がみられている (Culp, 2004)。遺伝毒性については、一部の *in vitro* 試験で陽性の結果が得られているが (Fessard et al., 1999)、*in vivo* 試験では陰性であるため (Mittelstaedt et al., 2004)、MG が遺伝毒性を有する可能性は否定できないものの、明らかな DNA 損傷を誘発する遺伝毒性物質との結論は得られていない。また、MG は肝細胞の空胞化を増加させるが、肝細胞の肥大が認められないことから (Cul et al., 1999)、薬物代謝酵素誘導との関連性を示さない発がん性機序を示す化合物と位置づけられる。そこで、本事業の目的に則して非ミクロソーム ROS 産生源である NOX に着目して肝前がん病変の検討を行った。その結果、GST-P 陽性巣の数と面積、Ki-67 陽性細胞率、active-caspase 3 陽性細胞率はいずれも MG により増加あるいは増加傾向を示した。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 EMIQ の併用効果を検討した。前がん病変、細胞増殖およびアポトーシスに対する APO による増加抑制が見られ、MG による肝発がん促進機序には NOX の関与を示唆する結果が得られた。これに関連して、NOX 複合体の構成成分である p22phox、p47phox 及び NOX4 の発現を免疫組織化学的に検討したところ、GST-P 陽性巣内の p22phox 及び p47phox 陽性細胞率が APO 投与により抑制ないし抑制傾向を示した。p22phox は NOX1、2 および 4 の構成分子であり、p47phox は NOX1 および 2 の構成分子であるが (Block and Gorin, 2012)、比較的明瞭な結果は p22phox の免疫染色反応から得られた。以上より、NOX 分子、特に p22phox が MG による肝前がん病変の形成に関与している可能性が考えられた。

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、p47phox の細胞膜への移行阻害と考えられており、 H_2O_2 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 p47phox 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 MG の肝発がん抑制効果に関連して、有意差は認められないものの、p47phox の発現変動が捉えられた。さらに、今回の研究では、APO による p22phox の発現抑制も明瞭に検出できたことから、p22phox の発現にも APO が関与していることも示唆された。EMIQ は抗酸化作用を持つケルセチンの配当体であり、ケルセチンに比較して水への溶解性が高く、体内への吸収性が大幅に改善されていることからその用途が広がっている (Valentova et al., 2014)。これまでの我々の研究グループでは、EMIQ は薬物酵素誘導剤である oxfendazole (Nishimura et al., 2010)、piperonyl butoxide (Hara et al., 2014) および phenobarbital (Morita et al., 2011) (いずれも CYP1A/2B 誘導剤)、 β -naphthoflavone (CYP1A 誘導剤) (Shimada et al., 2010; Kuwata et al., 2011) に加え、非酵素誘導剤である thioacetamide (Fuji et al., 2013) の肝発がんプロモーション作用を抑制することを報告している。抑制機構として GST-P 陽性巣内におけるアポトーシスの誘導 (Fuji et al., 2013) や細胞増殖活性の抑制 (Hara et al., 2014)、さらに、炎症反応に関連した酸化ストレスの抑制 (Shimada et al., 2010; Kuwata et al., 2011) が示唆されている。本研究において、EMIQ は GST-P 陽性巣内での p22phox の発現を抑制することが新たに明らかになった。ケルセチンの酸化ストレスに対する抑制機構として、ミトコンドリアの ROS 産生や xantine oxidase の抑制が知られているが、ケルセチンに糖付加された代謝物では NOX の抑制効果も指摘されている (Jones et al., 2012)。従って、この代謝物に類似すると考えられる

EMIQ についても NOX 抑制剤として機能を有することが示唆される。しかしながら、今回の研究では、MG の肝発がん促進過程に対しては EMIQ は抑制効果を示さず、NOX 発現と GST-P 陽性巢の増加を繋ぐ機序が必ずしも明確でないことも示していた。EMIQ は本実験において高脂血症を抑制していることから、脂肪化と NOX の関連性を示す新たな知見として注目された。

本モデルを遂行するにあたり、幾つかの問題点も浮き彫りになった。高脂肪飼料は通常の粉末飼料に比較し (Hara et al., 2014)、ラットの摂餌量が低下した (通常飼料 12.2±0.3 g/rat/day に対し、高脂肪飼料 9.5±3.4 g/rat/day)。これは、げっ歯類の嗜好性に加え、高カロリー食を摂取するため、通常よりも低い摂餌でカロリーの摂取が充足されたことが原因と考えられた。そのため、混餌投与した MG の検体摂取量が想定よりも低くなり、肝発がんプロモーション作用が軽度に留まったと考えられた。NOX 関連分子の免疫染色では GST-P 陽性巢内の免疫反応陽性像は比較的明瞭に捉えられたが、GST-P 陽性以外の肝細胞においては染色性のばらつきがあり解析が困難であった。また、p48phox および NOX4 では細胞質のみならず、核においても陽性反応がみられたが、その発現分布と GST-P 陽性巢との関連性は見いだせなかった。少なくとも NOX4 は核膜において発現し、NOX4 誘導 ROS 産生が DNA 傷害に関与することが示唆されていることから (Block and Gorin, 2012)、核における NOX 発現の発がんに対する意義が今後の検討課題と考えられた。

E. 結論

発がん初期過程の細胞周期解析

平成 25 年度に、肝発がん物質ないし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解析した結果、28 日間反復投与によって、肝発がん物質では増殖活性の亢進に M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を伴う可能性が示唆された。平成 26 年度は、平成 25 年度に用いた材料を用いて更に解析を進めた結果、肝発がん物質特異的に G₁/S ポイント遺伝子である *Rbl2* の発現減少、Rb 蛋白や p53 の分解を促進する *Mdm2* 遺伝子の発現増加およびリン酸化 *Mdm2* 陽性細胞の増加、DNA 損傷関連遺伝子の発現増加が見出され、このことから、肝発がん物質では、28 日間投与により M 期スピンドルチェックポイント機能のみならず G₁/S ポイント機能も破綻させることが示唆された。また、肝発がん性が指摘されている動物用医薬品と肝発がんプロモーター物質の 7、28 ないし 90 日間反復投与例での解析の結果、細胞増殖誘導性に乏しい肝発がん物質・プロモーターは最長 90 日間の反復投与によっても反応性を示さず、28 日間以上の長期投与による有効性は見出せなかった。さらに、腎発がん物質では、28 日間の投与により Ubd の発現異常を伴う細胞増殖活性の亢進を示すものの、細胞

周期障害性は強くないものや、細胞周期障害性を伴わない発がん機序を推定させるものがあると判断された。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

Nrf2 ホモ欠損 *gpt delta* マウスならびにその野生型に高用量の NFT を 13 週間投与したところ、レポーター遺伝子突然変異頻度は野生型では上昇傾向を示す程度であったが、*Nrf2* ホモ欠損では有意に上昇し、その値は同じ群の野生型に比して有意な高値となった。従って、転写因子 NRF2 は NFT の遺伝毒性に防御的に作用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が関与することが強く示唆された。一方、NFT の構成物質である NFA は、マウスでは遺伝毒性を示さないことが示され、NFT の酸化ストレス産生機序にはニトロフラン骨格の側鎖が大きく影響していることが示唆された。

F344 ラットに NFT と NAC、SAA あるいは α -TP を 1% で 4 週間併用投与した実験では、今後実施する 8-OHdG レベルの測定および *in vivo* 変異原性試験の結果を加えて、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評価する。

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 の関与について高脂肪食を適用したラット肝二段階発がんモデルを用いて検討した結果、MG の発がん促進作用は NOX 阻害剤により抑制され、前がん病変形成過程における NOX 関連分子 p22phox の関与が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura, M., Abe H., Mizukami, S., Tanaka, T., Itahashi, M., Onda, N., Toshinori, Yoshida T., Shibutani, M.: Onset of hepatocarcinogen-specific cell proliferation and cell cycle aberration during the early stage of repeated hepatocarcinogen administration in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 2015 (印刷中) .

Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Matsushita, K., Kuroda, K., Hibi, D., Suzuki, Y., Nohmi, T., Umemura, T.: Chemical structure-related mechanisms underlying *in vivo* genotoxicity induced by nitrofurantoin and its constituent moieties in *gpt delta* rats. *Toxicology*, 331, 125–135, 2015.

2. 学会発表

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：ラットの肝発がん物質投与初期での細胞増殖活性と細胞周期制御分子発現の関連性に関する解析、第 41 回日本毒理学学会学術年会、神戸、2014. 7. 2-4

Masayuki Kimura, Hajime Abe, Takeshi Tanaka, Megu

Itahashi Ayako Shiraki, Sayaka Mizukami, Toshinori Yoshida, Makoto Shibutani: Early time response of liver cells to facilitate cell cycle aberration by treatment with hepatocarcinogen in rats. 2nd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, Berlin, 2014. 8. 27-30

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラットへの肝発がん物質投与初期での肝臓における細胞増殖活性と細胞周期制御分子発現の変動、第 29 回発癌病理研究会、いわき、2014. 9. 1-2

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラットの肝発がん物質投与早期から生じる細胞周期の促進と制御異常の出現時期の検討、第 158 回日本獣医学会学術集会、札幌、2014. 9. 9-12

木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラット 28 日間反復投与における発がん予測指標分子の肝発がん物質・プロモーターに対する 90 日間反復投与での反応性、第 31 回日本毒性病理学会学術集会、東京、2015. 1. 29-30

木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳: ラット 28 日間反復投与における発がん予測指標分子の肝発がん物質・プロモーターに対する 90 日間反復投与での反応性、平成 26 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、滋賀、2015. 2. 5-6

木島綾希、石井雄二、高須伸二、横尾 諭、土屋卓磨、児玉幸夫、梅村隆志: ニトロフランチインの *in vivo* 変異原性における Nrf2 の役割、日本環境変異原学会、第 43 回大会、東京、2014. 12. 4-5

木島綾希、石井雄二、高須伸二、横尾 諭、土屋卓磨、梅村隆志: *Nrf2* 欠損 *gpt delta* マウスを用いたニトロフランチインの *in vivo* 変異原性機序の解析、第 31 回日本毒性病理学会、東京、2015. 1. 29-30

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 26 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

本研究では、動物用医薬品等の発がん性に関して、細胞周期異常に着目した短期発がん予測系の確立を目的として、ラットを用いて発がん物質反復投与時の発がん標的臓器での細胞増殖性と細胞周期関連分子の発現及びアポトーシスの誘導性を経時的に検討した。平成 25 年度は、2/3 肝部分切除群、肝発がん物質（methylugenol、thioacetamide）投与群及び非発がん肝毒性物質（acetaminophen、 α -naphthyl isothiocyanate、promethazine）投与群を設定し、肝切除後ないし投与開始後 3、7、28 日での肝臓での解析を実施した結果、投与開始後 28 日目で肝発がん物質特異的に M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻が生じる可能性を報告した。平成 26 年度は、同上の実験で G₁/S 期チェックポイント制御分子の発現変動を検討した。その結果、肝発がん物質特異的な反応として、投与開始後 28 日目に *Rbl2* の mRNA 発現減少、*Mdm2* の mRNA 発現増加、リン酸化 Mdm2 陽性細胞及び DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の増加が生じ、G₁/S 期チェックポイント機能の破綻が示唆された。また平成 26 年度は、肝発がんの陽性対照物質（methapyrilene、thioacetamide）、肝発がん性が指摘されている動物用医薬品（carbadox、leucomalachite green）、肝発がんプロモーター（ β -naphthoflavone、oxfendazole）、非発がん肝毒性物質（acetaminophen、promethazine）の 7、28 ないし 90 日間反復投与を実施して同様の検討を行った結果、細胞増殖誘導性に乏しい肝発がん物質・肝発がんプロモーターは最長 90 日間の反復投与によっても反応性を示さず、28 日間以上の長期投与による有効性は見出せなかった。更に、腎発がん性陽性の対照物質（1-amino-2,4-dibromoantraquinone、1,2,3-trichloropropane）、腎発がん性が指摘されている動物用医薬品（nitrofurantoin）、非発がん腎毒性物質（1-chloro-2-propanol、triamterene、carboxin）の 3、7 ないし 28 日間反復投与を実施し、肝臓とは異なる発がん標的性での細胞周期関連分子の経時的な反応性を検討した。その結果、腎発がん物質には、投与開始後 28 日目で発がん物質特異的な M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を示すものの、細胞周期障害性は強くないものや、細胞周期障害性を伴わない発がん機序を推定させる物質があると判断された。

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のある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、発がん標的部位に一致して、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、増殖活性の亢進と共に、アポトーシスの亢進および G₂/M 期関連分子発現細胞の増加を誘発することと、肝発がん物質の thioacetamide (TAA) と腎発がん物質の ochratoxin A に共通して、M 期スピンドルチェックポイント制御分子である Mad2 のキネトコアへの局在を阻止する Ubiquitin D (Ubd) の G₂ 期からの異常発現を誘発することを見出している。このことは、発がん物質の投与早期から、M 期スピンドルチェックポイント制御機構からすり抜ける細胞

のことは、発がん物質の投与早期から、M期スピンドルチェックポイント制御機構からすり抜ける細胞と共に、G₂/M期停止やアポトーシスに陥る細胞の増加を招いていることを示唆し、発がん過程早期のメカニズムとして短期発がん予測系への応用が期待される (Tani et al., 2012, Yafune et al., 2013)。しかし、M期スピンドルチェックポイント以外の細胞周期制御機構の傷害の有無や、28日間投与で細胞増殖活性亢進を示さない発がん物質・発がんプロモーターの長期間投与した際の反応性の変化、肝発がん物質で認められた細胞周期制御障害の肝臓とは異なる発がん標的臓器での反応性については未検討である。

平成25年度は、ラットに2/3肝部分切除及び肝発がん物質、非発がん肝毒性物質の反復投与を実施し、切除後ないし投与開始後3、7ないし28日間での細胞増殖性と細胞周期関連分子の発現及びアポトーシスの誘発性を経時的に解析し、発がん物質特異的な反応の出現時期を検討した。その結果、投与開始後28日目で、肝発がん物質特異的にM期スピンドルチェックポイント機能の破綻が生じる可能性が示唆された。平成26年度は、25年度に解析を実施した肝臓を標的とした実験サンプルを用いて、発がん物質の短期間投与によるM期スピンドルチェックポイント以外の細胞周期制御機構、特にG₁/S期チェックポイントにおける制御異常の可能性の有無を検討した。また、28日間投与で細胞増殖活性亢進を示さない発がん物質・発がんプロモーターを長期間投与した際の反応性を検討する目的で、典型的な肝発がんプロモーター物質と共に、肝発がん性が指摘されているものの増殖活性などが検討されていない動物用医薬品をラットに対して最大90日間反復投与した。その際、28日間投与で細胞増殖亢進が確認できている肝発がん物質を陽性対象として実施した。さらに、28日間反復投与によって生じた肝発がん物質に特異的な細胞周期制御障害が異なる発がん標的臓器でも認められるかを検討する目的で、腎発がん物質と非発がん腎毒性物質の3、7ないし28日間反復投与を実施した。これらの肝臓ないし腎臓の発がん標的組織について、免疫組織化学手法による細胞増

殖指標、アポトーシス指標および細胞周期関連分子群の発現分布と免疫二重染色法によるUbdのG₂期における発現の変化、real-time RT-PCR方による細胞周期チェックポイント関連遺伝子ないしDNA損傷関連遺伝子のmRNA発現の変化を解析した。

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。

(1) 肝発がん物質投与に起因するG₁/S期チェックポイント制御異常の検討

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)、methyleugenole(MEG)群(n=22)、TAA群(n=20)、acetaminophen(APAP)群(n=20)、 α -naphthyl isothiocyanate(ANIT)群(n=20)、promethazine(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、400ppm(TAA)、10,000ppm(APAP)、1000ppm~600ppm(ANIT)を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、MEG(1000mg/kg体重)群とPMZ(200~100mg/kg体重)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日後に摂餌量の減少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400ppm(TAA群)、10,000ppm(APAP群)、600ppm(ANIT群)、1000~800mg/kg体重(MEG群)、100mg/kg体重(PMZ群)の混餌ないし強制経口投与を

28日間行った。MEG投与群で、投与開始後11日目において全身状態の悪化から1匹安楽殺を行い、以後投与量を変更した。MEGおよびTAAは肝発がんの陽性対照物質として選択し、過去に行われたラットを用い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 (Becker, 1983; NTP, 2000)。

(2) 肝発がん物質・肝発がんプロモーターの最大90日間反復投与での反応性の検討

1週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=20)、methapyrilene (MTP) 群 (n=20)、carbadox (CRB) 群 (n=20)、leucomalachite green (LMG) 群 (n=20)、 β -naphthoflavone (BNF) 群 (n=20)、oxfendazole (OX) 群 (n=20)、promethazine (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、1000 ppm (MTP群)、300 ppm (CRB群)、1160 ppm (LMG群)、10,000 ppm (BNF群)、500 ppm (OX群) を混ぜた飼料と水道水にて飼育した。また、PMZ (100 mg/kg 体重) 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日目に各群半数ずつ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28日間の反復投与で増殖活性の亢進を示さない肝発がん物質・肝発がんプロモーターの反応性を検討する目的で、動物を無処置対照群 (n=10)、MTP群 (n=11)、TAA群 (n=11)、CRB群 (n=10)、TAA群 (n=10)、LMG群 (n=10)、BNF群 (n=10)、OX群 (n=10)、PMZ群 (n=11) に分け、それぞれ1000 ppm (MTP群)、400 ppm (TAA群)、300 ppm (CRB群)、1160 ppm (LMG群)、10,000 ppm (BNF群)、500 ppm (OX群)、10,000 ppm (APAP群)、100 mg/kg 体重 (PMZ群) の90日間反復投与を行った。CRBおよびLMGは動物用医薬品として選択した。CRBは設定用量で肝発がん性が報告されており (Sykora & Vortel, 1986)、LMGは肝発がん性が疑われており、2年間の発がん性試験で肝腫瘍の発生頻度が増加傾向を示した投与濃度の倍の濃度を設定した (Culp et al., 2006)。MTP (Lijinsky & Kovatch, 1986)、TAA (NTP, 2004) は肝発

がんの陽性対照物質として、BNF (Dewa et al., 2009)、OX (Shoda et al., 2000) は肝発がんプロモーターとして選択し、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 (Shoda et al., 2000; Dewa et al., 2009)。

(3) 腎発がん物質の3、7ないし28日間反復投与における腎臓での反応性の検討

1週間の馴化期間後、動物を無処置対照群 (n=30)、nitrofurantoin (NFT) 群 (n=33)、1-amino-2,4-dibromoantraquinone (ADAQ) 群 (n=33)、1,2,3-trichloropropane (TCP) 群 (n=33)、1-chloro-2-propanol (CPN) 群 (n=30)、triamterene (TAT) 群 (n=30)、carboxin (CBX) 群 (n=30) に分けた。無処置対照群、TCP群は、基礎飼料と蒸留水にて飼育し、投与群はそれぞれ、5000~3000 ppm (NFT群)、25,000 ppm (ADAQ群)、1200 ppm (TAT群)、2000 ppm (CBX群) を混ぜた飼料と蒸留水にて飼育した。また、TCP群においては、TCPを125 mg/kg 体重の割合で毎日強制経口投与した。NFT投与群では投与開始後10日目に摂餌量の減少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、28日後に各群全動物数の3分の1ずつ深麻酔下で放血殺により安楽殺を行い、腎臓を摘出した。NFTは動物用医薬品であり、腎発がん性が報告されている (NTP, 1989)。ADAQ、TCPは腎発がん物質として選択し、過去に行われた発がん性試験にて、腎臓に腫瘍の形成が認められる用量を投与量として設定した (NTP, 1993; NTP 1996)。

それぞれの動物実験で採取した肝臓および腎臓は、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、その後パラフィン包埋し、免疫組織化学的解析に供した。また、肝臓組織については、臓器摘出後液体窒素により直ちに凍結し、解析に使用するまで -80°C の環境下にて保存した。

免疫組織学的解析及びアポトーシスの解析

免疫組織化学的検索として、採取した肝臓ないし腎臓を 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} 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} はマイクロウェーブ 95°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 (200 倍希釈; Dako, Denmark)、マウス抗 p21^{Cip1} 抗体 (1000 倍希釈; Abcam, UK) 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'-ジアミノベンジ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 phosphorylated-histone H3 (p-Histone H3)、topoisomerase II alpha (TopoII α)、Ubd、cleaved caspase 3、phosphorylated-Mdm2 (p-Mdm2) 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、p-Histone H3、TopoII α 、Ubd は 0.5 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 および p-Mdm2 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 p-Histone H3 抗体 (1000 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, USA)、ウサギ抗 TopoII α 抗体 (1000 倍希釈; Abcam)、ウサギ抗 Ubd 抗体 (1000 倍希釈; Proteintech Group, USA)、ウサギ抗 cleaved caspase 3 抗体 (1000 倍希釈; Cell Signaling Technologies, USA)、p-Mdm2 (400 倍希釈; Cell Signaling Technologies) 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'-ジアミノベンジ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。

また腎臓組織については、更にアポトーシスの程度を検討するために、ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, MA, USA) を用いて TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 検出法による解析を行った。脱パラフィンした組織を 20 μ g/ml proteinase K で 15 分間室温に静置した。内在性のペルオキシダーゼ活性は 3.0% 過酸化水素で抑制した。発色および対比染色は免疫組織化学染色と同様に行った。

また、腎臓について、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'-ジアミノベンジ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。

陽性細胞の組織形態学的解析

肝臓に免疫組織化学染色を施した後、Ki-67、p-Histone H3、TopoII α 、Ubd、p21^{Cip1}、p-Mdm2 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。また、腎臓に Ki-67、p-Histone H3、TopoII α 、Ubd の免疫組織化学染色ないし TUNEL アッセイを施した後、400 倍視野で左右腎臓の髄質外帯 (OSOM) から無作為に 5 視野ずつ選択して陽性尿細管上皮細胞数を視覚的に計数した。そして、総細胞数を WinROOF image analysis and measurement software を用いて計数し、陽性細胞数の総細胞数に対する割合を求めた。

また、腎臓を用いて、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