

201522005A

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 27 年度 総括研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成 28(2016)年 5 月

## 別添2

### 目 次

#### I . 総括研究報告書

畜水産食品中に含まれる動物用医薬品等の安全性確保に関する研究 ----- 1

渋谷 淳

(資料) 図 1-14、表 1-11

#### II . 分担研究報告書

1. 発がん初期過程の細胞周期解析 ----- 22

渋谷 淳

(資料) 図 1-6、表 1-4

2. ニトロフラン類の in vivo 遺伝毒性評価 ----- 33

梅村 隆志

(資料) 図 1-2

3. 肝発がん促進シグナルの解析 ----- 36

吉田 敏則

(資料) 図 1-6、表 1-7

研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 45

研究成果の刊行物・別刷 ----- 46

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 27 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、動物薬の発がん性に関して、①発がん性全般に対応可能な予測指標の確立、②ニトロフラン類の遺伝毒性発がん機序の解明、③肝内 NOX 高発現系モデルを用いた発がん性予測系の確立を目指す。

発がん初期過程の細胞周期解析に関する研究では、27 年度はまず、26 年度に実施した腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質のラットを用いた反復投与例の腎臓サンプルを用い、各種チェックポイント遺伝子等の発現を経時的に検討した。その結果、腎発がん物質は肝発がん物質と異なり、発がん物質特異的な発現変動を誘発しなかった。27 年度はまた、26 年度までの解析で、反復投与での反応性に乏しかった肝発がん物質/プロモーターのポストイニシエーション期投与での反応性を検討した結果、肝発がん物質/プロモーターは、細胞毒性の増強により再生性増殖を誘発し、一方で、遺伝毒性肝発がん物質は、細胞増殖の亢進を伴わずに M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を誘発することが推察された。遺伝毒性肝発がん物質は増殖活性を亢進しなかったことから、増殖活性の亢進と M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻は、それぞれが独立して発がんに寄与する可能性が推察された。以上より、ポストイニシエーション期での 4 週間投与により、肝発がん物質/プロモーター物質の発がん性の予測が可能であることが示唆された。

ニトロフラン (NF) 類の *in vivo* 遺伝毒性評価に関する研究では、26 年度に *Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスとその野生型に、ニトロフラントイン (NFT) 並びにニトロフルフラール (NFA) を 13 週間強制経口投与し、腎臓における *in vivo* 変異原性試験を実施した。27 年度はその腎臓を用いて検討した結果、NRF2 制御下の抗酸化酵素 *Nqo1* の mRNA 及び蛋白発現レベルが *Nrf2* ホモ欠損マウスで野生型に比べ低値を示した。8-OHdG レベルは *Nrf2* ホモ欠損マウスの NFT 高用量群で上昇し、NFT の *in vivo* 変異原性に対する酸化的 DNA 損傷の関与が強く示唆された。一方、NFA は *Nrf2* ホモ欠損マウスで *in vivo* 変異原性は示さず、ラットで認められた *in vivo* 変異原性への酸化的 DNA 損傷の関与は低いことが示唆された。以上より、NF 類の酸化ストレス産生にはニトロ基の関与のみならず、ニトロフラン骨格の側鎖の化学構造が大きく影響することが明らかとなった。

肝発がん促進シグナルの解析に関する研究では、ラット肝発がん促進過程での薬物代謝酵素に依存しない NADPH オキシダーゼ (NOX) 依存性活性酸素種 (ROS) 産生を解析し、新たな非遺伝毒性機序による発がんの根拠を与える分子基盤の確立を目指す。27 年度は、抗真菌剤・肝毒性物質ジメトリダゾール (DRZ) を検討した。硫酸デキストラン投与による大腸炎誘発による肝臓への炎症波及による評価系の改良を行った結果、DRZ は血漿総コレステロールの増加と、中型以下の大きさの GST-P 陽性細胞巣を増加させ、それらは NOX 阻害剤アポニンにより抑制された。以上より、DRZ は NOX 関連の脂質代謝異常と不完全ではあるが NOX 依存的な肝発がん促進作用を示すことが見出された。

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 (平成 25 年 11 月 1 日-)

#### 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、動物薬の発がん性に関する研究では、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、及び肝内 NOX 高発現系モデルを用いた発がん性予測系の確立に関する研究を実施する。

#### 発がん初期過程の細胞周期解析に関する研究

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る。これらの代替試験法として、トランスジェニック動物や遺伝子ノックアウト動物を用いた短期試験系 (Eastin, 1998)、肝中期発がん性試験法や多臓器中期発がん性試験のような二段階発がんモデル (Tamano, 2010) が開発されているが、これらもまた高コストで多くの時間を必要とし、評価可能な標的臓器が限られている。現在、肝臓や腎臓で検討が進められているトキシコゲノミクスの解析による発がん性予測手法は多数の発がん標的に対して発がん性の予測が期待できる (Jonker *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2014; Uehara *et al.*, 2011)。しかしながら、この手法もまた高コストであり、さらに異なる研究機関でデータを共有するためには統合的方法が必要である。したがって、短期間で合理的に諸臓器全般にわたる発がん性を予測し得る指標の確立が求められている。

我々は既に、複数種類の発がん標的性を対象とした解析で、28日間の反復投与により発がんの標的細胞に増殖活性の亢進を示す発がん物質は、細胞周期チェックポイント機能の活性化を反映するような細胞周期関連分子の発現増加およびアポトーシスを誘発することを見出した (Taniai *et al.*, 2012a, b; Yafune *et al.*, 2013a, b)。さらに、肝臓と腎臓の発がん物質投与例で、M期進行に関わる ubiquitin D (UBD) のG<sub>2</sub>期からの異常発現を見出した (Taniai *et al.*, 2012b)。以上の結果より、発がん物質はその標的性を問わず、短期間の投与により発がん標的細胞に対してM期スピンドルチェックポイント機構の破綻を誘発する可能性が示唆された。これらの結果から、細胞増殖活性を亢進する発がん物質がM期進行に関わる分子の機能障害を含む細胞周期制御異常を誘発し、それが発がんメカニズムの早期過程に関与している可能性が示唆された。しかしながら、発がん物質特異的な細胞周期制御異常の出現時期や、増殖活性を亢進する非発がん性物質との鑑別、増殖活性を亢進しない発がん物質の検出性については検討の余地がある。

25年度は、ラットに2/3肝部分切除ないし、肝発

がん物質、非発がん肝毒性物質の3、7ないし28日間反復投与試験を実施した。その結果、投与開始後28日目から、増殖活性を亢進する物質のうち、肝発がん物質のみで、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結果が得られた。26年度はまず、25年度の実験で得られた肝臓サンプルを用いて、G<sub>1</sub>/S、G<sub>2</sub>/MおよびM期スピンドルチェックポイントの制御に関わる遺伝子および蛋白質の発現を経時的に検討した。その結果、投与開始後28日目で、肝発がん物質特異的に、G<sub>2</sub>/MおよびM期スピンドルチェックポイント関連遺伝子の発現増加、G<sub>1</sub>/Sチェックポイントに関わるがん抑制遺伝子である *Rbl2* の mRNA の発現減少およびG<sub>1</sub>/Sチェックポイント蛋白質の分解を促進する *Mdm2* の mRNA 発現およびリン酸化MDM2 (p-MDM2) 発現細胞の増加が生じ、発がん物質特異的に、G<sub>2</sub>期およびM期における細胞周期の停止と、G<sub>1</sub>/Sチェックポイント機能の破綻によるG<sub>1</sub>→S期進行の促進が生じていることが推察された。また26年度は次に、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について、最大90日間の反復投与による反応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、28ないし90日間反復投与試験を実施した。その結果、投与開始後28日目以降において、G<sub>1</sub>/Sチェックポイント機能の破綻を示唆する結果が得られた。一方で、G<sub>2</sub>/MおよびM期スピンドルチェックポイント関連遺伝子の肝発がん物質特異的な発現変動は認められなかった。さらに、細胞増殖誘発性を問わず肝発がん物質によってのみ、投与開始後28ないし90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唆する結果が得られた。この反応は発がん物質の細胞増殖誘発性に関わらず生じたことから、発がん過程における細胞増殖に先立って生じる可能性が推察された。26年度はさらに、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性肝毒性物質の3、7ないし28日間反復投与試験を実施した。その結果、投与開始後28日目で、肝発がん物

質と同様に、腎発がん物質のみで 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結果が得られた。27 年度はまず、26 年度の実験で得られた、腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質投与例の腎臓サンプルを用いて、腎発がん物質によっても肝発がん物質と同様に、G<sub>2</sub>/M および M 期スピンドルチェックポイント関連遺伝子の発現変動および G<sub>1</sub>/S チェックポイント機能の破綻が生じるか否かを検討した。また 27 年度は次に、昨年度までの解析で反応性に乏しかった肝発がん物質ないし肝発がんプロモーター物質を、ポストイニシエーション期に反復投与し、発がん性の予測性を検討した。

#### ニトロフラン類の in vivo 遺伝毒性評価に関する研究

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並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。しかし、様々なヒドラジド誘導体を用いた新規合成抗菌剤の報告は現在も続いている。従って、NF 類の発がん機序を解明することはこの種の動物用医薬品に対するヒト安全性の確保にとって重要な課題である。

NF 類の構成物質であるニトロフランとヒドラジド誘導体は、それぞれその化学構造から酸化 DNA 損傷と特異的 DNA 付加体生成の可能性が考えられている。これまでに、*gpt delta* ラットを用いて、ラット腎臓に発がん性の報告のある NFT とその構成物質のニトロフルフラール (NAF) およびアミノヒダントイン (AHD) の *in vivo* 変異原性を検索したところ、NFT と NFA でレポーター遺伝子突然変異頻度が上昇した。また NFT では GC-TA 及び GC-CG transversion 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深く関与する可能性が示唆された。しかし、

NFT の酸化ストレス産生に寄与すると考えられているニトロ基を同様に有する NFA では 8-OHdG の有意な上昇は観察されなかった。そこで本研究では、抗酸化酵素群の転写因子である *Nrf2* を欠損させた酸化ストレス高感受性のマウスを用いて、NFT の *in vivo* 変異原性と酸化ストレスとの関連性について、さらに詳細に検討した。

前年度、雄 6 週齢の C57BL/6J 系統 *Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウス並びにその野生型に NFT を最大耐量の 70 mg/kg bw 及びその半量である 35 mg/kg、NFA を NFT と同モル相当量の 41 および 21 mg/kg bw の用量で、連続 5 日間の強制経口投与を 13 週間行い、腎臓における *in vivo* 変異原性試験を実施した。本年度はその腎臓を用いて、NRF2 制御下の抗酸化酵素群の遺伝子および蛋白発現レベル並びに 8-OHdG レベルを検討した。

#### 肝発がん促進シグナルの解析に関する研究

動物医薬品などの化学物質の安全性試験において、肝細胞肥大やそれに関連する肝細胞腫瘍の増加は最も頻出する毒性所見のひとつであり、安全性評価の際にもその機序解明が必要となる重要事案である。通常、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、これによる細胞内成分に対する様々な分子学的異常が肝発がんの引き金となることが古典的に知られている。その際、CYP はミクロソーム (粗面小胞体) の増加を伴って誘導されるため、光顕レベルでは肝細胞肥大として検出される。このような作用を示す薬物代謝酵素誘導剤は CYP の誘導を起点として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が (Kuwata et al., 2011; Shimamoto et al., 2011; Morita et al., 2011; Tawfeeq et al., 2011; Hayashi et al., 2012)、ミクロソームの増加、ROS 産生並びに酸化ストレスが必ずしも連動して検出されるとは限らず、ROS の関与する肝発がん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。

本研究では、活性酸素種 (ROS) 産生源として膜蛋白である NADPH oxidase (NOX) に着目して肝発がん促進機序の解明を行った。肝臓においては、非アルコール性脂肪性肝炎 (NAFLD) やウイルス性肝炎における肝線維症の発症に NOX が関与することが明らかとなりつつあるが (Paik et al., 2014)、肝発がん促進作用を含む化学物質の肝臓への影響においては NOX に関連する研究はほとんど行われていない。NOX は膜貫通型の酵素複合体で、NADPH を分子ドナーとして、分子状酸素からスーパーオキシドと過酸化水素を産生する。哺乳類では、NOX1~5、DUOX1 および 2 の 7 種の分子種が知られており、古典的な NOX として細菌等の異物を除去する好中球やマクロファージなどの貪食細胞に発現している NOX2

(gp91phox) が最もよく知られている。NOX2 は調整サブユニットとして、p22phox、p47phox、p67phox および Rac を有しており、p22phox を中心に NOX1~4 では様々な調整サブユニットからなる複合体を構成している。肝臓では、NOX1、2 および 4 が肝細胞、類洞内皮細胞、衛星細胞 (伊東細胞) に、NOX2 がクッパー細胞、好中球、リンパ球などの白血球に発現している。内因性あるいは外因性の刺激によりこれらの NOX 複合体が刺激を受け、それによって産生される ROS が様々なシグナル伝達分子を連鎖的に活性化する。この一連のシグナル伝達によって、肝線維化では衛星細胞の増殖、遊走、肝細胞のアポトーシス等が誘導され、また、がん細胞においてもゲノム不安定性、細胞の自己増殖と生存、浸潤、転移、血管新生に関与することが示唆されている

(Block and Gorin, 2012)。

本研究では、肝発がん促進過程における NOX の関与を研究するにあたり、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) モデルに着目した。動物に高脂肪飼料を与えることでヒトの NAFLD に類似した病態を作製することができ、それに関連して NOX の発現亢進と脂質過酸化がみられ (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が報告されている (Lu et al.,

2006)。NAFLD は、NASH 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であり、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、peroxisome receptor-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 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細胞増殖を誘導することが示されているが (Rusyn et al., 2000)、PPAR $\alpha$  agonist 以外の化学物質誘発性の肝発がん過程における NOX の関与は不明である。

昨年度は、高脂肪飼料を用いた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 阻害剤の併用投与を検討した。その結果、NOX 複合体の構成分子である p22phox の関連する前がん病変形成が観察され、新規非遺伝毒性発がん機序が示唆される結果が得られた。本年度では、基礎飼料と高脂肪飼料給餌の 2 群間の比較により脂肪肝・肝二段階発がんモデルを用いた評価系の有用性の確認をまず行い、さらに大腸炎モデルとの併用により本モデルの高度化を検討した。Dextran sulfate sodium (DSS) の飲水投与による大腸炎モデルはヒトの炎症性腸疾患とそれに基づく大腸がんの発症研究に広く利用されている (Clapper et al., 2007)。高脂肪飼料給餌マウスに DDS 投与により大腸炎を誘発した研究では、大腸炎による血中リポポリサッカライドの増加による肝臓の炎症および線維化の増悪効果がみられている (Cabele et al., 2011)。従って、我々が進めている脂肪肝・肝二段階発がんモデルに大腸炎モデルを付加することで、NAFLD からさらに進行した肝疾患モデルを構築できると仮説をたてた。このモデルを利用して、被験物質として抗真菌剤・肝毒性物質 dimetridazole (DRZ) の肝臓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に関する研究  
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 1 週間の馴化後、実験に供した。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。

<腎発がん物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与例を用いた細胞周期チェックポイント関連遺伝子および p-MDM2 の発現の検討>

6 週齢の雄性 F344 ラットを初期体重に基づいて、無処置対照群、nitrofurantoin (NFT; 5,000 ppm)、1-amino-2,4-dibromoantraquinone (ADAQ; 25,000 ppm)、triamterene (TAT; 1,200 ppm) ないし carboxin (CBX; 2,000 ppm) の混餌投与を行う群、1-chloro-2-propanol (CP; 3,300 ppm) の飲水投与を行う群、ないし 1,2,3-trichloropropane (TCP; 125 mg/kg 体重) の強制経口投与を行う群の 7 つの群に分け、3、7 ないし 28 日間反復投与した。各投与期間において、無処置対照群、NFT 群、ADAQ 群、TCP 群、CP 群、TAT 群および CBX 群の各群でそれぞれ、10、11、11、11、10、10 および 10 匹のラットを使用した。TCP の投与の際に、コーンオイルを溶媒として使用した。NFT は動物の健康状況の悪化に伴い、その後段階的に、投与開始後 9 日目から 4,000 ppm へ、14 日目から 3,000 ppm へと用量を減少させた。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。各投与期間の終了後に、ラットを深麻酔下で放血殺により安楽殺し、腎臓を摘出した。採取した腎臓は組織学的検索及び免疫組織化学的検索用として 4%パラホルムアルデヒド溶液にて固定後パラフィンに包埋して保存し、また、残りの腎サンプルは遺伝子発現解析用としてメタカーンにて固定後 100%エタノールに浸漬して-80°Cにて保存した。

NFT、ADAQ および TCP は腎発がん物質として選定し、投与用量は発がん用量を設定し (NTP, 1989; NTP, 1993a; NTP, 1996)、投与用量の変更後においても発がん用量を下回らないように設定した。CP、TAT および CBX は非発がん性腎毒性物質として選

定し、投与用量は、13 ないし 14 週間反復投与試験においてラットに腎毒性を誘発する用量を設定した (NTP, 1993b; NTP, 1998; USEPA, 2004)。

<ポストイニシエーション期における肝発がん物質/肝発がんプロモーター物質の細胞周期制御異常への関与の検討>

6 週齢の雄性 F344 ラットに *N*-diethylnitrosamine (DEN; 200 mg/kg) を単回腹腔内投与し、その 2 週間後から  $\beta$ -naphthoflavone (BNF) 10,000 ppm (DEN + BNF 群)、carbadox (CRB) 300 ppm (DEN + CRB 群)、leucomalachite green (LMG) 1,160 ppm (DEN + LMG 群) ないし acetaminophen (APAP) 10,000 ppm (DEN + APAP 群) を 2、4 ないし 6 週間混餌投与を行うか基礎飼料 (DEN-alone 群) で維持した。また、投与開始の 1 週間後に、2/3 部分肝切除を実施した。2 ないし 4 週間投与実験において、DEN-alone 群、DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群の各群でそれぞれ、12、13、13、12 および 12 匹のラットを使用した。また、6 週間投与実験において、DEN-alone 群、DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群の各群でそれぞれ、15、16、16、16 および 15 匹のラットを使用した。各投与期間の終了後に、ラットを深麻酔下で放血殺により安楽殺し、肝臓を摘出した。採取した肝臓は、組織学的検索及び免疫組織化学的検索用として 4%パラホルムアルデヒド溶液にて固定後パラフィンに包埋して保存した。

BNF は肝発がんプロモーター物質として選定し、投与用量は肝二段階発がんモデルラットを用いた 6 週間の反復投与後に glutathione *S*-transferase placental (GST-P) によって検出される前がん病変の形成を促進する用量を設定した (Shoda *et al.*, 2000)。BNF は変異原性を持たず、またラットに対して肝発がんイニシエーション作用は示さない (Hayashi *et al.*, 2012; McKillop and Case, 1991)。CRB は遺伝毒性肝発がん物質として選定し、投与用量は発がん用量を設定した (King, 1976)。LMG は 2 年間のがん原性試験ではわずかに肝臓腫瘍の発生率を増加させるのみで

あることから、弱い肝発がん性が示唆されている物質として選定し、投与用量は発がん用量を超える用量を設定した (NTP, 2005)。APAP は非発がん性肝毒性物質として選定し、投与用量は 13 週間反復投与試験でラットに肝毒性を誘発する用量を設定した (NTP, 1993)。

#### 病理組織学的染色および免疫組織化学染色

パラフィン包埋した腎臓ないし肝臓を 3  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫組織化学染色に供した。腎臓切片を用いて p53 の下流分子の一つで p53 の分解を促進する phosphorylated MDM2 (p-MDM2) (Mamlöf *et al.*, 2007; Mayo and Donner, 2002) に対する一次抗体を用いて、免疫組織化学染色を実施した。また、肝臓切片を用いて、G<sub>1</sub> 期から M 期に存在する細胞の核に発現する細胞増殖指標の Ki-67 (Scholzen and Gerdes, 2000)、M 期の初期にクロマチンの凝集に関わる phosphorylated-histone H3 (p-Histone H3) (Hirota *et al.*, 2005)、G<sub>2</sub>/M 期に DNA デカテネーションに関わる topoisomerase II $\alpha$  (TOP2A) (Mattila *et al.*, 2007)、G<sub>2</sub>/M 期において mitotic arrest deficient-2 (MAD2) などのチェックポイント蛋白質のキネトコア局在を減少させることで染色体不安定性を誘導する ubiquitin D

(UBD) (Herrmann *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2006)、アポトーシス過程の後期に発現するアポトーシス指標の cleaved caspase 3 (Eckle *et al.*, 2004) および GST-P に対する一次抗体を用いて、免疫組織化学染色を実施した。用いた抗体、賦活化方法および抗体希釈条件は Table 1 に示した。シグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて可視化した後、ヘマトキシリンにより対比染色した。

UBD の細胞周期内での出現時期を検討する目的で、UBD と p-Histone H3 ないし TOP2A との二重染色を行った。UBD のシグナル検出は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用い

て可視化し、p-Histone H3 および TOP2A のシグナル検出は、二次抗体以降の反応は VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC-AP kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い、免疫反応は VECTOR Red Alkaline Phosphate Substrate Kit I (Vector Laboratories) を用いて可視化した。

#### 免疫組織化学染色による解析

腎臓切片に免疫組織化学染色を施した後、p-MDM2 は 400 倍視野で無作為に 10 視野 (左右腎臓各 5 視野ずつ) 選択して陽性細胞数を視覚的に計数した。肝臓切片に免疫組織化学染色を施した後、Ki-67、p-Histone H3、TOP2A および UBD、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。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。

GST-P 陽性肝細胞巣については、直径 200  $\mu\text{m}$  以上で明らかな陽性肝細胞巣の切片面積当たりの個数及び面積率を画像解析ソフト WinROOF (三谷商事, 東京) を用いて解析した。

#### Real-time RT-PCR による解析

メタカーン固定腎臓サンプルを用いて腎臓の髄質外帯外層 (OSOM) 部分を採取し、RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。2  $\mu\text{g}$  の total RNA から SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase (Life Technologies) を用いて cDNA を合成し、real-time reverse-transcription polymerase chain reaction

(RT-PCR、StepOnePlus Real-time PCR System、Life Technologies) により遺伝子発現解析を行った。プライマーは Primer Express software (Version 3.0; Life Technologies) を用いて設計し、Table 2 に示した。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 actin, beta (*Actb*) ないし glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) の検量線を求め、



$2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (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's test を行った。Bartlett 検定で等分散が認められなかった場合、Steel's test を実施した。

#### ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価に関する研究 遺伝子および蛋白発現解析

*Nqo1* 遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて定量した。核酸抽出用試薬 ISOGEN (日本ジーン(株)、東京)を用いて、凍結した腎臓から Total RNA を抽出した。High-Capacity cDNA Archive Kit Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて cDNA を合成し、TaqMan (R) Gene Expression Assays、TaqMan (R) Universal PCR Master Mix を混合し、Applied Biosystems 7900HT Fast real time PCR システムにて反応を行い、*Nqo1* 遺伝子の mRNA 発現量の変化を計測した。また、内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の値を用いて、発現量を補正した。

また、ウェスタンブロット法により NQO1 の蛋白発現量の変動を半定量的に評価した。凍結した腎臓 20~30 mg を、プロテアーゼ阻害剤を含む RIPA buffer にホモジナイズし、氷上で 30 分急冷後、遠心分離 (13000 g, 30 分, 4°C) により得られた上清を使用した。蛋白濃度は、Advanced protein assay reagent (Cytoskeleton Inc. CO, USA)、Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific Inc. MA, USA) を用いた BCA 法により定量した。1  $\mu$ g の蛋白を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜にセミドライ式プロットング装置で転写した。一次抗体は Abcam 社の抗 NQO1 抗体を使用し (1 : 1000)、二次抗体には HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を

用い (1 : 5000, Dako)、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, NJ, USA) を用いて蛋白質のバンドを可視化し、Bio-Rad Molecular Image ChemDoc XRS により検出した。

#### 腎 DNA 中の 8-OHdG 測定

DNA extractor WB kit (和光純薬(株)、大阪)を用いて、凍結した腎臓から DNA を抽出した。DNA を 8-OHdG 測定前処理試薬セットを用いて、スクレアーゼ P1 とアルカリフォスファターゼにより酵素的に分解した後、8-OHdG (8-OHdG/ $10^5$  dG) 量を高速液体クロマトグラフィー/電気化学的検出器 (Coulochem II; ESA, Bedford, MA, USA) により定量した。

#### 肝発がん促進シグナルの解析に関する研究

##### 動物実験

実験 1 と 2 に分けて実施した。

実験 1 : 6 週齢の雄性 F344 ラット (日本エスエルシー、浜松) を用い、脂肪肝モデルを併用した二段階発がんモデル実験を行った。試験開始時にイニシエーターである *N*-diethylnitrosamine (DEN; 200 mg/kg) を腹腔内投与し、試験期間中、高脂肪飼料 (D12451、Natural Diet 社製) を動物に給餌し (HFD 群)、対照群 (CTL 群) には基礎飼料のみを与えた。これら 2 群の動物に対し試験 3 週目に 2/3 部分肝切除を行った。

実験 2 : 実験 1 と同様に 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発がんモデルに、他臓器からの炎症波及効果による肝傷害増強を目的に、大腸炎モデルを一過性に適用した。基礎飼料を与える対照群に加え、高脂肪飼料を与える 3 群を設けた。3 群の内、高脂肪飼料のみを与える群に加え (HFD 群)、残りの群には 2 週後から DRZ を単独 (5000 ppm) (HFD+DRZ 群 ; Fig では DRZ 群と表示) あるいは DRZ と NOX 阻害剤 (Apocynin; APO, 2000 ppm) との併用投与を行う群 (HFD+DRZ+APO 群 ; Fig では DRZ+APO 群と表示) をそれぞれ設定した。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。DSS (1.5%) を試験開始 5 週目から

5日間飲水投与し、軽度の大腸炎を一過性に誘発した。DRZは、これまでの毒性試験・発がん性試験において肝、精巣及び卵巣毒性と乳腺腫瘍の増加をもたらすことが報告されている

([https://www.fsc.go.jp/ikenbosyu/pc1\\_douyaku\\_dimetridazole\\_270225.pdf](https://www.fsc.go.jp/ikenbosyu/pc1_douyaku_dimetridazole_270225.pdf))。DRZの2用量(5000、8000 ppm)を用いた予備試験により、8000 ppmでは著しい体重減少がみられたため、5000 ppmを採用した。APO(はすでに報告のある投与用量を設定した Chirino et al., 2008)。

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、腹腔内脂肪(精巣周囲)、肝臓、大腸、精巣、精巣上体を採取し、重量測定を行った。最終体重をもとに相対重量を算出した。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)、 $\gamma$ グルタミルトランスフェラーゼ(GGTP)、グルコース(GLU)、総蛋白(TP)、アルブミン(ALBU)、グロブリン(GLOB)、アルブミン/グロブリン比(A/G)、総コレステロール(T.CHOL)、中性脂肪(トリグリセライド; TG)および総ビリルビン(T.BIL)をJCA-BM1250(JEOL Ltd., 東京)を用いて測定した。臓器は病理組織学的・免疫組織化学的検索用に4%パラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋を行った。一部の肝臓は遺伝子発現解析用に分取し、液体窒素で急速凍結した後、検索まで-80°Cに保存した。

病理組織学的検査および免疫組織化学染色に対する解析

組織学的検索は薄切後にヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。顕微鏡下200倍でランダムに選んだ10視野の類洞内の好中球数をカウントし、1視野当たりの数を求めた。肝細胞脂肪化のスコア化も同様の手順で行った(1軽

微、2軽度、3中等度、4重度)。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、NOX 複合体構成分子である cytochrome b-245 light chain (p22phox) および p67phox 並びに DNA 傷害マーカーである Histone H2A.X (phospho S139; $\gamma$ -H2A.X) の免疫組織化学染色による観察を実施した (Table 3)。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、抗原賦活化処理を行い、続いて正常ウマ血清でブロッキングし、一次抗体を用いて 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。直径 0.2 mm 以上の大型の GST-P 陽性細胞巢の数と面積、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 (Hara et al., 2014)。実験 2 では、大型の陽性細胞巢に加え、中型 (0.05~0.2 mm) の陽性細胞巢の数についても測定し、小型 (0.05 mm 以下) の陽性細胞巢と単一陽性肝細胞について単位面積当たりの数をカウントした。実験 1 では、大型 GST-P 陽性細胞巢内の p22phox 陽性細胞、実験 2 では大型と中型の陽性細胞巢内の Ki-67、p22phox および  $\gamma$ -H2A.X 陽性細胞の百分率 (%) を求めた。p67phox 陽性の類洞内細胞をランダムに選んだ GST-P 陽性細胞巢以外の領域について好中球と同様にカウントした。

遺伝子発現解析では、ランダムに選んだ各群 6 例ずつを対象とし real-time RT-PCR 法にて定量解析した (Table 4)。発現量の補正は内部標準遺伝子である *Hprt* を用いて実施した。

統計解析

定量データについて平均値および標準偏差を求めた。実験 1 では、F 検定により等分散性の検定を行い、Student's t test または Aspin-Welch test により群間の差を検定した。実験 2 では、Bartlett 検定で等分

散を確認した後、一元配置分散分析を行った。有意差が認められた場合は Tukey's multiple comparison test を行った。Bartlett 検定で等分散でなかった場合、Steel-Dwass multiple comparison test を実施した。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与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、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い倫理規定、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

### 発がん初期過程の細胞周期解析に関する研究

<腎発がん物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与例を用いた細胞周期チェックポイント関連遺伝子および p-MDM2 の発現の検討>

#### p-MDM2 発現細胞の分布

我々の先行研究において、腎臓の髄質外帯外層 (OSOM) 領域での解析により使用した全ての腎発がん物質が、短期発がん予測指標候補分子に反応を示したが、OSOM と皮質領域での解析では、非発がん性腎毒性物質の *p*-nitrobenzoic acid も細胞周期関連分子発現細胞を増加させた (Tanai *et al.*, 2012a, b)。そのため本実験において腎臓における免疫組織学的解析は、偽陽性反応が生じることを避けるために、OSOM 領域に限定して行った。

尿細管上皮細胞において、p-MDM2 は核に局在しており、遠位尿細管上皮細胞に多く発現していた (Fig. 1)。

3 日目において、p-MDM2 陽性細胞率は、NFT 群、ADAQ 群、TCP 群、CP 群および TAT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められた (Fig. 1A)。

7 日目において、p-MDM2 陽性細胞率は、全投与群で無処置対照群に比較して有意な変動は認められなかった (Fig. 1B)。

28 日目において、p-MDM2 陽性細胞率は、TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、NFT 群および CP 群で有意な減少が認められた (Fig. 1C)。

#### mRNA 発現解析

NFT 群、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群について、Table 2 に記載されている遺伝子の mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法によって定量し、無処置対照群における mRNA 発現量との相対値を算出した (Table 5)。

3 日目において、*Cdkn1a* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Chek1* および *Mad2l1* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ、ADAQ 群で有意な減少が認められた。*Mdm2* は、*Actb* および *Gapdh* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で、*Mdm2* は、*Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rbl2* は、*Actb* によって相対値を求めたところ、NFT 群および TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Tp53* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ、NFT 群で有意な減少が認められた。

7 日目において、*Cdkn1a*、*Chek1* および *Mad2l1* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群および TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Cdkn1a* および *Mad2l1* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mdm2* は、*Actb* および *Gapdh* によって相対値を求めたところ、

ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Tp53* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Rbl2* は、*Actb* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で、*Rbl2* は、*Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。

28 日目において、*Cdkn1a* は、*Actb* および *Gapdh* によって相対値を求めたところ、TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められ、ADAQ 群で有意な減少が認められた。*Chekl1* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Mad2l1* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Mdm2* および *Tp53* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で、*Mdm2* は、*Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rbl2* は、*Actb* によって相対値を求めたところ、TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で、*Rbl2* は、*Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。

<ポストイニシエーション期における肝発がん物質/肝発がんプロモーター物質の細胞周期制御異常への関与の検討>

体重および肝重量

2 週間投与実験において、肝部分切除術実施時の

手技的失敗および術後の状態悪化により、DEN-alone 群で 1 匹、DEN+BNF 群で 2 匹、DEN+CRB 群で 2 匹および DEN+APAP 群で 3 匹のラットが死亡した。DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群では、無処置対照群と比較して最終体重が減少した (Table 6)。DEN+BNF 群では、無処置対照群と比較して絶対肝重量が増加した。DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群では、無処置対照群と比較して相対肝重量が増加した。

4 週間投与実験において、肝部分切除術実施時の手技的失敗および術後の状態悪化により、DEN-alone 群で 2 匹、DEN+BNF 群で 1 匹、DEN+CRB 群で 2 匹および DEN+APAP 群で 3 匹のラットが死亡した。DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群では、無処置対照群と比較して最終体重が減少した (Table 6)。DEN+BNF 群および DEN+LMG 群では、無処置対照群と比較して絶対肝重量が増加した。DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群では、無処置対照群と比較して相対肝重量が増加した。

6 週間投与実験において、肝部分切除術実施時の手技的失敗および術後の状態悪化により、DEN-alone 群で 1 匹、DEN+BNF 群で 1 匹のラットが死亡した。DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群では、無処置対照群と比較して最終体重が減少した (Table 6)。DEN+BNF 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群では、無処置対照群と比較して絶対肝重量が増加した。DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群では、無処置対照群と比較して相対肝重量が増加した。

病理組織学的変化

病理組織学的検索では、全群の全投与期間で好酸性変異肝細胞巣が認められた。DEN+BNF 群では、全投与期間で、小葉辺縁性の肝細胞肥大および空胞変性が認められた。さらに、4 週目においてのみ、

肝細胞の巣状壊死が認められた。DEN+CRB 群では、2 週目において、小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。一方で、4 週目および 6 週目では、明らかな組織学的所見は認められなかった。DEN+LMG 群では、小葉中心性の肝細胞肥大およびびまん性の核の大小不同が認められた。さらに、全投与期間で、主に変異肝細胞巢内の肝細胞において好酸性細胞質内封入体が認められた。DEN+APAP 群では、2 週目において明らかな組織学的所見は認められなかった。一方で、4 週目および 6 週目では小葉中心性に肝細胞のくもり硝子様変性が認められた。

#### 細胞周期関連分子発現細胞の分布

Ki-67、p-Histone H3 および TOP2A は核内に局在し、UBD は細胞質ないし有糸分裂紡錘体に局在し、cleaved caspase 3 は核内および細胞質内に局在していた (Fig. 2-3)。Ki-67、p-Histone H3、TOP2A および UBD 陽性細胞は、肝臓の小葉構造に関連なく均一に分布していた。cleaved caspase 3 陽性細胞は門脈周囲の領域に多く分布していた。

2 週目において、Ki-67 陽性細胞率は、DEN+BNF 群、DEN+CRB 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 2A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、DEN+BNF 群および DEN+APAP 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 2B)。TOP2A 陽性細胞率は、DEN+BNF 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 2C)。UBD 陽性細胞率は、DEN+BNF 群および DEN+APAP 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 2D)。cleaved caspase 3 陽性細胞率は、全投与群で DEN-alone 群と比較して有意な変化は認められなかった (Fig. 2E)。

4 週目において、Ki-67 陽性細胞率は、DEN+BNF 群および DEN+LMG 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 3A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、DEN+BNF 群および DEN+LMG 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 3B)。TOP2A 陽性細胞率は、DEN+BNF 群で

DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 3C)。Ki-67 陽性細胞率は、DEN+BNF 群、DEN+LMG 群および DEN+APAP 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 3D)。cleaved caspase 3 陽性細胞率は、DEN+BNF 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 3E)。

p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合

増殖細胞のうち M 期に存在する細胞の割合を推定するために、同一個体の肝臓から得られた別の組織スライドを用いて、p-Histone H3 ないし Ki-67 について免疫組織化学染色を実施し、各分子における陽性細胞率をそれぞれ求めた後、得られたデータを用いて、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合を求めた。

2 週目において、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は、DEN+BNF 群で DEN-alone 群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 4A)。4 週目において、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は、DEN+BNF 群および DEN+CRB 群で DEN-alone 群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 4B)。

UBD と p-Histone H3 ないし TOP2A との共発現

2 週目において、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、全投与群で DEN-alone 群と比較して有意な変化は認められなかった (Fig. 5A)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、全投与群で DEN-alone 群と比較して有意な変化は認められなかった (Fig. 5B)。

4 週目において、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、DEN+BNF 群および DEN+CRB 群で DEN-alone 群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 5C)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、DEN+APAP 群で DEN-alone 群と比較して有意な減少が認められた (Fig. 5B)。

## 肝発がんプロモーション活性

GST-P 陽性肝細胞巢の個数および面積は、DEN+BNF 群、DEN+CRB 群および DEN+LMG 群で DEN-alone 群と比較して有意な増加が認められ、DEN+APAP 群で有意な減少が認められた (Fig. 6)。

## ニトロフラン類の in vivo 遺伝毒性評価に関する研究

*Nqo1* の mRNA 発現および蛋白発現レベルを測定した結果を Fig. 7 に示す。mRNA 発現レベルは、何れの遺伝子型においても NFT あるいは NFA 投与による変化は認められなかったが、対照群間での比較では、*Nrf2* 欠損マウスは野生型に比較して有意に低い発現レベルを示した。また、蛋白発現レベルについても同様な傾向を示した。

腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを測定した結果を Fig. 8 に示す。野生型においては、NFT の投与により有意な変化は認められなかったが、*Nrf2* 欠損マウスでは NFT の高用量群において有意な上昇が認められた。また、今回は十分なサンプル量が確保できなかったため、各群 3 例で評価した。また、NFA 高用量群は 1 例のデータとして示しており、統計検定からは除外した。

## 肝発がん促進シグナルの解析に関する研究

### 実験 1 :

試験期間中、肝部分切除に起因して全群の体重が一過性に減少したが、いずれの群も、その後は順調に回復した。最終体重では、CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加した (CTL 群の 106%) (Table 7)。摂餌量および飲水量では、CTL 群に比較し、HFD 群で減少傾向を示した (それぞれ CTL 群の 83 および 81%)。臓器重量では、腹腔内脂肪組織の絶対および相対重量が CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加した (それぞれ CTL 群の 148 および 139%)。肝臓重量では、CTL 群に比較し、HFD 群で相対重量が有意に減少した (CTL 群の 96%)。肝臓の絶対重量に有意な変動はなかった。

血液生化学的検査では、CTL 群に比較し HFD 群

で AST は有意に減少し (CTL 群の 87%)、ALT および GGTP も有意でないものの減少傾向を示した (それぞれ CTL 群の 91 および 87%) (Table 8)。ALP、TG および T.BIL は、CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加した (それぞれ CTL 群の 112、195 および 183%)。T.Chol ならびに蛋白関連項目 (TP、ALUB、GLOB および A/G) に有意な変動はなかった。

病理組織学的検査では、肝臓における肝細胞脂肪化のスコアが、CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加した (CTL 群の 169%) (Table 7)。類洞内の好中球および p67phox 陽性細胞数については、両群間に有意な変動はなかった。大型の GST-P 陽性細胞巢の個数および面積は、CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加し、これに関連して GST-P 陽性細胞巢内の p22phox 陽性肝細胞数も CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加した (Fig. 9)。GST-P 陽性細胞巢外の p22phox 陽性肝細胞数に有意な変化はなかった。中型および小型の GST-P 陽性細胞巢数および単一陽性細胞数は CTL 群に比較し HFD 群で増加傾向を示すものの、有意な変化はなかった (Fig. 10)。

### 実験 2 :

試験期間中、肝部分切除および DSS 飲水投与に起因して全群の体重が一過性に減少した。CTL 群と HFD 群はいずれも、その後は順調に回復したが、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群では体重増加抑制が認められた。最終体重では、HFD 群で CTL 群に対する増加はわずかに留まり (CTL 群の 103%)、HFD+DRZ 群では HFD 群に比較し減少傾向を示し、HFD+DRZ+APO 群では有意に減少した (それぞれ HFD 群の 94 および 91%) (Table 9)。摂餌量では、CTL 群に比較し、HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群ともに有意に減少した (それぞれ CTL 群の 81、81 および 83%)。飲水量では、CTL 群に比較し、HFD 群で減少傾向を示し、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で有意に減少した (それぞれ CTL 群の 88、77 および 74%)。

臓器重量では、腹腔内脂肪組織の絶対および相対重量が CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加したが、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群では有意な変

化は認められなかった(絶対重量でそれぞれ CTL 群の 125、108 および 108%) (Table 9)。肝臓重量では、CTL 群に比較し、HFD 群で相対重量が有意に減少した (CTL 群の 93%)、HFD+DRZ 群で絶対重量が有意に減少した (CTL 群の 91%)。HFD+DRZ+APO 群では、HFD 群に比較し相対重量が有意に増加した (HDL 群の 107%)。精巣および精巣上体では、CTL 群および HDF 群に比較し、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群ともに絶対および相対重量が有意に減少した (精巣の絶対重量でそれぞれ CTL 群の 44 および 43%; 精巣上体の絶対重量でそれぞれ CTL 群の 56 および 57%)。

血液生化学的検査では、AST および ALT は、CTL 群に比較し HFD 群で有意な増加がみられた (それぞれ CTL 群の 110 および 119%) (Table 10)。これらの項目は、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群ともに HFD 群に比較し有意に減少し (AST でそれぞれ HFD 群の 77 および 86%; ALT でそれぞれ HFD 群の 84 および 86%)、AST では CTL 群に比較しても有意に減少した (それぞれ CTL 群の 85 および 86%)。GLU は HFD+DRZ+APO 群において CTL 群に比較し有意に増加した (CTL 群の 125%)。T.CHOL は、HFD 群で増加傾向を示し、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群では CTL 群に比較し有意に増加した (それぞれ CTL 群の 111、119 および 118%)。TG は、HFD 群および HFD+DRZ+APO 群では CTL 群に比較し有意に増加し、HFD+DRZ 群でも増加傾向を示した (それぞれ CTL 群の 169、194 および 142%)。T.BIL は、CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加した (CTL 群の 237%)。HFD 群に対しては HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で有意に減少した (それぞれ HFD 群の 57 および 56%)。ALP については、CTL 群に比較し HFD 群で増加傾向を示すものの (CTL 群の 112%)、その他の群では各処置による影響はなかった。

病理組織学的検査では、肝臓における肝細胞脂肪化のスコアは、CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加した (CTL 群の 215%) (Table 9)。HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群では、HFD 群に比較し有意

に減少した (HFD 群の 68 および 75%)。類洞内の好中球および p67phox 陽性細胞については、各群間に有意な差はなかった。DSS 処置により粘膜の剥離、粘膜固有層および粘膜下組織における炎症細胞の浸潤、再生陰窩および表層細胞の過形成で示される大腸炎が認められた。その程度に明らかな群間の差はなかった。精巣においては、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で精細管変性および萎縮がみられ、精巣上体では成熟精子の減少がみられた。両群においてその程度に特に差は認められなかった。

大型 (直径 0.2 mm 以上) の GST-P 陽性細胞巢の数および面積は、CTL 群に比較し HFD 群で増加し、面積において有意差が認められた (Fig. 11)。面積は HFD 群に対しては HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で有意に減少した。数については、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で HFD 群に比較し減少傾向を示した。中型 (直径 0.05~0.2 mm) の GST-P 陽性細胞巢の数は、CTL 群に比較し HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で有意に増加し、HFD+DRZ 群では、HFD 群に対してさらに有意に増加した。HFD+DRZ+APO 群では、HFD+DRZ 群に比較し減少傾向を示した。小型 (直径 0.05 mm 以下) の GST-P 陽性細胞巢および単一 GST-P 陽性肝細胞の数は、CTL 群と HFD 群間に有意な差はなかったが、HFD+DRZ 群では、CTL 群および HFD 群に対して有意に増加した。HFD+DRZ+APO 群では、単一 GST-P 陽性肝細胞数が CTL 群に比較し有意な増加を示したが、小型の陽性細胞巢、単一陽性細胞数とも HFD+DRZ 群に比較し減少傾向を示した (データ未提示)。

大型の GST-P 陽性細胞巢内の Ki-67 陽性細胞数は、CTL 群に比較し HFD 群で有意に増加した (Fig. 12)。HFD 群に対しては HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で有意に減少した。中型の GST-P 陽性細胞巢内の Ki-67 陽性肝細胞数は、HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で CTL 群に比較し、いずれも有意に増加した。HFD+DRZ 群では他の 2 群に比較しやや増加の程度が高い傾向にあった。大型の GST-P 陽性細胞巢内の p22phox 陽性肝

細胞数が、CTL 群に比較し HFD 群で増加傾向を示した (Fig. 13)。HFD+DMR 群では、HFD 群に比較し減少傾向を示した。中型の GST-P 陽性細胞巢内では、p22phox 陽性肝細胞数に各群間に有意な変化はなかった。大型の GST-P 陽性細胞巢内の  $\gamma$ -H2A.X 陽性細胞数に各群間に有意な変化はなかった (Fig. 14)。中型の GST-P 陽性細胞巢内では、CTL 群に比較し HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で増加を示し、HFD+DRZ 群で有意に増加した。

遺伝子発現解析では、*Poldip2*、*Pparg*、*Aox1*、*Plin2*、*Plin5* および *Gpx1* の発現は CTL 群に比較し、HFD 群で有意に増加した (それぞれ CTL 群の 152%、194%、138%、209%、203%、150%) (Table 11)。*Poldip2* は HFD 群に比較し、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で有意に減少した (それぞれ HFD 群の 65%、66%)。*Paprg* は CTL 群に比較し HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群でも有意に増加していた (いずれも CTL 群の 205%)。*Aox1* は CTL 群に比較して、HFD+DRZ+APO 群で有意に増加していた (CTL 群の 139%)。*Plin2* は、HFD+DRZ 群で HFD 群に比較し有意に減少したが (HFD 群の 67%)、HFD+DRZ+APO 群では CTL 群および HFD+DRZ 群に比較し有意に増加していた (CTL 群の 254%；HFD+DRZ 群の 182%)。*Plin5* は HFD+DRZ 群で HFD 群に比較し有意に減少したが (HFD 群の 67%)、CTL 群に比較し HFD+DRZ+APO 群で有意に増加していた (CTL 群の 168%)。*Fasn* および *Scd1* は CTL 群に比較し HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群とも有意に減少した (*Fasn* ではそれぞれ CTL 群の 31%、17%、34%；*Scd1* では CTL 群の 27%、21%、43%)。

#### D. 考察

##### 発がん初期過程の細胞周期解析に関する研究

<腎発がん物質の 3、7 ないし 28 日間反復投与例を用いた細胞周期チェックポイント関連遺伝子および p-MDM2 の発現の検討>

昨年度までの研究で、投与開始後 28 日目で肝発がん物質により、M 期スピンドルチェックポイント遺

伝子の *Mad211* (Weaver and Cleveland, 2005)、G<sub>2</sub>/M チェックポイント遺伝子の *Chek1* (Patil et al., 2013)、p21<sup>Cip1</sup> をコードする *Cdkn1a* の mRNA 発現の増加および、RB ファミリー蛋白の 1 つで G<sub>1</sub>/S 期の進行を制御する遺伝子の *Rbl2* (Cobrinik et al., 1996; Cobrinik, 2005) の mRNA 発現の減少が誘発された。このことから、肝発がん物質によって G<sub>2</sub> 期および M 期で細胞周期が停止している肝細胞の増加および G<sub>1</sub>/S チェックポイント機構の破綻が誘発されていることが示唆された。しかしながら、ラットへの肝発がん物質ないし肝発がんプロモーター物質の最大 90 日間反復投与による経時的な解析の結果、*Mad211*、*Chek1*、*Cdkn1a* および *Rbl2* の mRNA 発現の発がん物質特異的な変動は認められなかった。今年度の研究の結果、腎発がん物質については全投与期間で、これらの遺伝子の mRNA 発現における発がん物質特異的な変動は認められなかった。これらの結果より、*Mad211*、*Chek1* および *Cdkn1a* の mRNA 発現の増加および *Rbl2* の mRNA 発現の減少は、腎発がん物質反復投与の早期過程においては発がんに関与する変化ではないことが推察された。

昨年度までの研究において、肝発がん物質は特異的に、*Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 陽性細胞率を増加させた。MDM2 は p53 の下流分子であり、ユビキチン化による分解を促進または細胞質における p53 局在の保持によって、G<sub>1</sub>/S チェックポイントに関わる p53 の機能を制御していることが知られていることから (McNicholas and Griffin, 2012)、肝発がん物質によって p53 の分解促進とそれに伴う G<sub>1</sub>/S チェックポイント機能の破綻が誘発されていることが推察された。しかしながら今年度に腎臓発がん物質についてもこれらの分子発現の変動を検討した結果、腎発がん物質の ADAQ および TCP と、非発がん性腎毒性物質の CBX は、ADAQ が 3 日目に *Tp53* の mRNA 発現を増加させなかったことを除くと、*Mdm2* および *Tp53* の mRNA 発現を 3 日目から増加させた。また p-MDM2 陽性細胞率の発がん物質特異的な反応も認められなかった。これらの結果から、*Mdm2* の mRNA 発現の増加は、腎発がん物質および非発がん



性腎毒性物質による腎毒性に反応して生じた *Tp53* の発現上昇に伴って生じたものと考えられ、腎発がん物質特異的な反応ではないことが示唆された。さらに、腎発がん物質の投与早期において、発がん物質特異的な p-MDM2 陽性細胞率の増加が認められなかったことから、肝発がん物質とは異なり、腎発がん物質に誘発される発がん過程早期には、MDM2 の発現変動に起因する G<sub>1</sub>/S チェックポイント機能の破綻は関与していないことが推察された。

<ポストイニシエーション期における肝発がん物質/肝発がんプロモーター物質の細胞周期制御異常への関与の検討>

本実験で用いた、肝発がん物質および肝発がんプロモーター物質はポストイニシエーション期における投与開始後 2 週目において、Ki-67 陽性増殖細胞数と細胞周期関連分子発現細胞数を増加させた。しかしながら、非発がん性肝毒性物質の APAP も同様にこれらの免疫陽性細胞率を増加させた。これらの結果から、この時点で誘発される細胞増殖の亢進は、肝発がん物質/プロモーター物質特異的な反応ではないことが示唆された。それとは対照的に、4 週目において、肝発がんプロモーター物質の BNF および弱い肝発がん性が指摘されている LMG は Ki-67 陽性増殖細胞数と細胞周期関連分子発現細胞数を増加させたが、APAP が UBD 陽性細胞率を増加させた以外は、遺伝毒性肝発がん物質の CRB および非発がん性肝毒性物質の APAP によっては同様の反応は誘発されなかった。一方で、6 週目において、BNF、CRB および LMG は GST-P 陽性肝細胞増殖巣の数と面積を増加させた。これらの結果から、いくつかの肝発がん物質および肝発がんプロモーター物質はポストイニシエーション期の投与開始後 4 週目において、細胞増殖を亢進し、それが発がん促進過程早期において発がんに寄与する可能性が推察された。これらより、ポストイニシエーション期での 4 週間の投与期間は、肝発がん物質/プロモーター物質特異的な細胞増殖および細胞周期異常を誘発するのに十分な期間であることが示唆された。

26 年度に、BNF および LMG は最大 90 日間の反復投与を行った結果、これらの物質は細胞増殖およびアポトーシスを亢進しなかった。また、組織学的には肝細胞肥大が認められるのみで、その他に肝細胞への傷害性を示唆するような所見は認められなかった。一方で、27 年度に、ポストイニシエーション期での投与を行った結果、4 週目で BNF および LMG は増殖活性を亢進させた。さらに、組織学的には肝細胞肥大に加えて、BNF は 2 週目から肝細胞の空胞変性を、4 週目で巣状肝細胞壊死を誘発し、LMG は 2 週目から核の大小不同を誘発するとともに変異肝細胞巣内における肝細胞の細胞質内に好酸性封入体を出現させた。これらの結果から、肝細胞の再生性増殖ないし細胞周期異常が誘発されていることが推察された。発がんイニシエーション作用を有する発がん物質を投与することで、遺伝子の変異が生じ、それによって細胞の表現型に影響を与えるような、広範囲にわたる遺伝子機能の異常が生じることが知られている (Wada *et al.*, 2010)。そのため、発がん物質/プロモーター物質をポストイニシエーション期に投与することで、生体防御機能の欠陥が生じていることにより、イニシエーション処置を行わずに投与するよりも、高い細胞障害性を発揮する可能性が推察された。これらより、いくつかの肝発がん物質/プロモーター物質は、発がんイニシエーション・プロモーションモデルにおいて、細胞障害性が増強され、それによって再生性細胞増殖が誘発されることが推察された。

26 年度までの研究の結果、細胞増殖誘発性に関わらず、肝発がん物質および腎発がん物質は、投与開始後 28 ないし 90 日目で、UBD 陽性細胞および増殖細胞の M 期における割合を減少させることを見出している。これらの結果から、M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻が生じている可能性が示唆された。しかしながら、これらの反応は、弱い肝発がん性が指摘されている発がん物質および肝発がんプロモーター物質によっては誘発されなかった。今年度の研究結果では、遺伝毒性肝発がん物質の CRB および肝発がんプロモーター物質の BNF が、4 週目

において、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合とともに、Ki-67 陽性細胞率に対する p-Histone H3 陽性細胞率の割合を減少させたが、非発がん性肝毒性物質の APAP は減少させなかった。この時点において、BNF は増殖活性の亢進とともに細胞周期関連分子発現細胞数を増加させたが、CRB は同様の反応は示さなかった。p-Histone H3 は M 期に発現する蛋白質であるため (Hirota *et al.*, 2005)、これらの結果から、いくつかの肝発がん物質/肝発がんプロモーター物質はポストイニシエーション期の投与開始後 4 週目で、細胞増殖誘発性に関わらず UBD 陽性細胞および増殖細胞の M 期における割合を減少させることが示唆された。UBD の過剰発現によって、M 期スピンドルチェックポイントの 1 つである MAD2 のキネトコアにおける局在が M 期において抑制され、これにより M 期スピンドルチェックポイント機能が障害されることで M 期での細胞周期停止からの離脱とそれに伴う染色体不安定性が誘発されることが報告されている (Herrmann *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006)。これらの結果から、いくつかの肝発がん物質/肝発がんプロモーター物質は、M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻とそれに伴う細胞周期停止からの離脱を誘発し、これが、発がんイニシエーション・プロモーションモデルにおける発がん過程早期において、重要な役割を担っている可能性が推察された。

26 年度の研究において、CRB は 90 日間の反復投与によって、細胞増殖を伴わずに M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を誘発した。本年度の研究において、CRB はポストイニシエーション期での 4 週間投与によって同様の反応を誘発したが、一方で BNF および LMG は同じ時期で増殖活性を亢進した。BNF および LMG と異なり (Culp, 2004; Fessard *et al.*, 1999; McKillop and Case, 1991; NTP, 2005)、CRB は明らかな変異原性を有していることが報告されている (Beutin *et al.*, 1981; King, 1976)。これらの結果から、M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻は、遺伝毒性肝発がん物質によって誘発される肝発がん重要な反応であることが示唆された。一方で

遺伝毒性発がん物質によって誘発される肝発がん過程早期において、細胞増殖の亢進は必ずしも必要ではないことが示唆された。26 年度の研究では、BNF は最大 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誘発しなかった。今年度では、BNF はポストイニシエーション期の 4 週目において、M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を誘発した。これらの結果から、M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を誘発する細胞メカニズムは明らかではないが、BNF の発がん作用がポストイニシエーション期に増強され、その結果 M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻が生じた可能性が推察された。これらより、本研究で行った、ポストイニシエーション期における 4 週間の投与後での細胞周期制御機構に着目した解析は、発がんプロモーター物質の発がん性の早期の検出に有用であることが示唆された。

#### ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価に関する研究

NRF2 制御下の抗酸化酵素の一つである *Nqo1* の mRNA 並びに蛋白発現レベルは、対照群の遺伝子型間で比較すると *Nrf2* ホモ欠損マウスは野生型に比較して有意に低く、当該マウスの酸化ストレスに対する高感受性を確認した。8-OHdG レベルは、野生型では変化は認められず、*Nrf2* ホモ欠損マウスの NFT 高用量群のみで有意に上昇した。同群では前年度に実施した *in vivo* 変異原性試験において *gpt* 変異体頻度の有意な増加が認められ、そのスペクトラム解析の結果、G:C-T:A および G:C-C:G transversion 変異が増加する傾向が認められた。グアニンは酸化ストレスによる修飾を受けやすい塩基として知られており、これらの結果から NFT の *in vivo* 変異原性に対する酸化的 DNA 損傷の関与が強く示唆された。一方、NFA については、今回 8-OHdG レベルの変動について正確に評価できなかったが、*Nrf2* ホモ欠損マウスにおいても、前年度に実施した *in vivo* 変異原性試験で陽性結果は得られなかった。

NFA はその化学構造にニトロフラン基を有する物質である。ニトロフランのニトロ基還元では、ニト

ロアニオンラジカル、ヒドロキシルアミンなど不安定な反応性の高い中間活性体を経てアミンまで代謝されることが知られており、この代謝過程で $\cdot O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ といった種々の活性酸素を発生させる可能性が考えられている。従って、この機序が NFA の *in vivo* 変異原性さらには NFA を基本骨格として含有する NFT の遺伝毒性発現に関与することが考えられた。しかし、NFA はこれまでの研究で、ラット腎において *in vivo* 変異原性を有するが 8-OHdG レベルの明らかな上昇が見られなかったことに加え、本研究でも、野生型のみならず酸化ストレスに対し高感受性を示す *Nrf2* ホモ欠損マウスにおいても、*in vivo* 変異原性試験で陽性結果は得られなかったことから、NFA の *in vivo* 変異原性に酸化的 DNA 損傷に関与する可能性は低いことが示唆された。以上より、NF 類の酸化ストレス産生にはニトロ基の関与のみならず、ニトロフラン骨格の側鎖の化学構造が大きく影響することが明らかとなった。

#### 肝発がん促進シグナルの解析に関する研究

本研究では、1) 高脂肪飼料給餌による血漿脂質および肝臓への影響、2) 高脂肪飼料給餌に加え、一過性に大腸炎を誘発した場合の肝臓への影響、3) 抗真菌剤 DRZ の肝傷害および肝発がん促進効果の解析、の 3 点について検討を行った。

#### 《高脂肪飼料給餌の影響》

昨年度の研究により、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。この実験の際、基礎飼料を給餌する対照群を設定していなかったため、本年度では、基礎飼料を給餌する CTL 群と高脂肪飼料を給餌する HFD 群の 2 群をまず設定して、血漿脂質を含む血液生化学的検査並びに肝臓の脂肪化および GST-P 陽性細胞巢について詳細に解析を行った。まず、血漿脂質の分析では、TG が約 2 倍に増加した。T.CHOL は明らかではなかったが、脂肪摂取による影響はこれまでの報告と一致した (Castro et al., 2013 ;

Pahua-Ramos et al., 2013)。遺伝子発現解析では、HFD 給餌により *Pparg*、*Aox1*、*Plin2* および *Plin5* の mRNA 発現が増加し、*Fasn* および *Scd1* の mRNA 発現が減少した。*Pparg* はアディポネクチンをはじめとする脂質関連ホルモンなどを制御する転写因子、*Aox1* は脂肪酸の酸化酵素、*Plin2*、*Plin5*、*Fasn* および *Scd1* は脂肪酸および中性脂肪の合成・貯蔵に関連する酵素の遺伝子である (Zhang et al., 2015)。これらの変動に関連して肝臓の脂肪化のスコアの有意な増加が確認できた。HDF 群における ALP および T.BIL の増加も明らかであり、ビリルビン代謝の低下など肝機能の異常が示唆される所見も得られた。

重要な結果として、GST-P 陽性細胞巢の数および面積ともに有意な増加が検出され、高脂肪飼料自体が肝発がん促進効果を示していることが明らかとなった。非アルコール性脂肪性肝疾患では、非アルコール性脂肪性肝炎を経て、肝硬変、肝癌へと進展することが知られているが、動物モデルにおいては給餌する飼料 (成分) の適切な選択と長期の飼育が重要な発生要因となる。本研究において高脂肪飼料をラットに給餌し中期肝発がん性試験を実施した結果、比較的短期に脂肪性肝疾患に関連した肝プロモーション効果を検出することが可能となった。この脂肪肝・肝二段階発がんモデルは、脂肪肝に関連する被験物質の肝発がん促進効果の検出や脂肪肝を軽減する治療薬の検討に有用な評価モデルとなりうると考えられる。その詳細な発生機序は不明であるが、DEN 処置ラットに高脂肪飼料を 6 または 8 週間与えて肝臓の GST-P 陽性肝細胞および陽性細胞巢を解析した実験において、それらの増加に関連して酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine や脂質過酸化の増加が確認されている (Wang et al., 2009 ; Kumamoto et al., 2013)。本研究では、GST-P 陽性細胞巢の増加に伴い NOX 関連分子である p22phox (NOX1、2、4 の調整サブユニット) 陽性細胞および *Poldip2* (NOX4 の調整サブユニット) の遺伝子発現が増加し、さらに酸化ストレス指標となる *Gpx1* (酸化型グルタチオンを産生する抗酸化酵素) の遺伝子の発現増加もみられたことから、NOX 関連分子

に起因する酸化ストレスが高脂肪飼料給餌による肝プロモーション作用に関与している可能性が推察された。

#### 《DSS 誘発性大腸炎の肝臓への影響》

脂肪性肝疾患は、単純性脂肪肝と異なり、脂肪性肝炎に進展し、肝傷害を誘発すると考えられている。実験2において、DSSを試験中に5日間飲水投与し、一過性に軽度の大腸炎を誘発したところ、実験1と比較して肝類洞内の好中球数には明らかな差は認められなかったが（実験1のCTL群  $1.3 \pm 0.6$  個/視野；実験2のCTL群  $1.8 \pm 0.5$  個/視野）、p67phox陽性細胞数は明らかに増加していた（実験1のCTL群  $3.5 \pm 1.4$  個/視野；実験2のCTL群  $15.4 \pm 3.0$  個/視野）。さらに、肝傷害マーカーであるASTおよびALTについては、実験1においてCTL群に比較しHFD群で有意な減少ないし減少傾向を示したのに対し、実験2ではいずれの項目も有意な増加を示した。また、CTL群に対するHFD群のT.BILの増加も実験1に比べ実験2で顕著になった（実験1ではCTL群に対し183%の増加；実験2ではCTL群に比べ237%の増加）。従って、HFD群におけるDSS誘発性腸炎の炎症波及効果によって、肝臓に肝傷害が誘発された可能性が示唆された。

GST-P陽性細胞巢の解析において、実験1と2のCTL群を比較した場合、大型（直径0.2mm以上）の陽性細胞巢は減少傾向にあったが（CTL群：実験1の陽性細胞巢  $10.6 \pm 3.4$  個/cm<sup>2</sup>；実験2の陽性細胞巢  $4.4 \pm 1.6$  個/cm<sup>2</sup>）、中型の陽性細胞巢は増加傾向を示した（CTL群：実験1の陽性細胞巢  $8.2 \pm 3.7$  個/cm<sup>2</sup>；実験2の陽性細胞巢  $14.7 \pm 4.9$  個/cm<sup>2</sup>）。大型の陽性細胞巢の面積には、数への影響ほどでないものの、減少傾向が認められた（CTL群：実験1の陽性細胞巢  $0.55 \pm 0.37$  mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>；実験2の陽性細胞巢  $0.39 \pm 0.18$  mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>）。これらの結果から、試験期間中の一過性の大腸炎はGST-P陽性細胞巢の増加、特に数の増加を抑制し、大型の陽性細胞巢よりも中型の陽性細胞巢を増加させたことが明らかとなった。この中型の陽性細胞巢の毒性学的意義は不明であるが、大腸炎

による生体へのストレス、肝臓への炎症波及による前がん病変抑制シグナルの亢進などが要因となり、大型の陽性巣まで拡大できないものが多数観察されたと考えられた。ヒトでは脂肪性肝疾患から発生する肝がんは75歳以上で増加するとされ、その発生には長期間に及ぶagingが関与するため（Sheedfar et al., 2013）、本モデルにおいても肝細胞の脂肪化や類洞内の炎症細胞の増加が関与する、緩やかな肝がん過程を誘発した可能性が考えられた。一方、大型GST-P陽性細胞巢においてもHFD群でp22phox・Ki-67陽性細胞の増加がみられることから、数の減少はあるものの観察されている大型の陽性細胞巢にはNOXの関与する増殖活性が亢進していることは明らかであった。

#### 《DRZの肝臓への影響》

DRZは、*in vitro*の遺伝毒性試験で陽性を示すが、小核試験や不定期DNA合成試験を含め*in vivo*の試験は全て陰性であり、生体に対して明らかな遺伝毒性を示さないと考えられている。また、げっ歯類を用いた毒性試験において肝細胞の変性は認められるものの薬物代謝酵素誘導を示唆する肝細胞肥大も観察されていない（ikenbosyu/pc1douyaku\_dimetridazole270225.pdf）。*in vivo*コメントアッセイにおいて酸化ストレスの関与するDNA損傷を示すことから（Re et al., 2009）、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に与える影響について検討を行った。

高脂肪飼料給餌による脂肪肝のスコアの増加がHFD群に比較しDRZ投与により減少し、この変化は血漿TGの減少を伴っていた。肝毒性マーカー（ALT、AST）はDRZにより軽減しているものの、TGの減少は肝細胞におけるリポ蛋白等の合成抑制の影響が示唆される。有意な変化ではないもの最終体重がHFD群に比較しやや低値であり、飲水量の低下もみられた。このため、基礎代謝の低下による影響とも推察された。一方、血漿T.CHOLはHFD群に比較しDRZ投与により増加した。実験1および2