

Fig. 2

Fig. 2. Distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TOP2A⁺, UBD⁺ and cleaved caspase 3⁺ 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 μ m (A–D) or 200 μ m (E). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the DEN-alone group (Steel's test).

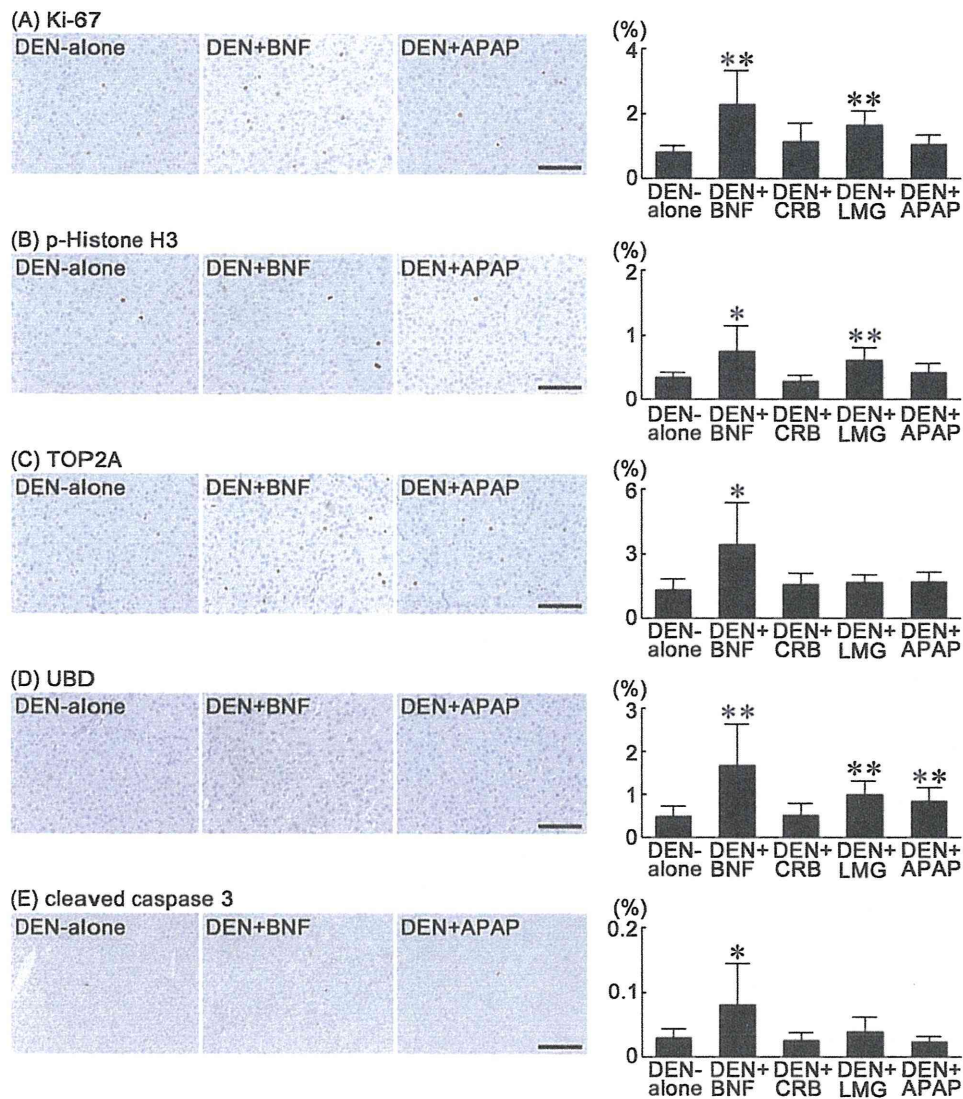


Fig. 3

Fig. 3. Distribution of Ki-67⁺, p-Histone H3⁺, TOP2A⁺, UBD⁺ and cleaved caspase 3⁺ 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 μ m (A–D) or 200 μ m (E). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the DEN-alone group (Steel's test).

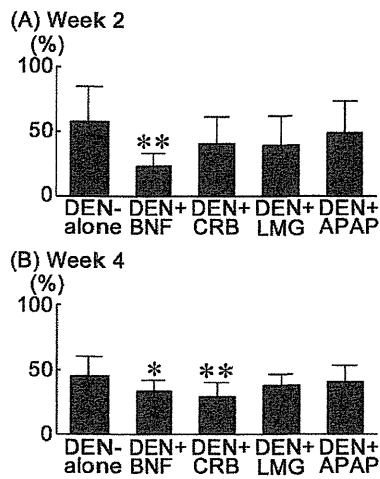


Fig. 4

Fig. 4. Ratio of p-Histone H3⁺ cell per total Ki-67⁺ 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⁺/Ki-67⁺ cell ratio at week 2, (B) p-Histone H3⁺/Ki-67⁺ cell ratio at week 4. ** $P < 0.01$ vs. the DEN-alone group (Dunnett's test).

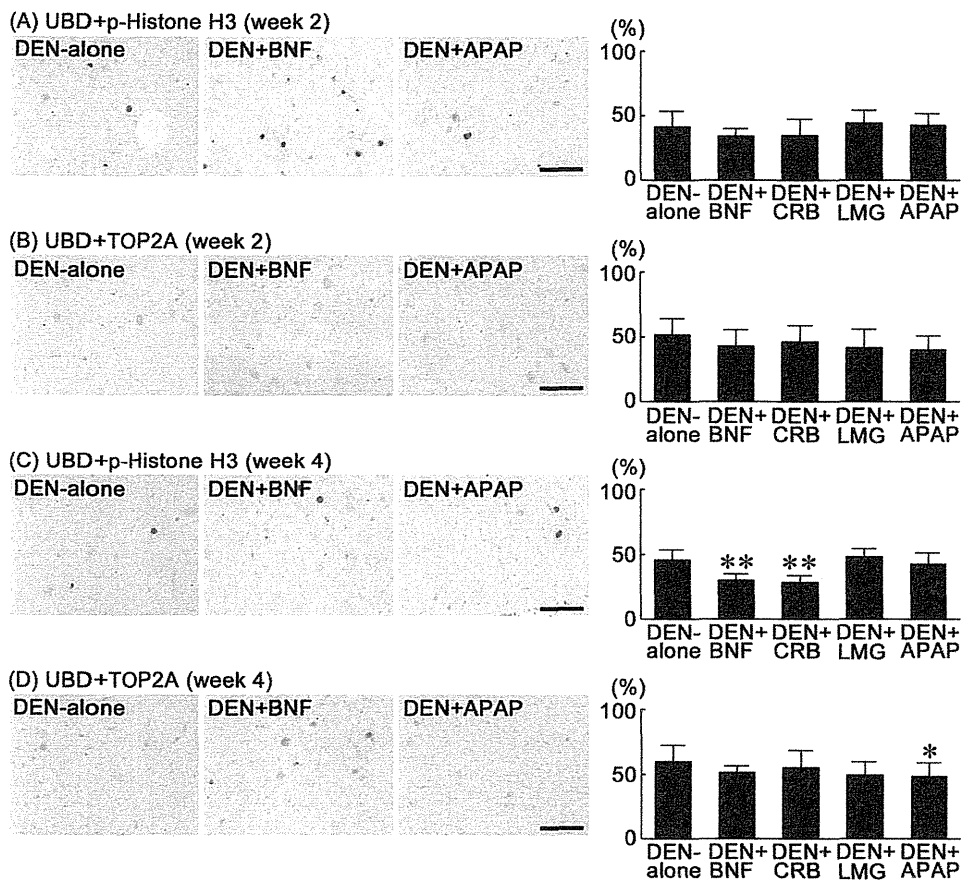


Fig. 5

Fig. 5. Incidence of hepatocytes expressing p-Histone H3 or TOP2A in UBD⁺ 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⁺/UBD⁺ cell ratio at week 2, (B) TOP2A⁺/UBD⁺ cell ratio at week 2, (C) p-Histone H3⁺/UBD⁺ cell ratio at week 4, (D) TOP2A⁺/UBD⁺ cell ratio at week 4. Bar = 100 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the DEN-alone group (Dunnett's test).

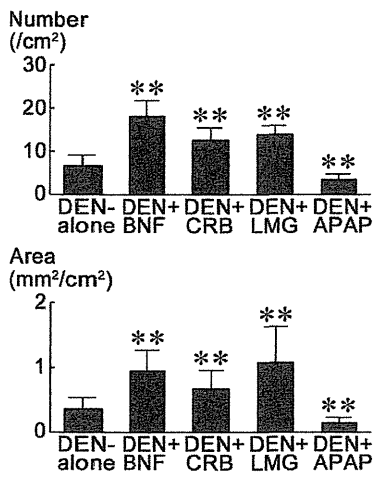


Fig. 6

Fig. 6. Number and area of GST-P⁺ 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).

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>Mad2l1</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 CCTTTTTTTA 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; *Mad2l1*, 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. 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.

^a n = 6.

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

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

Table 4. 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).

畜水産食品中に含まれる動物用医薬品等の安全性確保に関する研究

分担課題: ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価

分担研究者 梅村隆志 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 第一室長

研究要旨

ニトロフラン (NF) 類を構成するニトロフルフラール (NFA) とヒドラジド誘導体は、それぞれその化学構造から酸化的 DNA 損傷と特異的 DNA 付加体生成の可能性が考えられている。本研究では *gpt delta* 動物を用いて NF 類とその構成物質についてレポーター遺伝子変異原性解析と酸化的 DNA 損傷の定量解析を組み合わせ、NF 類の化学構造に依存した *in vivo* 変異原性ならびにその発現機序の解明を目指す。ラット腎臓に発がん性を有するニトロフラントイン (NFT) の遺伝毒性発現機序には酸化的 DNA 損傷の関与が示唆されているが、その化学構造中の酸化ストレス産生を担うと考えられるニトロ基を有するニトロフルフラール (NFA) は遺伝毒性を有するが酸化的 DNA 損傷は誘発しない。そこで、本研究では NFT の遺伝毒性機序と酸化的 DNA 損傷の関連性をより詳細に検討する目的で、*Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスとその野生型に、NFT 並びに 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。本年度は、さらにその実験で得られた腎臓を用いて 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酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxyguanosine (8-OHdG) レベルを検討した。その結果、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、両遺伝子型の対照群間を比較すると *Nrf2* ホモ欠損マウスが野生型に比較して有意に低かった。8-OHdG レベルは、*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や、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ており、本結果から 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 は *Nrf2* ホモ欠損マウスにおいても *in vivo* 変異原性は示さず、NFA がラット腎臓において示した *in vivo* 変異原性に酸化的 DNA 損傷が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。

A. 研究目的

動物用医薬品として使用される合成抗菌剤であるニトロフラン類 (NF 類) は、ニトロフランを基本骨格に隣接するヒドラジド誘導体の違いにより多くの種類が知られている。その中には遺伝毒性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的 DNA 損傷と特異的 DNA 付加体生成の可能性が考えられている。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 (NFA) 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 mkg 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。

A. 研究方法

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 Gene Expression Assays、TaqMan 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 (Cytoskelton 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 µg 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) 膜にセミドライ式ブロッティ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、ヌクレアーゼ 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/10⁵ dG) 量を高速液体クロマトグラフィー/電気化学的検出器 (Coulchem II; ESA, Bedford, MA, USA) により定量した。

(倫理面への配慮)

投与実験は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、国立医薬品食品衛生研究所実験動物取り扱い倫理規定、及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。

B. 研究結果

Nqo1 の mRNA 発現および蛋白発現レベルを測定した結果を Fig. 1 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. 2 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。

C. 考察

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 損傷が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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

G-1. 学会発表

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トインの遺伝毒性発現機序における酸化ストレスの関与、日本毒性学会学術年会、第 42 回大会、石川、2015.6.29-7.1

G-2. 発表論文

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Nqo1

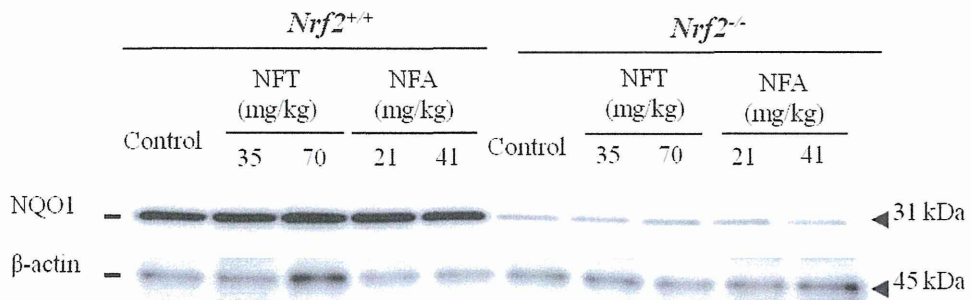
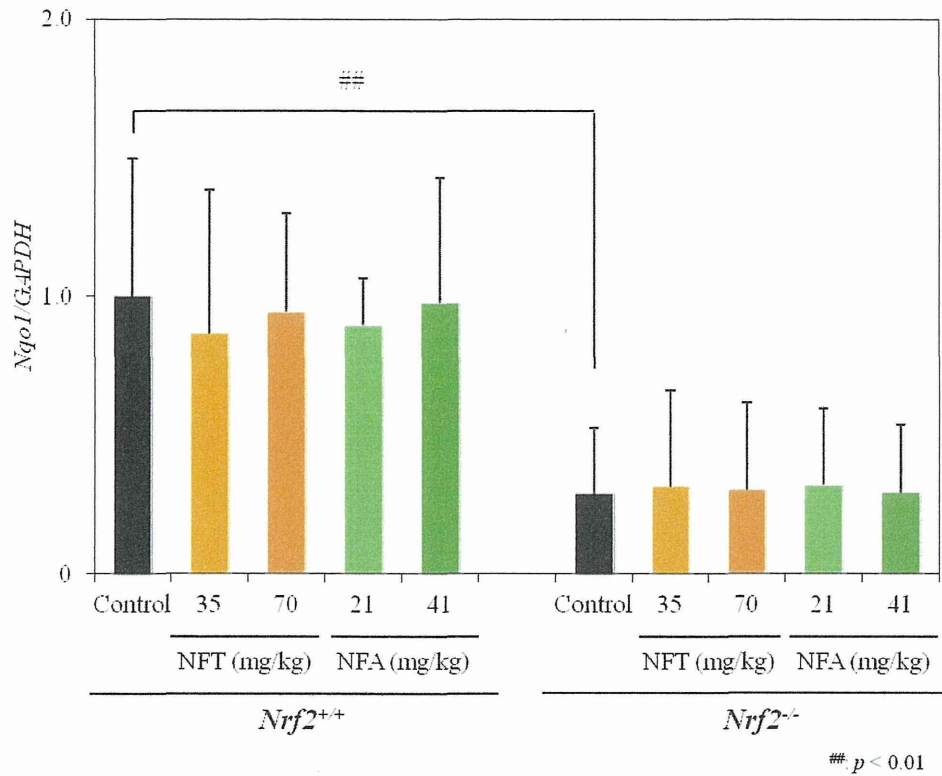
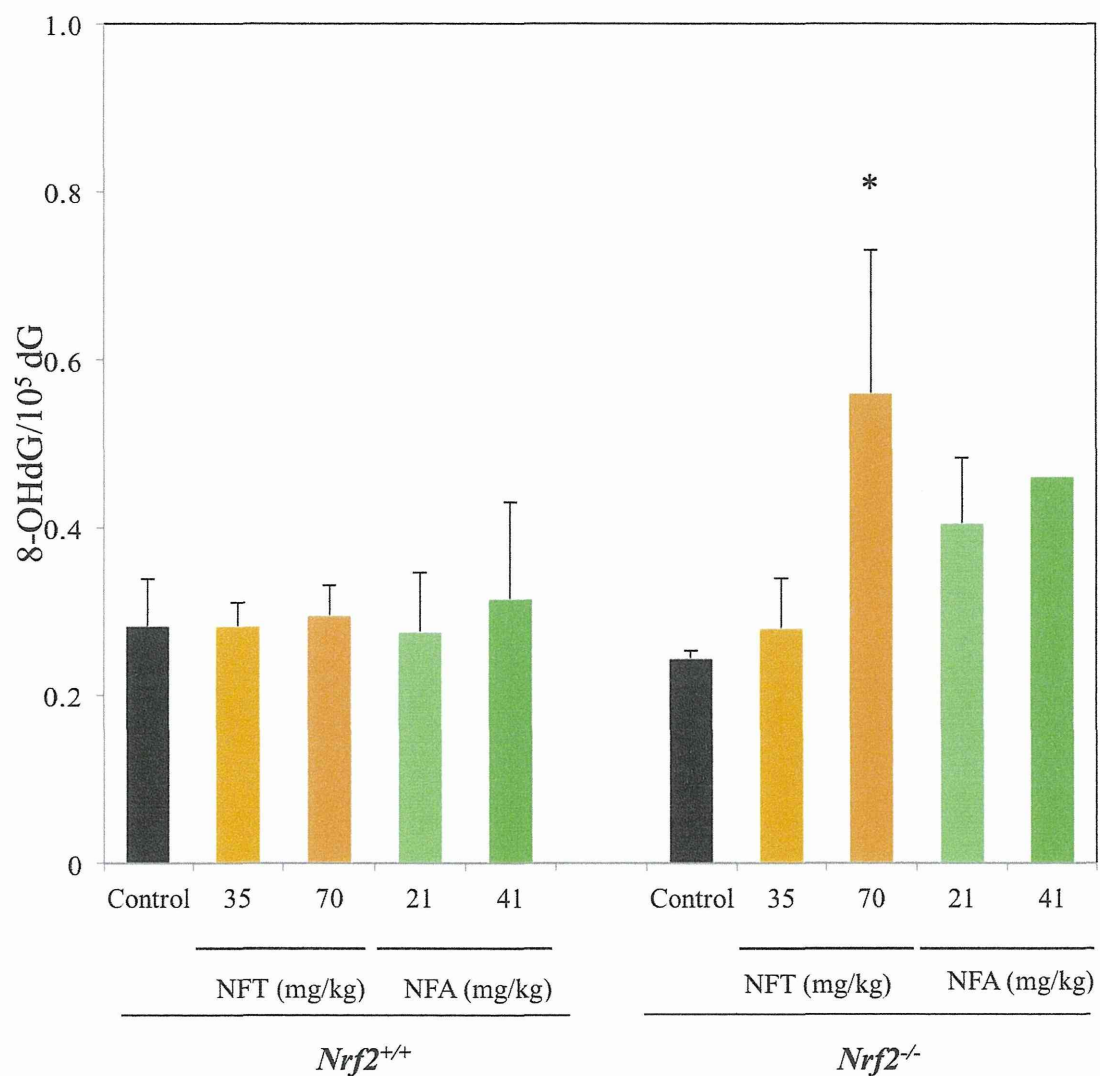


Fig. 1. (A) Change in the mRNA levels of *Nqo1* gene in the kidneys of *Nrf2*^{+/+} or *Nrf2*^{-/-} *gpt* delta mice treated with NFT or NFA for 13 weeks. Data were normalized to GAPDH mRNA levels. (B) Western blotting analysis of NQO1 in the kidneys of *Nrf2*^{+/+} or *Nrf2*^{-/-} *gpt* delta mice treated with NFT or NFA for 13 weeks.



*: $p < 0.05$ vs. relevant control

Fig. 2. 8-OHdG levels in the kidneys of *Nrf2*^{+/+} or *Nrf2*^{-/-} *gpt* delta mice treated with NFT or NFA for 13 weeks.

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：肝発がん促進シグナルの解析

分担研究者 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

研究要旨

我々はこれまでに薬物代謝酵素誘導剤（CYP inducer）により産生される活性酸素種(ROS)が肝発がん促進過程に関与する可能性を示してきた。しかし、CYP inducer であってもミクロソームで ROS を産生しない場合や ROS 産生が酸化ストレスの増強に繋がらない場合でも肝発がん促進作用が見られることがあり、その機序は明確になっていない。そこで今回、非ミクロソーム ROS 産生源である NADPH oxidase (NOX)に着目して、ラット肝発がん促進過程において細胞増殖亢進を来たす非遺伝毒性発がん機序への NOX の関与を検討した。ラット二段階発がんモデルを用い、*N*-diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、2 週間から肝傷害物質として dimetridazole (DRZ) を単独あるいは NOX 阻害剤(Apocynin; APO ; 飲水投与)と併用して混餌投与を 7 週間行った。試験期間中、高 NOX 環境を構築するため高脂肪飼料を給餌し、大腸炎からの肝臓への炎症波及効果を目的として dextran sulfate sodium (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。肝傷害物質投与 1 週間後に定法に従い部分肝切除を行った。投与期間終了時に血液を採取し、血液生化学的検査を実施すると共に、肝臓を採取し、病理組織学的検索並びに免疫組織化学的解析を行った。高脂肪飼料により血漿中性脂肪、脂肪肝、肝脂質代謝関連遺伝子の変動に加え、前がん病変指標の glutathione *S*-transferase placental form(GST-P)陽性細胞巢が増加し、大型の GST-P 陽性細胞巢内の Ki-67 並びに NOX 関連分子 p22phox 陽性細胞率が増加した。また、NOX 関連因子 Poldip2 mRNA の高発現がみられた。DRZ 投与により血漿総コレステロールの増加と共に大型の GST-P 陽性細胞巢が減少したが、中型以下の大きさの GST-P 陽性細胞巢が増加し、APO の併用によりそれらの増加は抑制された。HFD 給餌及び DSS 処置条件下において、DRZ は NOX 関連性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示唆された。

A. 研究目的

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（NASH）やウイルス性肝炎における肝線維症の発生に NOX が関与することが明らかとなりつつあるが（Paik et a., 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 NOX 1～4 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) 投与により脂肪肝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 α (PPAR α) の agonist である Wy-14643 が、クッパー細胞における NOX 介在性の ROS 産生により肝細胞の細胞増殖を誘導することが示されているが (Rusyn et al., 2000)、PPAR α agonist 以外の化学物質誘発性の肝発がん過程における NOX の関与は不明である。

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

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)。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（精索周囲）、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）、 γ 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・免疫組織化学的の検索用に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 cytosome 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; γ -H2A.X）の免疫組織化学染色による観察を実施した（表1）。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 で一晩反応させた。次いで、二次抗体以降の反応は Vectastain Elite ABC kit（Vector Laboratories, USA）を用い、3,3'-ジアミノベンジジンにより発色させた後、ヘマトキシリンで対比染色を施した。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 γ -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 2)。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

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 3)。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 4)。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 3)。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 1)。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 2)。

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 5)。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 5)。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（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HFD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 6）。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 5）。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 3）。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 4）。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 5）。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 γ -H2A.X 陽性細胞数に各群間に有意な変化はなかった (Fig 6)。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 7)。*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

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。HFD 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、脂肪肝が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思われる。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