

較して有意な減少が認められた (Fig. 15B)。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、ADAQ 群および TCP 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. 15C)。

UBD と TOP2A ないし p-Histone H3 との共発現

3日目において、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. 16A)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、TCP 群および CBX 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. 16B)。

7日目において、UBD 陽性細胞のうち TOP2A を共発現する細胞の割合は、TCP 群で無処置対照群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 16C)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、TCP 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. 16D)。

28日目において、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. 16E)。UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合は、ADAQ 群および TCP 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. 16F)。

mRNA 発現

NFT 群、ADAQ 群、TCP 群および CBX 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 10)。

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

認められ、ADAQ 群で有意な減少が認められた。

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

7日目において、*Cdkn1a*、*Chek1* および *Mad2l1* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群および TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Cdkn1a* および *Mad2l1* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Mdm2* は、*Actb* および *Gapdh* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Tp53* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Rbl2* は、*Actb* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で、*Rbl2* は、*Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。

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

Mad211 は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。*Mdm2* および *Tp53* は、*Actb* ないし *Gapdh* によって相対値を求めたところ、ADAQ 群、TCP 群および CBX 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で、*Mdm2* は、*Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。*Rbl2* は、*Actb* によって相対値を求めたところ、TCP 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現増加が認められた。一方で、*Rbl2* は、*Gapdh* によって相対値を求めたところ、NFT 群で無処置対照群と比較して mRNA の有意な発現減少が認められた。

動物実験 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 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 11)。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 11)。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 11)。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. 17, 18)。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. 17A)。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. 17B)。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. 17C)。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. 17D)。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. 17E)。

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. 18A)。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. 18B)。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. 18C)。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. 18D)。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. 18E)。

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. 19A)。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. 19B)。

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. 20A)。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. 20B)。

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. 20C)。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. 20B)。

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. 21)。

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: 8週間の予備検討の結果、NFT の投与で、腎臓における *gpt* 変異体頻度が野生型では対照群に対して上昇する傾向が見られ、*Nrf2* ホモ欠損マウスでは対照群に対して有意に増加した (Table 12)。この結果を基に、*Nrf2* ホモ欠損並びに野生型マウスに NFT および NFA をそれぞれ 2 用量で 13 週間強制経口投与した。腎臓における *Nqo1* の mRNA および蛋白発現レベルを検討した結果では、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対し有意に低い発現レベルを示した (Fig. 22)。腎 DNA 中の 8-OHdG レベルは、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 (Fig. 23)。In vivo 変異原性試験の結果では、野生型では NFT 高用量群で *gpt* 変異体頻度が上昇傾向を示す程度に留まったが、*Nrf2* 欠損マウスでは NFT 高用量群で対照群の 2 倍程度上昇し有意な変化となり

(Table 13, 14)、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 (Fig. 24)。

実験 2: *gpt delta* ラットに NFT と抗酸化剤の NAC、SAA あるいは α -TP をそれぞれ 1% の用量で 4 週間投与した。その結果、NFT 単独投与群では溶媒対照群に対し、約 10% の体重減少が認められた (Fig. 25)。腎相対重量は、NFT 単独群、併用投与群では NFT/NAC、NFT/SAA および NFT/ α -TP 群、各抗酸化剤の単独群では、NAC 群で有意に増加した (Table 15)。

肝発がん促進シグナルの解析に関する研究

実験 1: 基礎飼料給餌ラットにおける PBO の肝プロモーション効果における NOX の関与

試験期間中、全ての群において基礎飼料を給餌した。肝部分切除に起因して PBO 投与群で 1 匹、NAC 併用群で 2 匹が死亡した。これらの動物の死亡は PBO 処置による影響ではなかった。PBO 単独および併用群において、対照群と比較して、剖検時に体重の有意な低値が認められた (Table 16)。絶対及び相対肝重量は対照群と比較して、PBO 単独および併用群において有意に増加した。いずれの項目についても APO あるいは NAC の併用投与による影響は認められなかった。

血液生化学検査では対照群に比べ、PBO 単独および併用群において総蛋白、アルブミン、尿素窒素および総コレステロールの増加と AST、GLU および

TG の低下が見られたが、APO あるいは NAC の併用投与による影響は認められなかった (Table 17)。APO および NAC 単独投与群では対照群に比べ T.CHOL の軽度の増加が認められた。

病理組織学的解析では、各群において変異肝細胞巢 (明細胞性、空胞性、好酸性及び好塩基性) が認められた。免疫組織化学的解析では、対照群に比べ、GST-P 陽性肝細胞巢の数および面積は PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった (Table 18)。Ki-67 陽性細胞率ならびに active caspase-3 陽性細胞率も PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった。

Real-time RT-PCR でも、第一相薬物代謝酵素である *Cyp1a1* と *Cyp2b1/2*、抗酸化酵素の *Nqo1* と *Gpx2* では DEN 単独群に比較して PBO 投与群で有意に増加したが、APO および NAC 併用群において増加抑制は見られなかった。一方、NOX 関連因子 *Cybb* (*gp91phox/Nox2*) および *Rac1* に有意な変化は見られなかった (Table 19)。

実験 2: 高脂肪飼料給餌ラットにおける MG の肝プロモーション効果における NOX の関与

試験期間中、全ての群において高脂肪飼料を給餌した。肝部分切除に起因して高脂肪飼料のみの対照群の 2 匹、MG+APO 併用投与群で 1 匹が死亡した。MG+APO 併用群の動物の死亡は MG あるいは APO 処置による影響ではなかった。MG 単独および併用群において、対照群と比較して、試験期間中および剖検時に体重に有意な変化は認められなかった (Table 20)。絶対及び相対肝重量は対照群と比較して、MG 単独および併用群において増加傾向を示し、相対重量は EMIQ 併用群において有意に増加した。

血液生化学検査では対照群に比べ、MG 単独群において ALP および T.CHOL が有意に減少した。EMIQ 併用群では、MG 単独群に比較しても両項目が有意に減少した。EMIQ 併用群では、MG 単独群に比較して TG の低下傾向がみられた (Table 21)。正常値と比較すると (Kojima et al., 2009)、本試験の対照群の TG および T.CHOL はそれぞれ 7.5 倍および 2 倍の高

値を示していた (TG の正常値 42 ± 8 mg/dL に対し本試験の対照群 316 ± 128 mg/dL; T.CHOL の正常値 44 ± 2 mg/dL に対し本試験の対照群 90 ± 10 mg/dL)。

病理組織学的解析では、各群において変異肝細胞巣 (明細胞性、空胞性、好酸性及び好塩基性) が認められた。肝細胞脂肪化が種々の程度 (軽度から中等度) に発生したが、明らかな群間の差はなかった。免疫組織化学的解析では、対照群に比べ、GST-P 陽性肝細胞巣の数が MG 群、MG+APO 群および MG+EMIQ 群では有意に増加したが、MG+APO 群においては MG 群に比較し、有意に減少した (Fig. 26)。GST-P 陽性巣の面積に有意な変化はなかったが、MG 群では対照群に比べ増加傾向を示し、MG+APO 群については対照群と同程度に留まった。MG+EMIQ 群は MG 単独群と同程度であった。GST-P 陽性巣内の肝細胞の Ki-67 陽性細胞率は、有意な変動はなかったものの、MG 単独群では対照群に比べ、増加傾向を示した (Fig. 27)。MG+APO 群については対照群と同程度に留まった。GST-P 陽性巣以外の肝細胞の Ki-67 陽性細胞率には各処置の影響はみられなかった。GST-P 陽性巣内の肝細胞の active caspase-3 陽性細胞率も対照群に比較し MG 単独群で増加傾向を示し、MG+APO 群において増加抑制が見られた (Fig. 28)。MG+EMIQ 群では、対照群および MG+APO 群に比べ、有意に増加した。GST-P 陽性巣以外の肝細胞の active caspase-3 陽性細胞率にも同様の影響が見られた。NOX 複合体の構成成分である p22phox、p47phox 及び NOX4 の発現を検討したところ、GST-P 陽性巣内の p22phox 及び p47phox 陽性細胞率に MG 投与の明らかな影響はなかったが、APO 投与によりそれらは有意な抑制ないし抑制傾向が認められた (Fig. 29, 30)。NOX4 の発現に明らかな投与の影響はなかった。

実験 3-1 : 高脂肪飼料給餌ラットにおける肝プロモーション効果

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、基礎飼料 (対照) 群に比較し高脂肪飼料 (HFD) 群で有意に増加した (Table

22)。摂餌量および飲水量では、対照群に比較し、HFD 群で減少傾向を示した。臓器重量では、腹腔内脂肪組織の絶対および相対重量が対照群に比較し HFD 群で有意に増加した。肝臓重量では、対照群に比較し、HFD 群で相対重量が有意に減少した。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、対照群に比較し HFD 群で AST は有意に減少し、ALT および GGTP も有意でないものの減少傾向を示した (Table 23)。ALP、TG および T.BIL は、対照群に比較し HFD 群で有意に増加した。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、対照群に比較し HFD 群で有意に増加した (Table 22)。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 陽性巣の数および面積は、対照群に比較し HFD 群で有意に増加し、これに関連して GST-P 陽性巣内の p22phox 陽性肝細胞数も対照群に比較し HFD 群で有意に増加した (Fig. 31)。中型および小型の GST-P 陽性細胞巣数および単一陽性細胞数は対照群に比較し HFD 群で増加傾向を示すものの、有意な変化はなかった (Fig. 32)。

実験 3-2 : 高脂肪飼料給餌・大腸炎誘発ラットにおける DRZ の肝プロモーション効果

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。対照群と 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 群で対照群に対する増加はわずかに留まり、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 (Table 24)。摂餌量では、対照群に比較し、HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群ともに有意に減少した。飲水量では、対照群に比較し、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。

臓器重量では、腹腔内脂肪組織の絶対および相対

重量が対照群に比較し 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 (Table 24)。肝臓重量では、対照群に比較し、HFD 群で相対重量が有意に減少し、HFD+DRZ 群で絶対重量が有意に減少した。

HFD+DRZ+APO 群では、HFD 群に比較し相対重量が有意に増加した。精巣および精巣上体では、対照群および 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。

血液生化学的検査では、AST および ALT は、対照群に比較し HFD 群で有意な増加がみられた (Table 25)。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 では対照群に比較しても有意に減少した。GLU は HFD+DRZ+APO 群において対照群に比較し有意に増加した。T.CHOL は、HFD 群で増加傾向を示し、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群では対照群に比較し有意に増加した。TG は、HFD 群および HFD+DRZ+APO 群では対照群に比較し有意に増加し、HFD+DRZ 群でも増加傾向を示した。T.BIL は、対照群に比較し HFD 群で有意に増加した。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。ALP については、対照群に比較し HFD 群で増加傾向を示すものの、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が対照群に比較し HFD 群で有意に増加した (Table 24)。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。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 処置により軽度の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差は認められなかった。

大型 (直径 0.2 mm 以上) の GST-P 陽性巣の数および面積は、対照群に比較し HFD 群で増加し、面積

において有意差が認められた (Fig. 33)。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 陽性巣の数は、対照群に比較し 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 50 μ m 以下) の GST-P 陽性巣および単一 GST-P 陽性肝細胞の数は、対照群と HFD 群間に有意な差はなかったが、HFD+DRZ 群では、対照群および HFD 群に対して有意に増加した。HFD+DRZ+APO 群では、単一 GST-P 陽性肝細胞数が対照群に比較し有意な増加を示したが、小型の陽性巣、単一陽性細胞数とも HFD+DRZ 群に比較し減少傾向を示した。

大型の GST-P 陽性巣内の Ki-67 陽性細胞は、対照群に比較し HFD 群で有意に増加した (Fig. 34)。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 陽性巣内の Ki-67 陽性肝細胞数は、HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で対照群に比較し、いずれも有意に増加した。HFD+DRZ 群で他の 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 陽性巣内の p22phox 陽性肝細胞数が、対照群に比較し HFD 群で増加傾向を示した (Fig. 35)。HFD+DRZ 群では、HFD 群に比較し減少傾向を示した。中型の GST-P 陽性巣内では、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 陽性巣内の γ -H2A.X 陽性細胞数に各群間に有意な変化はなかった (Fig. 36)。中型の GST-P 陽性巣内では、対照群に比較し HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群で増加を示し、HFD+DRZ 群は GST-P 陽性内の γ -H2A.X 陽性細胞数が、

遺伝子発現解析では、*Poldip2*、*Pparg*、*Aox1*、*Plin2*、*Plin5* および *Gpx1* の発現は対照群に比較し、HFD 群で有意に増加した (Table 26)。*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。*Paprg* は対照群に比較し HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群でも有意に増加していた。*Aox1* は対照群に比較して、HFD+DRZ+APO 群で有意に増加していた。*Plin2* は、HFD+DRZ 群で HFD 群に比較し有意に減少したが、HFD+DRZ+APO 群では対照群および HFD+DRZ 群に比較し有意に増加していた。*Plin5* は HFD+DRZ 群で HFD 群に比較し有意に減少したが、対照群に比較し HFD+DRZ+APO 群で有意に増加していた。*Fasn* および *Scd1* は対照群に比較し HFD 群、HFD+DRZ 群および HFD+DRZ+APO 群とも有意に減少した。

D. 考察

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

実験 1 では、肝発がん物質投与早期に誘発される細胞周期制御破綻とその出現時期の同定を目的として、肝発がん物質をラットへ最大 28 日間反復投与し、細胞周期関連分子の発現変動を、免疫組織化学染色および real-time RT-PCR 法の解析により経時的に検討した。その結果、反復投与開始後 28 日目で肝発がん物質は、細胞増殖活性の亢進とともに p21^{Cip1} 陽性細胞率、p-MDM2 陽性細胞率、cleaved caspase 3 陽性細胞率および DNA 損傷関連遺伝子の mRNA 発現の増加を誘発した。肝発がん物質はさらに、*Rbl2* の mRNA 発現の減少、*Cdkn1a*、*Mad2l1*、*Chek1* および *Mdm2* の mRNA 発現の増加、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および p-Histone H3 陽性細胞率の Ki-67 陽性増殖細胞率に対する割合の減少を誘発した。UBD の過剰発現により、スピンドルチェックポイント蛋白質の MAD2 の機能が阻害され、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)。また、所属研究室の先行研究において、28 日間反復投与によって増殖活性の亢進を示す発がん物質は、UBD の G₂ 期からの異常発現に起因する、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を見出した (Taniai et al., 2012b)。これら

ら、28 日目で肝発がん物質は、M 期における UBD 発現の減少に起因する M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻と、それに伴う増殖細胞の M 期からの早期の移行を誘発することが推察された。RBL2 は、RB ファミリー蛋白質の 1 つで、G₁/S 期の進行を制御し (Cobrinik et al., 1996; Cobrinik, 2005)、MDM2 は、p53 の下流因子の 1 つで、ユビキチン化により p53 や RB 蛋白質の分解を促進する (Bhattacharya and Ghosh, 2014; Honda et al., 1997; Uchida et al., 2005)。したがって、28 日目で肝発がん物質により、p53 および RB 蛋白質の不足に起因する G₁/S チェックポイント機能の破綻が生じ、それが細胞増殖活性の亢進に関与していることが推察された。p53 は遺伝毒性ストレスにตอบสนองして、p21^{Cip1} などの発現を誘導することで、G₁ 期で細胞周期を停止させ、DNA 損傷の修復を促す (Bartek and Lukas, 2001; Speidel, 2015)。また、p21^{Cip1} はアポトーシスの誘発に必要であることが報告されている (Kondo et al., 1996; Lincet et al., 2000)。したがって、DNA 損傷の蓄積は、おそらく MDM2 の活性化に起因する p53 の分解促進に関連して生じており、それが p21^{Cip1} の異常な活性化とそれに引き続くアポトーシスを誘発している可能性が推察された。以上より、肝発がん物質特異的な細胞周期制御破綻は、投与開始後 28 日目で明らかになることが判明した。

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

実験 2 では、実験 1 で見出された細胞周期制御破綻が、増殖活性の亢進を示さない肝発がん物質や肝発がんプロモーター物質の反復投与時においても誘発され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の低いことが想定される物質ないし肝発がんプロモーター物質を最大 90 日間反復投与した。その結果、投与開始後 28 日目で増殖活性の亢進を示す肝発がん物質は、細胞周期関連分子発現細胞およびアポトーシスも増加させ、90 日目においても同様の反

応を示した。しかしながら、増殖活性を亢進しない肝発がん物質および肝発がんプロモーター物質については、免疫組織化学染色による単一分子解析では最大 90 日間の反復投与によっても、特異的な反応を検出することはできなかつた。*Cdkn1a*、*Mad2l1*、*Chek1* および *Rbl2* の mRNA 発現に関しては、実験 1 の結果とは異なり、肝発がん物質/プロモーター物質一特異的な変動は認められなかつた。それとは対照的に、28 日目から、全ての肝発がん物質は、細胞増殖誘発性に関係なく、*Mdm2* の mRNA 発現ないし p-MDM2 陽性細胞率の増加を誘発した。これらから、実験 1 と同様に、肝発がん物質特異的に、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示唆された。しかしながら、*Tp53* の mRNA 発現が物質によって異なる変動パターンを示したことから、MDM2 発現の誘発および活性化には肝発がん物質間で、異なる機序が働いている可能性が推察された。一方で、肝発がん物質の MP および CRB は、28 日目ないし 90 日目で、細胞増殖誘発性に関わらず、M 期に存在する UBD 陽性細胞および M 期に存在する増殖細胞を減少させた。これらの結果から、肝発がん物質は投与開始後 28 日目で以降ないし 90 日目で M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を誘発し、この反応は増殖活性の亢進に先立って誘発されることが推察された。しかしながら、本研究において、肝発がんプロモーター物質については、特異的な反応を検出することができなかつた。

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

実験 3 では、肝発がん物質の反復投与によって誘発された経時的な反応が、腎発がん物質によっても誘発され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。その結果、免疫組織化学染色による単一分子解析および real-time RT-PCR 解析のいずれによっても、最大 28 日間の反復投与によっても、腎発がん物質特異的な反応は見出しなかつた。それとは対照的に、腎発がん物質の ADAQ および

TCP は投与開始後 28 日目で、UBD 陽性細胞のうち p-Histone H3 を共発現する細胞の割合および M 期における増殖細胞の割合を減少させたことから、肝発がん物質と同様に、M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻を誘発していることが推察されたが、この反応にはアポトーシスの亢進は伴わなかつた。一方で、発がん性が弱い腎発がん物質の NFT は同様の反応を示さなかつた。これらから、腎発がん物質による細胞周期制御破綻は投与開始後 28 日目で明らかになるが、アポトーシスの亢進は必ずしも伴うものではないことが示唆された。また、M 期スピンドルチェックポイント機能の破綻は発がん物質の発がん強度に依存して誘発され、発がん性の弱い発がん物質は、少なくとも 28 日間では、これらの反応を誘発しないことが示唆された。

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

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/プロモーター物質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。すなわちラットを用いて、肝発がんプロモーター物質の BNF、遺伝毒性肝発がん物質の CRB、弱い肝発がん性が指摘されている LMG ないし非発がん性肝毒性物質の APAP 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/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つた。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/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推察された。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予測に有用であることが示唆された。

ニトロフラン類の *in vivo* 遺伝毒性評価に関する研究

Nrf2 ホモ欠損 *gpt delta* マウスおよびその野生型に、NFT 並びに NFA をそれぞれ2用量で13週間強制経口投与した。*Nrf2* 欠損マウスでは、NRF2 制御下の *Nqo1* の mRNA および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。*In vivo* 変異原性試験では、NFT 高用量群で、野生型マウスでは *gpt* 変異体頻度に変化は見られなかったが、*Nrf2* 欠損マウスでは *gpt* 変異体頻度が有意に上昇し 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。また、同群のみで 8-OHdG レベルも有意に上昇した。従って、今回、酸化ストレスに対し高感受性を示す *Nrf2* 欠損マウスでのみ、ラットでの試験と同様な結果を示したことから、NFT の *in vivo* 変異原性に対する酸化的 DNA 損傷の関与が明らかとなった。一方、NFA は、ラットでは *in vivo* 変異原性陽性を示すものの、酸化的 DNA 損傷レベルの上昇は認められていない。今回、野生型のみならず *Nrf2* 欠損マウ

スでも、NFA の投与で変異頻度の上昇は認められなかったことから、NFA のラット腎における *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。NF 類の酸化ストレス産生には、ニトロ基の酸化還元が関与することが考えられているが、ニトロ基の影響だけでなく、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。

F344 系 *gpt delta* ラットに NFT と、N-アセチルシステイン、アスコルビン酸及び α トコフェロールをそれぞれ4週間併用投与させた腎臓を用いた *in vivo* 変異原性並びに酸化的 DNA 損傷の検索は現在、進行中である。

肝発がん促進シグナルの解析に関する研究

本事業では、非遺伝毒性性肝発がん物質である PBO、肝発がん物質である MG 並びに肝毒性物質である DRZ 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肝二段階発がんモデルを中心に一部改編を加えた実験系を用いて NOX の関与について検討した。

実験 1: 基礎飼料給餌ラットにおける PBO の肝プロモーション効果における NOX の関与

PBO は殺虫剤用共力剤であり、それ自体に殺虫効果はないが、他のピレスロイドとの併用によりその効果を高めることが知られており、国内を含め広く使用されている。PBO は肝臓の CYP1A および CYP2B inducers であり、ラットにおいて肝発がん promotion 作用を示すことが明らかとなっている (Kawai et al., 2010; Morita et al., 2013)。その機序として ROS 産生の関与が示唆されているものの、ROS 産生源としての CYP の関与は明らかにされていない (Hara et al., 2014)。

解析の結果、GST-P 陽性巣の数と面積、Ki-67 陽性細胞率、active-caspase 3 陽性細胞率はいずれも PBO により増加した。NOX を介した薬物代謝非依存的な ROS 産生と全般的な ROS 産生の影響を確認する目的で、APO や NAC の併用効果を検討した。しかしながら、前がん病変、細胞増殖およびアポトーシス

に対する APO や NAC による増加抑制は見られず、薬物代謝酵素や抗酸化酵素の mRNA 発現レベルも同様であった。また、PBO 投与による NOX 関連因子 *Cybb* (*gp91phox/Nox2*) および *Rac1* に有意な変化は見られなかった。これらの結果は、PBO による肝発がん促進機序には NOX が関与している可能性が低いことを示唆するものであった。なお、肝重量や一部の血液生化学的検査項目に PBO 投与の影響がみられたが、APO あるいは NAC の併用処置による影響は認められなかった。

APO (4-hydroxy-3-methoxyacetophenone) は *Apocynum cannabinum* や *Picrorhiza kurrora* などの植物の茎から分離、抽出された免疫調整物質であり、貪食細胞や非貪食細胞の NOX 活性を抑制することが報告されている (Stefanska and Pawliczak, 2008)。その抑制機序は完全には解明されていないが、p47^{phox} の細胞膜への移行阻害と考えられており、H₂O₂ や MPO の作用により形成された APO ラジカル (APO の 2 量体を含む) が p47^{phox} の thiol 基を酸化することによると考えられている。今回、APO による PBO の肝発がん促進効果が見いだせなかったが、グルタチオンやシステインなどのチオールが存在下では APO の作用が抑制されることが知られており、PBO によるグルタチオンの増加が NOX の効果発現に影響を及ぼした可能性が示唆された。PBO 投与ラットの肝臓におけるグルタチオン含量や GSH/GSSG の比率の検討はこれまでなされていないが、GSH の酸化酵素である *Gpx2* の mRNA レベルの増加が本実験やこれまでの研究で確認されている (Morita et al., 2013)。

PBO 投与による NOX 関連遺伝子の発現が検出できなかった理由とし、PBO そのものが NOX 誘発性を有しなかった可能性に加え、標準的なラット二段階肝発がんモデルでは、試験系や観察期間を含め NOX 関連分子の変動をとらえることが難しかったことが挙げられる。従って、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が必要であると考えられた。

実験 2 : 高脂肪飼料給餌ラットにおける MG の肝

プロモーション効果における NOX の関与

NOX の関与する肝発がん性を効率的に検出するため脂肪性肝疾患モデルを採用した。動物に高脂肪食を与えることで NOX の発現増加に伴って脂質過酸化が増加し (Matsunami et al., 2010)、APO 投与により肝脂肪化が軽減することが知られている (Lu et al., 2006)。ヒトでは、高脂肪食等の摂取による脂肪肝は NAFLD と呼ばれ、NASH やそれに続く肝線維症を経て肝発がんに至る進行性疾患として知られており (Sheedfar et al., 2013)、動物モデルを用いた研究が精力的に行われている。このような NOX 高発現環境下において被験物質の肝発がん性を検討することで、NOX の関与する肝発がん促進過程を明確化できる可能性を提唱する。

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。これにより脂肪肝モデルが成立していることが確認された。肝二段階発がんモデルにおいて高脂肪飼料を適用した研究はこれまで報告がないが、高脂肪飼料を無処置ラットに与えて継時的に観察した研究では、肝臓の脂肪化は摂取開始 2 週後に正常の 2 倍程度に増加し、その後、6 週ごろまでにいったん減少し、17 週までにわずかに増加することが報告されている (Gauthier et al., 2006)。また、肝臓の脂肪化についてラットの個体差も同時に観察されている。従って、今回観察された脂肪化の程度は摂取期間 (8 週間) を反映したものであり、軽度から中等度の脂肪化のばらつきはおそらく脂肪代謝の差に起因した個体差を反映したものと考えられる。また、肝臓における明らかな炎症性変化は認められないことから NASH の前段階である NAFLD の病態を再現していると判断される。

今回、被験物質として用いた MG は緑色の合成色素で、工業的に繊維等の染色に使用され、また、抗菌活性を示すことから、水産業において水カビ病の治療薬等として広く使用されていた (Srivastava et al., 2004)。しかし、発がん性が懸念されているため、欧州等の諸外国において養殖水産動物への使用は禁止

されている。米国 National Toxicology Program (NTP) で実施された MG に対するラットの 2 年間発がん性試験では、雌において肝細胞腺腫及び甲状腺濾胞細胞腺腫・腺癌、乳腺腺癌の発生頻度に軽度の増加がみられている (Culp, 2004)。遺伝毒性については、一部の *in vitro* 試験で陽性の結果が得られているが (Fessard et al., 1999)、*in vivo* 試験では陰性であるため (Mittelstaedt et al., 2004)、MG が遺伝毒性を有する可能性は否定できないものの、明らかな DNA 損傷を誘発する遺伝毒物質との結論は得られていない。また、MG は肝細胞の空胞化を増加させるが、肝細胞の肥大が認められないことから (Cul et al., 1999)、薬物代謝酵素誘導との関連性を示さない発がん性機序を示す化合物と位置づけられる。そこで、本事業の目的に則して非ミクロソーム ROS 産生源である NOX に着目して肝前がん病変の検討を行った。

その結果、GST-P 陽性巣の数と面積、Ki-67 陽性細胞率、active-caspase 3 陽性細胞率はいずれも MG により増加あるいは増加傾向を示した。NOX を介した薬物代謝非依存的な ROS 産生と全般的な ROS 産生の影響を確認する目的で、APO や EMIQ の併用効果を検討した。前がん病変、細胞増殖およびアポトーシスに対する APO による増加抑制が見られ、MG による肝発がん促進機序には NOX の関与を示唆する結果が得られた。これに関連して、NOX 複合体の構成成分である p22phox、p47phox 及び NOX4 の発現を免疫組織化学的に検討したところ、GST-P 陽性巣内の p22phox 及び p47phox 陽性細胞率が APO 投与により抑制ないし抑制傾向を示した。p22phox は NOX1、2 および 4 の構成分子であり、p47phox は NOX1 および 2 の構成分子であるが (Block and Gorin, 2012)、比較的明瞭な結果は p22phox の免疫染色反応から得られた。EMIQ は抗酸化作用を持つケルセチンの配当体であるが、EMIQ は GST-P 陽性巣内で p22phox の発現を抑制することが新たに明らかになった。以上より、NOX 分子、特に p22phox が MG による肝前がん病変の形成に関与している可能性が考えられた。

実験 3-1 : 高脂肪飼料給餌ラットにおける肝プロ

モーション効果

実験 2 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、実験 3 では、基礎飼料を給餌する対照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 陽性巣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* の発現が増加し、*Fasn* および *Scd1* の発現が減少した。*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である (Zhang et al., 2015)。これらの変動に関連して肝臓の脂肪化についてもスコアの有意な増加を確認できた。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 陽性巣の数および面積ともに有意な増加を示しており、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示された。NAFLD では、NASH 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必要となる。本事業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発がん促進効果を検出することが可能となり、脂肪肝に関連する被験物質の肝発がん促進効果の検出や脂肪肝を軽減する治療薬の検討に有用なモデルとなりうると考えられる。その詳細な発生機序は不明であるが、DEN 処置ラットに高脂肪飼料を 6 または 8 週間与えて肝臓の GST-P 陽性肝細胞および陽性細胞巣を解析した実験

において、それらの増加に関連して酸化的 DNA 損傷の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine や脂質過酸化の増加が確認されている (Wang et al., 2009 ; Kumamoto et al., 2013)。本研究では、GST-P 陽性巣の増加に伴い NOX 関連分子である p22phox (NOX1、2、4 の調整サブユニット) 陽性細胞および Poldip2 (NOX4 の調整サブユニット) の遺伝子発現が増加し、さらに酸化ストレス指標となる Gpx1 (酸化型グルタチオンを産生する抗酸化酵素) の遺伝子の発現増加もみられたことから、NOX 関連分子の発現による酸化ストレスが高脂肪飼料により肝発がん促進作用に関与している可能性が推察された。

実験 3-2 : 高脂肪飼料給餌・大腸炎誘発ラットにおける DRZ の肝プロモーション効果

《DSS 誘発性腸炎の肝臓への影響》

脂肪性肝疾患は、単純性脂肪肝と異なり、脂肪性肝炎に進展し、肝傷害を誘発すると考えられている。実験 3-2 において、DSS を試験中に 5 日間飲水投与し、一過性に軽度の大腸炎を誘発したところ、実験 3-1 と比較して肝臓の類洞内において好中球数には明らかな差は認められなかったが、p67phox 陽性細胞数は明らかに増加していた。さらに、肝傷害マーカーである AST および ALT については、実験 3-1 において対照群に比較し HFD 群で有意な減少ないし減少傾向を示したのに対し、実験 3-2 ではいずれの項目も有意な増加を示した。また、対照群に対する HFD 群の T.BIL の増加も実験 3-1 に比べ実験 3-2 で顕著になった (実験 3-1 では CTL 群に対し 183% の増加 ; 実験 3-2 では CTL 群に比べ 237% の増加)。従って、HFD 群における DSS 誘発性腸炎の炎症波及効果によって、肝臓に肝傷害が誘発された可能性が示唆された。

GST-P 陽性細胞巣の解析において、実験 3-1 と 3-2 の対照群を比較した場合、大型 (直径 0.2 mm 以上) の陽性細胞巣は減少傾向にあったが、中型の陽性細胞巣は増加傾向を示した。大型の陽性細胞巣の面積には、数への影響ほどでないものの、減少傾向が認められた。これらの結果から、試験期間中の一過性の大腸炎は GST-P 陽性細胞巣の増加、特に数の増加を

抑制し、大型の陽性細胞巣よりも中型の陽性細胞巣を増加させたことが明らかとなった。この中型の陽性細胞巣の毒性学的意義は不明であるが、大腸炎による生体へのストレス、肝臓への炎症波及による前がん病変抑制シグナルの亢進などが要因となり、大型の陽性巣まで拡大できないものが多数観察されたと考えられた。ヒトでは脂肪性肝疾患から発生する肝発がんは 75 歳以上で増加するとされ、その発生には長期間に及ぶ aging が関与するため (Sheedfar et al., 2013)、本モデルにおいても肝細胞の脂肪化や類洞内の炎症細胞の増加が関与する、緩やかな肝発がん過程を再現したと推察された。一方、大型 GST-P 陽性細胞巣においても HFD 群で p22phox・Ki-67 陽性細胞の増加がみられることから、数の減少はあるものの、観察されている大型の陽性細胞巣には NOX の関与する増殖活性があることは明らかであった。

《DRZ の肝臓への影響》

DRZ は、*in vitro* の遺伝毒性試験で陽性を示すが、小核試験や不定期 DNA 合成試験を含め *in vivo* の試験は全て陰性であり、生体に対して明らかな遺伝毒性を示さないと考えられている。また、げっ歯類を用いた毒性試験において肝細胞の変性は認められるものの薬物代謝酵素誘導を示唆する肝細胞肥大も観察されていない (ikenbosyu/pc1douyaku_dimetridazole270225.pdf)。*in vivo* コメントアッセイにおいて酸化ストレスの関与する DNA 損傷を示すことから (Re et al., 2009)、本事業の目的に則して非ミクロソーム ROS 産生源である NOX に着目して肝前がん病変に与える影響について検討を行った。

高脂肪飼料給餌による肝毒性指標 (ALT、AST) の増加、脂肪肝のスコアの増加が DRZ 投与により減少し、この変化は血漿 TG の減少も伴っていた。一方、血漿 T.CHOL は DRZ 投与により増加した。実験 3-1 および 3-2 ともに対照群と HFD 群間の T.CHOL の変動は軽度に留まり、DRZ によって特異的に T.CHOL が増加したと考えられた。DRZ のコレステロール代謝への影響についての研究報告はないが、肝毒性に関連した肝細胞への取込・排泄の異常に加

え、後述するように DRZ は卵巣・精巣毒性を示すため、ステロイド合成の異常に関連してコレステロール代謝に影響を及ぼしている可能性も推察された。

GST-P 陽性細胞巢の解析では、様々な大きさの陽性細胞巢に変動がみられたため、サイズ別に定量解析を行った。その結果、DRZ 投与により大型の陽性細胞巢の面積の有意な減少がみられ、この変化は陽性巢内の Ki-67 および 22phox 陽性細胞の減少も伴っていた。中型以下の陽性巢の増加を考慮すると、不完全な肝発がん促進作用のため、高脂肪飼料給餌による効果を遅延させ、今回の試験期間では大型のサイズまで陽性細胞巢を拡大させなかった可能性がある。実際、DMR には肝毒性はあるものの、発がん性試験では肝発がん性は認められていない

(ikenbosyu/pcldouyaku_dimetridazole270225.pdf)。他の機序として、本剤の有する卵巣および精巣毒性との関連を考慮する必要がある。エストロゲンおよびその誘導体は DEN 処置ラットの肝前がん病変を抑制するが、それには TGF- β の誘導に関連した細胞増殖の抑制の関与が示唆されている (Moser et al., 1996; Kang et al., 2011)。また、ラットの 2 段階発がんモデルにおいて、去勢により GGTP 陽性肝細胞巢が減少し、その場合、数よりも面積の減少が顕著であり、アンドロゲン投与によりその抑制が軽減されることが報告されている (Lindhe et al., 1990)。従って、DRZ 投与では、直接的な肝臓への作用以外にも卵巣あるいは精巣毒性の要因となる性ホルモン様の作用あるいはその受容体への影響により、大型の GST-P 陽性細胞巢の減少が生じた可能性が考えられた。

一方、中間型および小型の GST-P 陽性細胞巢並びに単一 GST-P 陽性肝細胞の数が DRZ 投与により有意に増加した。これらの陽性細胞巢および細胞数は APO 投与により有意な減少ないし減少傾向を示していることから、中型以下の大きさの病変の発生には NOX の関与が示唆される。中型の GST-P 陽性細胞巢における p22phox 陽性細胞数の解析結果において、群間に有意な変動が観察されなかったため、関連する NOX 関連分子の変動を捉えることができなかった。一方、HFD 給餌下の DRZ 投与により増加

した Ki-67 および γ -H2A.X 陽性細胞が APO との併用により減少傾向を示したことから、細胞増殖や DNA 損傷の軽減が中型以下の陽性巢の減数に関与していることが示唆された。特に、DRZ による DNA 損傷においては、ヒトリンパ球を用いたコメットアッセイにおいて、酸化ストレスが関与することが報告されている (Re et al., 1997)、従って、NOX によって産生されるスーパーオキシドは、SOD やカタラーゼによって還元されることも勘案すると、中型以下の病変の発生には NOX の関与が強く示唆される。

以上のように、本研究では肝毒性および肝発がん性の評価の際に、肝発がん促進作用の一般的な概念である薬物代謝酵素誘導に関連したミクロソームによる ROS 産生やそれによる酸化ストレスの増強では説明できない事象を考慮し、非ミクロソーム ROS 産生源である NOX に着目して検討を行った。DEN 処置および部分肝切除によるラット二段階発がんモデルを用い、被験物質として PBO、MG あるいは DRZ を単独あるいは NOX 阻害剤 APO と併用して試験を行った結果、基礎飼料を用いた通常の試験では PBO 投与による NOX の関与を明らかにすることができなかったが、新規に開発した脂肪肝・肝二段階発がんモデルあるいはさらに DSS 誘発性大腸炎モデルを付加した条件下において、MG および DRZ は NOX 関連性の脂質代謝異常と肝発がん促進作用を示すことが明らかとなった。

E. 結論

発がん初期過程の細胞周期解析に関する研究

投与開始後 28 日目以降ないし 90 日目で、標的臓器を問わず、発がん物質特異的に UBD の M 期における発現減少に起因する M 期スピンドルチェックポイント機構の破綻が誘発され、それが発がん早期過程に関与していることが推察された。一方で、mRNA 発現やアポトーシスの解析によっては肝臓および腎臓標的発がん物質特異的な反応は見出すことができなかったことから、少なくとも 90 日間の投与期間では、これらの解析による化学物質の発がん性予測は困難であることが示唆された。さらに、ポス

トイニシエーション期における投与によって、最大90日間の反復投与によっても反応性に乏しかった肝発がん物質および肝発がんプロモーター物質についても、肝発がん物質/プロモーター物質特異的な増殖活性の亢進ないし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。これらのことから、28日間ないし90日間反復投与系と発がんプロモーションの系を組み合わせた検出系において、二重染色を組み合わせた免疫組織化学染色によるKi-67、p-Histone H3、TOP2A およびUBDの発現分布解析によって、2年間のがん原性試験で明らかに腫瘍を誘発する発がん物質だけでなく発がんプロモーター物質についても、化学物質の発がん性を予測できる可能性が示唆された。

ニトロフラン類の in vivo 遺伝毒性評価に関する研究

NFTのラット腎臓における *in vivo* 変異原性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。ニトロフラン骨格の側鎖を替えた新規NF類の開発は現在も行われていることから、本結果はNF類のリスク評価にとって有用であると考えられた。

肝発がん促進シグナルの解析に関する研究

3種の異なる肝毒性物質を用いて肝発がん促進作用におけるNOXの関与を検討した。基礎飼料を用いた通常の肝二段階モデルでは、NOXの関与する肝発がん促進作用は検出できなかった。そこで、高脂肪飼料あるいは大腸炎モデルを適用したラット肝二段階発がんモデルを用いて検討した結果、脂肪肝と炎症波及効果に関連した肝発がん促進作用を検出することが可能となった。その際、様々な大きさの前がん病変に着目してサイズ依存性の反応があるかどうかを評価することが重要であった。免疫染色を用いた前がん病変の評価には、NOX関連分子のp22phoxの発現解析が有用であり、細胞増殖およびアポトーシスマーカーに加え、NOX抑制剤との併用群を設定することで、NOXの関与する酸化ストレス

に起因した非遺伝毒性発がん機序の一端を解明することができた。

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.

Kijima, A., Ishii, Y., Takasu, S., Matsushita, K., Kuroda, K., Hibi, D., Suzuki, Y., Nohmi, T., Umemura, T.: Chemical structure-related mechanisms underlying *in vivo* genotoxicity induced by nitrofurantoin and its constituent moieties in gpt delta rats. *Toxicology*, 331, 125–135, 2015.

Kimura, M., Abe H., Mizukami, S., Tanaka, T., Itahashi, M., Onda, N., Toshinori, Yoshida T., Shibutani, M.: Onset of hepatocarcinogen-specific cell proliferation and cell cycle aberration during the early stage of repeated hepatocarcinogen administration in rats. *J. Appl. Tox.* 36(2):223–237, 2016.

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、盛田怜子、阿部 一、田中 猛、鈴木和彦、村上智亮、吉田敏則、渋谷 淳：ラットの発がん物質投与初期に誘発される増殖活性亢進時における細胞

周期制御異常の特異性に関する検討、第30回毒性病理学会学術集会、徳島、2014.1.30-31

木村真之、盛田怜子、阿部 一、田中 猛、鈴木和彦、村上智亮、吉田敏則、渋谷 淳：ラットの発がん物質投与初期に誘発される増殖活性亢進時における細胞周期制御異常の特異性に関する検討、平成25年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、滋賀、2014.2.17-18

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：ラットの肝発がん物質投与初期での細胞増殖活性と細胞周期制御分子発現の関連性に関する解析、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014.7.2-4

Masayuki Kimura, Hajime Abe, Takeshi Tanaka, Megu Itahashi Ayako Shiraki, Sayaka Mizukami, Toshinori Yoshida, Makoto Shibusatani: Early time response of liver cells to facilitate cell cycle aberration by treatment with hepatocarcinogen in rats. 2nd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, Berlin, 2014. 8. 27-30

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：ラットへの肝発がん物質投与初期での肝臓における細胞増殖活性と細胞周期制御分子発現の変動、第29回発癌病理研究会、いわき、2014.9.1-2

木村真之、阿部 一、田中 猛、板橋 恵、白木彩子、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：ラットの肝発がん物質投与早期から生じる細胞周期の促進と制御異常の出現時期の検討、第157回日本獣医学会学術集会、札幌、2014.9.9-12

木島綾希、石井雄二、高須伸二、横尾 諭、土屋卓磨、児玉幸夫、梅村隆志：ニトロフラントインの *in vivo* 変異原性における Nrf2 の役割、日本環境変異原学会、第43回大会、東京、2014.12.4-5

木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：ラット28日間反復投与における発がん予測指標分子の肝発がん物質・プロモーターに対する90日間反復投与での反応性、第31回日本毒性病理学会学術集会、東京、2015.1.29-30

木島綾希、石井雄二、高須伸二、横尾 諭、土屋卓磨、梅村隆志：Nrf2 欠損 *gpt delta* マウスを用いたニトロフラントインの *in vivo* 変異原性機序の解析、第31回日本毒性病理学会学術集会、東京、2015.1.29-30

木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、渋谷 淳：ラット28日間反復投与における発がん予測指標分子の肝発がん物質・プロモーターに対する90日間反復投与での反応性、平成26年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、滋賀、2015.2.5-6

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、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、

<p><u>渋谷 淳</u>: 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</p> <p>Masayuki Kimura, Hajime Abe, Takeshi Tanaka, Yousuke Watanabe, Ayako Shiraki, Sayaka Mizukami, Yasuko Hasegawa-Baba, Toshinori Yoshida, <u>Makoto Shibutani</u>: 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</p> <p>木村真之、水上さやか、寒川祐見、吉田敏則、<u>渋谷 淳</u>: 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</p>	<p>理学会総会および学術集会、高松、2016. 1. 28-29</p> <p><u>吉田敏則</u>、村山宗理、河嶋将司、木村真之、水上さやか、寒川祐美、林 新茂、渋谷 淳: 高脂肪飼料給餌ラットを用いた二段階肝発がんモデルにおける血中脂質および肝 p22phox 発現の解析、第32回日本毒性病理学会総会および学術集会、高松、2016. 1. 28-29</p> <p>H. 知的財産権の出願・登録状況</p> <p>1. 特許取得 なし</p> <p>2. 実用新案登録 なし</p> <p>3. その他</p>
---	--

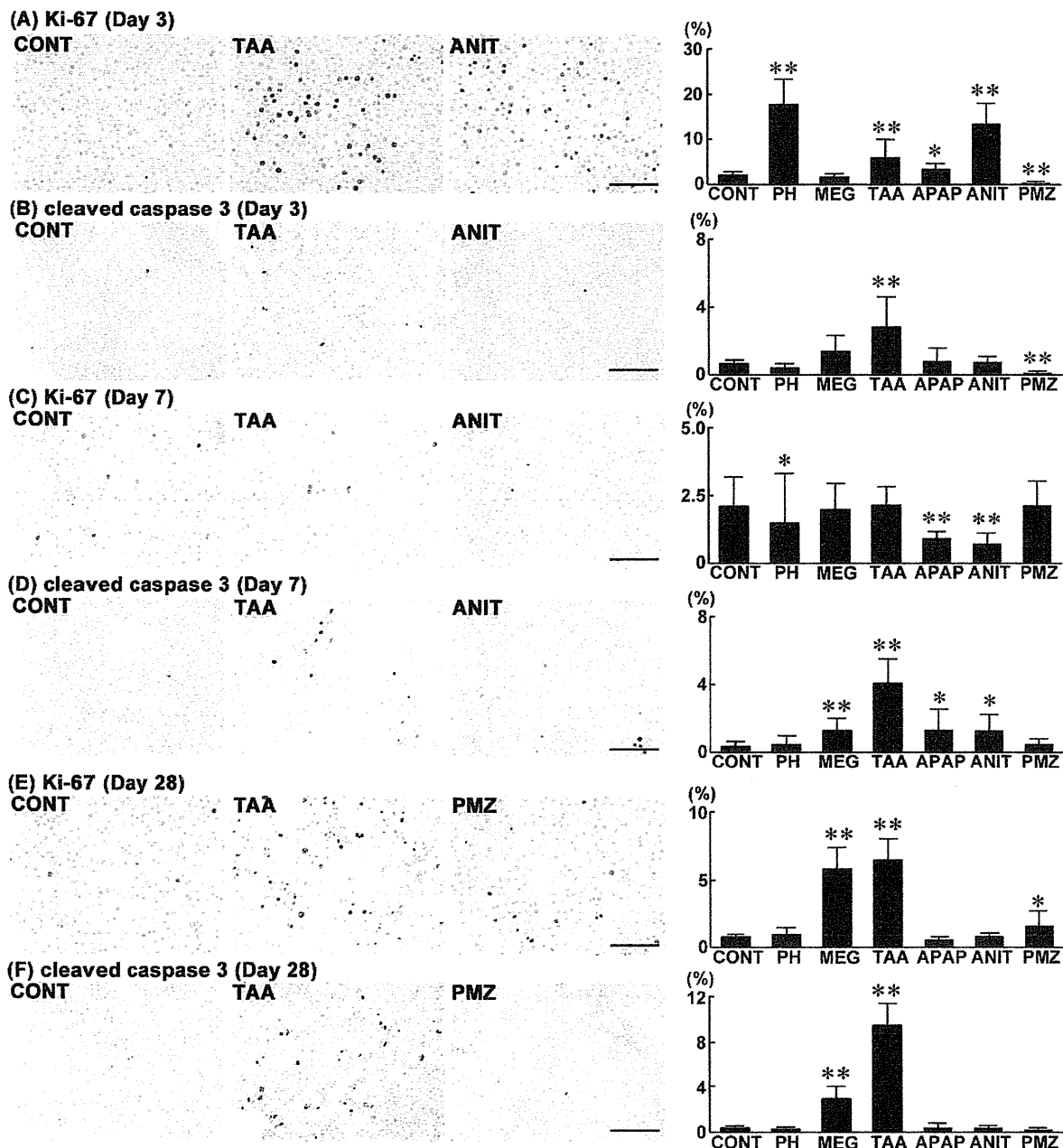


Fig. 1. Distribution of Ki-67⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver of rats at day 3, 7 and 28 after treatment with PH, noncarcinogenic hepatotoxicants or hepatocarcinogens. Photomicrographs show the distribution of Ki-67⁺ and cleaved caspase 3⁺ cells in the liver of representative cases from untreated controls (A–F), animals treated with TAA or ANIT (A, B, C, D), and animals treated with TAA or PMZ (E, F). The graphs show the positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) Ki-67 (day 3), (B) cleaved caspase 3 (day 3), (C) Ki-67 (day 7), (D) cleaved caspase 3 (day 7), (E) Ki-67 (day 28), and (F) cleaved caspase 3 (day 28). Bar = 100 μ m (A, C and E) or 200 μ m (B, D and F). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

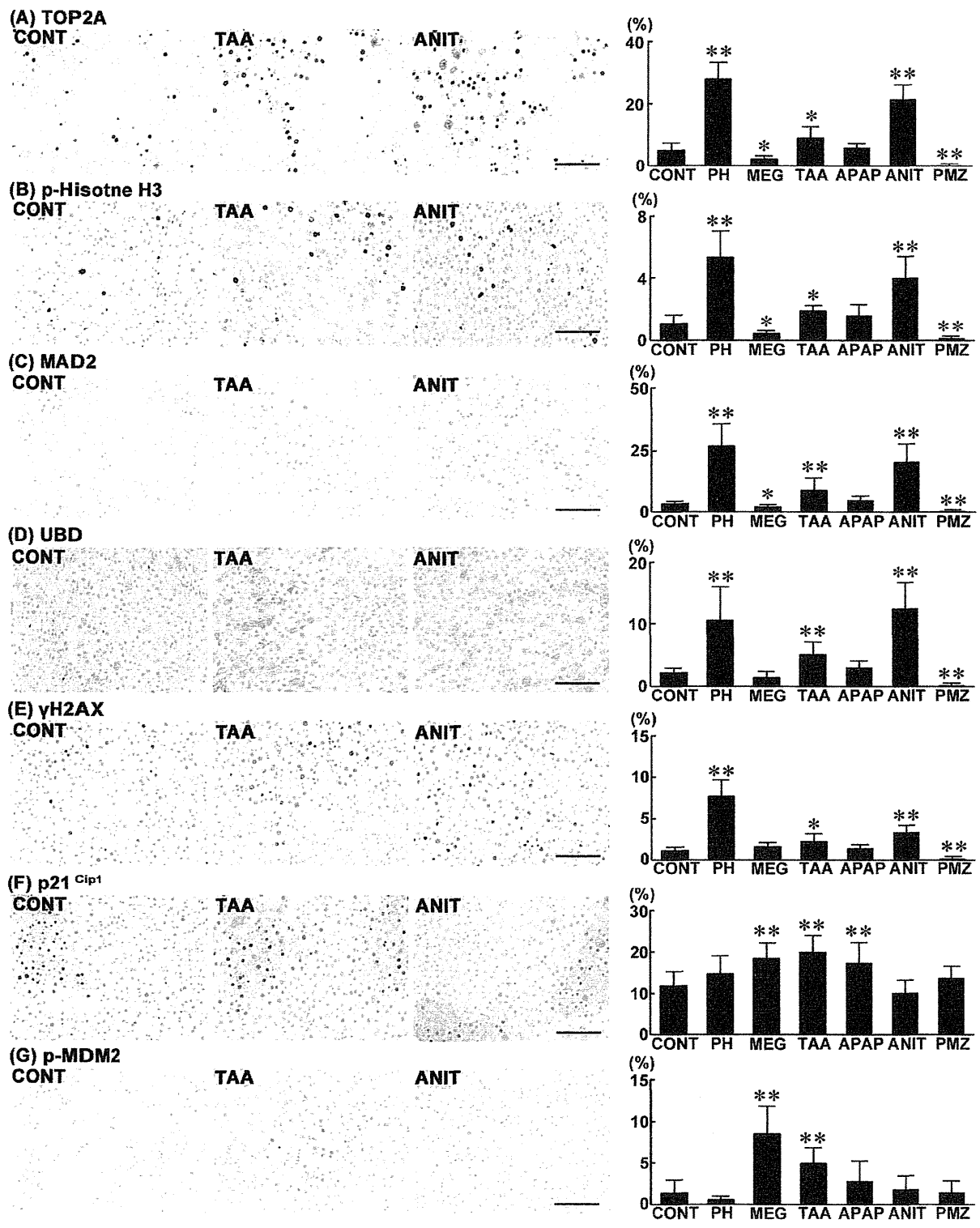


Fig. 2. Distribution of TOP2A⁺, p-Histone H3⁺, MAD2⁺, UBD⁺, γ H2AX⁺, p21^{Cip1+} and p-MDM2⁺ cells in the liver of rats at day 3 after treatment with PH, noncarcinogenic hepatotoxicants or hepatocarcinogens. Photomicrographs show the distribution of TOP2A⁺, p-Histone H3⁺, MAD2⁺, UBD⁺, γ H2AX⁺, p21^{Cip1+} and p-MDM2⁺ cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or ANIT. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) TOP2A, (B) p-Histone H3, (C) MAD2, (D) UBD, (E) γ H2AX, (F) p21^{Cip1}, and (G) p-MDM2. Bar = 100 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

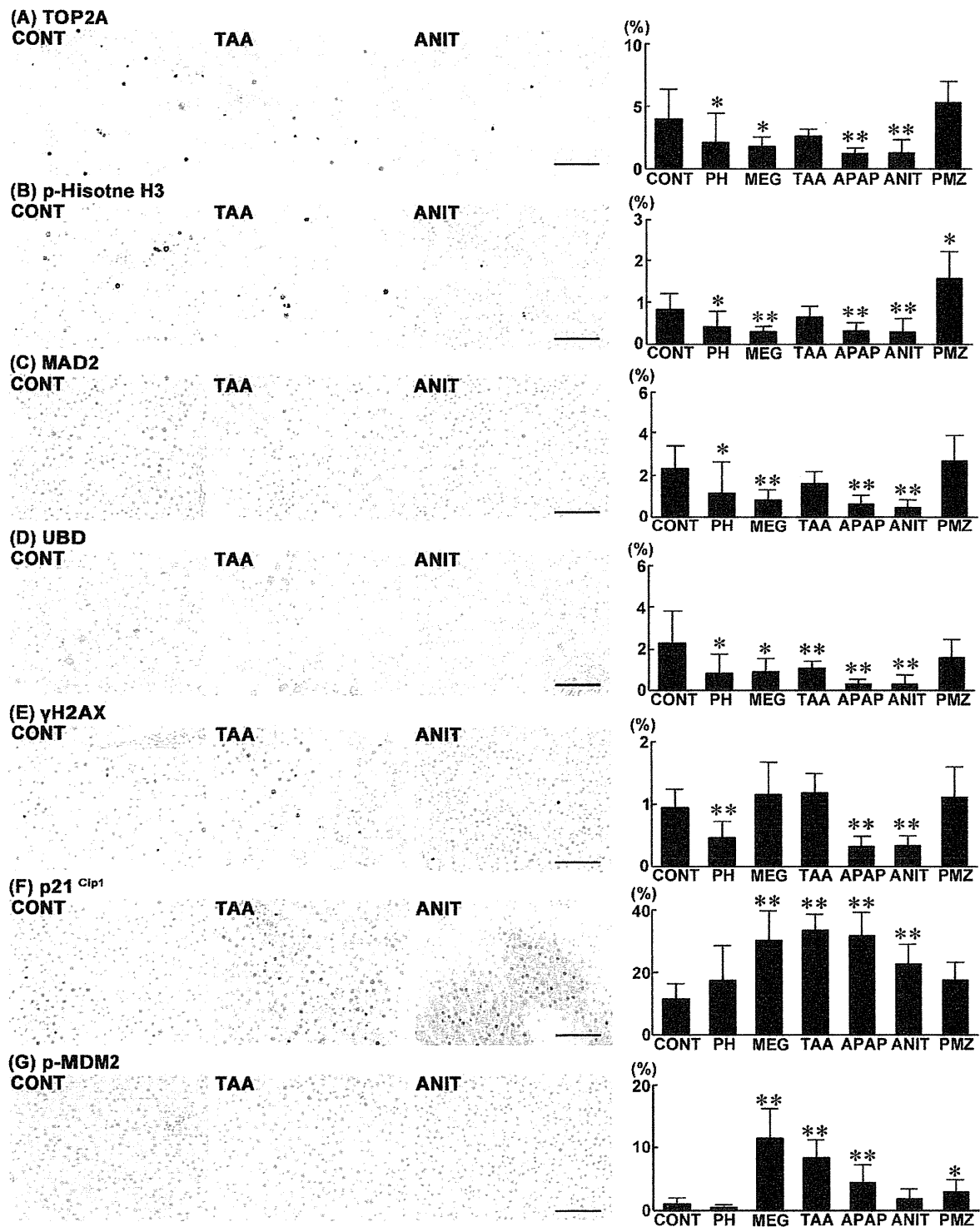


Fig. 3. Distribution of TOP2A⁺, p-Histone H3⁺, MAD2⁺, UBD⁺, γ H2AX⁺, p21^{Cip1+} and p-MDM2⁺ cells in the liver of rats at day 7 after treatment with PH, noncarcinogenic hepatotoxicants or hepatocarcinogens. Photomicrographs show the distribution of TOP2A⁺, p-Histone H3⁺, MAD2⁺, UBD⁺, γ H2AX⁺, p21^{Cip1+} and p-MDM2⁺ cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or ANIT. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) TOP2A, (B) p-Histone H3, (C) MAD2, (D) UBD, (E) γ H2AX, (F) p21^{Cip1}, and (G) p-MDM2. Bar = 100 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated controls (Dunnett's or Steel's test).

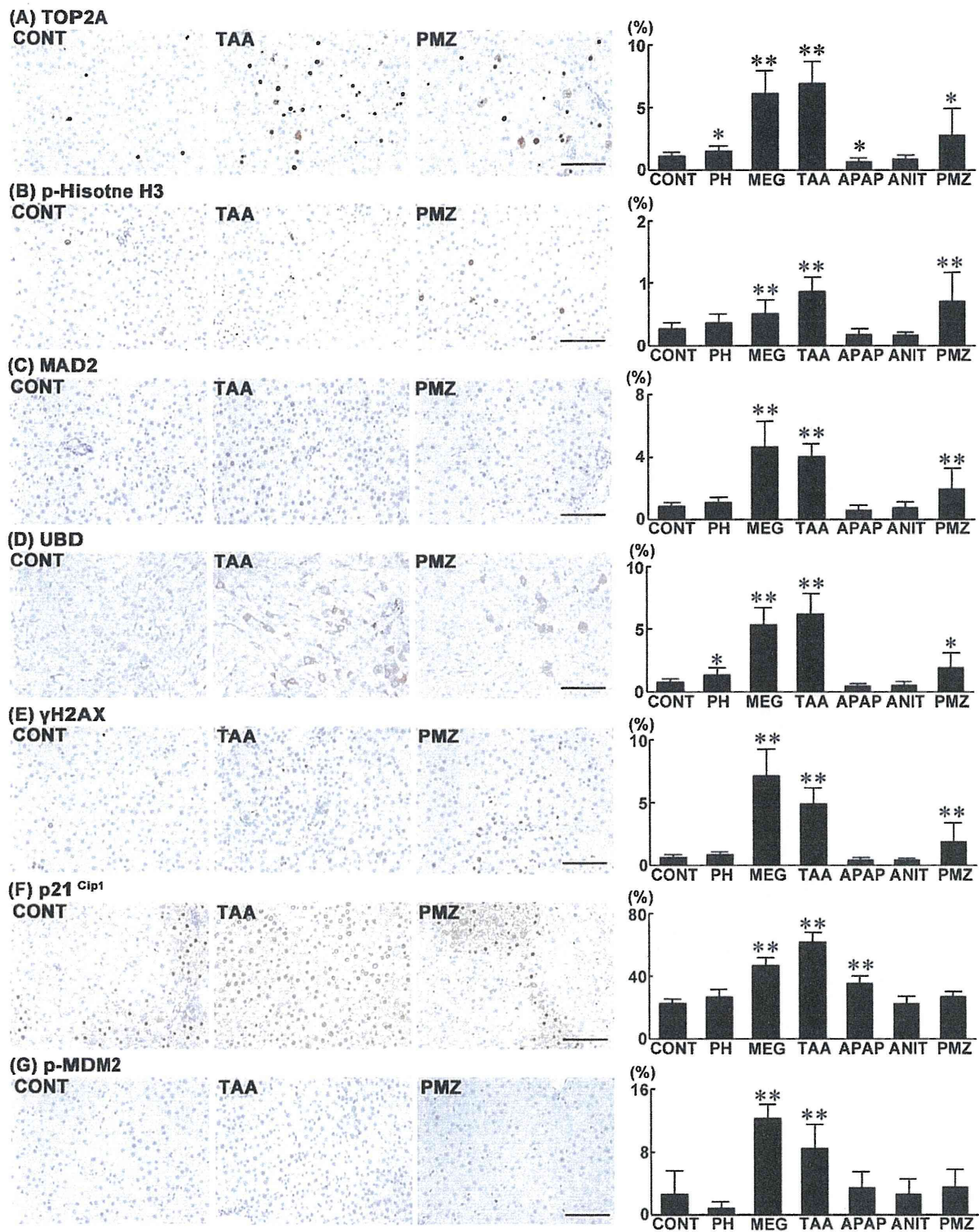


Fig. 4. Distribution of TOP2A⁺, p-Histone H3⁺, MAD2⁺, UBD⁺, γH2AX⁺, p21^{Cip1+} and p-MDM2⁺ cells in the liver of rats at day 28 after treatment with PH, noncarcinogenic hepatotoxics or hepatocarcinogens. Photomicrographs show the distribution of TOP2A⁺, p-Histone H3⁺, MAD⁺, UBD⁺, γH2AX⁺, p21^{Cip1+} and p-MDM2⁺ cells in the liver of representative cases from untreated controls and animals treated with TAA or PMZ. The graphs show positive cell ratios of hepatocytes per total cells counted in 10 animals in each group. Values represent mean + SD. (A) TOP2A, (B) p-Histone H3, (C) MAD2, (D) UBD, (E) γH2AX, (F) p21^{Cip1}, and (G) p-MDM2. Bar = 100 μm. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs. untreated controls (Dunnnett's or Steel's test).