

Table 4. Sequence of primers used for real-time RT-PCR

Accession no.	Gene	Forward primer (5' →3')	Reverse primer (5' →3')
NM 001100984	<i>P67phox</i>	GAAAGCATGAAGGATGCCTGG	ATAGCACCAAGATCACATCTCC
NM 024160	<i>P22phox</i>	TGTTGCAGGAGTGCTCATCTGTCT	AGGACAGCCCGGACGTAGTAATTT
NM 001105816	<i>Poldip2</i>	GCTGCTGGCTCTGCTAAGGT	AACTACTGCCCCCAGGAGATG
NM 013196	<i>Ppara</i>	CCCCACTTGAAGCAGATGACC	CCCTAAGTACTGGTAGTCCGC
NM 001145366	<i>Pparg</i>	GACCACTCCCATTCTTTGA	CATTGGGTCAGCTTGTGA
NM 017340	<i>Aox1</i>	GCGCAAGGAGCGGGCCTCC	CTCGACGGCGCCGGGTATTC
NM 001007144	<i>Plin2</i>	CCGAGCGTGGTGACGAGGG	GAGGTCACGGTCCTCACTCCC
NM 012589	<i>Il10</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATAC
NM 001108509	<i>Pnpla2</i>	CGGTGGATGAAGGAGCAGACA	TGGCACAGACGGCAGAGACT
NM 001183664	<i>Dgal</i>	CACGAATCATTGAGCGTCTCTTA	GCCAATAGAAGAAGATGAGCCATATC
NM 175837	<i>Cyp4a1</i>	CGGGCGATCAGATCCAAA	GAGCAAACCATATCCGATCCA
NM 017332	<i>Fasn</i>	GCGGGCGTGGTAATGCT	CTGTTTCGCAAATACGCTCCAT
NM 139192	<i>Scd1</i>	CACACGCCGACCCTCACAAC	TCCGCCCTTCTCTTTGACAGCC
NM 001134637	<i>Plin5</i>	GGATGTCCGGTGATCAGAC	GTGCACGTGGCCCTGACCAG
NM 012520	<i>Catalase</i>	ATTGCCGTCCGATTCTCC	CCAGTTACCATCTTCAGTGTAG
NM 017051	<i>Mn-SOD</i>	GACCTGCCTTACGACTATG	TACTTCTCCTCGGTGACG
NM 030826	<i>Gpx1</i>	GCTGCTCATTGAGAATGTCG	GAATCTCTTCATTCTTGCCATT
NM 012675	<i>Tnf-alpha</i>	ATACACTGGCCCGAGGCAAC	CCACATCTCGGATCATGCTTTC
NM 012541	<i>Cyp1a2</i>	AAGCGCCGGTTGCATTG	TGCAGGAGGATGGCTAAGAAG
NM 031543	<i>Cyp2e1</i>	TGACTTTGGCCGACCTGTTC	TGAGGATCAGGAGCCCATATCT
NM_012583	<i>Hprt</i>	GTCAAGCAGTACAGCCCCAAA	CAACACTTCGAGAGGTCCTTTTC

Abbreviations: Poldip2, Polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2; Ppara, Peroxisome proliferator activated receptor alpha; Pparg, peroxisome proliferator activated receptor alpha; Aox1, Alternative oxidase1; Plin2, Perilipin2; Il10, Interleukin-10; Pnpla2, Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 2; Dgal, diacylglycerol O-acyltransferase; Cyp4a1, Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 1; Fasn, Fatty acid synthase; Scd1, Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1; Plin5, Perilipin 5; Mn-SOD, Manganese superoxide dismutase; Gpx1, Glutathione peroxidase 1; Tnf-alpha, tumor necrosis factor alpha; Cyp1a2, Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2; Cyp2e1, Cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1; Hprt, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase.

Table 5. Relative transcript levels in the OSOM of rats treated with NFT, ADAQ, TCP or CBX at day 3, day 7 and day 28

Gene	Relative transcript level normalized to <i>Actb</i>				Relative transcript level normalized to <i>Gapdh</i>			
	NFT ^a	ADAQ ^a	TCP ^a	CBX ^a	NFT ^a	ADAQ ^a	TCP ^a	CBX ^a
Day 3								
<i>Cdkn1a</i>	4.11±1.69*	1.35±0.35	4.79±0.69**	2.38±0.42*	2.60±0.95**	3.85±0.48**	4.25±0.54**	2.17±0.47**
<i>Chek1</i>	1.46±0.18**	0.71±0.12*	1.55±0.21**	1.42±0.19**	0.94±0.16	0.67±0.07**	1.25±0.19*	1.30±0.26*
<i>Mad2l1</i>	1.23±0.19*	0.77±0.17*	1.45±0.15**	1.27±0.11*	0.80±0.19	0.73±0.13	1.17±0.16	1.14±0.01
<i>Mdm2</i>	1.20±0.19	1.41±0.22**	2.13±0.21**	1.79±0.17**	0.78±0.18*	1.33±0.09*	1.71±0.12**	1.63±0.21**
<i>Rbl2</i>	1.27±0.21*	1.20±0.15	1.45±0.18**	1.20±0.07	0.85±0.31	1.13±0.03	1.17±0.14	1.09±0.13
<i>Tp53</i>	1.20±0.23	1.30±0.18	1.42±0.13*	1.79±0.35**	0.77±0.11*	1.24±0.20	1.15±0.16	1.64±0.43**
Day 7								
<i>Cdkn1a</i>	1.99±0.46*	0.45±0.16**	2.32±0.62*	0.89±0.10	1.49±0.34	0.38±0.13**	1.85±0.51*	0.83±0.12
<i>Chek1</i>	2.08±0.47**	0.89±0.13	2.22±0.28**	1.25±0.18	1.56±0.35**	0.76±0.13	1.78±0.30**	1.17±0.17
<i>Mad2l1</i>	1.37±0.18**	0.98±0.05	1.35±0.13**	1.13±0.14	1.03±0.14	0.83±0.05*	1.08±0.16	1.05±0.14
<i>Mdm2</i>	1.18±0.15	1.52±0.10**	1.98±0.23**	1.47±0.07**	0.89±0.10	1.29±0.11**	1.58±0.21**	1.37±0.11**
<i>Rbl2</i>	1.03±0.21	1.30±0.05**	1.45±0.10**	1.23±0.09*	0.77±0.12**	1.11±0.09	1.16±0.18	1.15±0.14
<i>Tp53</i>	1.50±0.26**	1.53±0.11**	1.68±0.18**	1.58±0.18**	1.13±0.21	1.30±0.08*	1.35±0.19**	1.47±0.18**
Day 28								
<i>Cdkn1a</i>	1.28±0.61	0.51±0.08**	4.30±1.16**	1.36±0.33	0.93±0.41	0.49±0.06**	4.27±1.31**	1.41±0.58
<i>Chek1</i>	1.44±0.48*	1.23±0.19	2.02±0.30**	1.84±0.25**	1.02±0.24	1.18±0.16	2.00±0.39**	1.89±0.57*
<i>Mad2l1</i>	1.17±0.32	1.25±0.11**	1.20±0.13*	1.38±0.09**	0.84±0.15	1.20±0.08	1.19±0.16	1.40±0.27**
<i>Mdm2</i>	0.96±0.16	1.40±0.11**	1.68±0.16**	1.38±0.09**	0.70±0.10*	1.36±0.14**	1.67±0.26**	1.40±0.27*
<i>Rbl2</i>	0.97±0.28	1.10±0.06	1.14±0.03*	0.99±0.12	0.70±0.17**	1.06±0.09	1.13±0.13	1.00±0.19
<i>Tp53</i>	1.10±0.13	1.24±0.12*	1.27±0.13**	1.50±0.09**	0.80±0.11	1.20±0.14	1.25±0.07*	1.52±0.27**

Abbreviations: *Actb*, actin beta; ADAQ, 1-amino-2,4-dibromoantraquinone; CBX, carboxin; *Cdkn1a*, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; *Chek1*, checkpoint kinase 1; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *Mad2l1*, MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast); *Mdm2*, MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase; NFT, nitrofurantoin; *Rbl2*, retinoblastoma-like 2; OSOM, outer stripe of the outer medulla; TCP, 1,2,3-trichloropropane; *Tp53*, tumor protein p53.

^an = 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).

Table 6. Final body weight and liver weight of rats after treatment with hepatocarcinogens, hepatocarcinogenic promoters or non-carcinogenic hepatotoxicants at the post-initiation phase

Group	Number of animals	Final body weight (g)	Liver weight	
			Absolute (g)	Relative (g/100g BW)
Week 2				
DEN-alone	12	207.7±10.7	6.59±0.36	3.18±0.11
DEN+BNF	11	172.1±16.6**	8.89±1.50**	5.13±0.42**
DEN+CRB	11	182.8±13.5**	6.79±0.67	3.71±0.19**
DEN+LMG	12	171.2±8.2**	6.77±0.39	3.96±0.12**
DEN+APAP	9	183.0±11.7**	6.63±0.67	3.62±0.19**
Week 4				
DEN-alone	11	246.9±9.9	9.03±1.13	3.67±0.52
DEN+BNF	12	218.0±15.4**	13.87±1.69**	6.35±0.40**
DEN+CRB	11	219.3±12.5**	8.72±0.46	3.98±0.11**
DEN+LMG	11	218.2±7.5**	10.17±0.54**	4.66±0.15**
DEN+APAP	11	228.6±12.8**	8.71±0.50	3.96±0.52**
Week 6				
DEN-alone	14	279.9±7.5	8.94±0.45	3.19±0.15
DEN+BNF	15	258.0±10.5**	13.94±1.09**	5.40±0.34**
DEN+CRB	16	240.6±15.2**	9.29±0.69	3.77±0.16**
DEN+LMG	16	240.6±7.9**	10.79±0.43**	4.49±0.10**
DEN+APAP	15	257.7±11.9**	9.68±0.54**	3.76±0.12**

Abbreviations: APAP, acetaminophen; BNF, β -naphthoflavone; CRB, carbadox; DEN, *N*-diethylnitrosamine; LMG, leucomalachite green.

Values are expressed as mean \pm SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. DEN-alone group (Dunnett's or Steel's test).

Table 7. Final body weight, organ weight, food intake, water intake, and histopathological findings in rats fed with basal diet and high fat diet after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD
No. of animals	14	13
Final body weight (g)	282.0±13.9	300.3±8.1 ^a
Absolute intraabdominal adipose tissue weight (g)	1.96±0.21	2.91±0.23 ^a
Relative intraabdominal adipose tissue weight (%BW)	0.70±0.06	0.97±0.07 ^a
Absolute liver weight (g)	8.29±0.50	8.44±0.37
Relative liver weight (%BW)	2.95±0.09	2.83±0.08 ^a
Food intake (g/rat/day)	13.7±2.3	11.4±0.7
Water intake (g/rat/day)	20.3±2.8	16.5±1.5
Steatosis, hepatocellular (Score)	1.3±0.5	2.2±0.7 ^a
Neutrophil, sinusoidal, liver (No./field)	1.3±0.6	0.7±0.2
p67phox ⁺ cell, sinusoidal, liver (No./field)	3.5±1.4	3.4±1.8

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; BW, body weight; DEN, N-diethylnitrosamine.

§: All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 3 after DEN initiation.

Data are shown as the mean ± standard deviation.

^a: p<0.05 vs CTL (Student's t test or Aspin-Welch test).

Table 8. Blood biochemistry in rats fed with control basal diet and high fat diet after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD
No. of animals	14	13
AST (U/L)	90 ± 12	78 ± 4 ^a
ALT (U/L)	55 ± 12	50 ± 5
ALP (U/L)	1305 ± 187	1461 ± 103 ^a
GGTP (U/L)	0.89 ± 0.28	0.77 ± 0.21
GLU (mg/dL)	127 ± 17	135 ± 7
TP (g/dL)	7.4 ± 0.3	7.2 ± 0.2
ALUB (g/dL)	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1
GLOB (g/dL)	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.1
A/G (ratio)	2.4 ± 0.3	2.5 ± 0.2
T.CHOL (mg/dL)	75 ± 6	80 ± 8
TG (mg/dL)	116 ± 26	226 ± 61 ^a
T.BIL (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02 ^a

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DEN, N-diethylnitrosamine; AST, aspartate aminotransaminase; ALT, alanine aminotransaminase; ALP, alkaline phosphatase; GGTP, γ -glutamyl transpeptidase; GLU, glucose; TP, total protein; ALUB, albumin; GLOB, globulin; A/G, albumin/globulin; T.CHOL, total cholesterol; TG, triglyceride; T.BIL, total bilirubin.

§: All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 3 after DEN initiation.

Data are shown as the mean ± standard deviation.

a: $p < 0.05$ versus CTL (Student's t test or Aspin-Welch test).

Table 9. Final body weight, liver weight, food intake, and water intake in rats treated with or without DRZ or APO after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD	HFD+DRZ	HFD+DRZ+APO
No. of animals	11	13	12	12
Final body weight (g)	278.0±7.3	285.7±24.3	267.4±14.7	259.6±17.2 ^b
Absolute adipose tissue weight (g)	2.25±0.39	2.82±0.47 ^a	2.44±0.49	2.44±0.50
Relative adipose tissue weight (%BW)	0.81±0.14	0.99±0.14 ^a	0.91±0.16	0.93±0.16
Absolute liver weight (g)	9.48±0.64	9.00±0.63	8.59±0.62 ^a	8.74±0.79
Relative liver weight (%BW)	3.41±0.20	3.16±0.15 ^a	3.21±0.13	3.37±0.27 ^b
Absolute testis weight (g)	2.99±0.11	3.00±0.28	1.33±0.13 ^{a,b}	1.29±0.17 ^{a,b}
Relative testis weight (%BW)	1.08±0.03	1.05±0.04	0.50±0.04 ^{a,b}	0.50±0.07 ^{a,b}
Absolute epididymis weight (g)	0.81±0.07	0.80±0.08	0.45±0.05 ^{a,b}	0.46±0.03 ^{a,b}
Relative epididymis weight (%BW)	0.29±0.03	0.28±0.02	0.17±0.01 ^{a,b}	0.18±0.01 ^{a,b}
Colon length (cm)	18.1±1.7	16.4±1.2 ^a	16.3±1.1 ^a	15.7±2.0 ^a
Food intake (g/rat/day)	12.9±0.5	10.5±0.4 ^a	10.4±0.5 ^a	10.7±1.3 ^a
Water intake (g/rat/day)	23.2±2.6	20.5±1.2	17.8±1.3 ^a	17.1±1.6 ^a
Steatosis, hepatocellular (Score)	1.3±0.5	2.8±0.7 ^a	1.9±0.9 ^b	2.1±0.8 ^b
Neutrophil, sinusoidal, liver (No./field)	1.8±0.5	1.6±0.4	1.8±0.7	1.9±0.6
p67phox+ cell, sinusoidal, liver (No./field)	15.4±3.0	17.5±4.2	16.9±3.3	17.8±5.3
Colitis, large intestine (Score)	2.6±0.9	2.4±0.6	2.3±0.3	2.7±0.8
Degeneration/atrophy, tubular, testis (Score)	0.0±0.0	0.0±0.0	2.5±0.7 ^{a,b}	2.6±0.5 ^{a,b}
Reduced sperm, luminal, epididymis (Score)	0.0±0.0	0.0±0.0	2.0±0.0 ^{a,b}	2.0±0.0 ^{a,b}

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin; BW, body weight; DEN, N-diethylnitrosamine.

§ : All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 1 after starting DRZ promotion.

Data are shown as the mean ± standard deviation.

a: p<0.05 vs CTL (Tukey's or the Steel-Dwass test).

b: p<0.05 vs HFD (Tukey's or the Steel-Dwass test).

Table 10. Blood biochemistry in rats treated with or without DRZ or APO after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD	HFD+DRZ	HFD+DRZ+APO
No. of animals	10	13	12	11
AST (U/L)	84±5	92±9 ^a	71±4 ^{ab}	72±5 ^{ab}
ALT (U/L)	48±6	57±9 ^a	48±4 ^b	49±5 ^b
ALP (U/L)	1230±151	1379±428	1213±136	1232±116
GGTP (U/L)	1.3±0.2	1.2±0.8	1.2±0.3	1.2±0.4
GLU (mg/dL)	139±20	142±29	146±22	174±34 ^{ab}
TP (g/dL)	7.24±0.20	7.28±0.28 ^a	7.24±0.27 ^b	7.14±0.32 ^b
ALUB (g/dL)	5.01±0.08	5.04±0.25	5.08±0.17	4.98±0.25
GLOB (g/dL)	2.24±0.14	2.24±0.19	2.16±0.14	2.16±0.18
A/G (ratio)	2.25±0.12	2.26±0.24	2.36±0.14	2.31±0.22
T.CHOL (mg/dL)	70.6±4	78.4±10	84.3±9 ^a	83.1±12
TG (mg/dL)	154±30	261±56 ^a	218±72	299±92 ^a
T.BIL (mg/dL)	0.043±0.01	0.102±0.03 ^a	0.058±0.02 ^b	0.068±0.01 ^a

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DEN, N-diethylnitrosamine; AST, aspartate aminotransaminase; ALT, alanine aminotransaminase; ALP, alkaline phosphatase; GGTP, γ -glutamyl transpeptidase; GLU, glucose; TP, total protein; ALUB, albumin; GLOB, globulin; A/G, albumin/globulin; T.CHOL, total cholesterol; TG, triglyceride; T.BIL, total bilirubin.

§ : All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 1 after starting DRZ promotion.

Data are shown as the mean \pm standard deviation.

a: $p < 0.05$ vs CTL (Tukey's or the Steel-Dwass test).

b: $p < 0.05$ vs HFD (Tukey's or the Steel-Dwass test).

c: $p < 0.05$ vs HFD+DRZ (Tukey's or the Steel-Dwass test).

Table 11. Hepatic gene expression in rats treated with or without DRZ or APO after DEN initiation[§]

Group	CTL	HFD	HFD+DRZ	HFD+DRZ+APO
No. of animals	6	6	6	6
<i>P67phox</i>	1.04±0.30	1.34±0.15	0.91±0.29	1.28±0.44
<i>P22phox</i>	1.04±0.33	1.17±0.24	0.72±0.27	1.13±0.32
<i>Poldip2</i>	1.06±0.45	1.61±0.23 ^a	1.04±0.13 ^b	1.06±0.19 ^b
<i>Ppara</i>	1.02±0.21	1.16±0.25	1.25±0.30	1.32±0.33
<i>Pparg</i>	1.05±0.35	2.04±0.25 ^a	2.15±0.52 ^a	2.15±0.52 ^a
<i>Aox</i>	1.01±0.17	1.39±0.21 ^a	1.16±0.26	1.40±0.21 ^a
<i>Plin2</i>	1.01±0.12	2.11±0.38 ^a	1.41±0.40 ^b	2.57±0.47 ^{ac}
<i>Il10</i>	1.32±1.23	1.26±0.95	0.80±0.61	0.65±0.22
<i>Pnpla2</i>	1.02±0.21	1.03±0.21	0.97±0.16	0.96±0.11
<i>Dgal</i>	1.04±0.32	1.24±0.19	1.03±0.08	1.15±0.12
<i>Cyp4a1</i>	1.01±0.15	1.20±0.32	0.92±0.24	1.32±0.32
<i>Fasn</i>	1.03±0.29	0.32±0.19 ^a	0.17±0.12 ^a	0.35±0.12 ^a
<i>Scd1</i>	1.05±0.34	0.28±0.18 ^a	0.22±0.13 ^a	0.45±0.40 ^a
<i>Plin5</i>	1.01±0.17	2.05±0.17 ^a	1.37±0.38 ^b	1.70±0.29 ^a
<i>Catalase</i>	1.01±0.15	1.14±0.28	1.10±0.29	1.21±0.22
<i>Mn-SOD</i>	1.01±0.12	1.15±0.23	0.95±0.16	1.03±0.19
<i>Gpx1</i>	1.01±0.14	1.52±0.34 ^a	1.32±0.33	1.32±0.15 [*]
<i>Tnf-alpha</i>	1.04±0.33	1.20±0.49	0.94±0.41	1.30±0.31 [*]
<i>Cyp1a2</i>	1.04±0.33	1.17±0.31	1.23±0.28	1.26±0.45
<i>Cyp2e1</i>	1.02±0.23	1.49±0.30	1.29±0.28	1.35±0.40

Abbreviations: CTL, control; HFD, high fat diet; DRZ, dimetridazole; APO, apocynin; BW, body weight; DEN, N-diethylnitrosamine.

§: All animals were subjected to two-thirds partial hepatectomy at week 1 after starting DRZ promotion.

Data are shown as the mean ± standard deviation.

^a: p<0.05 vs CTL (Tukey's or the Steel-Dwass test).

^b: p<0.05 vs HFD (Tukey's or the Steel-Dwass test).

^c: p<0.05 vs HFD+DRZ (Tukey's or the Steel-Dwass test).

*: The number of samples is 5

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

分担研究報告書（平成 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

分担研究課題：発がん初期過程の細胞周期解析

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学大学院 農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究要旨 昨年度までの研究の結果、肝発がん物質ないし腎発がん物質は、投与開始後 28 日目以降ないし 90 日目で発がん物質特異的に、ubiquitin D (UBD) の M 期における割合の減少に起因する 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。肝発がん物質はまた、G₁/S、G₂/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リン酸化 MDM2 (p-MDM2) の発がん物質特異的な発現変動を誘発した。27 年度はまず、26 年度に用いた、腎発がん物質 (nitrofurantoin、1-amino-2,4-dibromoantraquinone、1,2,3-trichloropropane) ないし非発がん性腎毒性物質 (1-chloro-2-propanol、triamterene、carboxin) の 3、7 ないし 28 日間反復投与例の腎臓サンプルを用い、G₁/S、G₂/M およびスピンドルチェックポイント遺伝子および p-MDM 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、昨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における反応性を検討した。ラットを用いて、肝発がんプロモーター物質の β -naphthoflavone (BNF)、遺伝毒性肝発がん物質の carbadox (CRB)、弱い肝発がん性が指摘されている leucomalachite green (LMG) ないし非発がん性肝毒性物質の acetaminophen をポストイニシエーション期に 2、4 ないし 6 週間混餌投与した。その結果、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反応は認められなかった。一方 4 週目で、BNF および LMG は肝障害を伴いながら増殖活性を亢進させ、また、BNF および CRB は UBD 陽性細胞および Ki-67 陽性増殖細胞の M 期における割合を減少させた。BNF、CRB および LMG は、6 週目において明らかな発がん促進作用を示した。これらの結果から、肝発がん物質/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。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。

A. 研究目的

動物用医薬品等の化学物質の発がん性評価手法であるげっ歯類を用いた発がん性試験は、長期間に及ぶ投与のため、コスト、評価の効率性や動物愛護の面で課題がある。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 G₂ 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、G₁/S、G₂/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、G₂/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、G₁/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 G₁/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、G₂ 期および M 期における細胞周期の停止と、G₁/S チェックポイント機能の破綻による G₁→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、G₁/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、G₂/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腎毒性物質の 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、G₂/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 G₁/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。

B. 研究方法

動物実験

5 週齢の雄性 F344 ラットを日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、粉末基礎飼料 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) と自由飲水にて 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、残りの腎臓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は腎臓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臓がん物質/肝臓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β-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は肝臓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臓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は遺伝毒性肝臓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、弱い肝臓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3μm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) (Malmlof *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、G₁ 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)、G₂/M 期に DNA デカタネーションに関わる topoisomerase II α (TOP2A) (Mattila *et al.*, 2007)、G₂/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[®] 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/H₂O₂ 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[®] Elite ABC Kit (Vector Laboratories) のプロトコールに従い、免疫反応は 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ 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[®] 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 μ 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 μ g の total RNA から SuperScript[®] 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。

(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

<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。

尿管上皮細胞において、p-MDM2は核に局在しており、遠位尿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群で無処置対照群と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と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群で無処置対照群と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 3)。

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*Mad21l*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*Mad21l*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*Mad21l*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。*Chek1* 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。*Rb12* 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、*Rb12* 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 4)。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 2)。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 2)。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、主に変異肝細胞巣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)。

D. 考察

<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 *Mad2l1* (Weaver and Cleveland, 2005)、G₂/M チェックポイント遺伝子の *Chek1* (Patil et al., 2013)、p21^{Cip1} 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 G₁/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 G₂ 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 G₁/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、*Mad2l1*、*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、*Mad2l1*、*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、G₁/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 G₁/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 G₁/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関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での投与開始後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。

E. 結論

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 G₁/S、G₂/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、G₂/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 G₁/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。

F. 健康危機情報

特になし

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.

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.

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

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

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 158 回日本獣医学会学術集会、十和田、2015.9.7-9

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

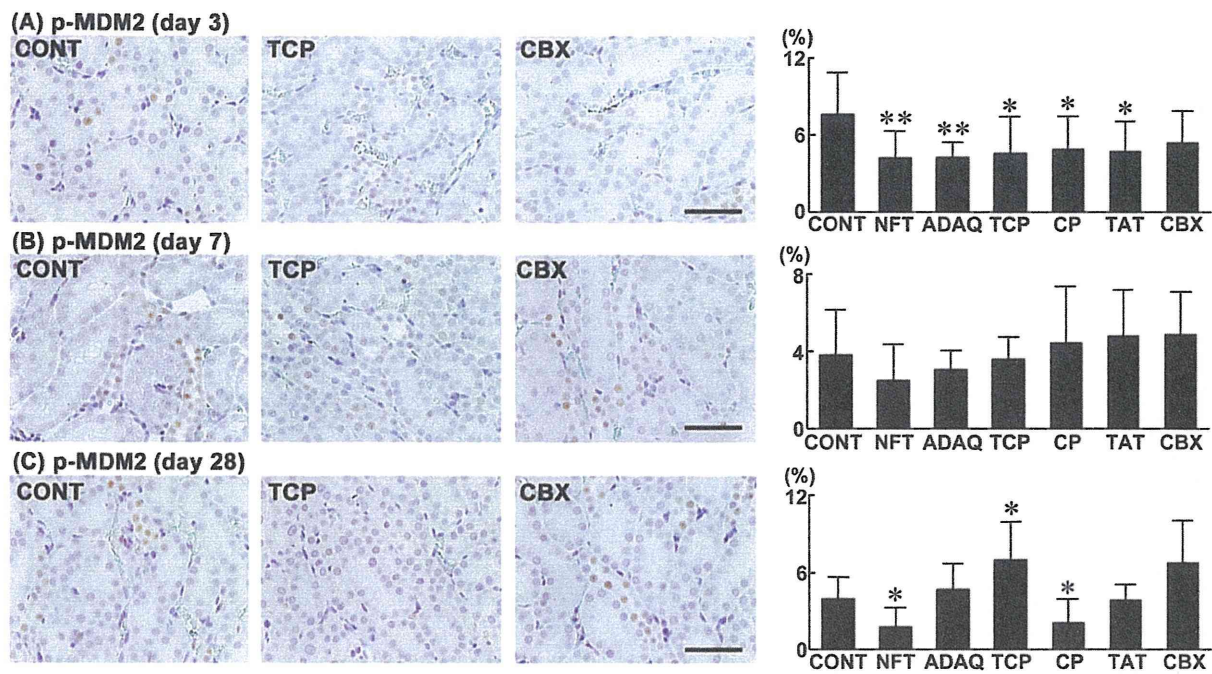


Fig. 1

Fig. 1. Distribution of p-MDM2⁺ 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⁺ 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 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated controls (Steel's test).