

ともに CTL 群と HFD 群間の T.CHOL の変動は軽度にとどまり、DRZ によって特異的に T.CHOL が増加したと考えられた。DRZ のコレステロール代謝への影響についての研究報告はないが、肝毒性に関連した肝細胞への取込・排泄の異常に加え、後述するように DRZ は卵巣・精巣毒性を示すため、ステロイド合成の異常に関連してコレステロール代謝に影響を及ぼしている可能性も推察された。

GST-P 陽性細胞巢の解析では、様々な大きさの陽性細胞巢に変動がみられたため、サイズ別に定量解析を行った。その結果、DRZ 投与により大型の陽性細胞巢の面積の有意な減少がみられ、この変化は陽性巢内の Ki-67 および p22phox 陽性細胞の減少も伴っていた。中型以下の陽性巢の増加を考慮すると、不完全な肝発がん促進作用のため、高脂肪飼料給餌による肝発がん促進作用を遅延させ、今回の試験期間では大型のサイズまで陽性細胞巢を拡大させなかった可能性がある。実際、DMR には肝毒性はあるものの、発がん性試験では肝発がん性は認められていない (ikenbosyu/pc1douyaku\_dimetridazole270225.pdf)。他の機序として、本剤の有する卵巣および精巣毒性との関連を考慮する必要がある。エストロゲンおよびその誘導体は DEN 処置ラットの肝前がん病変を抑制するが、それには TGF- $\beta$  の誘導に関連した細胞増殖の抑制の関与が示唆されている (Moser et al., 1996; Kang et al., 2011)。また、ラットの 2 段階発がんモデルにおいて、去勢とアンドロゲン投与を組み合わせ合わせた実験において、去勢により GGTP 陽性肝細胞巢が減少し、その場合、数よりも面積の減少が顕著であり、アンドロゲン投与によりその抑制が軽減されることが報告されている (Lindhe et al., 1990)。一方、アンドロゲン受容体の競合的拮抗剤であっても、肝臓に薬物代謝酵素 (Cyp1A1) を誘導する場合は、アンドロゲンの変動に関わらず GST-P 陽性肝細胞巢を増加することも報告されている (Tawfeeq et al., 2012)。DRZ 投与では、少なくとも 3 種の薬物代謝酵素 (Cyp1a2, Cyp2e1, Cyp4a1) の誘導は確認されていない。従って、DRZ 投与では直接的な肝臓への作用以外にも卵巣あるいは精巣毒性の要因となる

性ホルモン様の作用あるいはその受容体への影響により、大型の GST-P 陽性細胞巢の減少が生じた可能性が考えられた。

一方、中間型および小型の GST-P 陽性細胞巢並びに単一 GST-P 陽性肝細胞の数が DRZ 投与により HFD 群に比較し有意に増加した。上記のように大型の GST-P 陽性細胞巢の減少に対比して、本剤の特有の肝発がん促進作用と考えられる。これらの陽性細胞巢および細胞数は APO 投与により有意な減少ないし減少傾向を示していることから、中型以下の大きさの病変の発生には NOX の関与が示唆される。中型の GST-P 陽性細胞巢における p22phox 陽性細胞数の解析結果において、群間に有意な変動が観察されなかったため、関連する NOX 関連分子の変動を捉えることができなかった。これまでの研究において、免疫染色では p22phox および NOX4 が肝細胞において明瞭に染めださせるが、NOX4 は大型の GST-P 陽性に比較的発現しやすく、今回の検討には適さない可能性が高い。今後、さらに NOX 関連分子と前がん病変の関連性について検討を加え、中型以下の前がん病変の形成機序を明らかにする必要がある。一方、HFD 給餌下の DRZ 投与により増加した Ki-67 および  $\gamma$ -H2A.X 陽性細胞が HFD+DRZ 群に比較し、APO との併用により減少傾向を示したことから、細胞増殖や DNA 損傷の軽減が中型以下の陽性巢の減少に関与していることが示唆された。特に、DRZ による DNA 損傷においては、ヒトリンパ球を用いた comet assay において、SOD やカタラーゼを含む数種の抗酸化剤投与により DRZ の DNA 損傷が抑制されたとの報告があることから、その DNA 損傷には酸化ストレスが関与していることが示唆されている (Re et al., 1997)。NOX によって産生されるスーパーオキシドは、SOD やカタラーゼによって還元されることも勘案すると、中型以下の病変の発生には NOX の関与が影響を与えている可能性がある。

## E. 結論

### 発がん初期過程の細胞周期解析に関する研究

腎発がん物質は、肝発がん物質とは異なり、最大

28日間の反復投与によっても、発がん物質特異的な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関連遺伝子およびp-MDM2の発現変動を誘発しなかった。このことから、腎発がん物質によって誘発される発がん過程の早期では、G<sub>2</sub>/MおよびM期スピンドルチェックポイント機能の活性化に伴う細胞周期停止およびG<sub>1</sub>/Sチェックポイント機能の破綻は、発がんに関与しない可能性が示唆された。

ポストイニシエーション期での解析の結果、投与開始後2週目では、肝発がん物質/肝発がんプロモーター物質特異的な細胞周期制御異常は認められなかった。ポストイニシエーション期での投与4週目では、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によってのみ増殖活性が亢進された。一方で、遺伝毒性肝発がん物質のCRBおよびBNFは、UBD発現細胞および増殖細胞のM期における割合を減少させ、M期スピンドルチェックポイント機能の破綻の誘発が示唆された。また、今回用いた肝発がん物質/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における6週間の投与後に、明らかな肝発がんプロモーション作用を示した。これらの結果から、発がんイニシエーション・プロモーションモデルでは、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での投与により細胞毒性が増強され、それにより再生性の増殖活性の亢進が誘発されることが示唆された。一方で、遺伝毒性発がん物質は、発がん促進過程早期において、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示唆された。遺伝毒性発がん物質のCRBは増殖活性を亢進しなかったことから、増殖活性の亢進およびM期スピンドルチェックポイント機能の破綻は、肝発がん過程においてそれぞれの反応が独立して発がんに関与してい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週間の投与後での、細胞増殖活性ないしM期スピンドルチェックポイント関連分子に着目した解析は、肝発がん物質/プロモーター物質の発がん性の予測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* ホモ欠損 *gpt delta* マウスならびにその野生型への13週間のNFTの投与により、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酸化的DNA損傷レベルが上昇した。前年度の報告で*Nrf2* 欠損マウスのみで腎臓におけるin vivo 変異原性が陽性結果を示していることから、NFTの遺伝毒性発現機序には酸化ストレスが関与することが明らかとなった。NF類の酸化ストレス産生機序には、ニトロフラン骨格の側鎖の化学構造が大きく影響する可能性が示唆された。

#### 肝発がん促進シグナルの解析に関する研究

肝発がん促進過程におけるNOXの関与について検討するため、基礎飼料と高脂肪飼料の給餌ラットを用いて肝二段階発がんモデルを実施したところ、高脂肪飼料給餌ラットでは高脂血症、脂肪肝および肝脂質代謝酵素の遺伝子変動とともにNOX関連分子p22phoxの発現を伴う前がん病変の増加がみられ、NOXの関与が示唆される肝発がん促進作用が検出できた。このモデルに肝臓への炎症の波及効果を目的として大腸炎モデルを適用した結果、本モデルでは肝傷害を伴う肝発がん促進作用を検出することができた。その際、様々な大きさの前がん病変を標的としてサイズ依存性の反応があるかどうかを検出する必要性があり、通常よりもサイズの小さな前がん病変に着目することが重要であった。抗真菌剤・肝毒性物質であるDMRを被験物質として用い、大型、中型、小型の前がん病変に分けて評価した結果、中型以下の前がん病変を増加させる特徴的な肝発がん促進作用を検出できた。この結果は、本剤が弱い肝発がん促進作用を有することを示唆し、発がん性試験においても明瞭な肝発がん性を示さないことと一致した。中型以下の前がん病変の増加には細胞増殖とDNA損傷指標の発現が関与しており、それらがNOX阻害剤により抑制されたことから、DRZの前がん病変形成過程にはNOXの関与する酸化ストレスに依存した細胞増殖機構が関与することが示唆さ

れた。

158 回日本獣医学会学術集会、十和田、2015.9.7-9

## F. 健康危機情報

特になし

Masayuki Kimura, Hajime Abe, Takeshi Tanaka, Yousuke

Watanabe, Ayako Shiraki, Sayaka Mizukami, Yasuko

Hasegawa-Baba, Toshinori Yoshida, Makoto Shibutani:

Onset analysis of carcinogen-specific disruptive cell cycle facilitation during the early stage of repeated administration of renal carcinogens in rats. 13th European Congress of Toxicologic Pathology, 2015.9.22-25

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kimura, M., Mizukami, S., Watanabe, Y.,

Hasegawa-Baba, Y., Onda, N., Yoshida, T., Shibutani,

M.: Disruption of spindle checkpoint function ahead of facilitation of cell proliferation by repeated administration of hepatocarcinogens in rats. J. Toxicol. Sci. 40(6):855-871, 2015.

木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：ラットポストイニシエーション早期での肝発がん物質・プロモーター反復投与に対する肝細胞における細胞周期関連分子の反応性、第 32 回日本毒性病理学会総会および学術集会、高松、2016.1.28-29

Kimura, M., Mizukami, S., Watanabe, Y.,

Hasegawa-Baba, Y., Onda, N., Yoshida, T., Shibutani,

M.: Disruption of spindle checkpoint function in rats following 28 days of repeated administration of renal carcinogens. J. Toxicol. Sci. 41(1):91-104, 2016.

木島綾希、石井雄二、高須伸二、横尾 諭、土屋卓磨、児玉幸夫、小川久美子、梅村隆志：腎発がん剤ニトロフランチインの遺伝毒性発現機序における酸化ストレスの関与、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、2015.6.29-7.1

### 2. 学会発表

木村真之、阿部 一、田中猛、板橋恵、白木彩子、水上さやか、渡邊洋祐、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：ラットの腎発がん物質反復投与早期から生じる細胞周期の促進とその制御異常の出現時期の解析、第 42 回日本毒性学会学術年会、金沢、2015.6.29-7.1

吉田敏則、村山宗理、河嶋将司、木村真之、水上さやか、寒川祐美、林 新茂、渋谷 淳：高脂肪飼料給餌ラットを用いた二段階肝発がんモデルにおける血中脂質および肝 p22phox 発現の解析、第 32 回日本毒性病理学会総会および学術集会、高松、2016.1.28-29

木村真之、阿部 一、田中 猛、白木彩子、水上さやか、渡邊洋祐、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：発がん物質の反復投与早期から生じる細胞周期制御異常に関する研究、第 30 回発癌病理研究会、高松、2015.8.26-28

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

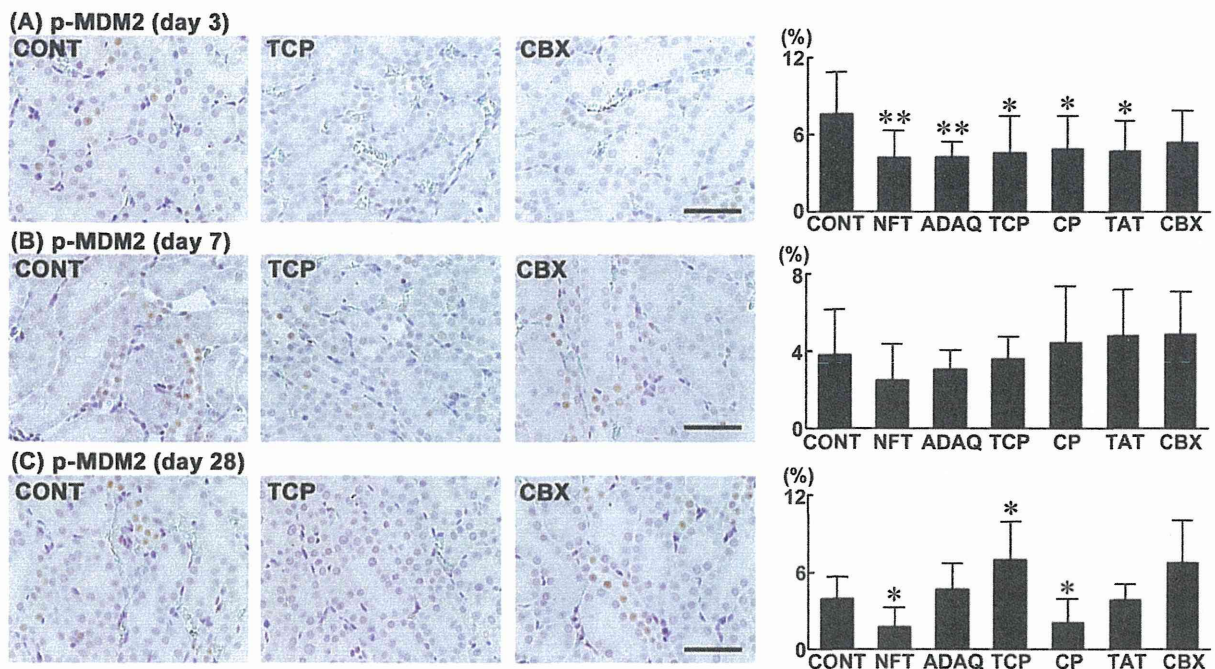
### 2. 実用新案登録

なし

木村真之、阿部 一、田中 猛、白木彩子、水上さやか、渡邊洋祐、寒川祐見、長谷川也須子、吉田敏則、渋谷 淳：ラットの腎発がん物質反復投与早期から生じる細胞周期制御異常とその出現時期の検討、第

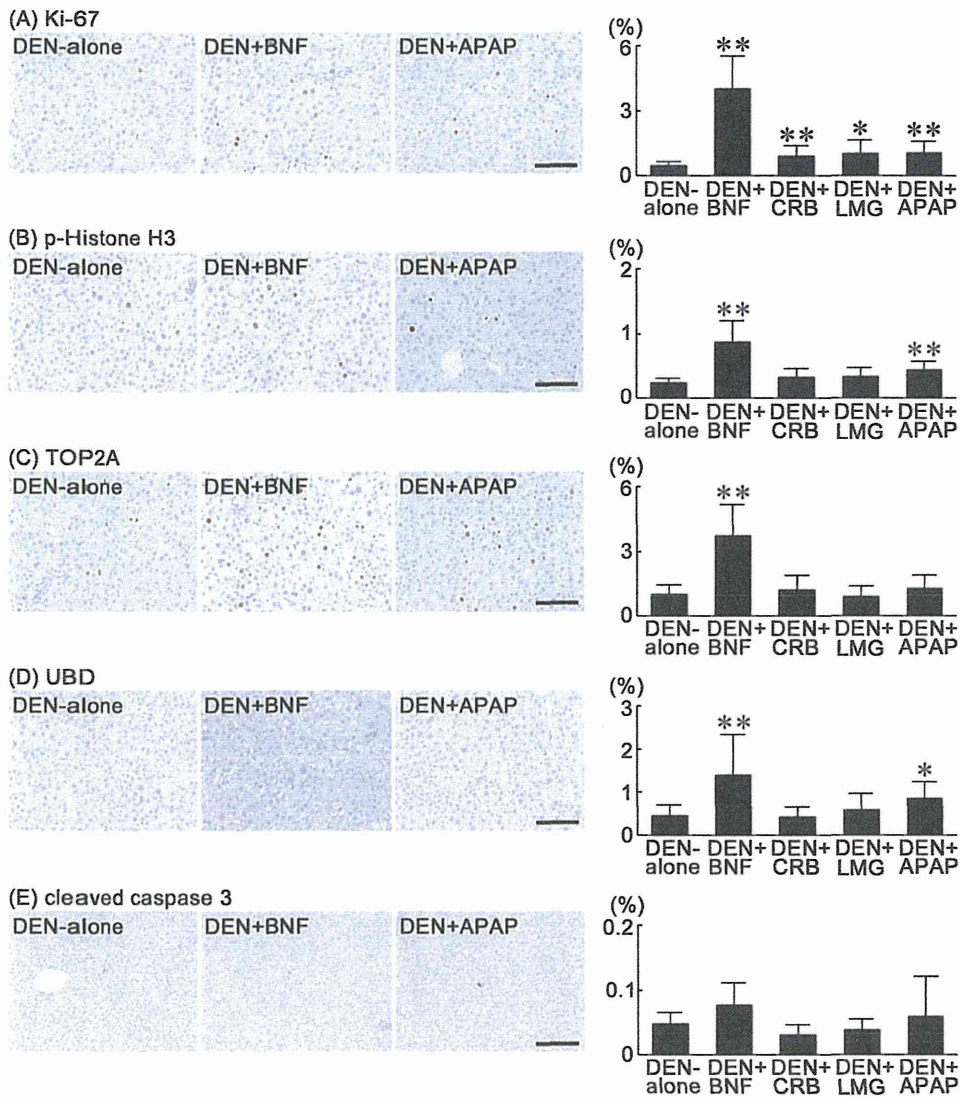
### 3. その他

なし



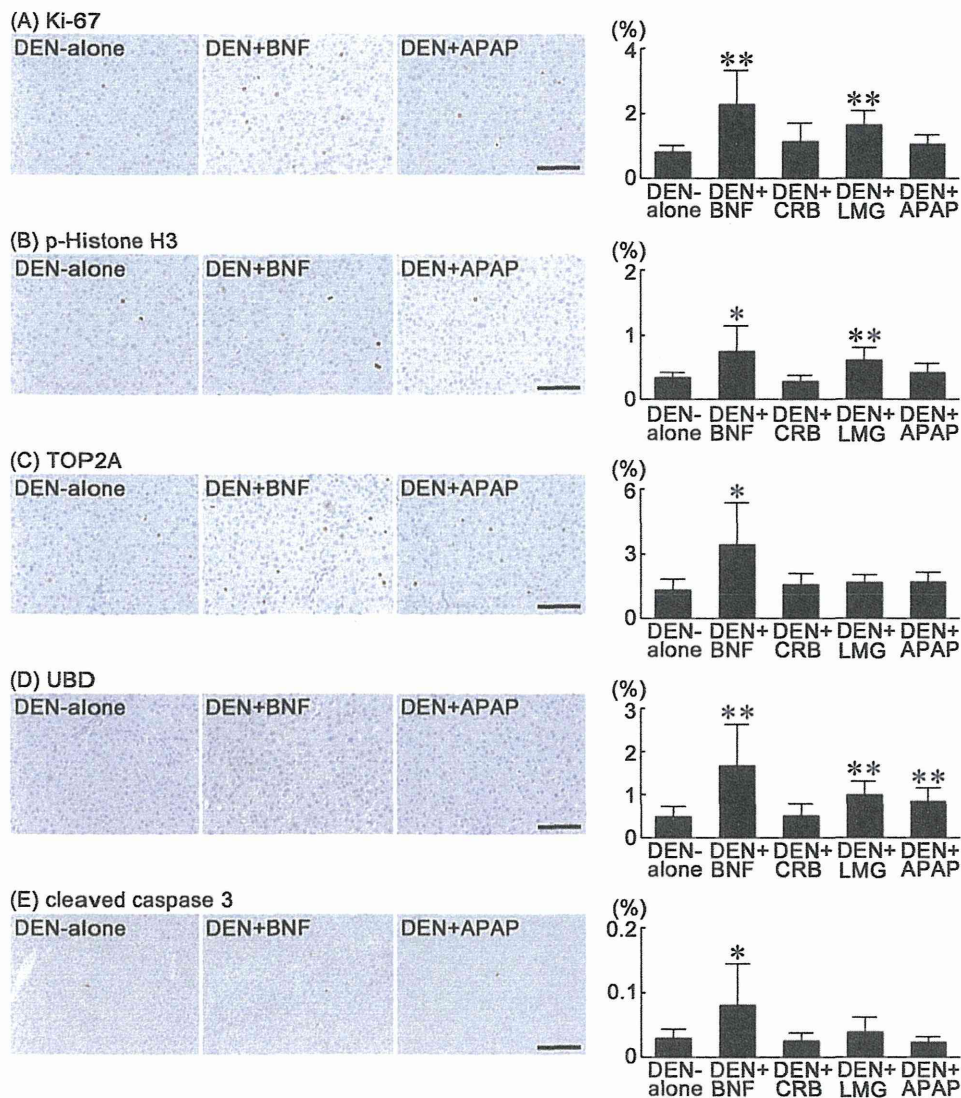
**Fig. 1**

**Fig. 1.** Distribution of p-MDM2<sup>+</sup> cells in the OSOM of rats at days 3, 7 or 28 after treatment with renal carcinogens or non-carcinogenic renal toxicants. Photomicrographs show the distribution of p-MDM2<sup>+</sup> cells in the OSOM of representative cases from untreated controls and animals treated with TCP or CBX. The graphs show positive cell ratios of renal tubular epithelial cells per total cells counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) p-MDM2 (day 3), (B) p-MDM2 (day 7), (C) p-MDM2 (day 28). Bar = 50  $\mu$ m. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. untreated controls (Steel's test).



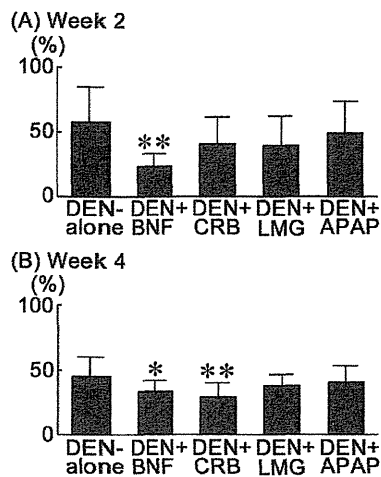
**Fig. 2**

**Fig. 2.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> hepatocytes in the liver of rats after 2 weeks of post-initiation treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic tumor promoters or non-carcinogenic hepatotoxicants. Photomicrographs show the distribution of immunoreactive cells in the liver of representative cases from the DEN-alone, DEN+BNF or DEN+APAP. The graphs show mean positive cell ratios per total hepatocytes counted in each animal of DEN-alone (N=10), DEN+BNF (N=10), DEN+CRB (N=10), DEN+LMG (N=10) and DEN+APAP (N=9). Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TOP2A, (D) UBD, (E) cleaved caspase 3. Bar = 100  $\mu$ m (A–D) or 200  $\mu$ m (E). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. the DEN-alone group (Steel's test).



**Fig. 3**

**Fig. 3.** Distribution of Ki-67<sup>+</sup>, p-Histone H3<sup>+</sup>, TOP2A<sup>+</sup>, UBD<sup>+</sup> and cleaved caspase 3<sup>+</sup> hepatocytes in the liver of rats after 4 weeks of post-initiation treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic tumor promoters or non-carcinogenic hepatotoxicants. Photomicrographs show the distribution of immunoreactive cells in the liver of representative cases from the DEN-alone, DEN+BNF or DEN+APAP. The graphs show mean positive cell ratios per total hepatocytes counted in 10 animals of each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67, (B) p-Histone H3, (C) TOP2A, (D) UBD, (E) cleaved caspase 3. Bar = 100  $\mu$ m (A–D) or 200  $\mu$ m (E). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. the DEN-alone group (Steel's test).



**Fig. 4**

**Fig. 4.** Ratio of p-Histone H3<sup>+</sup> cell per total Ki-67<sup>+</sup> hepatocytes in the liver of rats after 2 or 4 weeks of post-initiation treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic tumor promoters or non-carcinogenic hepatotoxicants. Number of animals examined was 10 for DEN-alone, DEN+BNF, DEN+CRB, DEN+LMG and 9 for DEN+APAP at week 2 and 10 for all groups at week 4. Values represent mean + SD. (A) p-Histone H3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> cell ratio at week 2, (B) p-Histone H3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> cell ratio at week 4. \*\*  $P < 0.01$  vs. the DEN-alone group (Dunnett's test).

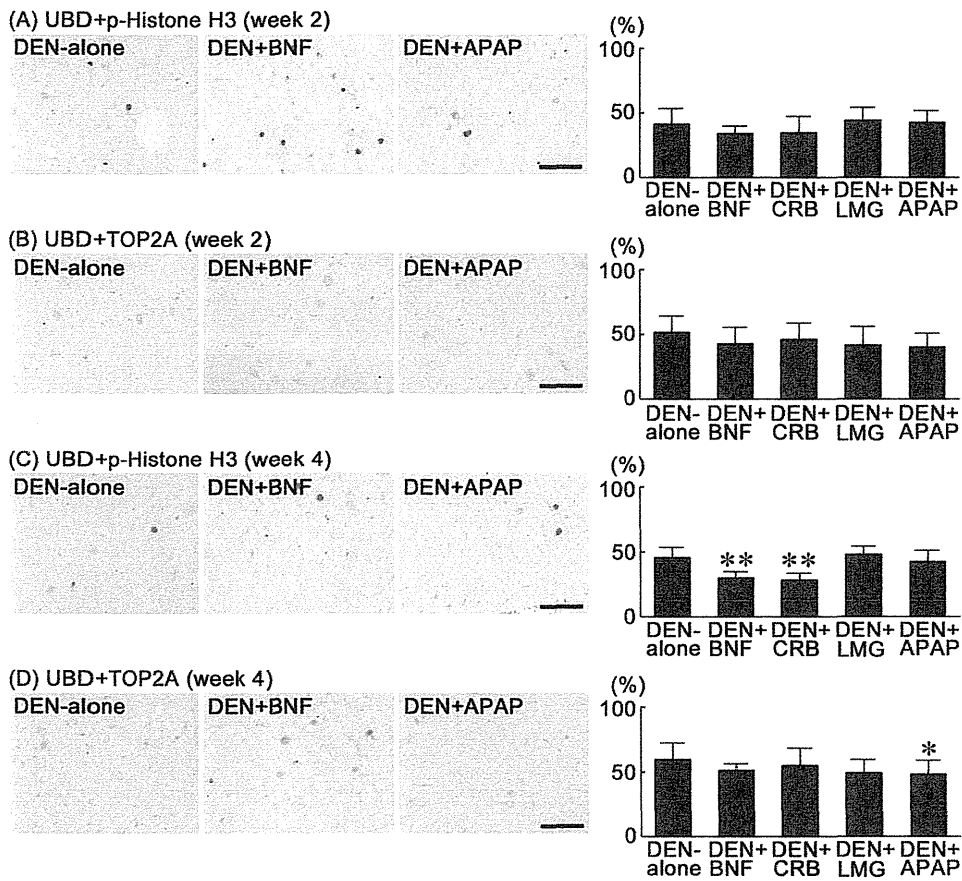
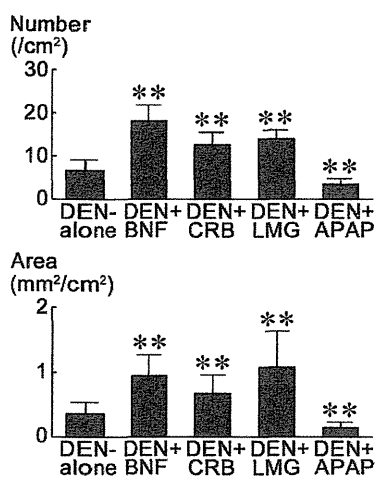


Fig. 5

**Fig. 5.** Incidence of hepatocytes expressing p-Histone H3 or TOP2A in UBD<sup>+</sup> populations in the liver of rats after 2 or 4 weeks of post-initiation treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic tumor promoters or non-carcinogenic hepatotoxicants. Photomicrographs show the distribution of immunoreactive cells in the liver of representative cases from the DEN-alone, DEN+BNF or DEN+APAP. The immunoreactivity of UBD (cytoplasm) is visualized as brown, and that of p-Histone H3 (nucleus) or TOP2A (nucleus) as red. The graphs show the incidence ratio of p-Histone H3- or TOP2A-positive cells (%) per total hepatocytes immunoreactive to UBD. Number of animals examined was 10 for DEN-alone, DEN+BNF, DEN+CRB, DEN+LMG and 9 for DEN+APAP at week 2 and 10 for all groups at week 4. Values represent mean + SD. (A) p-Histone H3<sup>+</sup>/UBD<sup>+</sup> cell ratio at week 2, (B) TOP2A<sup>+</sup>/UBD<sup>+</sup> cell ratio at week 2, (C) p-Histone H3<sup>+</sup>/UBD<sup>+</sup> cell ratio at week 4, (D) TOP2A<sup>+</sup>/UBD<sup>+</sup> cell ratio at week 4. Bar = 100  $\mu$ m. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. the DEN-alone group (Dunnett's test).

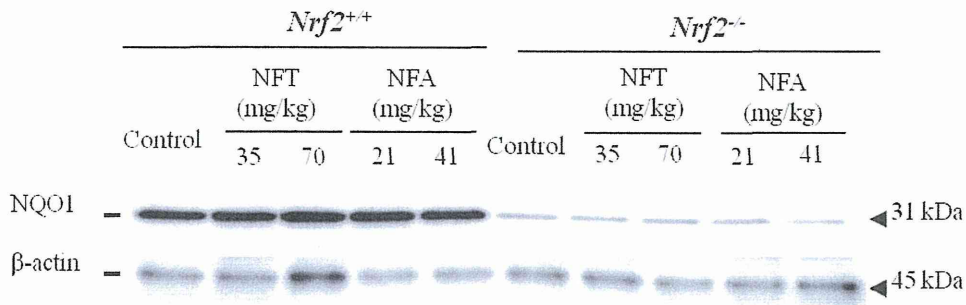
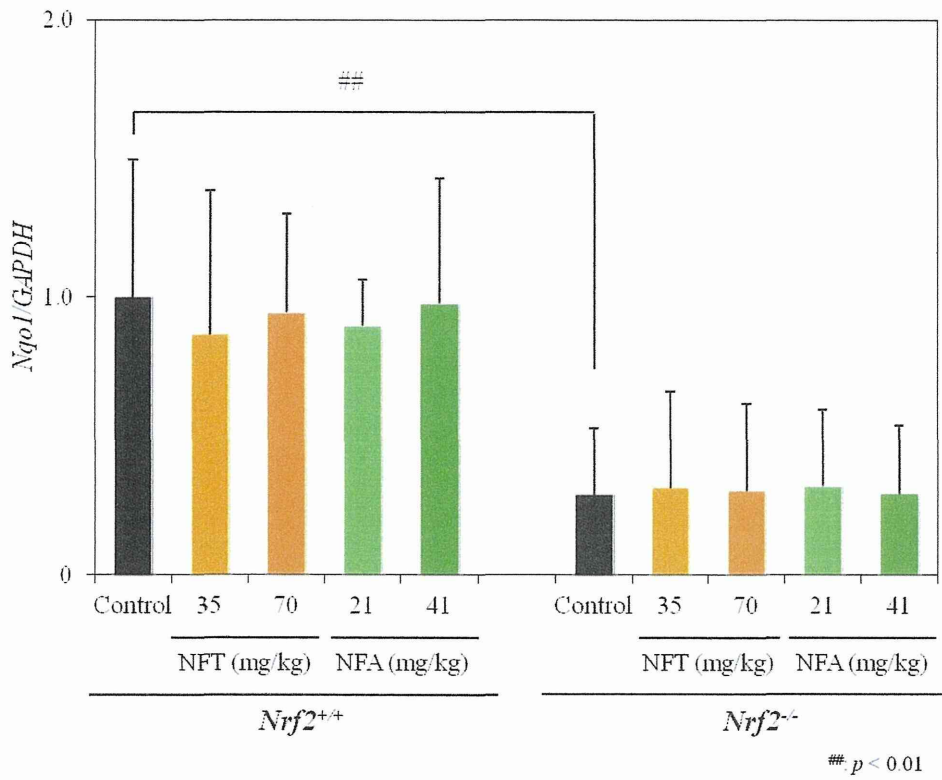




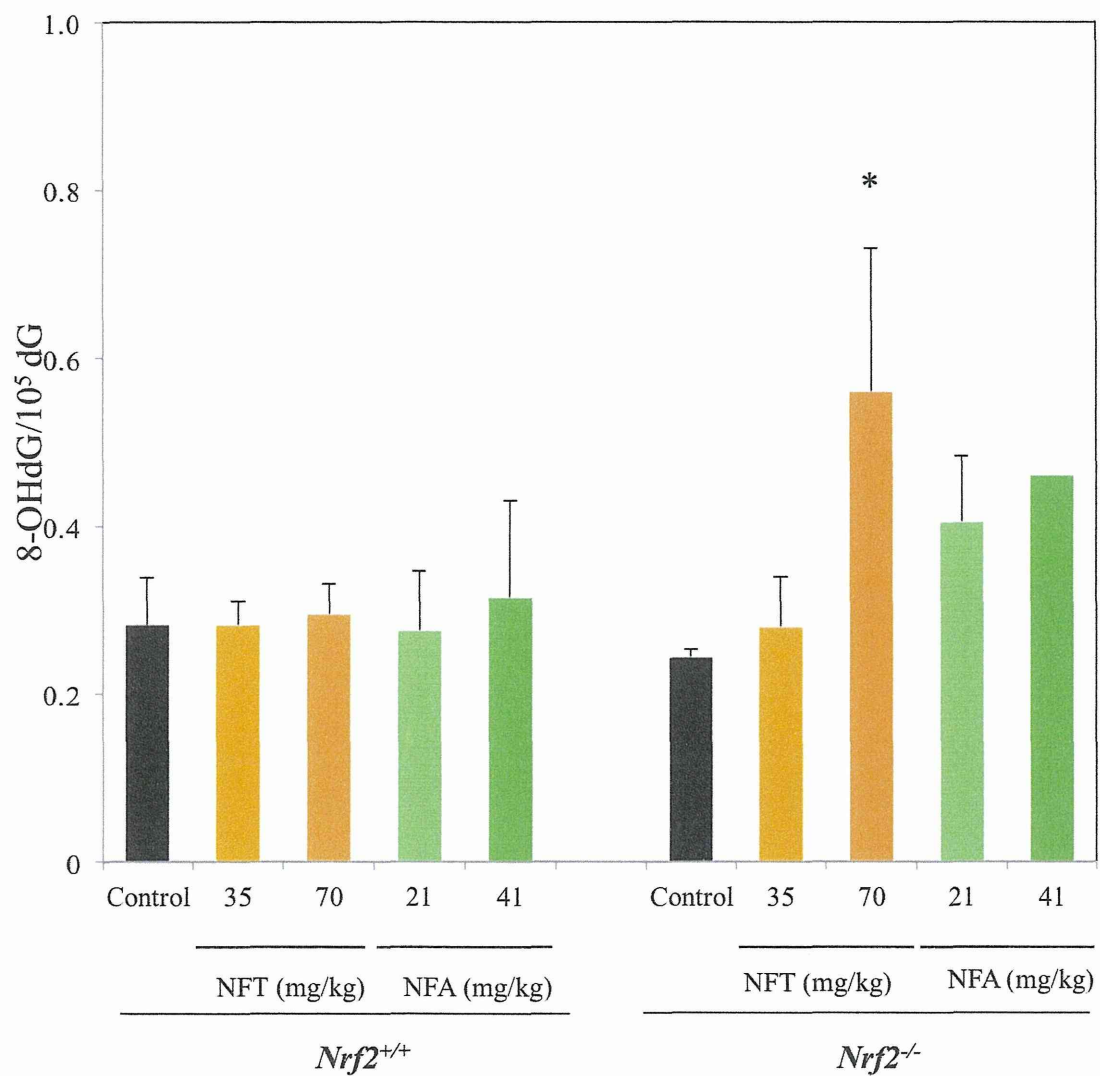
**Fig. 6**

**Fig. 6.** Number and area of GST-P<sup>+</sup> liver cell foci in the liver of rats after 6 weeks of post-initiation treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic tumor promoters or non-carcinogenic hepatotoxicants. Number of animals examined was 14 for DEN-alone, 15 for DEN+BNF, 16 for DEN+CRB, 16 for DEN+LMG and 15 for DEN+APAP. \*\*  $P < 0.01$  vs. the DEN-alone group (Steel's test).

## *Nqo1*

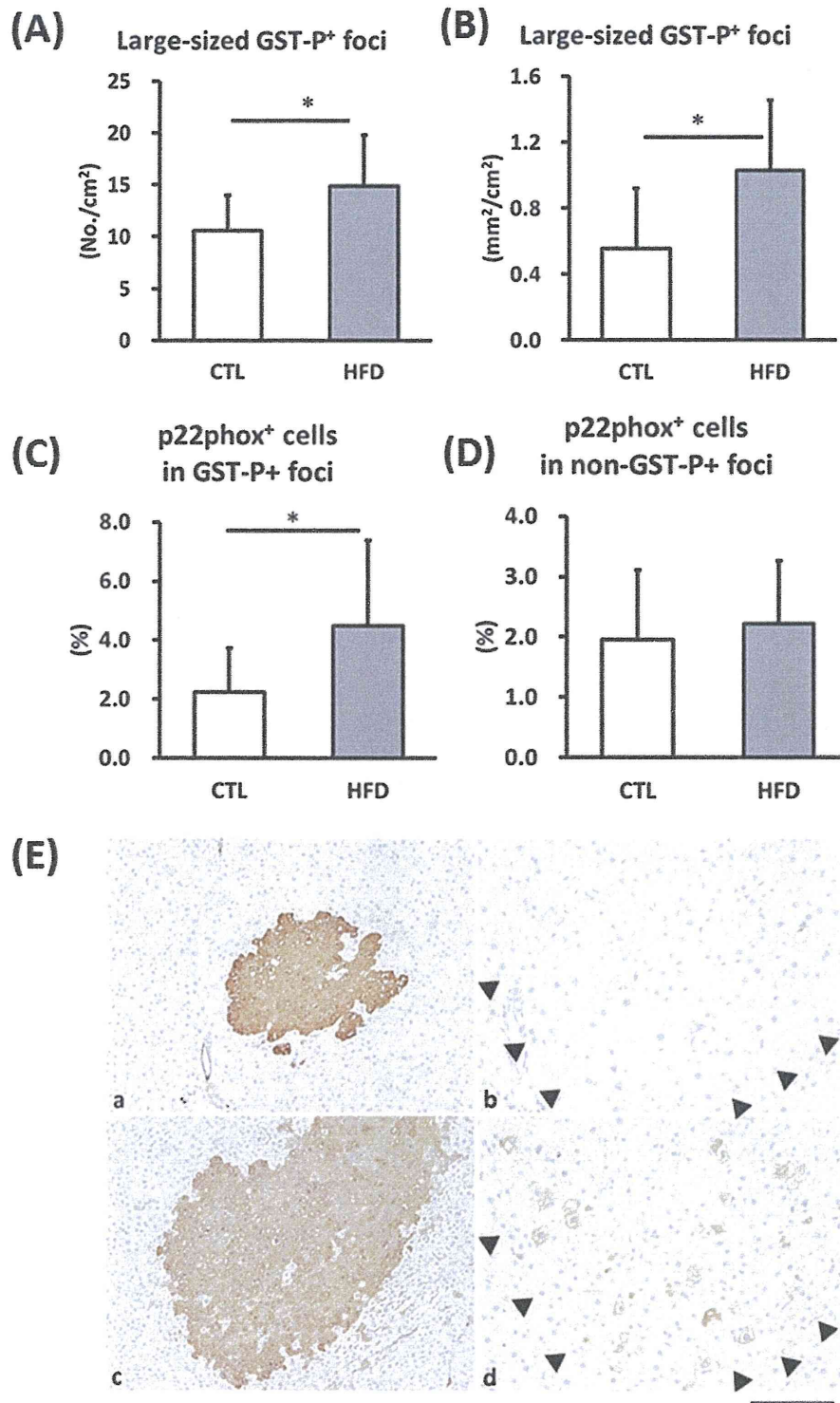


**Fig. 7.** (A) Change in the mRNA levels of *Nqo1* gene in the kidneys of *Nrf2*<sup>+/+</sup> or *Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice treated with NFT or NFA for 13 weeks. Data were normalized to GAPDH mRNA levels. (B) Western blotting analysis of NQO1 in the kidneys of *Nrf2*<sup>+/+</sup> or *Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice treated with NFT or NFA for 13 weeks.

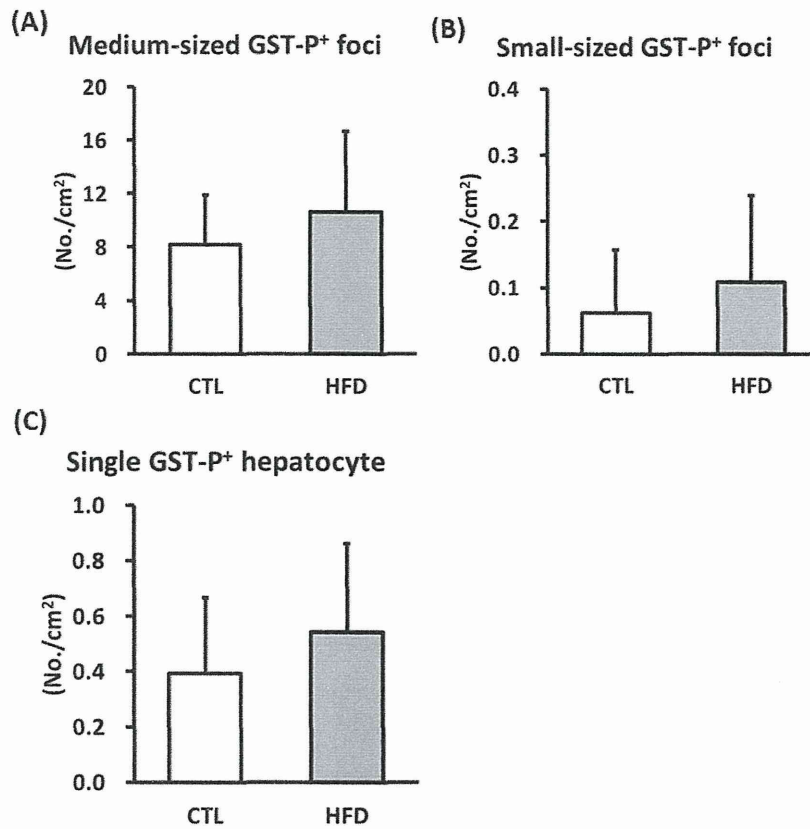


\*:  $p < 0.05$  vs. relevant control

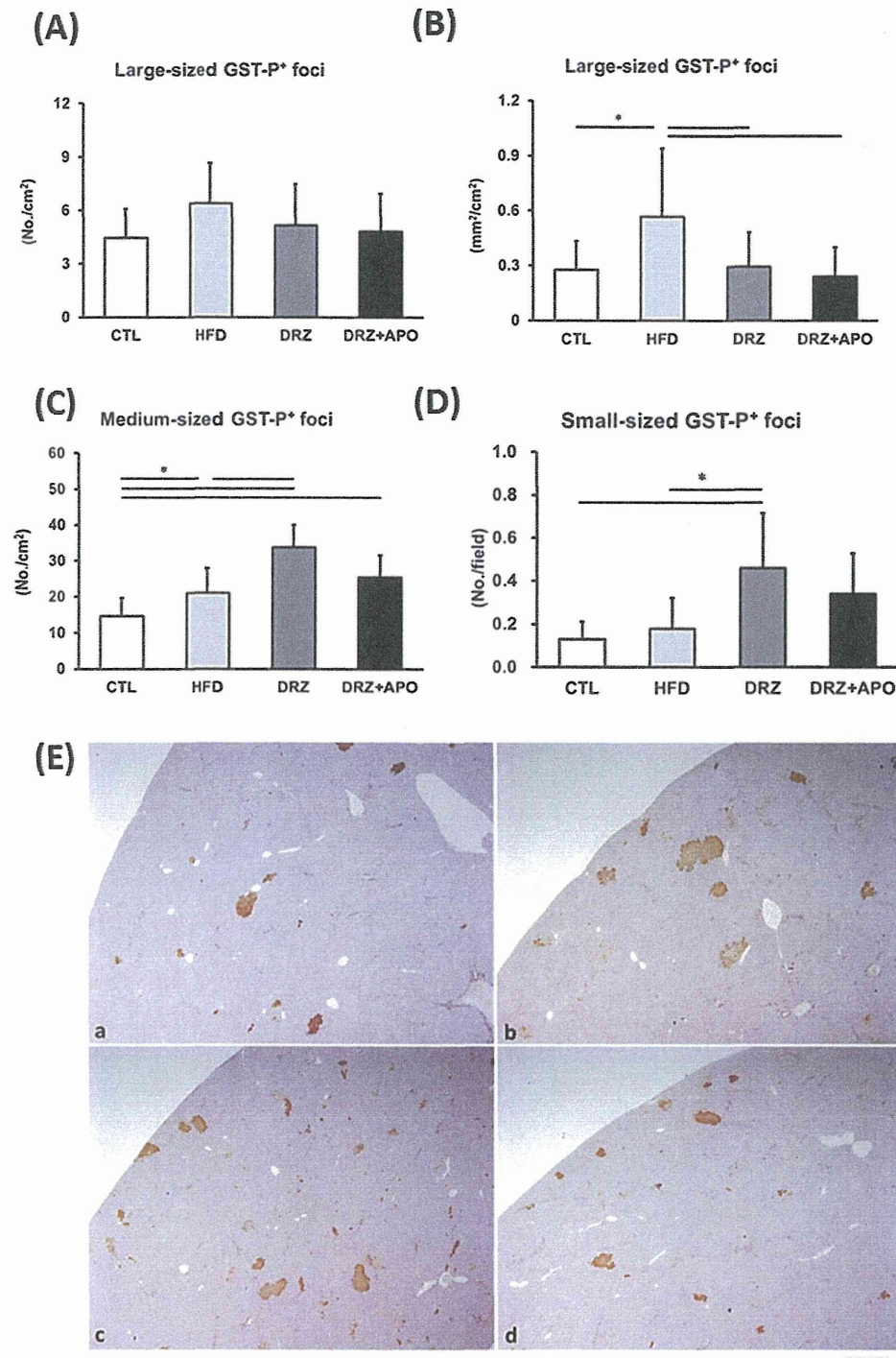
**Fig. 8.** 8-OHdG levels in the kidneys of *Nrf2*<sup>+/+</sup> or *Nrf2*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice treated with NFT or NFA for 13 weeks.



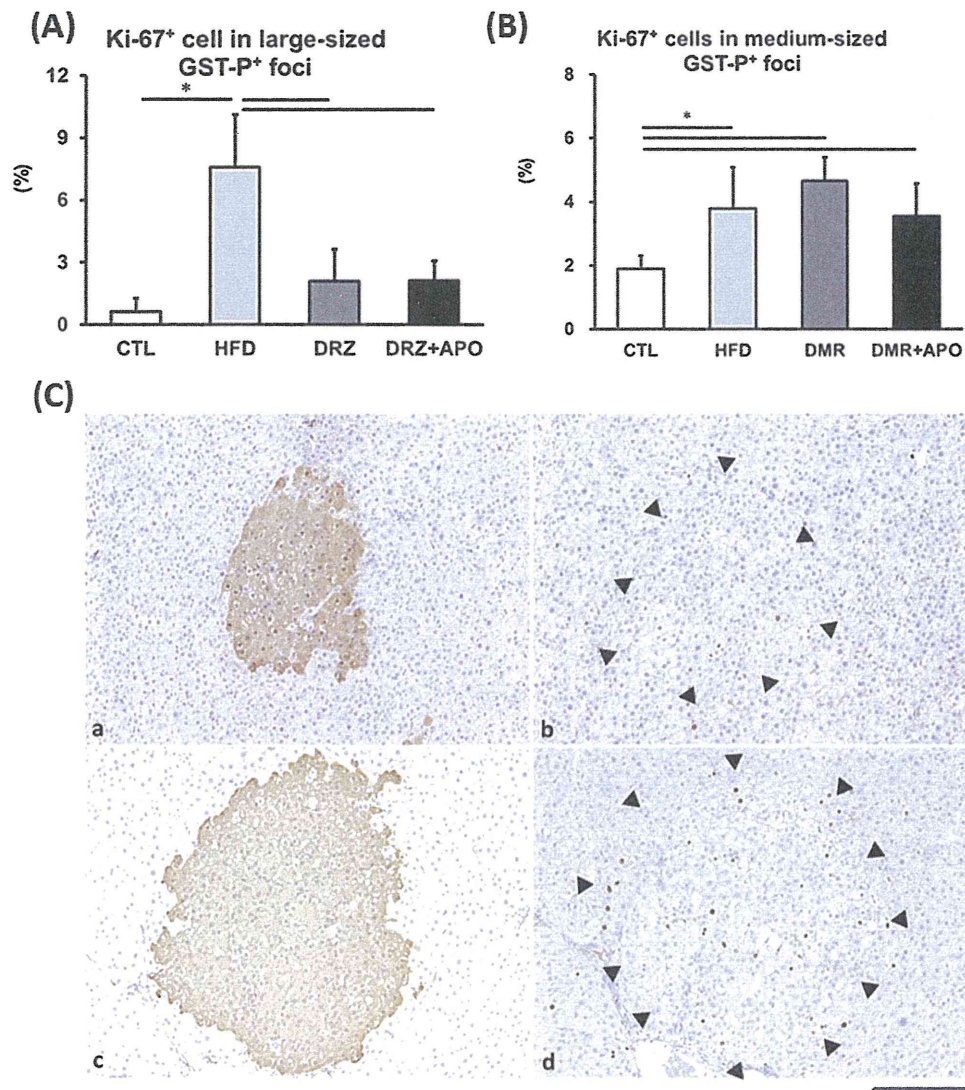
**Fig. 9.** Quantitative analysis of large-sized GST-P<sup>+</sup> foci and expression of p22phox<sup>+</sup> cells in the GST-P<sup>+</sup> foci and non-GST-P<sup>+</sup> foci in the liver of rats fed with basal diet and high fat diet after DEN initiation. (A, B) The number (A) and area (B) of large-sized GST-P<sup>+</sup> foci in each group. (C, D) Quantitative data (%) of p22phox<sup>+</sup> cells in large-sized GST-P<sup>+</sup> foci (C) and non-GST-P<sup>+</sup> foci (D). (E) Representative images of large-sized GST-P<sup>+</sup> foci (a, c) and p22phox<sup>+</sup> cells (b, d) in CTL (a, b) and HFD (c, d) groups. Bar=200 μm (a, b), 100 μm (b, d). Columns represent mean and standard deviation. CTL, control group; HFD, high fat diet group. \*: p<0.05 (Student's t test or Aspin-Welch test).



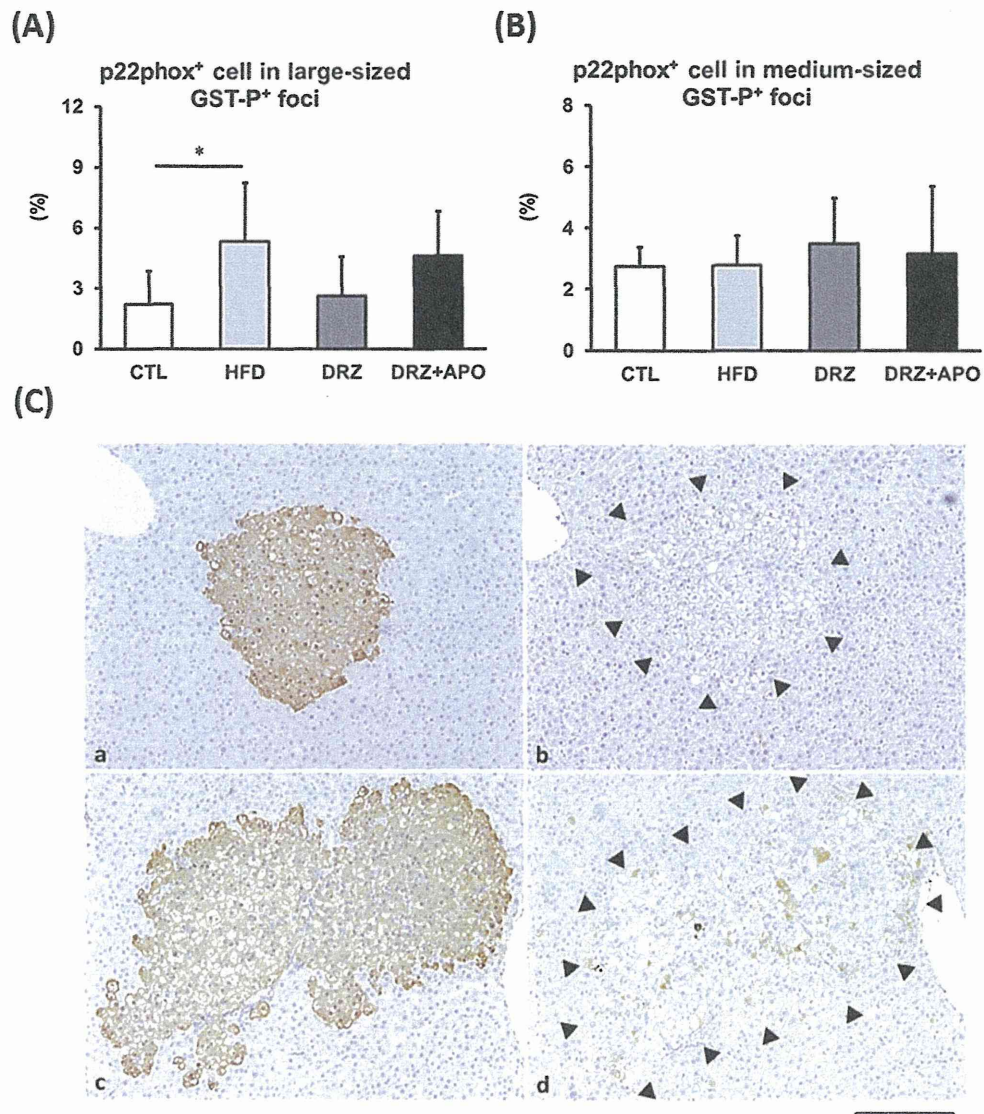
**Fig. 10.** Quantitative analysis of variable-sized GST-P<sup>+</sup> foci and single GST-P<sup>+</sup> hepatocyte in the liver of rats fed with basal diet and high fat diet after DEN initiation. The number of medium- (A) or small-sized GST-P<sup>+</sup> foci (B) and single GST-P<sup>+</sup> hepatocyte (C) in each group are shown. Columns represent mean and standard deviation. CTL, control group; HFD, high fat diet group. \*:  $p < 0.05$  (Student's t test or Aspin-Welch test).



**Fig. 11.** Quantitative analysis of variable-sized GST-P<sup>+</sup> foci in the liver of rats fed basal diet after DEN initiation or fed high fat diet after DEN initiation followed by DRZ treatment with or without co-treatment with APO. (A-D) The number (A) and area (B) of large-sized GST-P<sup>+</sup> foci, more than 200 μm in diameter, number of medium-sized GST-P<sup>+</sup> foci, 50 to 200 μm in diameter (C), and small-sized GST-P<sup>+</sup> foci, less than 50 μm in diameter (D). (E) Representative images of GST-P<sup>+</sup> foci in CTL (a) and HFD (b), HFD+DRZ (c), and HFD+DRZ+APO (d) groups. Bar=200 μm. Columns represent mean and standard deviation. Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin. \*, p<0.05 (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

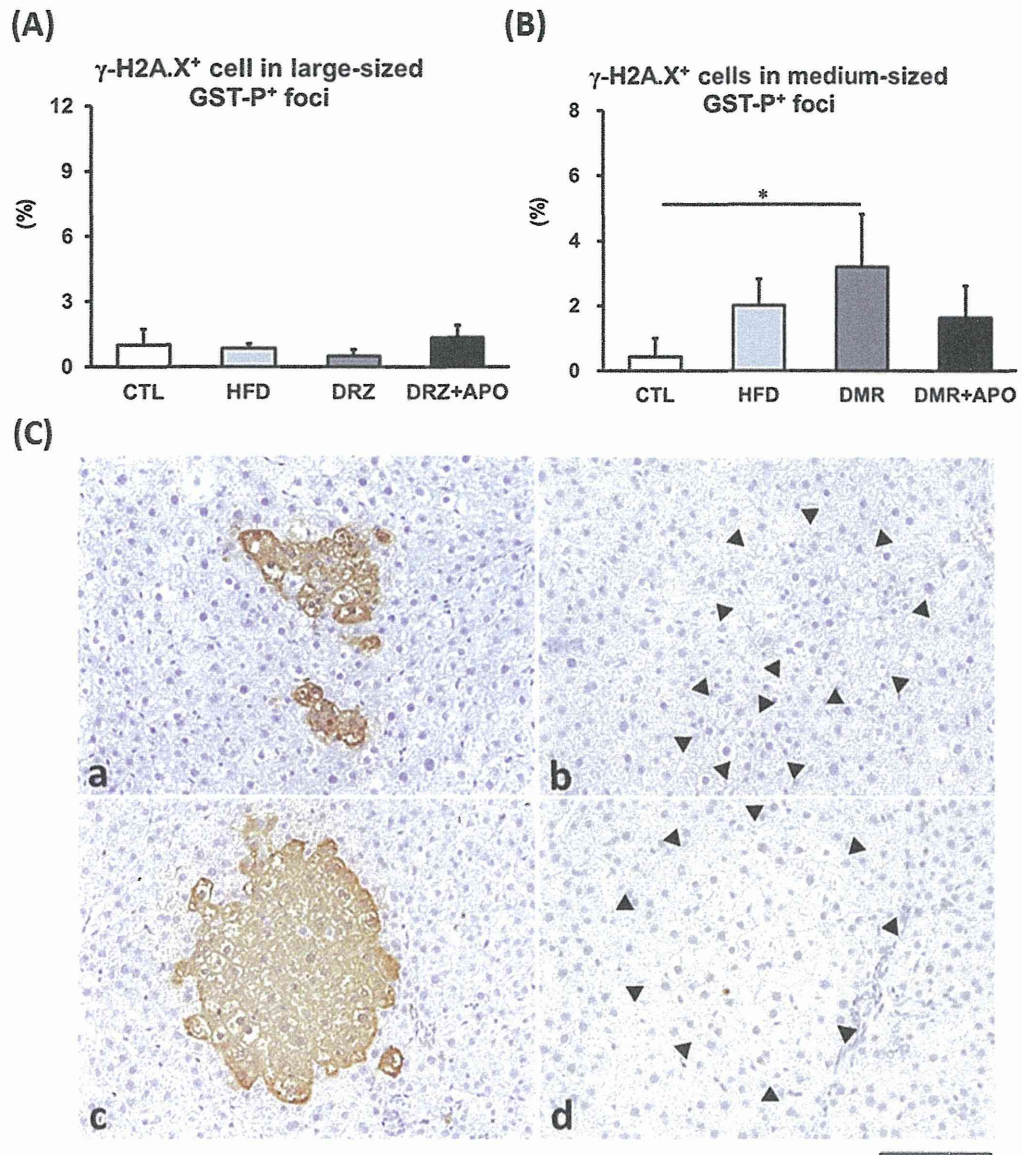


**Fig. 12.** Quantitative analysis of Ki-67<sup>+</sup> cells in GST-P<sup>+</sup> foci in the liver of rats after DEN initiation or DEN initiation followed by DMR treatment with or without co-treatment with APO. (A, B) Quantitative data (%) of Ki-67<sup>+</sup> cells in large-sized (A) or medium-sized (B) GST-P<sup>+</sup> foci. (C) Representative images of large-sized GST-P<sup>+</sup> foci (a, c) and Ki-67<sup>+</sup> cells (b, d) in CTL (a, b) and HFD (b, d) groups. Bar=200 um. Columns represent mean and standard deviation. Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin. \*,  $p < 0.05$  (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).



**Fig. 13.** Quantitative analysis of p22phox<sup>+</sup> cells in GST-P<sup>+</sup> foci in the liver of rats after DEN initiation or DEN initiation followed by DMR treatment with or without co-treatment with APO. (A, B) Quantitative data (%) of p22phox<sup>+</sup> cells in large-sized (A) or medium-sized (B) GST-P<sup>+</sup> foci. (C) Representative images of large-sized GST-P<sup>+</sup> foci (a, c) and p22phox<sup>+</sup> cells (b, d) in CTL (a, b) and HFD (b, d) groups. Bar=200 μm. Columns represent mean and standard deviation. Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin. \*,  $p < 0.05$  (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).





**Fig. 14.** Quantitative analysis of  $\gamma$ -H2A.X<sup>+</sup> cells in GST-P<sup>+</sup> foci in the liver of rats after DEN initiation or DEN initiation followed by DMR treatment with or without co-treatment with APO. (A, B) Quantitative data (%) of p22phox<sup>+</sup> cells in large-sized (A) or medium-sized (B) GST-P<sup>+</sup> foci. (C) Representative images of medium-sized GST-P<sup>+</sup> foci (a, c) and  $\gamma$ -H2A.X<sup>+</sup> cells (b, d) in CTL (a, b) and HFD (b, d) groups. A small-sized focus is also observed (a, b). Bar=100  $\mu$ m. Columns represent mean and standard deviation. Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin. \*,  $p < 0.05$  (Tukey's or Steel-Dwass multiple comparison test).

**Table 1. Antibodies used for immunohistochemistry**

Antigen	Abbreviated name	Host species	Clone name	Dilution	Antigen retrieval	Manufacturer (City, State, Country)
Cleaved caspase 3 (Asp175)	—	Rabbit	Polyclonal	1:500	Autoclaving in target retrieval solution	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
Glutathione <i>S</i> -transferase placental form	GST-P	Rabbit	Polyclonal	1:1000	None	Medical & Biological Laboratories (Nagoya, Japan)
Ki-67 antigen	Ki-67	Mouse	Monoclonal (MIB-5)	1:200	Autoclaving in citrate buffer	Dako (Glostrup, Denmark)
Phosphorylated histone H3 (Ser10)	Phospho-Histone H3	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Phosphorylated MDM2 (Ser166)	p-MDM2	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in target retrieval solution	Cell Signaling Technology, Inc.
Topoisomerase II alpha	TOP2A	Rabbit	Monoclonal (EP1102Y)	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Epitomics, Inc. (Burlingame, CA, USA)
Ubiquitin D	UBD	Rabbit	Polyclonal	1:400	Autoclaving in citrate buffer	Proteintech Group, Inc. (Chicago, IL, USA)

Antigen retrieval was applied for immunohistochemistry. Retrieval conditions were either autoclaving at 121°C for 10 min in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) or in target retrieval solution (3-in-1; pH 9.0, Dako).

**Table 2. Sequence of primers used for real-time RT-PCR**

Gene	Accession no.	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Cdkn1a</i>	NM_080782	ACCAGCCACA GGCACCAT	CGGCATACTT TGCTCCTGTG T
<i>Chek1</i>	NM_080400	TGGCAGCTGG CAAAGGA	AATCCCAGTC TTCCACAAAA GG
<i>Mad211</i>	NM_001106594	ACAGCCACTG TGACATTTCT ACCA	CCCGATTCTT CCCACTTTTC A
<i>Mdm2</i>	NM_001108099	GAAGGAGGAC ACACAAGACA AAGA	ATGGCTCGAT GGC GTTCA
<i>Rbl2</i>	NM_031094	AAGTGAATCG CCTGCAAAAA G	CTCGGTCATT AGCTACATCT TGGA
<i>Tp53</i>	NM_030989	CCCTTCACTG CCTTTTTTTTA CCT	GCCAGGAACC AGTTTGCATA G
Housekeeping genes			
<i>Actb</i>	NM_031144	CCCTGGCTCCTAGCACCAT	AGAGCCACCAATCCACACAGA
<i>Gapdh</i>	NM_017008	GGCCGAGGGC CCACTA	TGTTGAAGTC ACAGGAGACA ACCT

Abbreviations: *Actb*, actin beta; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Mad211*, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; *Rbl2*, retinoblastoma-like 2; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; *Tp53*, tumor protein p53.

**Table 3. Antibodies for immunohistochemistry**

Antigen	Host species	Clonality (Clone)	Dilution	Antigen retrieval	Manufacture
GST-P	Rabbit	Polyclonal	1:1000	none	Medical & Biological Laboratories (Nagoya, Japan)
Ki-67	Mouse	Monoclonal (MIB-5)	1:50	Autoclaving at 121°C for 10 min in citrate buffer, pH6.0	Dako (Glostrup, Denmark)
p22phox	Rabbit	Polyclonal	1:200	Autoclaving at 121°C for 10 min in antigen retrieval solution (Dako), pH9.0	Bioss Inc. (Woburn, MA, USA)
p67phox	Rabbit	Polyclonal	1:200	Autoclaving at 121°C for 10 min in antigen retrieval solution (Dako), pH9.0	Merck KGaA.(darmstadt, Germany)
Histone H2A.X (phospho S139)	Rabbit	Monoclonal (EP854(2)Y)	1:3000	Autoclaving at 121°C for 10 min in citrate buffer, pH6.0	Abcam (Cambridge, UK)