

201522005B

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 25-27 年度 総合研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成 28(2016)年 5月

目 次

|      |                                |          |
|------|--------------------------------|----------|
| I.   | 総合研究報告書                        |          |
|      | 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- 3 6                  |          |
|      | 表 1- 2 6                       |          |
| II.  | 研究成果の刊行に関する一覧表                 | _____ 35 |
| III. | 研究成果の刊行物・別刷                    | _____ 36 |

## 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）

## 総合研究報告書（平成25-27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（NF）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、投与開始後 28 日目において発がん物質特異的な M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を示した肝発がん物質は、特異的に G<sub>1</sub>/S ポイント機能を破綻させることも見出した。また、反復投与による細胞増殖誘導性に乏しい動物薬などの肝発がん物質・肝発がんプロモーターは、90 日間の反復投与によっても反応性を見出せなかった。更に、腎発がん物質では、28 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すものの他に、細胞周期障害性を示さないものもあった。反復投与での反応性に乏しい肝発がん物質/プロモーターは、ポストイニシエーション期投与で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を破綻することが推察された。以上より、28 日間反復投与とポストイニシエーション期投与の組み合わせにより、発がん性の予測が可能であることが示唆された。

NF 類の *in vivo* 遺伝毒性評価に関する研究では、まず C57BL/6J 系統の *Nrf2* 欠損 *gpt delta* マウスを作製し、ニトロフラントイン（NFT）による遺伝毒性発現機序に対する酸化ストレスの関与を示唆する予備的結果が得られた。次いで、*Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスとその野生型に NFT 並びにニトロフルフラール（NAF）を 13 週間投与し、腎臓での *in vivo* 変異原性を検討した結果、ホモ欠損マウスの NFT 投与群のみで *gpt* 変異体頻度が上昇し、予備試験結果が再現できた。一方、NFA は何れの遺伝子型マウスにおいても遺伝毒性を示さなかった。また、*Nrf2* ホモ欠損マウスで NRF2 制御下の抗酸化酵素 *Nqo1* の mRNA 及び蛋白発現レベルが野生型に比べ低値を示し、8-OHdG レベルは *Nrf2* ホモ欠損マウスの NFT 投与で上昇したことから、NFT の *in vivo* 変異原性に対する酸化的 DNA 損傷の関与が示唆された。以上より、NF 類の酸化ストレス産生へのニトロフラン骨格の側鎖の化学構造の影響が明らかとなった。

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）依存性活性酸素種産生を解析した。ピペロニルブトキシサイドによる発がん促進作用に対しては、NOX 阻害剤アポニン（APO）の抑制作用は認められず、NOX の関与は低いと推察された。次いで、高 NOX 環境を構築するため高脂肪飼料を給餌して、動物薬のマラカイトグリーンを検討した結果、増加した肝前がん病変数と、前がん病変内の細胞増殖活性とアポトーシス率、及び NOX 複合体構成成分の p22phox 及び p47phox 陽性細胞率が、APO の併用により抑制ないし抑制傾向を示し、肝前がん病変形成への NOX の関与が示唆された。また、抗真菌剤ジメトリダゾールを検討し、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、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

鈴木 和彦 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 10 月 31 日）

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構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ている (Tanai *et al.*, 2012a, b; Yafune *et al.*, 2013a, b)。さらに、肝発がん物質と腎発がん物質の28日間投与例で、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 (Tanai *et al.*, 2012b)。以上の結果より、発がん物質はその標的臓器性を問わず、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能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、それが発がん過程早期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破綻の表現型の成立時期や、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

については検討の余地がある。

本研究では、化学物質による発がんの主要な標的臓器である肝臓と腎臓を対象として、ラットを用いた4つの反復投与試験を実施した。実験1では、肝発がん物質投与初期に誘発される肝細胞増殖時に生じる、発がん物質特異的な細胞周期制御破綻の表現型の成立時期とその主要メカニズムの解明を目的とし、発がん標的である肝細胞を対象として、細胞増殖活性、細胞周期関連分子発現およびアポトーシスの変動を経時的に解析した。すなわち、ラットを用いて、肝発がん物質ないし非発がん性肝毒性物質を3、7ないし28日間反復投与する群と、再生性肝細胞増殖を誘発する肝部分切除を行う群を設定し、実験終了後に、取り出した肝臓を用いて、免疫組織化学染色およびreal-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) による解析を行った。実験2では、実験1で見出された反応が、細胞増殖誘発性に乏しい肝発がん物質や肝発がんプロモーター物質によっても生じるか否かを検討するために、ラットに、肝発がん物質、弱い肝発がん性が示唆されており細胞増殖誘発性が乏しいことが予想される物質、肝発がんプロモーター物質ないし非発がん性肝毒性物質を7、28ないし90日間反復投与した。実験3では、肝発がん物質で見出された経時的な反応が腎発がん物質でも生じるか否かを検討するために、ラットに、腎発がん物質ないし非発がん性腎毒性物質を3、7ないし28日間反復投与した。実験4では、実験2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、細胞周期関連分子の発現解析のこれらの物質に対する発がん性検出性を検討した。すなわち、ラットの発がんイニシエーション・プロモーションモデルを用い、肝発がん物質、肝発がんプロモーター物質ないし非発がん性肝毒性物質を2、4ないし6週間反復投与した。

#### 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 (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 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、腎臓において NFT と NFA でレポーター遺伝子突然変異頻度が上昇した。また NFT では G:C-T:A transversion 変異の上昇、腎 DNA 中の 8-OHdG レベルの上昇が確認され、NFT の遺伝毒性発現機序には酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。従って、本研究では、NFT の *in vivo* 変異原性と酸化ストレスとの関連性をより詳細に検討する目的で、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に、NFT および NFA を投与し、腎臓における *in vivo* 変異原性、NRF2 制御下の抗酸化酵素群の mRNA および蛋白発現レベル、並びに酸化的 DNA 損傷の指標として腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを検索した。(実験 1)。

また、F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と抗酸化剤を併用投与し、NFT の *in vivo* 変異原性への抗酸化剤による修飾効果を検討した (実験 2)。

#### 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は肝臓における第 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、蛋白、脂質、核などに対する様々な分子学的異常を誘発し、肝発がんの

発生に関連することが古典的に知られている。申請者の研究グループでは、薬物代謝酵素誘導剤 (以下、CYP inducer という) による CYP の誘導が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ことを報告してきた (Kuwata et al., 2011; Shimamoto et al., 2011; Morita et al., 2011; Tawfeeq et al., 2011; Hayashi et al., 2012)。しかし、CYP inducer であってもミクロソームで ROS 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ないなど、CYP 誘導、ROS 産生および酸化ストレスが必ずしも分子学的連動性を示さないことも明らかとなり、ROS に曝露された肝細胞の細胞増殖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。

細胞内における ROS 産生源としてミクロソームやミトコンドリアが広く知られているが、膜蛋白である NADPH oxidase (NOX) と発がんとの関連性が近年、注目されている (Block and Gorin, 2012)。好中球やマクロファージなどの貪食細胞に発現する NOX2 (gp91phox) は抗菌作用を担う中心的な分子として 1999 年に報告されて以来、NOX2 のホモログ (NOX1、3、4、5 並びに DUOX1 および 2) があいついで発見され病態発生との関連性について研究が精力的に進んでいる。細胞レベルでは、一部の NOX の触媒サブユニットは細胞膜に加えて、小胞体、ミトコンドリアおよび核膜にも分布し、当初の概念よりも幅広く分布し、かつ細胞機能に関与していることが明らかとなっている (Choi et al., 2015)。NOX は調整サブユニットとして細胞膜成分 (p22<sup>phox</sup>) と細胞質成分 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, Rac 1) を合わせ持ち、これら触媒および調整サブユニットの種々の組み合わせにより NOX 複合体が構成され、様々な細胞において標的分子の酸化反応を調節している。

一般に、NOX は NADPH を基質として酸素一分子よりスーパーオキシドを産生し、superoxide dimutase により過酸化水素とし、Fenton 反応などを介してヒドロキシラジカルを産生し、また、好中球

由来の myeloperoxidase の作用により次亜塩素酸を産生する (Kalyanaraman, 2013)。NOX はこのような ROS 産生源であると同時に細胞内情報伝達因子としての役割も担い、貪食細胞以外の実質細胞においても、TGF- $\beta$ 1 (Boudreau et al., 2012)、NF $\kappa$ B (Wang et al., 2011)、Wnt/ $\beta$ -catenin (Kato et al., 2012)あるいは PI3K/Akt (Huang et al., 2012)などを介して、腫瘍細胞の増殖やアポトーシスの抑制、血管新生、浸潤、転移など、がんの進展に関わる主要経路として機能していることが示されている (Block and Gorin, 2012)。

肝臓において NOX の関与を示す病態としてエタノール誘発性のアルコール性肝障害 (Thakur et al., 2006)、虚血・再灌流モデル (Liu et al., 2008) および脂肪性肝疾患モデル (Chatterjee et al., 2012) が知られており、クッパー細胞の活性化に伴い NOX を介した ROS 産生が亢進することで病態が進行することが示されている。脂肪性肝疾患モデルでは動物に高脂肪飼料を与えることで NOX の発現増加に関連して脂質過酸化を増加させ (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示されている (Lu et al., 2006)。高脂肪食摂取による脂肪肝は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と呼ばれ、非アルコール性脂肪肝炎 (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として知られており、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)。一方、NOX が関連する化学物質投与の影響としては、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初期細胞増殖を誘導することが p47<sup>phox</sup> の null マウスを用いた実験により示されている (Rusyn et al., 2000)。しかし、同様の実験系を用いた Wy-14643 の長期間暴露における検討では NOX に関連した細胞増殖の増加は検出されず (Woods et al., 2007)、また、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 の関与は検討されていないため、NOX 介在性の化学発がん過程の戦略的な研究推進が期待される。

本事業では、実験 1 として非遺伝毒性性肝発がん物質である piperonyl butoxide (PBO)を用いて通常の基礎飼料給餌条件下でラット肝二段階発がんモデルを実施し、NOX 阻害剤の併用投与の細胞増殖、アポトーシスならびに前がん病変形成に与える影響について検討した。実験 2 では、NOX の発現の高い肝内環境を設定するなどの実験系の改善を目的に、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 阻害剤の併用投与による細胞増殖、アポトーシスならびに前がん病変形成に与える影響について検討した。実験 3 では、実験 2 で高脂肪飼料を用いた実験系の有用性を確認するため、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再確認を行い、さらに大腸炎モデルとの併用により脂肪性肝疾患モデルの高度化を検討した。Dextran sulfate sodium (DSS) を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さらに適用することで、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 週間の馴化をした後に実験に供した。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。

## 実験 1：ラットの肝発がん物質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

### 3 ないし 7 日間投与試験

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、2/3 部分肝切除を行う群 (PH)、thioacetamide (TAA; 400 ppm)、acetaminophen (APAP; 10,000 ppm) ないし  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate (ANIT; 1,000) の混餌投与を行う群、methyleugenol (MEG; 1,000 mg/kg 体重) ないし promethazine (PMZ; 200 mg/kg 体重) の強制経口投与を行う群の 7 つの群に分け、3 ないし 7 日間反復投与を行った。各投与期間において、無処置対照群、PH 群、MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群および PMZ 群の各群でそれぞれ、10、11、11、10、10、10 および 11 匹のラットを使用した。MEG および PMZ の投与の際に、溶媒として 0.5 % methyl cellulose 溶液を使用した。

ANIT 群において、投与開始後 3 日目で動物の健康状況の悪化が生じたため、用量を 600 ppm に減少させた。PMZ 群において、投与開始後 3 日目で動物の健康状況の悪化が生じたため、用量を 100 mg/kg 体重に減少させた。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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> による深麻酔下で大動脈からの放血により安楽殺し、肝臓を採取した。

### 28 日間投与試験

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 (n=10)、2/3 部分肝切除を行う群 (PH、n = 12)、TAA (400 ppm、n = 10)、APAP (10,000 ppm、n = 10) ないし ANIT (600、n = 10) の混餌投与を行う群、MEG (1,000 mg/kg 体重、n = 11) ないし PMZ (100 mg/kg 体重、n = 11) の強制経口投与を行う群の 7 つの群に分け 28 日間反復投与を行った。MEG および PMZ の投与の際に、溶媒として 0.5% methyl cellulose 溶液を使用した。MEG 群において、投与開始後 10 日目に 1 個体で健康状況の悪化が生じたため安楽殺を実施し、その後用量を 800 mg/kg 体重に減

少させた。投与終了後に、ラットを CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> による深麻酔下で大動脈からの放血により安楽殺し、肝臓を採取した。

MEG および TAA は肝発がん物質として選定し、投与用量は発がん用量ないし最大耐量を設定し (Becker, 1983; NTP, 2000)、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。APAP、ANIT および PMZ は非発がん性肝毒性物質として選定し、投与用量は、13 ないし 16 週間反復投与試験においてラットに肝毒性を誘発することが報告されている用量を設定した (NTP, 1993a, 1993b; Rees et al., 1962)。

## 実験 2：ラットの最大 90 日間反復投与例での肝発がん物質/プロモーター物質の細胞周期制御異常への関与の検討

### 7 ないし 28 日間投与試験

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、methapyrilene (MP; 1,000 ppm)、carbadox (CRB; 300 ppm)、leucomalachite green (LMG; 1,160 ppm)、 $\beta$ -naphthoflavone (BNF; 10,000 ppm) ないし oxfendazole (OX; 500 ppm) の混餌投与を行う群、ないし PMZ (100 mg/kg 体重) の強制経口投与を行う群の 7 つの群に分け、7 ないし 28 日間反復投与を行った。各投与期間において、無処置対照群、MP 群、CRB 群、LMG 群、BNF 群、OX 群および PMZ 群の各群でそれぞれ、10、10、10、10、10、10 および 11 匹のラットを使用した。PMZ の投与の際に、溶媒として 0.5% methyl cellulose 溶液を使用した。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 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> による深麻酔下で大動脈からの放血により安楽殺し、肝臓を採取した。

### 90 日間投与試験

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 (n = 10)、TAA (400 ppm、n = 10)、MP (1,000 ppm、n = 10)、CRB (300 ppm、n = 10)、LMG (1,160 ppm、n = 10)、BNF (10,000 ppm、n = 10)、

OX (500 ppm, n = 10) ないし APAP (10,000 ppm, n = 10) の混餌投与を行う群、ないし PMZ (100 mg/kg 体重, n = 11) の強制経口投与を行う群の9つの群に分け、90日間反復投与を行った。PMZの投与の際に、溶媒として0.5% methyl cellulose 溶液を使用した。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。無処置対照群は基礎飼料と飲料水で維持した。投与終了後、ラットをCO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>による深麻酔下で大動脈からの放血により安楽殺し、肝臓を採取した。

MP、TAA および CRB の投与用量は発がん用量を設定した (Becker, 1983; King, 1976; NTP, 2000)。BNF および OX の投与用量は、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

(Mitsumori *et al.*, 1997; Shoda *et al.*, 2000)。LMG は弱い肝発がん性が指摘されている物質として選定し、投与容量は発がん容量を超える容量を設定した (NTP, 2005)。APAP および PMZ の投与用量は、13週間反復投与試験においてラットに肝毒性を誘発する用量を設定した (NTP, 1993a, 1993b)。

#### 実験3：ラットの腎発がん物質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

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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>による深麻酔下で大動脈からの放血により安楽殺し、腎臓を採取した。

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 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)。

#### 実験4：ポストイニシエーション期における肝発がん物質/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BNF (DEN + BNF群、10,000 ppm)、CRB (DEN + CRB群、300 ppm)、LMG (DEN + LMG群、1,160 ppm) ないし APAP (DEN + APAP群、10,000 ppm) を2、4ないし6週間混餌投与、または基礎飼料 (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CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>による深麻酔下で大動脈からの放血により安楽殺し、肝臓を採取した。

BNFは肝発がんプロモーター物質として選定し、投与容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、投与容量は発がん容量を設定した (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、投与容量は発がん容量を超える容量を設定した (NTP, 2005)。APAP は非発がん性肝毒性物質として選定し、投与容量は 13 週間反復投与試験でラットに肝毒性を誘発する容量を設定した (NTP, 1993)。

実験 1、2 および 4 で採取した肝臓は、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、また、残りの肝サンプルは遺伝子発現解析用として液体窒素に浸漬して凍結し-80°C にて保存した。

実験 3 で採取した腎臓は、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。

#### 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肝臓ないし腎臓を 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。肝臓ないし腎臓切片を用いて、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)、M 期スピンドルチェックポイント蛋白質の mitotic arrest deficient 2 (MAD2) (Kops *et al.*, 2004)、DNA 損傷に応答して発現する phosphorylated H2AX ( $\gamma$ H2AX) (Burma *et al.*, 2001)、サイクリン依存性キナーゼ阻

害因子の 1 つである p21<sup>Cip1</sup> (Sherr and Roberts, 1995)、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)、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)、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/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。

腎臓組織におけるアポトーシス細胞の検出をするために terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色を実施した。シグナル検出は, ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Billerica, MA, USA) のプロトコールに従い、反応を進め、免疫組織化学染色と同様の手順で染色を施した。

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/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® 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

肝臓組織については、免疫組織化学染色を施した後、Ki-67、p-Histone H3、TOP2A、UBD、 $\gamma$ H2AX、

MAD2、p21<sup>Cip1</sup>、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。腎臓組織については、免疫組織化学染色ないし TUNEL 染色を施した後、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。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

RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて、凍結肝臓サンプルないしメタカーン固定腎臓サンプルから 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 hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*)、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

実験 1：平成 25 年度に、C57BL/6J 系統の *Nrf2* ホモ欠損 *gpt delta* マウスを作製し、作出した動物を用いて予備検討を実施した。*Nrf2* ホモ欠損並びに野生型マウスに NFT を、最大耐量の 70 mg/kg bw で 8 週間強制経口投与し、in vivo 変異原性試験として *gpt* および *Sp1* assay を実施した。この結果を基に、平成 26 年度に *Nrf2* ホモ欠損並びに野生型マウスに、NFT および NFA を 13 週間強制経口投与した。投与用量は、NFT は 70 mg/kg bw およびその半量の 35 mg/kg bw、NFA は NFT と同モル相当量の 41 および 21 mg/kg bw の用量に、それぞれ設定した。この腎臓を用いて in vivo 変異原性試験を実施し、H27 年度には同サンプルを用いて、NRF2 制御下の抗酸化酵素群の一つである *Nqo1* について、mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法にて定量し、蛋白発現レベルをウェスタンブロット法にて半定量的に評価した。また酸化的 DNA 損傷の指標として腎 DNA 中の 8-OHdG レベルを検討した。

実験 2：平成 26 年度に、F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と抗酸化剤の NAC、SAA あるいは  $\alpha$ -TP をそれぞれ 4 週間併用投与した。NFT はラット腎発がん用量の 125 mg/kg bw の用量で強制経口した。NAC、SAA 及び  $\alpha$ -TP はそれぞれ 1% の用量で、NFT 投与開始の 1 週間前から実験終了まで粉末基礎飼料に混じて自由摂取させた。また NFT と抗酸化剤 3 種については、単剤での影響を確認するため、それぞれの単独投与群を設けた。解剖時は、腎臓を採取し、重量を測定した後、長軸にそって切断し、弓状動脈を境界に皮質部と髄質部を分離した。採材した皮質および髄質部のそれぞれ一部をホルマリン固定し、残りを凍結保存した。

#### 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 1：6 週齢の雄性 F344 ラット（日本エスエルシー、浜松）に基礎飼料を給餌し、二段階発がんモ

デルを用いた発がんプロモーション実験に供した。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、2 週後から PBO を単独 (15000 ppm) あるいは NOX 阻害剤 (Apocynin; APO, 250 ppm) あるいは抗酸化剤 (N-acetyl cystein; NAC, 3000 ppm) と併用して混餌投与を 8 週間行った。対照群は基礎飼料で維持し、APO および NAC 単独処置群も設定した。動物は定法に従い、試験 3 週目に部分肝切除を行った。PBO、APO および NAC の投与用量は、過去の報告を参照して設定した (Nishikawa-Ogawa et al., 2005; Walter et al., 2009; Ichimura et al., 2010)。PBO は肝臓に CYP1A および 2B を誘導し、肝プロモーション作用を示すことが知られている (Morita et al., 2013)。

実験 2 : 実験 1 と同様に 6 週齢の雄性 F344 ラットを用い、高脂肪飼料 (D12451、Natural Diet 社製) を動物に給餌して試験を実施した。DEN 投与、部分肝切除も同様に行った。2 週後から MG を単独 (100 ppm) あるいは NOX 阻害剤 (Apocynin; APO, 2000 ppm) あるいは抗酸化剤 (酵素処理イソクエルシトリン; EMIQ, 15000 ppm) と併用して混餌投与を 8 週間行った。MG は、DEN 飲水投与ラットで肝プロモーション効果を示した用量を設定した (Sundarrajan et al., 2000)。APO (Chirino et al., 2008) および EMIQ (Hara et al., 2014) もすでに報告のある投与用量を設定した。

実験 3-1 : 実験 1 と同様に 6 週齢の雄性 F344 ラットを用い、基礎飼料のみを与える対照群 (対照群) と高脂肪飼料を動物に給餌し (HFD 群)、二段階発がんモデル実験を行った。

実験 3-2 : 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実験を行い、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、残りの群には 2 週後から DRZ を単独 (5000 ppm) あるいは DRZ と NOX 阻害剤 (APO, 2000 ppm) との併用投与を行う群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。大腸炎からの肝臓への炎症波及効果を期待して 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。DRZ は、肝及び精巣毒性、乳腺腫瘍の増加をもたらすことが知られている ([https://www.fsc.go.jp/ikenbosyu/pc1douyaku\\_dimetridazole\\_270225.pdf](https://www.fsc.go.jp/ikenbosyu/pc1douyaku_dimetridazole_270225.pdf))。

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 を投与用量として採用した。APO の用量は実験 2 に従った。

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)、 $\gamma$  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) を測定した。臓器は病理組織学的・免疫組織化学的検査用に 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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。実験 2 および 3 では、肝細胞脂肪化のスコア化を行った (1 軽微、2 軽度、3 中等度、4 重度)。実験 3 では顕微鏡下 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。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、アポトーシスマーカーである active caspase-3、NOX 複合体構成分子である cytochrome b-245 light chain (p22phox)、p47phox、p67phox および NOX4 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) を使い、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 3 では、大型の陽性巢に加え、中型 (0.05 ~ 0.2 mm) の陽性巢の数も測定し、小型 (0.05 mm 以下) の陽性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、Ki-67 および active caspase-3 陽性肝細胞はランダムに選んだ領域の 1000 個以上の肝細胞当たりの百分率を求めた。実験 2 では、Ki-67、active caspase-3、p22phox、p47phox および NOX4 陽性肝細胞は GST-P 陽性巢の内部、Ki-67 および active caspase-3 陽性肝細胞はランダムに選んだ GST-P 陽性巢以外の領域の 1000 個以上の肝細胞当たりの百分率を求めた。実験 3-1 では、大型 GST-P 陽性細胞巢内の p22phox 陽性細胞、実験 3-2 では大型と中型の陽性巢内の Ki-67、p22phox および  $\gamma$ -H2A.X 陽性細胞の百分率 (%) を求めた。実験 3-1、-2 とも p67phox 陽性の類洞内細胞をランダムに選んだ GST-P 陽性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  $\beta$  アクチンまたは *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、2 および 3-2 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。実験 3-1 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。

#### (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

実験 1 : ラットの肝発がん物質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  
体重および肝臓重量

3 日目において、PH 群、MEG 群、TAA 群、ANIT 群および PMZ 群では無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 5)。PH 群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。MEG 群および APAP 群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。MEG 群、TAA 群、APAP 群、ANIT 群および PMZ 群では無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

7日目において、全処置群で、無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 5)。PH群およびANIT群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。MEG群、TAA群、APAP群、ANIT群およびPMZ群では無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。また、PH群において、6日目に動物1個体の死亡が確認された。

28日目において、MEG群、TAA群、APAP群、ANIT群およびPMZ群では、無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 5)。PH群、TAA群およびANIT群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。PMZ群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。MEG群、TAA群、APAP群、ANIT群およびPMZ群では無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

#### 病理組織学的変化

MEG群では、3日目では組織学的な変化は認められず、7日目ではすりガラス状変性を伴う小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。またそれに加え、28日目では、核の大小不同を伴う“巨大細胞”が認められ、び漫性に分布が認められた。TAA群では、3日目および7日目で核小体の肥大を伴う肝細胞肥大が認められ、それに加え7日目では門脈周辺領域で肝細胞の空胞変性が認められた。28日目では、核の大小不同、有糸分裂異常およびアポトーシスと共に、“巨大細胞”が出現し、び漫性にその細胞の分布が認められた。核小体の肥大を伴う“巨大細胞”の出現はこの時点において顕著に認められた。APAP群では、3日目で明らかな組織所見は認められなかった。7日目および28日目では、小葉中心性の肝細胞肥大が軽度に認められた。ANIT群では、3日目から門脈周辺領域で胆管増生が認められた。7日目から、肝細胞の巣状壊死が散在性に認められた。PMZ群では、小葉中心性にすりガラス状変性を伴う肝細胞肥大が認められた。

#### 細胞増殖活性およびアポトーシス変動

Ki-67は肝細胞の核に局在していた (Fig. 1A、CおよびE)。大部分の例では、Ki-67陽性細胞は肝臓組織全体に均一に分布していたが、TAA群の3および7日目、PMZ群の28日目では門脈周囲の領域に多く分布していた。cleaved caspase 3は肝細胞の核と細胞質に局在していた (Fig. 1B、DおよびF)。全投与群の全投与期間において、cleaved caspase 3陽性細胞は門脈周囲の領域に多く分布していた。

3日目において、Ki-67陽性細胞率はPH群、TAA群、APAP群およびANIT群で、無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、PMZ群では有意な減少が認められた (Fig. 1A)。cleaved caspase 3陽性細胞率は、TAA群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、PMZ群では有意な減少が認められた (Fig. 1B)。

7日目において、Ki-67陽性細胞率は、PH群、APAP群およびANIT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. 1C)。cleaved caspase 3陽性細胞率は、MEG群、TAA群、APAP群およびANIT群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1D)。

28日目において、Ki-67陽性細胞率は、MEG群、TAA群およびPMZ群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1E)。cleaved caspase 3陽性細胞率は、MEG群およびTAA群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 1F)。

#### 細胞周期関連分子発現細胞の分布

TOP2A、p-Histone H3、MAD2、 $\gamma$ H2AX、p21<sup>Cip1</sup>およびp-MDM2は核に局在し、UBDは細胞質ないし有糸分裂紡錘体に局在していた (Fig. 2A-G)。大部分の群では、TOP2A、p-Histone H3、MAD2、 $\gamma$ H2AXおよびUBD陽性細胞は肝臓組織全体に均一に分布していたが、TAA群の3および7日目、PMZ群の28日目では門脈周囲の領域に多く分布していた。全投与群の全投与期間において、p21<sup>Cip1</sup>およびp-MDM2陽性細胞は門脈周囲の領域に多く分布していた。

3日目において、TOP2A 陽性細胞率は、PH 群、TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、MEG 群および PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 2A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、PH 群、TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、MEG 群および PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 2B)。MAD2 陽性細胞率は、PH 群、TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、MEG 群および PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 2C)。UBD 陽性細胞率は、PH 群、TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 2D)。 $\gamma$ H2AX 陽性細胞率は、PH 群、TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、PMZ 群で有意な減少が認められた (Fig. 2E)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は、MEG 群、TAA 群および APAP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2F)。p-MDM2 陽性細胞率は、MEG 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 2G)。

7日目において、TOP2A 陽性細胞率は、PH 群、MEG 群、APAP 群および ANIT 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. 3A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、PH 群、MEG 群、APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な減少が認められ、PMZ 群で有意な増加が認められた (Fig. 3B)。MAD2 陽性細胞率は、PH 群、MEG 群、APAP 群および ANIT 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. 3C)。UBD 陽性細胞率は、PH 群、MEG 群、TAA 群、APAP 群および ANIT 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. 3D)。 $\gamma$ H2AX 陽性細胞率は、PH 群、APAP 群および ANIT 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. 3E)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は、MEG 群、TAA 群、APAP 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 3F)。p-MDM2 陽性細胞率は、MEG 群、TAA 群、APAP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増

加が認められた (Fig. 3G)。

28日目において、TOP2A 陽性細胞率は、PH 群、MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、APAP 群で有意な減少が認められた (Fig. 4A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 4B)。MAD2 陽性細胞率は、MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 4C)。UBD 陽性細胞率は、PH 群、MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 4D)。 $\gamma$ H2AX 陽性細胞率は、MEG 群、TAA 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 4E)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は、MEG 群、TAA 群および APAP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 4F)。p-MDM2 陽性細胞率は、MEG 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 4G)。

28日目において、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は、TAA 群および MEG 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. 5)。

#### UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との共発現

3日目において、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 6A)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、全処置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。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、PH 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. 6B)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、PH 群および ANIT 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。

7日目において、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、PH 群、TAA 群および ANIT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ

た (Fig. 6C)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、全処置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。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、全処置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. 6D)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、全処置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。

28 日目において、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、TAA 群および MEG 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた

(Fig. 6E)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、全処置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。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、PMZ 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 6F)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、MEG 群および TAA 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。

### mRNA 発現

28 日目で増殖活性の亢進が認められた MEG 群、TAA 群および PMZ 群について、3、7 および 28 日目の時点における、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 6)。

3 日目において、G<sub>1</sub>/S チェックポイント関連遺伝子のうち、*Cdkn1a* は MEG 群および TAA 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、PMZ 群において有意な減少が認められた。*Cdkn2a* および *Rb1* は MEG 群、TAA 群および PMZ 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 MEG 群および TAA 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* および *Tp53* は TAA 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、*Tp53* は MEG 群および PMZ 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。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka*、*Bub1* および *Plk1* は MEG 群および PMZ 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。*Aurkb* は MEG 群、TAA 群および PMZ 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。*Mad11l* は TAA 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。*Mad21l* は PMZ 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。DNA 損傷関連遺伝子のうち *Atm* および *Chek1* は PMZ 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。*Brcal* は MEG 群、TAA 群および PMZ 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。*Brc2*、*Chek2* および *Esco1* は MEG 群および PMZ 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。*Brc3* は TAA 群および PMZ 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。*Esco1* および *Rad17* は TAA 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。*Gadd45a* は TAA 群および PMZ 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。*Rad50* は全投与群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現変動は認められなかった。

7 日目では、G<sub>1</sub>/S チェックポイント関連遺伝子のうち、*Cdkn1a* は MEG 群および TAA 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、PMZ 群で有意な発現減少が認められた。*Cdkn2a* および *Tp53* は MEG 群および PMZ 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。一方で、*Tp53* は TAA 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。*Rb1* および *Rb12* は MEG 群、TAA 群および PMZ 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 MEG 群および TAA 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。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka* および *Mad21l* は MEG 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。*Aurkb*、*Bub1* および *Plk1* は MEG 群および TAA 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。*Mad11l* は MEG 群、TAA 群および PMZ 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。DNA 損傷関連遺伝子のうち、*Brca1* は MEG 群および TAA 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。*Brca2*、*Chek1* および *Chek2* は MEG 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。*Brcc3* は MEG 群、TAA 群および PMZ 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。*Escol1* および *Rad17* は MEG 群および PMZ 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。一方で、*Escol1*、*Gadd45a* および *Rad17* は TAA 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。*Gadd45a* は PMZ 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。*Rad50* は MEG 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。*Atm* は全投与群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現変動は認められなかった。

28 日目において、G<sub>1</sub>/S チェックポイント関連遺伝子のうち、*Cdkn1a* および *Mdm2* は MEG 群および TAA 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、*Cdkn1a* は PMZ 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。*Cdkn2a* および *Tp53* は TAA 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 MEG 群および TAA 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。*Rb1* は TAA 群および PMZ 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。M 期スピンドルチェックポイントおよび M 期関連遺伝子のうち、*Aurka* は TAA 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。*Aurkb*、*Mad21l* および *Plk1* は MEG 群および TAA 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。*Mad11l* は TAA 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。*Bub1* は MEG 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。DNA 損傷関連遺伝子のうち、*Brcc3* および *Chek1* は MEG 群および TAA 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。*Escol1*、*Gadd45a*、*Rad17* および *Rad50* は TAA 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。*Atm* および *Escol1* は MEG 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。*Escol1* および *Rad17* は PMZ 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。*Brca1*、*Brca2* および *Chek2* は全投与群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現変動は認められなかった。

実験 2: ラットの最大 90 日間反復投与例での肝発がん物質/プロモーター物質の細胞周期制御異常への関与の検討  
体重および肝臓重量

7 日目において、MP 群、CRB 群、LMG 群、BNF 群および PMZ 群では無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 7)。LMG 群、BNF 群および OX 群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。全投与群で無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

28 日目において、全投与群で無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 7)。MP 群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な減少が認められた。LMG 群、BNF 群および OX 群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。CRB 群、LMG 群、BNF 群、OX 群および PMZ 群では無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

90 日目において、MP 群、TAA 群、CRB 群、LMG 群、BNF 群、APAP 群および PMZ 群では、無処置対照群に比較して、最終体重の有意な減少が認められた (Table 7)。MP 群では無処置対照群に比較して、



絶対肝重量の有意な減少が認められた。LMG 群、BNF 群、OX 群、APAP 群および PMZ 群では無処置対照群に比較して、絶対肝重量の有意な増加が認められた。全投与群で無処置対照群に比較して、相対肝重量の有意な増加が認められた。

#### 病理組織学的変化

MP 群では、全投与期間で、核の大小不同、有糸分裂異常およびアポトーシスと共に、“巨大細胞”が出現し、び漫性にその細胞の分布が認められた。28 日目および 90 日目で、胆管増生、間質の線維増生を伴う oval cell の増殖および色素沈着が、門脈周辺領域に顕著に認められた。さらに、90 日目で胆管線維症および好酸性肝細胞増殖巣が認められた。CRB 群では、全投与期間で、明らかな組織学的所見は認められなかった。LMG 群では、全投与期間で、小葉中心性に肝細胞肥大が認められた。さらに、90 日目において、肝細胞の脂肪変性が散在性に認められた。BNF 群では、7 日目で、明らかな組織学的変化は認められなかった。28 日目および 90 日目では、小葉辺縁性に肝細胞肥大が認められた。さらに、90 日目において、肝細胞の脂肪変性が散在性に認められた。OX 群では、全投与期間で、小葉中心性に肝細胞肥大と肝細胞の脂肪変性が認められた。PMZ 群では、全投与期間で、小葉中心性に肝細胞肥大が認められた。さらに、90 日目において、肝細胞の脂肪変性が散在性に認められた。TAA 群では、90 日目で、核の大小不同、有糸分裂異常およびアポトーシスと共に、“巨大細胞”が認められ、び漫性に分布が認められた。また、胆管増生、間質の線維増生を伴う oval cell の増殖および色素沈着が、門脈周辺領域に顕著に認められた。さらに、線維性結合組織に区画された再生性結節の形成が認められた。APAP 群では、明らかな組織学的所見は認められなかった。

#### 細胞周期関連分子発現細胞の分布

Ki-67、p-Histone H3、TOP2A、p21<sup>Cip1</sup> および p-MDM2 は核に局在し、cleaved caspase 3 は核および細胞質に局在し、UBD は細胞質ないし有糸分裂紡錘

体に局在していた (Fig. 7A–G)。大部分の例では、Ki-67、p-Histone H3、TOP2A および UBD 陽性細胞は肝臓組織全体に均一に分布していたが、TAA 群の 7 日目、PMZ 群の 28 日目では門脈周囲の領域に多く分布していた。全投与群の全投与期間において、p21<sup>Cip1</sup>、p-MDM2 および cleaved caspase 3 陽性細胞は門脈周囲の領域に多く分布していた。

7 日目において、Ki-67 陽性細胞率は、MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、CRB 群、LMG 群および OX 群で有意な減少が認められた (Fig. 7A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、CRB 群および OX 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. 7B)。TOP2A 陽性細胞率は、MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、CRB 群および OX 群で有意な減少が認められた (Fig. 7C)。UBD 陽性細胞率は、MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、CRB 群、LMG 群および OX 群で有意な減少が認められた (Fig. 7D)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は、MP 群、CRB 群および LMG 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 7E)。p-MDM2 陽性細胞率は、MP 群、LMG 群、BNF 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 7F)。cleaved caspase 3 陽性細胞率は、MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 7G)。

28 日目において、Ki-67 陽性細胞率は、MP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 8A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、MP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 8B)。TOP2A 陽性細胞率は、MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、CRB 群で有意な減少が認められた (Fig. 8C)。UBD 陽性細胞率は、MP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、CRB 群で有意な減少が認められた (Fig. 8D)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は、CRB 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 8E)。p-MDM2 陽性細胞率は、MP 群および LMG 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 8F)。cleaved caspase 3 陽

性細胞率は、MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 8G)。

90 日目において、Ki-67 陽性細胞率は、MP 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 9A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、MP 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、CRB 群および APAP 群で有意な減少が認められた (Fig. 9B)。TOP2A 陽性細胞率は、MP 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 9C)。UBD 陽性細胞率は、MP 群および TAA 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 9D)。p21<sup>Cip1</sup> 陽性細胞率は、TAA 群、CRB 群、LMG 群、OX 群、APAP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 9E)。p-MDM2 陽性細胞率は、TAA 群および LMG 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、OX 群で有意な減少が認められた (Fig. 9F)。cleaved caspase 3 陽性細胞率は、MP 群、TAA 群および OX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 9G)。

#### 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。

7 日目において、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は、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. 10A)。28 日目において、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は、MP 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. 10B)。90 日目において、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は、MP 群、TAA 群および CRB 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. 10C)。

#### UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との共発現

28 日目において、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、MP 群および PMZ 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 11A)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、全処置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。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、MP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、CRB 群で有意な減少が認められた (Fig. 11B)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、MP 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。

90 日目において、TOP2A 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、全処置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. 11C)。UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、MP 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。p-Histone H3 陽性細胞のうち UBD を共発現する細胞の割合は、OX 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. 11D)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、MP 群および CRB 群で無処置対照群と比較して有意な減少が認められた。

#### mRNA 発現

MEG 群、TAA 群および PMZ 群について、28 日目および 90 日目の時点における、Table 2 に記載されている遺伝子の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法によって定量し、無処置対照群における mRNA 発現との相対値を算出した (Table 8)。

28 日目において、*Cdkn1a* は、*Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ、CRB 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、PMZ 群において有意な減少が認められた。*Chekl1* は、*Hprt1* ないし *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群、OX 群および PMZ 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、*Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群および PMZ 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、*Hprt1* によって相対値を求めたところ、OX 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、*Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群、CRB 群および OX 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、*Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 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、CRB 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、*Hprt1* ないし *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群および OX 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。

90 日目において、*Cdkn1a* は、*Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ、CRB 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、PMZ 群で有意な減少が認められた。*Chek1* および *Mad2l1* は、*Hprt1* および *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 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、*Chek1* は、*Hprt1* によって相対値を求めたところ、OX 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、*Hprt1* ないし *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群および CRB 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、*Hprt1* ないし *Actb* によって相対値を求めたところ、MP 群および PMZ 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。*Tp53* は、*Hprt1* によって相対値を求めたところ、MP 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、OX 群で有意な減少が認められた。

動物実験 3 : ラットの腎発がん物質投与早期から生

じる細胞周期制御異常とその出現時期の検討  
体重および腎臓重量

3 日目において、NFT 群、TCP 群および CP 群では、無処置対照群に比較して最終体重の有意な減少が認められた (Table 9)。CP 群では無処置対照群に比較して、絶対腎重量の有意な減少が認められた。NFT 群、ADAQ 群、TCP 群および CP 群で無処置対照群に比較して、相対腎重量の有意な増加が認められた。

7 日目において、NFT 群、TCP 群および CP 群では、無処置対照群に比較して最終体重の有意な減少が認められた (Table 9)。NFT 群、TCP 群、CP 群および TAT 群では、無処置対照群に比較して絶対腎重量の有意な減少が認められた。NFT 群、TCP 群および CP 群で、無処置対照群に比較して相対腎重量の有意な増加が認められた。

28 日目において、NFT 群、TCP 群および CP 群では、無処置対照群に比較して最終体重の有意な減少が認められた (Table 9)。NFT 群および CP 群では、無処置対照群に比較して絶対腎重量の有意な減少が認められた。NFT 群、ADAQ 群、TCP 群、CP 群および CBX 群で、無処置対照群に比較して相対腎重量の有意な増加が認められた。

病理組織学的変化

NFT 群では、3 日目から、皮質において近位尿管の硝子滴変性が認められた。また、28 日目で、皮質および OSOM において再生尿管が散在性に認められた。ADAQ 群では、3 日目から、皮質において近位尿管の硝子滴変性が認められた。また、28 日目で、OSOM において近位尿管での色素沈着が認められ、皮質および OSOM において、再生尿管が散在性に認められた。TCP 群では、3 日目から、OSOM 領域においてびまん性の近位尿管上皮細胞の増数を伴う "巨大核" の出現が認められた。CP 群では、28 日目で、皮質において近位尿管の硝子滴変性がわずかに認められた。TAT 群では、28 日目で、皮質において近位尿管の硝子滴変性が、皮質および OSOM において再生尿管が散在性に認められ

た。CBX 群では、28 日目、皮質および OSOM において、再生尿細管が散在性に認められ、また、ヘンレループ領域および集合管における硝子円柱、集合管の再生像がびまん性に認められた。

#### 細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシス細胞の分布

尿細管上皮細胞において、Ki-67、p-Histone H3、TOP2A および p-MDM2 は核に局在し、UBD は細胞質ないし有糸分裂紡錘体に局在していた (Fig. 12A-F)。TUNEL 陽性アポトーシス細胞についても、尿細管上皮細胞の核に陽性反応を示した。Ki-67、p-Histone H3、TOP2A、UBD および TUNEL は、近位尿細管と遠位尿細管に均一に分布していた。P-MDM2 は、遠位尿細管上皮細胞に多く発現していた。

3 日目において、Ki-67 陽性細胞率は、NFT 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 12A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、NFT 群および TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 12B)。TOP2A 陽性細胞率は、NFT 群、TCP 群、CP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 12C)。UBD 陽性細胞率は、NFT 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 12D)。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. 12E)。TUNEL 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. 12F)。

7 日目において、Ki-67 陽性細胞率は、NFT 群および TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 13A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、NFT 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められ、

CP 群で有意な減少が認められた (Fig. 13B)。TOP2A 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、ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 13C)。UBD 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、ADAQ 群および TAT 群で有意な減少が認められた (Fig. 13D)。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. 13E)。TUNEL 陽性細胞率は、NFT 群および TCP 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 13F)。

28 日目において、Ki-67 陽性細胞率は、NFT 群、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 14A)。p-Histone H3 陽性細胞率は、NFT 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 14B)。TOP2A 陽性細胞率は、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 14C)。UBD 陽性細胞率は、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 14D)。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. 14E)。TUNEL 陽性細胞率は、CBX 群で無処置対照群に比較して有意な増加が認められた (Fig. 14F)。

#### 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、同一個体の腎臓から得られた別の組織スライドを用いて得られた各分子の陽性細胞率のデータを用いて、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。

3 日目において、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は、TCP 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. 15A)。7 日目において、p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性細胞率に対する割合は、TCP 群で無処置対照群に比