

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 期チェック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 μ g 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、 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) にて算出した。用いたプライマーは Table 1 に示した。

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。

(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

(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

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 法による解析を行い、結果は Table 2 に示した。

投与開始後 3 日目では、G₁/S 期チェック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*、*Rb1* 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。*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。*Mad211* 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。*Brc2*、*Chek2*、*Esco1* 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。*Brc3* 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。*Esco1*、*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 期チェック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。*Rb1*、*Rb12* 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*、*Mad211* 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。*Mad111* 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。*Brc2*、*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。*Brc3* 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 期チェック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。*Rb12* 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。*Brcal*、*Brc2*、*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 (Fig. 1A)。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 (Fig. 1B)。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 (Fig. 1C)。

(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 (Fig. 2A)。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 (Fig. 2B)。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 (Fig. 2C)。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 (Fig. 2D)。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 (Fig. 2E)。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 (Fig. 2F)。

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 (Fig. 3A)。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 (Fig. 3B)。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 (Fig. 3C)。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 (Fig. 3D)。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 (Fig. 3E)。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 (Fig. 3F)。

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 (Fig. 4A)。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 (Fig. 4B)。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 (Fig. 4C)。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 (Fig. 4D)。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 (Fig. 4E)。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 (Fig. 4F)。

(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 (Fig. 5A)。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 (Fig. 5B)。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 (Fig. 5C)。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 (Fig. 5D)。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 (Fig. 5E)。

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 (Fig. 6A)。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 (Fig. 6B)。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 (Fig. 6C)。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 (Fig. 6D)。TUNEL 陽性細胞率は、NFT群、TCP群で有意に増加した (Fig. 6E)。

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 (Fig. 7A)。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 (Fig. 7B)。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 (Fig. 7C)。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 (Fig. 7D)。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 (Fig. 7E)。

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 (Fig. 8A)。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 (Fig. 8B)。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。

D. 考察

(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

平成 25 年度の解析の結果、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 期チェック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 期チェック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 チェック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) (Malmlof 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 *Chek1* (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、乳腺癌や膀胱癌、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

28 日間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。

E. 結論

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期チェックポイント遺伝子である*Rb12*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期チェック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。

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) .

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回日本毒性学会学術年会、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

なし

2. 実用新案登録
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

3. その他

Table 1. Sequence of primers used for real-time RT-PCR

Gene	Accession no.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
G₁/S checkpoint-related genes			
<i>Cdkn1a</i>	NM_080782	ACCAGCCACA GGCACCAT	CGGCATACTT TGCTCCTGTG T
<i>Cdkn2a</i>	NM_031550	CAAACGCCCC GAACACTT	CACTTTGACG TTGCCATCA
<i>Rb1</i>	NM_017045	CACCAGGCCT CCTACCTGT C	AGGAATCCGC AAGGGTGAAC
<i>Rbl2</i>	NM_031094	AAGTGAATCG CCTGCAAAAA G	CTCGGTCATT AGCTACATCT TGA
<i>Mdm2</i>	NM_001108099	GAAGGAGGAC ACACAAGACA AAGA	ATGGCTCGAT GGC GTTCA
<i>Tp53</i>	NM_030989	CATGAGCGTT GCTCTGATGG T	GATTTCTTC CACCCGATA A
Spindle checkpoint and M phase-related genes			
<i>Aurka</i>	NM_153296	AAGAGAGTCA TCCACAGAGA CATCAA	CGATCTTCAA CTCCCCATTT G
<i>Aurkb</i>	NM_053749	CGGATGCATA ATGAGATGGT AGAT	TCCCCACCAT CAGTTCATAG C
<i>Bub1</i>	NM_001106507	CCCTAGCTCC CAGTCCTAAA AGT	TTGTGGAATG GTGTAGATGA AAGC
<i>Mad111</i>	NM_001109387	TCCAGGAGTT CCGCAAGGT	GAGGCGGTAT TGGCTCTCAG T
<i>Mad211</i>	NM_001106594	ACAGCCACTG TGACATTTCT ACCA	CCCATTCTT CCCACTTTTC A
<i>Plk1</i>	NM_017100	TCCCACCAAG GTTTTCAATA GC	TGTGAGAGGC TTCCTGTTGC T
DNA damage-related genes			
<i>Atm</i>	NM_001106821	AGGCTGTCCG CAGGTGTTT	TGGTGTACGG CGTATCTTTG C
<i>Brca1</i>	AF036760	TGATGTGGGA CTGGGTGTTG	CTGTACCAGG TAGGCATCCA GAT
<i>Brca2</i>	NM_031542	AGGCTTTCCG TTGGCAGAT	AGAGACCCAG ACGCTAGAAA TCA
<i>Brcc3</i>	NM_001127300	CCACATCCAC TCGGTCATCA T	AAATCTCCAC GCGGTCCTT
<i>Chek1</i>	NM_080400	TGGCAGCTGG CAAAGGA	AATCCCAGTC TTCCACAAAA GG
<i>Chek2</i>	NM_053677	TTGCTTCGAT GGACCACTGT T	GATGCGAAAAG TGCTTCTTGC T
<i>Esco1</i>	NM_001126299	CCAAATCCCA CTGCCGTTA	GCTGCCTCTT TTGCTCTTTC C
<i>Gadd45a</i>	NM_024127	CACCATAACT GTCGGCGTGT A	GGCACAGGAC CACGTTGTC
<i>Rad17</i>	NM_001024778	GACTGGGTAG ATCCGGCATT T	AAACGGTGAT GGTGGTGACA
<i>Rad50</i>	NM_022246	TGGCCCCTGG CAGTGA	AACTTCGCAC GCCCAGAGT
Housekeeping gene			
<i>Hprt1</i>	NM_012583	GCCGACCGGT TCTGTCAT	TCATAACCTG GTTCATCATC ACTAATC

Abbreviations: Atm, ATM serine/threonine kinase; Aurka, aurora kinase A; Aurkb, aurora kinase B; Brca1, breast cancer 1, early onset; Brca2, breast cancer 2, early onset; Brcc3, BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3; Bub1, BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase; Cdkn1a, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; Cdkn2a, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; Chek1, checkpoint kinase 1; Chek2, checkpoint kinase 2; Esco1, establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1; Gadd45a, growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha; Hprt1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; Mad111, MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); Mad211, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); Mdm2, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; Plk1, polo-like kinase 1; Rad17, RAD17 homolog (S. pombe); Rad50, RAD50 homolog (S. cerevisiae); Rb1, retinoblastoma 1; Rbl2, retinoblastoma-like 2; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; Tp53, tumor protein p53.

Table 2. Relative transcript levels in the liver of rats treated with MEG, TAA or PMZ for up to 28 days

Gene	Day 3			Day 7			Day 28		
	MEG ^a	TAA ^a	PMZ ^a	MEG ^a	TAA ^a	PMZ ^a	MEG ^a	TAA ^a	PMZ ^a
<i>G₁/S checkpoint-related genes</i>									
<i>Cdkn1a</i>	2.13±0.59 ^{b**}	2.61±0.38 ^{**}	0.41±0.13 ^{**}	2.14±0.43 ^{**}	2.21±0.26 ^{**}	0.30±0.07 ^{**}	2.67±0.40 ^{**}	2.99±0.62 ^{**}	0.28±0.08 ^{**}
<i>Cdkn2a</i>	0.32±0.18 [*]	0.47±0.31 [*]	0.43±0.29 [*]	0.57±0.46 [*]	0.70±0.28	0.47±0.37 [*]	1.58±0.49	2.52±0.19 ^{**}	0.73±0.15
<i>Rb1</i>	0.54±0.33 [*]	0.52±0.10 ^{**}	0.30±0.09 ^{**}	0.49±0.09 ^{**}	0.52±0.07 ^{**}	0.55±0.04 ^{**}	0.79±0.05	0.40±0.06 ^{**}	0.57±0.15 ^{**}
<i>Rbl2</i>	0.55±0.28 [*]	0.33±0.06 ^{**}	0.65±0.32	0.42±0.07 ^{**}	0.30±0.04 ^{**}	0.70±0.15 [*]	0.55±0.06 ^{**}	0.33±0.04 ^{**}	0.82±0.14
<i>Mdm2</i>	2.86±1.65	3.36±0.64 ^{**}	0.86±0.35	4.55±0.76 ^{**}	3.75±0.67 ^{**}	0.85±0.14	3.74±1.13 ^{**}	3.20±0.36 ^{**}	0.90±0.14
<i>Tp53</i>	0.73±0.34 [*]	1.51±0.19 ^{**}	0.49±0.10 ^{**}	0.64±0.11 ^{**}	1.41±0.18 ^{**}	0.67±0.12 ^{**}	0.96±0.08	1.63±0.27 ^{**}	0.99±0.11
<i>Spindle checkpoint and M phase-related genes</i>									
<i>Aurka</i>	0.22±0.12 ^{**}	1.27±0.38	0.13±0.04 ^{**}	0.36±0.07 ^{**}	0.87±0.18	0.80±0.36	1.34±0.32	1.96±0.26 ^{**}	1.03±0.31
<i>Aurkb</i>	0.34±0.31 [*]	0.42±0.34 [*]	0.02±0.01 ^{**}	0.21±0.07 ^{**}	0.30±0.07 ^{**}	0.58±0.45	2.61±0.82 ^{**}	1.87±0.36 [*]	1.12±0.36
<i>Bub1</i>	0.17±0.10 ^{**}	0.79±0.31	0.08±0.02 ^{**}	0.23±0.08 ^{**}	0.38±0.09 ^{**}	0.75±0.42	2.16±0.52 ^{**}	1.50±0.15	1.22±0.36
<i>Mad111</i>	0.73±0.32	0.56±0.10 ^{**}	0.72±0.27	0.60±0.06 ^{**}	0.49±0.07 ^{**}	0.80±0.14 ^{**}	0.93±0.29	0.52±0.07 ^{**}	0.87±0.11
<i>Mad211</i>	0.75±0.57	0.69±0.47	0.16±0.05 ^{**}	0.43±0.07 ^{**}	0.95±0.17	0.66±0.32	2.18±0.64 ^{**}	2.68±0.43 ^{**}	1.25±0.34
<i>Plk1</i>	0.13±0.09 ^{**}	0.94±0.34	0.02±0.01 ^{**}	0.21±0.09 ^{**}	0.36±0.11 ^{**}	0.85±0.56	2.24±0.83 ^{**}	1.92±0.37 ^{**}	1.21±0.35
<i>DNA damage-related genes</i>									
<i>Atm</i>	0.79±0.32	0.92±0.18	0.67±0.22 [*]	0.71±0.07	0.78±0.09	0.94±0.11	0.76±0.10 [*]	0.95±0.08	0.88±0.11
<i>Brcal</i>	0.27±0.15 ^{**}	0.76±0.25 [*]	0.25±0.12 ^{**}	0.24±0.03 ^{**}	0.47±0.08 ^{**}	0.68±0.26	1.18±0.31	0.97±0.07	0.87±0.14
<i>Brcal2</i>	0.48±0.26 [*]	1.19±0.39	0.26±0.09 ^{**}	0.54±0.12 ^{**}	1.03±0.25	0.91±0.37	0.73±0.06	0.72±0.06	0.86±0.13
<i>Brcal3</i>	0.78±0.41	0.76±0.10 ^{**}	0.70±0.25 [*]	0.62±0.09 ^{**}	0.67±0.09 ^{**}	0.57±0.12 ^{**}	1.87±0.37 [*]	3.17±0.86 ^{**}	1.37±0.40
<i>Chek1</i>	0.73±0.42	0.81±0.41	0.30±0.11 ^{**}	0.61±0.08 ^{**}	1.06±0.22	0.93±0.15	1.98±0.48 ^{**}	1.94±0.27 ^{**}	1.24±0.28
<i>Chek2</i>	0.45±0.22 ^{**}	1.28±0.36	0.36±0.16 ^{**}	0.46±0.03 ^{**}	1.27±0.26	0.84±0.17	0.84±0.29	1.29±0.11	0.70±0.13
<i>Esco1</i>	0.70±0.35 [*]	1.53±0.25 ^{**}	0.57±0.15 ^{**}	0.51±0.05 ^{**}	1.74±0.21 ^{**}	0.72±0.18 ^{**}	0.61±0.12 ^{**}	1.51±0.15 ^{**}	0.59±0.09 ^{**}
<i>Gadd45a</i>	1.88±1.31	3.18±0.61 ^{**}	1.97±0.11 ^{**}	1.10±0.25	2.35±0.46 ^{**}	0.47±0.14 ^{**}	1.83±0.56	3.07±0.50 ^{**}	1.18±0.63
<i>Rad17</i>	0.89±0.45	1.94±0.29 ^{**}	0.79±0.17	0.69±0.12 ^{**}	2.20±0.23 ^{**}	0.65±0.17 ^{**}	0.88±0.07	2.15±0.17 ^{**}	0.74±0.09 ^{**}
<i>Rad50</i>	0.94±0.50	1.18±0.26	0.62±0.22	0.71±0.15 ^{**}	1.00±0.13	0.80±0.22	0.85±0.08	1.27±0.14 ^{**}	0.95±0.10

Abbreviations: Atm, ATM serine/threonine kinase; Aurka, aurora kinase A; Aurkb, aurora kinase B; Brcal, breast cancer 1, early onset; Brcal2, breast cancer 2, early onset; Brcal3, BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3; Bub1, BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase; Cdkn1a, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; Cdkn2a, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; Chek1, checkpoint kinase 1; Chek2, checkpoint kinase 2; Esco1, establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1; Gadd45a, growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha; Mad111, MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); Mad211, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); Mdm2, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; MEG, methyleugenol; Plk1, polo-like kinase 1; PMZ, promethazine hydrochloride; Rad17, RAD17 homolog (*S. pombe*); Rad50, RAD50 homolog (*S. cerevisiae*); Rb1, retinoblastoma 1; Rbl2, retinoblastoma-like 2; TAA, thioacetamide; Tp53, tumor protein p53.

^a n = 6.

^b Values represent relative expression levels expressed as mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

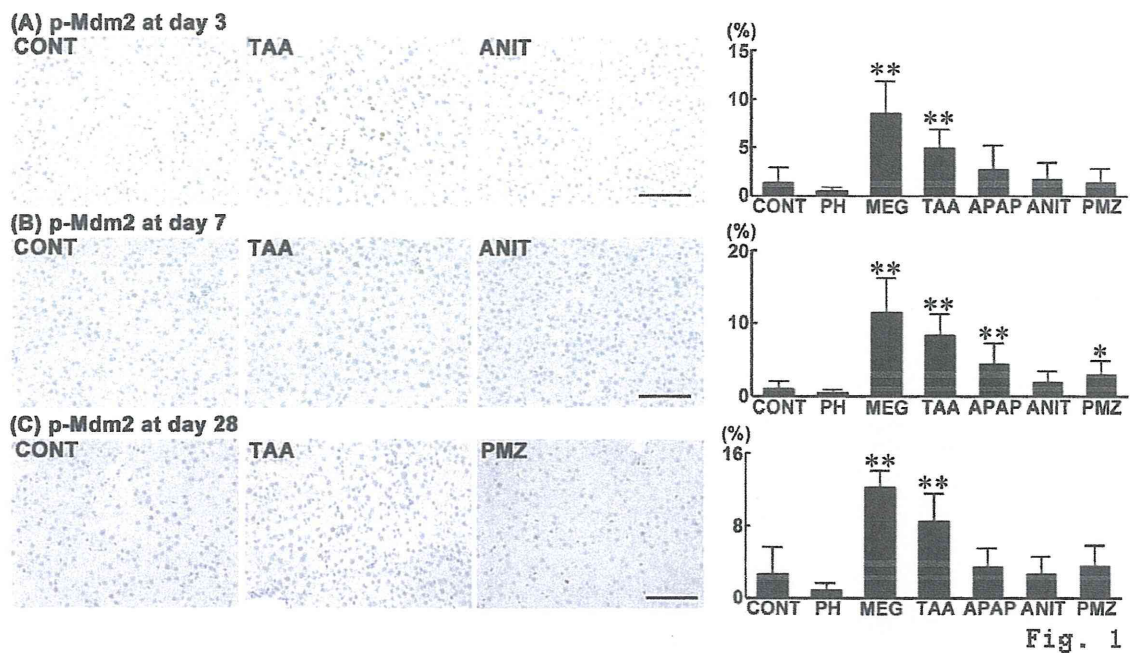


Fig. 1

Fig. 1. Distribution of p-Mdm2⁺ cells in the liver in rats after 3, 7 or 28 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of p-Mdm2⁺ cells in the liver of the representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or ANIT (A, B) and treated with TAA or PMZ (C). The graph show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) p-Mdm2 at day 3, (B) p-Mdm2 at day 7, (C) p-Mdm2 at day 28. Bar = 100 μ m. **, * $P < 0.05, 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

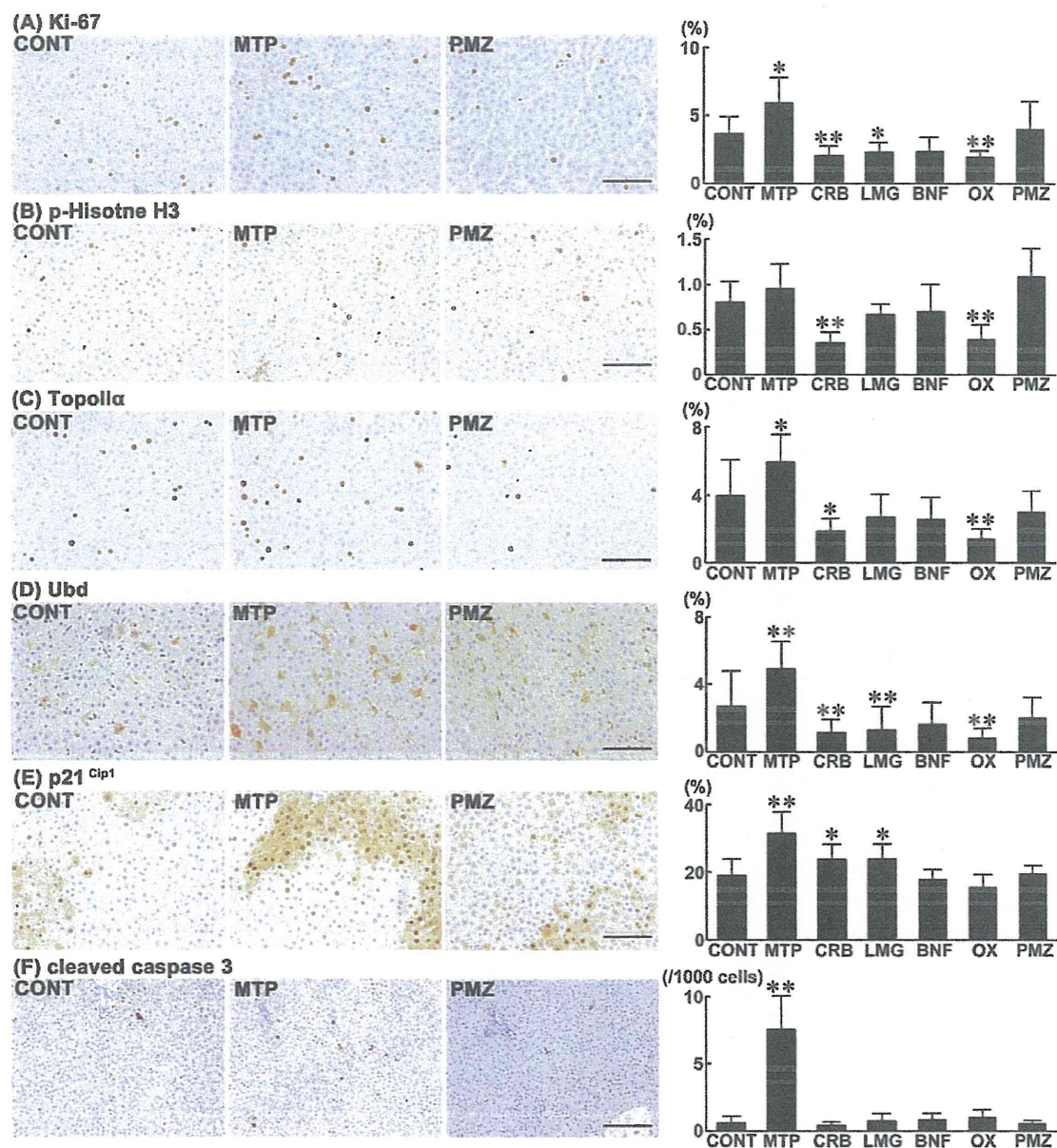


Fig. 2

Fig. 2. Distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺, p21^{Cip1}⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver in rats after 7 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺, p21^{Cip1}⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver of the representative cases from untreated controls and animals treated with MTP 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) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TopoIIα, (D) Ubd, (E) p21^{Cip1}, (F) cleaved caspase 3. Bar = 100 μm (A, B, C, D and E) or 200 μm (F). **, * *P* < 0.05, 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

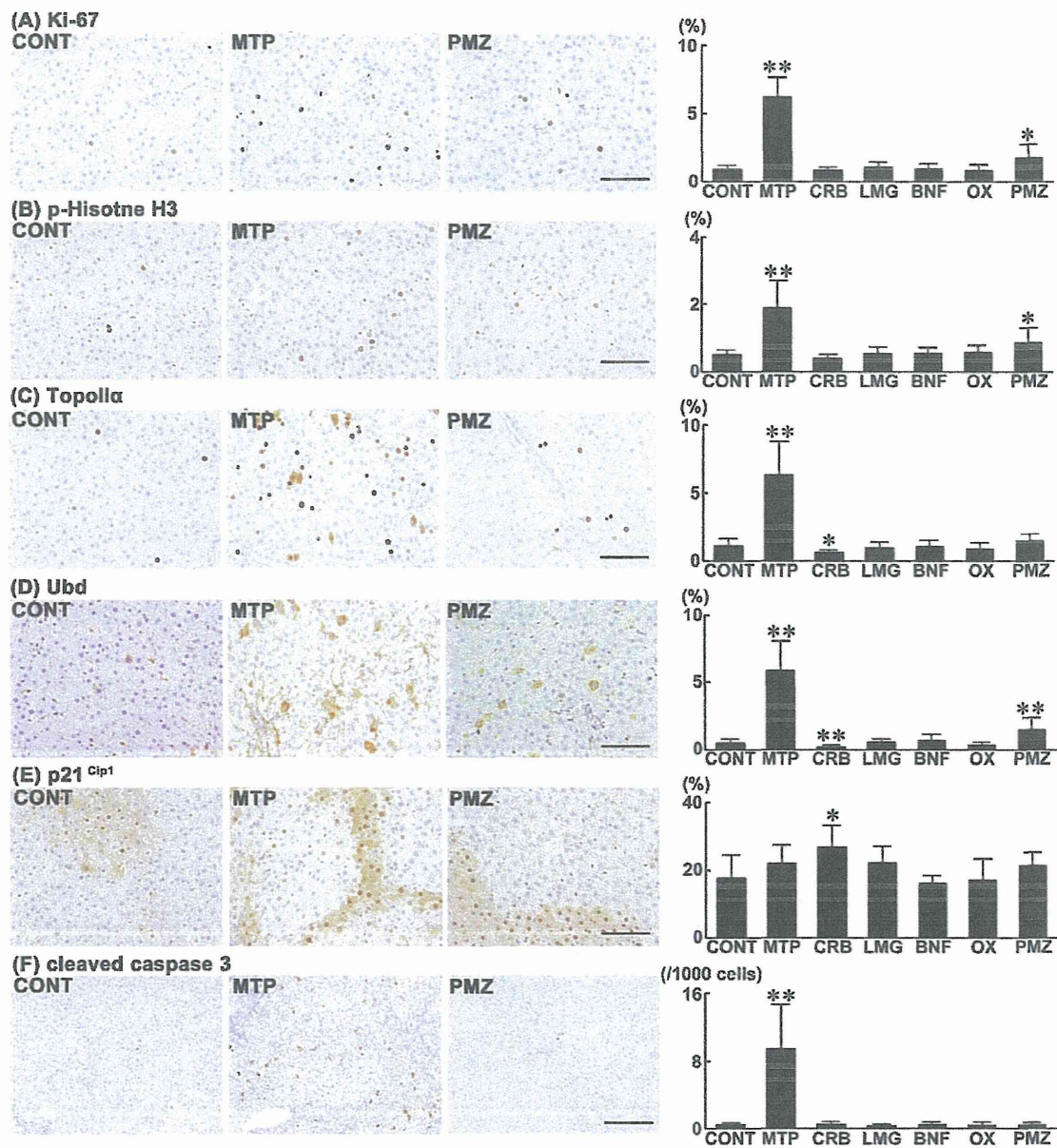


Fig. 3

Fig. 3. Distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺, p21^{Cip1}⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver in rats after 28 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺, p21^{Cip1}⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver of the representative cases from untreated controls and animals treated with MTP 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) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TopoIIα, (D) Ubd, (E) p21^{Cip1}, (F) cleaved caspase 3. Bar = 100 μm (A, B, C, D and E) or 200 μm (F). **, * *P* < 0.05, 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

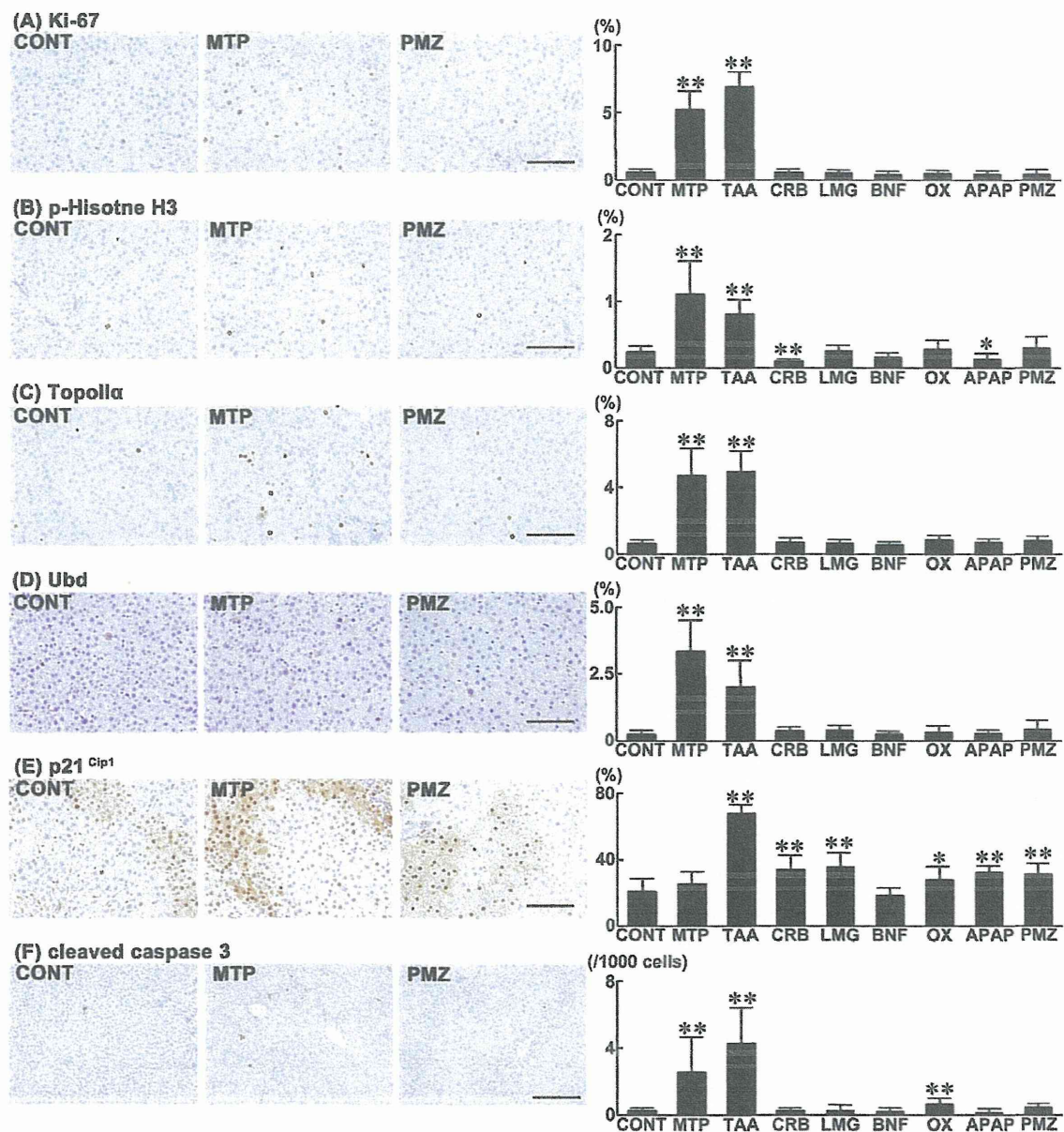


Fig. 4

Fig. 4. Distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺, p21^{Cip1}⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver in rats after 90 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺, p21^{Cip1}⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver of the representative cases from untreated controls and animals treated with MTP 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) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TopoIIα, (D) Ubd, (E) p21^{Cip1}, (F) cleaved caspase 3. Bar = 100 μm (A, B, C, D and E) or 200 μm (F). **, * *P* < 0.05, 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

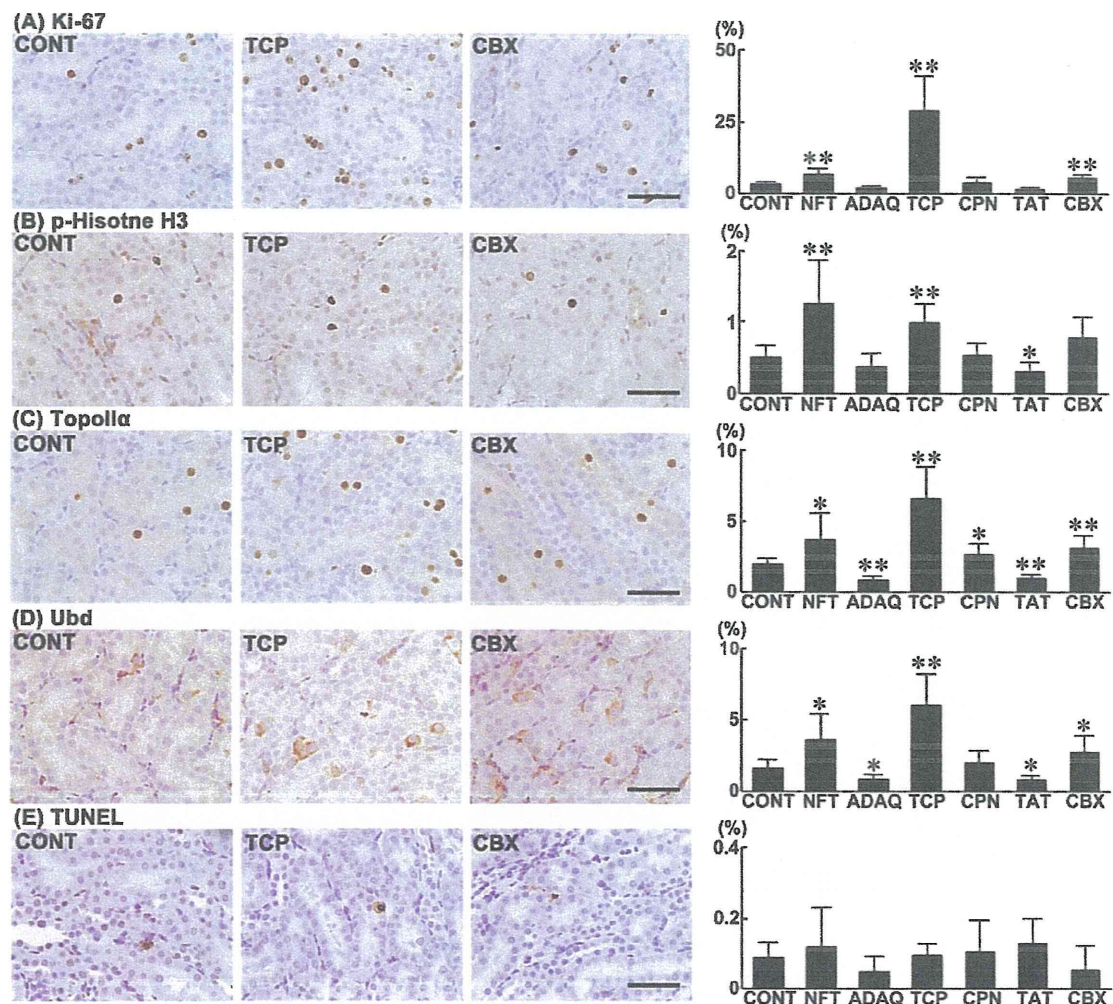


Fig. 5

Fig. 5. Distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺ and TUNEL⁺ cells in the kidney in rats after 3 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺ and TUNEL⁺ cells in the OSOM of the representative cases from untreated controls and animals treated with TCP or CBX. The graphs show positive cell ratios (%) of proximal tubular epithelial cells per total cells counted in the OSOM using 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TopoIIα, (D) Ubd, (E) TUNEL. Bar = 50 μm. **, * *P* < 0.05, 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

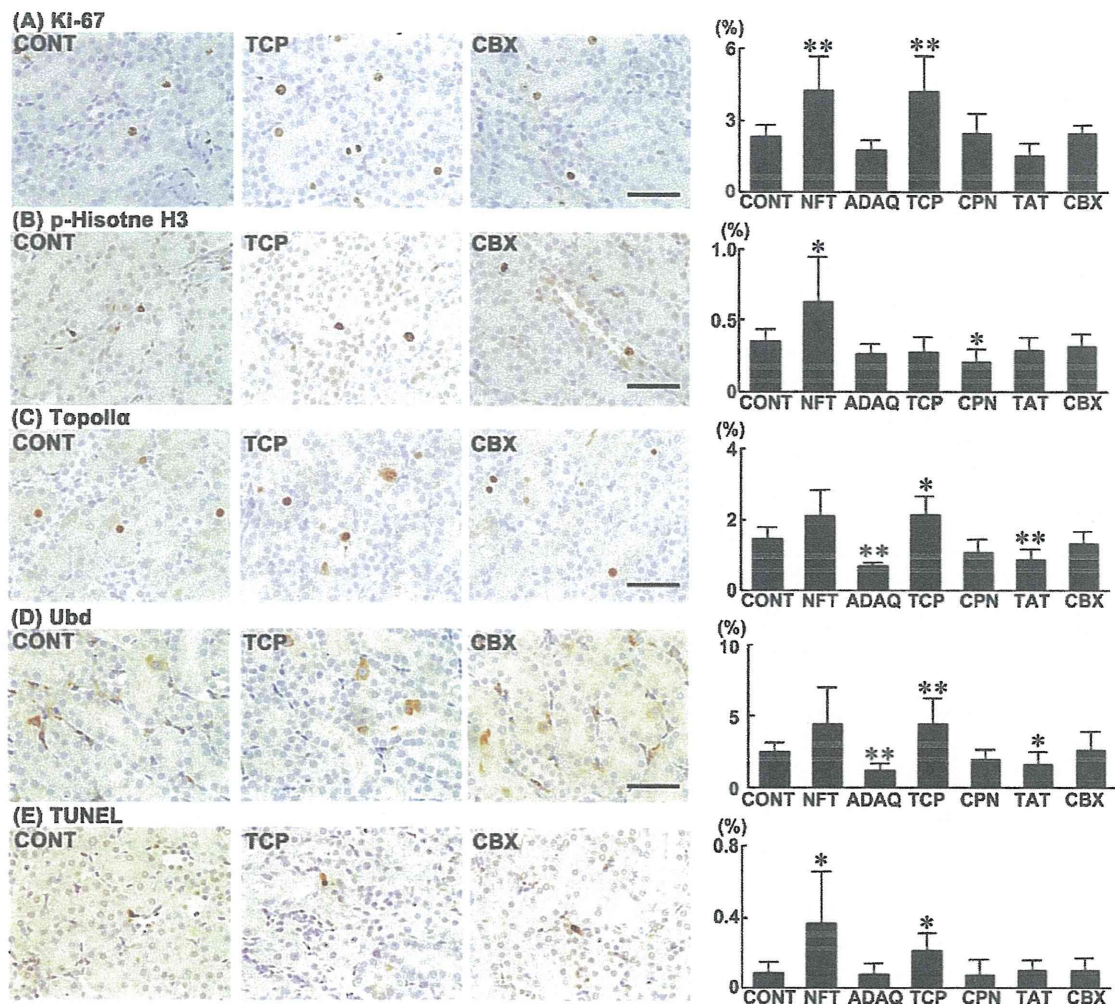


Fig. 6

Fig. 6. Distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺ and TUNEL⁺ cells in the kidney in rats after 7 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺ and TUNEL⁺ cells in the OSOM of the representative cases from untreated controls and animals treated with TCP or CBX. The graphs show positive cell ratios (%) of proximal tubular epithelial cells per total cells counted in the OSOM using 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TopoIIα, (D) Ubd, (E) TUNEL. Bar = 50 μm. **, * *P* < 0.05, 0.01 vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

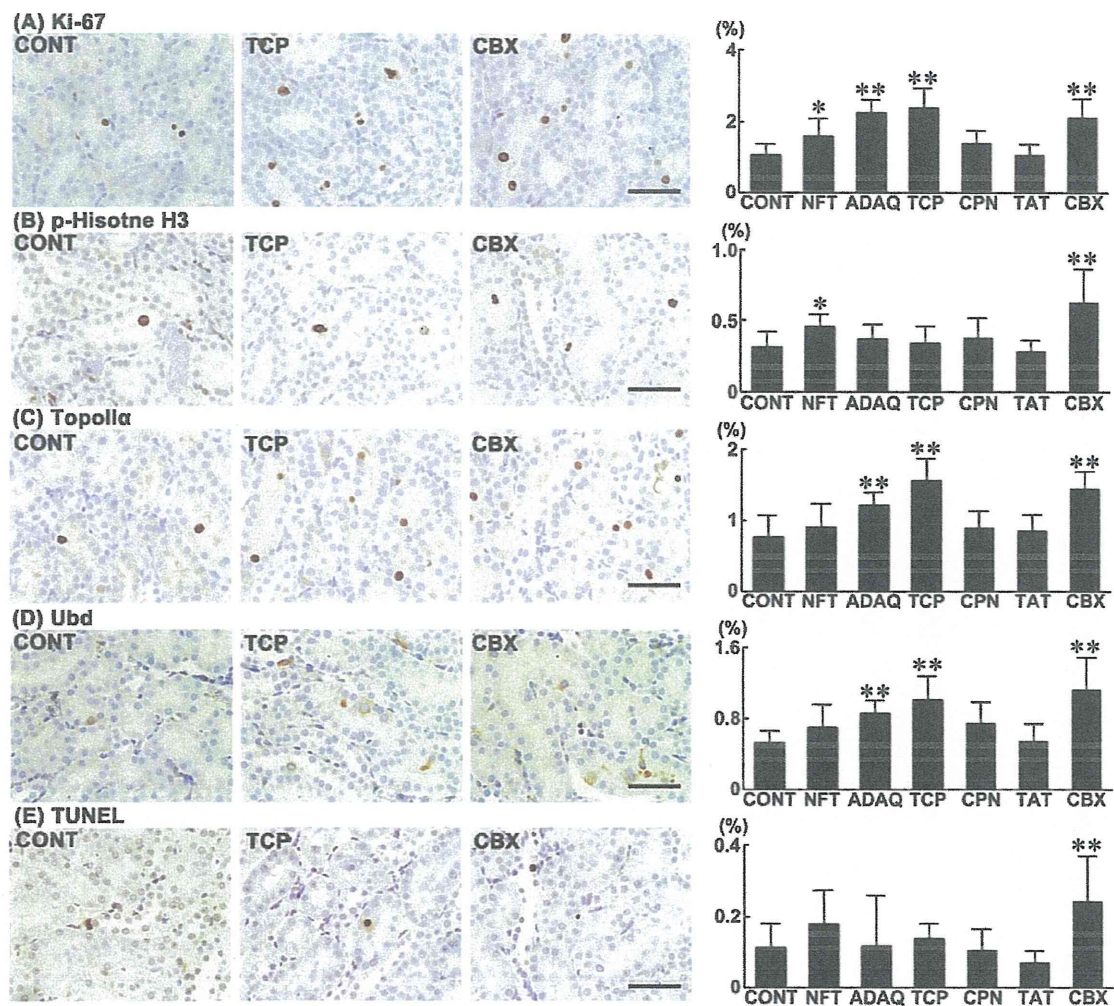


Fig. 7

Fig. 7. Distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺ and TUNEL⁺ cells in the kidney in rats after 28 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TopoIIα⁺, Ubd⁺ and TUNEL⁺ cells in the OSOM of the representative cases from untreated controls and animals treated with TCP or CBX. The graphs show positive cell ratios (%) of proximal tubular epithelial cells per total cells counted in the OSOM using 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TopoIIα, (D) Ubd, (E) TUNEL. Bar = 50 μm. **, * *P* < 0.05, 0.01 vs. untreated controls (Dunnnett's or Steel's test).

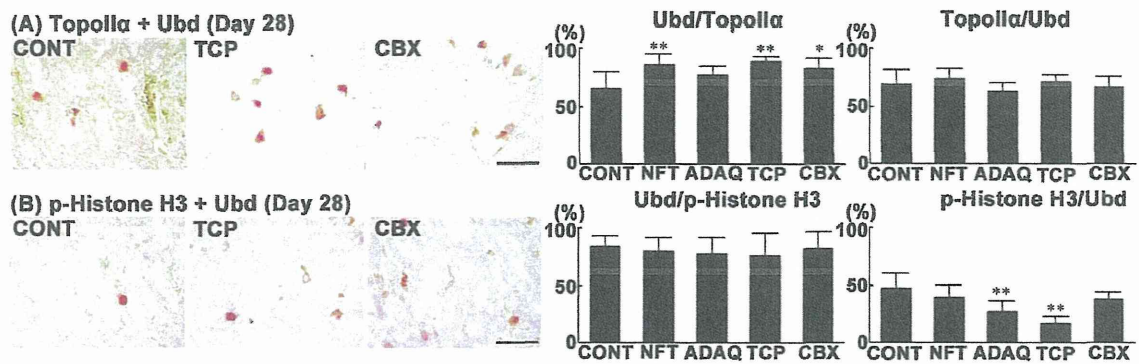


Fig. 8

Fig. 8 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 TopoIIα co-expressing Ubd (Ubd/ TopoIIα) in the OSOM in rats after 28 days from the start of treatment. Photomicrographs show distribution of Ubd/p-Histone H3, p-Histone H3/Ubd, Ubd/ TopoIIα in the OSOM in untreated controls and animals treated with TCP or CBX. Immunoreactivity of Ubd (cytoplasm) and p-Histone H3 (nucleus) or TopoIIα (nucleus) is visualized as brown and red, respectively. The graphs show Ubd-positive cell ratio (%) of proximal tubular epithelial cells per total cells immunoreactive with p-Histone H3 or TopoIIα, p-Histone H3-positive cell ratio (%) of proximal tubular epithelial cells per total cells immunoreactive with Ubd counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) Ubd/ TopoIIα or TopoIIα/Ubd, (B) Ubd/p-Histone H3 or p-Histone H3/Ubd. Bar = 50 μm. **, * $P < 0,05, 0,01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

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 (H26 年度)

畜水産食品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の解明を目指す。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) の遺伝毒性発現機序への酸化ストレスの関連性を検討することを目的とし、*Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスとその野生型に、NFT 並びに NFT の構成物質であり化学構造としてニトロフラン骨格 5 位にアルデヒド基を有するニトロフルフラール (NAF) を 13 週間強制経口投与し、*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 (MF) 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、前年度に実施した用量設定試験の結果を基に、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 週間併用投与した。NFT と各抗酸化剤についてはそれぞれの単独投与群を設けた。NFT の単独投与群および NAC あるいは SAA との併用投与群で溶媒対照群より体重が減少し腎相対重量が増加した。また、NAC 単独投与でも腎相対重量が増加した。今後は遺伝子突然変異頻度および酸化的 DNA 損傷の定量解析を実施する。これらの結果より NFT の遺伝毒性と酸化ストレスの関連性の詳細を検討し、NF 類の安全性評価への貢献を目指す。

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。我々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ラール (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が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。

本年度は、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)。

B. 研究方法

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 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* 変異体頻度 (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 :

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、ラット腎発がん用量の 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、それぞれの単独投与群を設けた。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。

(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 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* ホモ欠損マウスのみ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 (Fig. 1)。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 (Table 1)。

腎臓における *gpt* および *Sp1* assay の結果を Table 2 および 3 に示す。*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。*Sp1* 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 (Table 2)。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。*Sp1* MF はいずれの投与群においても対照群と比較し明らかな変化は認められなかった (Table 3)。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 (Fig. 2)。

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 (Fig. 3)。

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 (Table 4)。

D. 考察

実験 1 :

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 は防御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