

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための
短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究**

(研究課題番号 H26-化学-指定-001)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉見 直己

平成27(2015)年 3月

目 次

| | |
|--|-------|
| . 総括研究報告 | |
| 化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発 | 1-7 |
| 吉見 直己 | |
| . 分担研究報告 | |
| 1 . 大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発 | 9-22 |
| 吉見 直己 | |
| 2 . 胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発 | 23-24 |
| 塚本 徹哉 | |
| 3 . 遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発 | 25-33 |
| 魏 民 | |
| 4 . 肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発 | 35-43 |
| 横平 政直 | |
| 5 . 前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発 | 45-47 |
| 鈴木 周五 | |
| 6 . 膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発 | 49-51 |
| 小川 久美子 | |
| 7 . 網羅的なDNA付加体解析法を用いた化学物質のDNA損傷性評価 | 53-55 |
| 戸塚 ゆ加里 | |
| 8 . ヒストン修飾を指標としたin vitro発がんリスク評価系の開発 | 57-58 |
| 伊吹 裕子 | |
| . 研究成果の刊行に関する一覧表 | 59-65 |
| . 研究班名簿 | 67 |

化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究

総括研究者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

化学物質は毎年新規に開発され、その一部は Ames 試験等の変異原試験陽性が含まれ、ヒトに対する発がんへの安全性の確認が必要であるものの、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞の性質から生体での変化を確認することはなかなか困難であるため、本研究では発がん性を検証するために病理組織診断法を利用した短・中期のバイオアッセイ系の開発を目的とした。臓器により、免疫組織化学法を含む病理組織学的に、微小の腫瘍性病変を特定できる解析法の検討を始めた(大腸・肺臓・肝臓)。他の臓器でも *in vitro* 系との組み合わせによる DNA 損傷依存的ヒストン修飾酵素である γ -H2AX を予測マーカーとした早期病巣の特定とその特徴解析を検討した。加えて、分担者間での多施設共同として動物臓器供与のシステムの構築に関して検討するために、評価マニュアルを作成し、今後そのマニュアルの有用性を検証していく予定である。

A. 研究目的

本研究では、短・中期発がん予測バイオアッセイ系の開発と検証が目的である。結果としてガイドライン提唱を目指している。既にヨーロッパ・ユーロ圏の諸国での研究施設では、特に化粧品関連物質に関しては、法的に動物実験系ができなくなるため、代替実験法の開発が急がれ、最近では動物愛護の観点から動物発がん性から培養細胞を利用する代替法が開発されつつある。しかし、培養細胞での方法論は、生体での変化を確認することは困難である。そのため、動物モデルでの評価法はいまだに必要不可欠と考えられるが、国際的に動物試験に対する 3R (代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則は、動物系実験を肯定的に考える我々研究者も当然考慮すべきものである。このため、腫瘍形成を正確に判定し得る病理組織学的な評価を基とした各臓器別の発がん試験として短・中期でのバイオアッセイ系の開発はその一つの解決策と考えている。実際、ヒトの場合においても各臓器のがんの早期発見がその治療と予後に重要な関与があることは周知の事実であり、実際、ヒトのがんの診断に病理組織診断が利用されるようになった 150 年ほどの間に、生検標本での病理診断技術の発達は、内視鏡的にも病変を認めない場合でも、ランダム生検により、病理組織学的に異型細胞の存在は重要な診断価値があり、その後の精査の対象となっている。しかるに、未知物質の発がん性試験には長期動物実験による肉眼的な腫瘍形成を指標としており、その観察される腫瘍の病理組織学的な検索はあくまでも腫瘍組織を確定するためのものであった。しかし、動物実験においても従前より前がん病変として種々の早期に発現する病巣の研究がなされてきた。その多くの研究は腫瘍発生機序の視点でのものであり、微小な病理組織での判定はなされていなかった。このため、本研究では、前がん病変とされてきたもの

のうち、病理組織学的に腫瘍として認識可能であるものは、その肉眼的な腫瘍形成に関わらず、腫瘍として認められるものを指標とする試験法の開発を目指すことにした。

加えて、動物使用数を減少させるためには、臓器専門性を有する多施設間での動物の共有システムの検討を目的とした。

B. 研究方法

1) 多施設共同システム構築

分担者ごとに動物実験の対象臓器以外の臓器に関して、他施設で研究対象にする臓器を一定の固定・保存状態をするための共通プロトコルを代表者がまとめることにした。

2) 中・短期バイオアッセイ系

胃

ヒト胃癌において、術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy, NAC)の有無、胃型・腸型形質発現と γ -H2AX の発現を検討した。胃癌ブロックより直径 8mm のパンチ生検用器具を用いがん部分を採取し、合計 18 個の 10x2 組織アレイを作製した。それらを用いて、遺伝子損傷および修復のマーカーとして、 γ -H2AX、activation-induced cytidine deaminase (AID)、p53、ATM (ataxia telangiectasia mutated)、Mre11(meiotic recombination 11)、NBS1 (Nijmegen breakage syndrome)、胃型腸型マーカーとして、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、CDX2 の発現を検討した。MUC5AC あるいは MUC6 陽性の腫瘍を胃型、MUC2 あるいは CD10 陽性のものを腸型、胃型(G)および腸型(I)マーカーのいずれもが陽性のものを胃腸混合型(GI)、いずれのマーカーも陰性のものをヌル型

(N)と判定した。 γ -H2AX に関しては、Allred scoring system により Proportion score (PS) : 0 (陰性) 1 ($\leq 1\%$) 2 (1- 10%) 3 (11- 33%) 4 (34- 66%) 5 (67- 100%陽性); Intensity score (IS) : 0 (陰性) 1 (弱陽性) 2 (中等度陽性) 3 (強陽性) にスコアリングし、PS と IS の積 > 5 を陽性とし、統計学的に解析した。他のマーカーは 0~3 の 4 段階にスコアリングした。

大腸

4 週齢の F344 ラットに対し、発癌剤 azoxymethane (AOM; 15 mg/kg 体重) を投与して、40 週時での大腸発癌を誘発された大腸腫瘍を用いて、その杯細胞形成に関係する遺伝子と考えられている Klf4 の mRNA 発現を検討し、前がん病変にみられる粘液涸渇病巣 (mucin-depleted foci; MDF) の特性を検討した。

肝臓

動物は 10 週齢の雄性 *gpt delta* F344 ラット 12 匹を用いた。実験開始時より無処置群、92 ppm dimethylarsinic acid (DMA) 飲水投与群の各群 6 匹ずつの 2 群に分けて 13 週まで飼育し、剖検を行った。なお、DMA の 92 ppm は膀胱発がん性、肝発がん促進作用を示した用量である。得られた肝臓より genomic DNA を抽出し、突然変異を検出する *gpt* assay および欠失変異を検出する Spi⁻ assay をそれぞれ行い、DMA の *in vivo* 変異原性の有無について評価を行った。さらに *gpt* assay では得られた変異体について、キャピラリーシーケンサーでレポーター遺伝子である *gpt* 遺伝子の変異を同定し、そのスペクトラム解析を行った。

肺臓

8 週齢の F344 ラット 46 匹を 4 群に分け、それぞれ 1 群 : 12 匹、2 群 : 13 匹、3 群 : 12 匹、4 群 : 13 匹とした。実験開始の 0 週目から発がん物質を投与した。1 群には水道水を溶媒とした 0.1%DHPN をラットの自由に 2 週間飲水投与し、2 群には urethane を 1g/kg body weight の用量 (10ml 生理的食塩水に 1g urethane の濃度で溶解) で 1 週間おきに合計 10 回腹腔内投与した。3 群では、実験開始時に 30mg/kg body weight の用量 (10ml 生理的食塩水に 30mg DMN の濃度で溶解) で単回の腹腔内投与を行った。4 群には実験開始時に benzo[a]pyrene を 20mg/kg body weight の用量 (10ml 生理的食塩水に 1g benzo[a]pyrene の濃度で溶解) で単回の気管内投与を行った。

肺では、肺内へのホルマリン注入固定と肺重量測定した。肝、膀胱、前立腺、胃、大腸については、本研究班の臓器取り扱いマニュアルに従って処理を行い、それぞれを分担研究者に送付した。

膀胱

6 週齢の雄 F344 ラットに、0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)、2% 2,2-bis(bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、1.8% 2-nitroanisole (2-NA)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、3% melamine、または 3% uracil を 4 週間混餌 (BBN のみ飲水) 投与した。

各群 10 匹を用い、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖した。膀胱を採材し、尿路上皮における H2AX および Ki67 の発現を免疫組織化学的に解析した。さらに、0.025% 2-acetamidofluorene (2-AAF)、1% *p*-cresidine、0.02%/0.01% dimethylarsenic acid (DMA)、0.04% glycidol、0.001% *N*-nitrosodiethylamine (DEN)、または 0.005% acrylamide (AA) の投与実験 (2-AAF、*p*-cresidine のみ混餌、他は飲水投与) を同様に実施した。

前立腺

6 週齢 F344 雄ラットに、PhIP 100 mg/kg で週 2 回強制胃内投与を 10 週間行い、60 週齢で屠殺剖検した前立腺腹葉において認められた腫瘍病変、6 週齢 F344 雄ラットに、DMAB 50 mg/kg で皮下に 2 週間に 1 回を 20 週間行い、60 週齢で屠殺剖検した前立腺腹葉において認められた腫瘍病変およびヒト前立腺癌を含む前立腺組織について、免疫組織染色を行い、H2AX、HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

3) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

網羅的な DNA 付加体解析法

1,4-ジオキサンを 0, 20, 200 及び 5000 ppm の濃度で、雄性 F344 ラット (各群それぞれ 5 匹) に 16 週間飲水投与した後、肝臓を摘出し、DNA を抽出した。各種ヌクレアーゼにより DNA をモノヌクレオシドに分解し、DNA 付加体を質量分析機器を用いて解析した。また、得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析し、ジオキサン投与に相関する付加体の抽出を実施した。抽出した DNA 付加体の同定は、独自に構築した DNA 付加体データベースとの比較により行った。抽出した付加体の各サンプル中の存在量は、定量分析用の質量分析機器 (Waters Quattro Pt LC-MS/MS) により分析した。

ヒストン修飾を指標とした解析法

各種培養細胞に化学物質などを作用後、一定時間後のヒストン修飾変化をウエスタンブロット法で検出した。本年度は、DNA 損傷マーカーとして知られる H2AX (Ser139) に焦点を絞り検討した。また、蛍光免疫染色により、リン酸化パターンを解析した。

(倫理面への配慮)

全ての分担者の動物施設においての規程に基づいて、実験計画の許可とともに、遺伝子を利用する場合はそれぞれの施設での組み換え DNA 実験委員会の許可を得、厳正に動物愛護と倫理面を配慮した実験を施行した。また、胃と前立腺の検討ではヒト検体を検討したが、いずれもインフォームド・コンセントの得られた症例を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

C. 研究結果

1) 多施設共同システム構築

上記の動物系実験をしている施設での専門臓器に関するの摘出とその保存と前がん病変同定の方法

プロトコールを PDF としてまとめた。

実際、今年度、香川大から肺臓モデル実験系と国立衛研の膀胱モデルで得られた種々の臓器を、マニュアルに沿って保存、搬送を試みた。

なお、琉球大へのホルマリン保存大腸は航空便では既存の宅配便では輸送できないことが判明した。但し、船便では可能であった。

現在、各施設での専門臓器での解析を実施中である。

2) 中・短期バイオアッセイ系

胃

組織アレイを作製したヒト胃癌のうち、140 例の進行胃癌を対象とした。そのうち NAC を施行していない症例が 79 例、NAC をした症例が 52 例であった。残りは未確認のため除外した。NAC なし症例の H2AX 陽性/陰性例比は、G 3/8, G1 1/22, I 3/27, GI 3/27, N 2/13、NAC あり症例では、G 3/10, GI 0/18, I 4/12, N 1/4 であった。NAC の有無による有意な差は確認できなかったが、NAC あり症例で 11.4%、NAC なし症例で 15.4%が H2AX 陽性であることが明らかとなった。ATM、Mre11 は全体に発現量が多く、NBS は逆に全体に発現量が少なく有意な差は得られなかった。現在、腫瘍全体でなく、H2AX 陽性局在部位について胃型腸型形質、細胞増殖能等との相関性について、検索中である。

大腸

33 個の大腸腫瘍から抽出した mRNA において、KLF4 発現 (GAPDH 遺伝子発現との比) は平均 0.79 であり、周辺の正常大腸粘膜の比の平均 2.15 と比べると有意な減少を認めた。前がん病変としての変異陰窩巢 (ACF) や MDF での発現を今後検討している。

肝臓

gpt delta ラットを用いた *in vivo* 変異原性解析の結果、肝臓において DMA が変異体頻度の有意な変化を誘発しないことが明らかとなった。また、*gpt* 変異体についてスペクトラム解析を行った結果、無処置群と比較して DMA 投与群で有意な変異スペクトラムが認められなかった。

肺臓

現在、実験は 16 週の解剖を終え、32 週に向けて実験は進行中である 16 週目における摘出肺の肉眼所見は、3 群 (DMN) を除くすべての群で、肺表面が粗造な印象であった。また、1 群 (DHPN) 2 群 (urethane) 3 群 (DMN) のいずれも、肺表面に小結節が認められた。組織学的には hyperplasia、adenoma、lymphocyte infiltration が見られた。2 群 (urethane) では明らかな上皮増殖性病変は見られなかった。

膀胱

遺伝毒性膀胱発がん物質である BBN および 2-NA を 4 週間投与したラット膀胱上皮には、H2AX の発現が基底細胞 (basal cell) を中心に高頻度に認められた一方、対照群にはほとんど観察されなかった。細胞 1000 個あたりの H2AX 陽性細胞数 (\pm SD) は、BBN 群 76 ± 21 および 2-NA 群 111 ± 37 で、

対照群 0.8 ± 0.6 と比較して有意に高かった。BMP および PEITC (過形成誘発、遺伝毒性 \pm) 群では、

H2AX 発現はそれぞれ表層細胞 (superficial cell) と中間細胞 (intermediate cell) に多い傾向を示し、陽性細胞数は 8.3 ± 6.6 ならびに 26 ± 9.0 であった。非遺伝毒性の膀胱発がん物質である melamine および uracil 群には局所的に H2AX 発現を示す部位がみられたが、陽性細胞の割合は遺伝毒性発がん物質と比較して低かった。2 週間の休薬後、すべての群で H2AX 発現は減少したものの、BBN および 2-NA 群では比較的多くの残存が認められた。Ki67 発現は、4 週時には BMP 群以外の各群で上昇し、休薬後には BBN 群を除いて対照群とほぼ同じレベルにまで低下した。現在、DEN および AA など膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質についても同様の解析を実施しており、H2AX による評価の臓器特異性を検証する予定である。

前立腺

PhIP および DMAB 誘発の前立腺腫瘍性病変において、HMGB2 および Ki-67 標識率は周囲正常前立腺上皮に比べ、有意に上昇した。一方、 \square -H2AX 標識率は染色性に問題があり、正常上皮及び腫瘍性病変において差が見られなかった。ヒト前立腺組織においては、正常前立腺上皮に比べ、H2AX、HMGB2 および Ki-67 標識率いずれも腺癌で有意な上昇を認めるとともに、組織形態の指標である Gleason grade の上昇に比例して、各標識率の有意な上昇を確認した。

3) 新規 *in vitro* 発がん性予測試験

網羅的な DNA 付加体解析法

1,4-ジオキサンを投与したマウス肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なった結果を図 1 に示す。溶媒対象と比較し、1,4-ジオキサン投与により、付加体の総数は増加する傾向が観察されたが、必ずしも 1,4-ジオキサンの濃度とは相関しなかった。更に、主成分 (PCA) 解析を行なったところ、各投与群毎のクラスターに分類され、1,4-ジオキサン投与に相関する付加体として、複数個の付加体が抽出された。このうち、1,4-ジオキサン 5000ppm 投与群からは 6 つの特異的な付加体が検出された。検出された特異的な付加体の *m/z* 値および溶出時間を DNA 付加体データベースと比較した結果、炎症及び酸化ストレス由来の付加体であることが示唆された。

ヒストン修飾を指標とした解析法

化学物質など作用後、アポトーシスが誘導されると、顕著な γ -H2AX の誘導が認められた。免疫染色では、それらは、DNA 損傷に基づくリン酸化パターンとは明らかな違いを示した。DNA 損傷能を有さない化学物質作用においても γ -H2AX の誘導が確認された。特に、界面活性剤、熱などによるリン酸化は顕著であった。いずれも細胞周期依存性や活性酸素種生成を起因としておらず、通常の DNA 損傷に基づくリン酸化とは異なる機構で誘導

されたものと考えられた。

D. 考察

前年度までの研究として、大腸と肺臓での早期がん病巣を特定できる中短期モデルの可能性が示唆されたため、今年度は、その2臓器に関しては標準的な検索法を目指し、各施設での標準的なプロトコールでのマニュアル作成をまとめ、多施設間での検討に入った。

大腸の前がん病変である ACF と MDF での粘液成分に關与する杯細胞発生に關与する(iPS 細胞作成にも必要な遺伝子でもあるが)Klf4 遺伝子の発現が大腸腫瘍で著明に抑制されている事実も今回確認できた。そのため、これらの早期の病理組織学的検索は発がん性試験として十分に利用できると考えられた。また、肺臓では免疫組織学的に Napsin A の染色性で発がん予測として役立つと考えられたが、現在、固定方法の標準化を施行している過程である。

肝臓では従来からの伊東モデルと加えて、変異原性・遺伝毒性を *in vivo* で確認できる *gpt-delta* ラットを利用することで、変異原性・発癌モデルとして利用できる可能性を示唆したが、経済的な側面での考慮が必要である。

胃・膀胱・前立腺での検討臓器では、今年度までの研究成果として *in vitro* 系での新規予測マーカーとして H2AX を検討し、H2AX 発現が、ヒトでの胃癌や前立腺癌での腫瘍マーカーとなる可能性やラットを用いた短期反復投与試験における遺伝毒性膀胱発がん物質の早期検出指標となる可能性が示唆されたものの、今後更なる検討が必要と思われる。

新規 *in vitro* 系での試験においては、付加体解析ではマウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質 1,4-ジオキサンの発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後、本解析で抽出された 1,4-ジオキサンに關する付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう必要がある。更に、アダクトーム法の他の遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん物質のリスク評価への応用についても検討を行なう。また、H2AX 発現に關する *in vitro* 系検討で DNA 損傷能を有さない化学物質においても顕著な H2AX が認められたことから、組織免疫染色におけるポジティブな H2AX のデータは、幾つかのアーティファクトの可能性を加味して、慎重に評価されるべきと考えられ、*in vivo* 系への応用の困難さが示された。

E. 結論

動物を供する発がん試験における代替法の確立は化学物質のヒトへの安全性に対して重要である。しかし、動物実験に対する 3R(代替法活用、使用数削減、苦痛軽減)の原則は決して動物を使用しないということではないため、今回の研究目標はその精神に基づいて動物での発がん、すなわち、従来からの伊東法による肝臓モデルとともに、大腸と肺臓モデルでは腫瘍形成の有無を推測できるシステムの構築の確立が可能と位置づ

けることができると思われる。しかし、他の臓器での *in vitro* 系からの予測マーカーとして H2AX の有用性の検討は重要であると考えられるが、H2AX は、DNA 損傷以外にもいくつかの要因で誘導される可能性が考えられるので、それらを加味した評価も考慮する必要が出てきた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okochi-Takada E., Tsukamoto T. et al. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene* 33: 2273-2278, 2014.
- 2) Toyoda T., Tsukamoto T. et al. Molecular mechanism of gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected rodent models. *Diseases* 2: 168-186, 2014.
- 3) Tsukamoto T., Tatematsu M. Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Neoplasia. *Curr Infect Dis Rep* 16: 402, 2014.
- 4) 塚本徹哉, 桐山諭和, 柴田知行 【ヘリコバクター・ピロリ感染胃炎を診る、治す】 *H.pylori* 胃炎除菌による胃内環境への影響 除菌による病理組織学的所見の変化. *臨牀消化器内科* 29: 337-344, 2014.
- 5) 塚本徹哉, 桐山諭和, 立松正衛. 3. 胃癌ハイリスクの病理学的背景— 発癌仮説, 前癌病変, 前癌状態—. In: 一瀬雅夫, 岡政志, 齋藤博 編. *胃癌リスクファクターとリスク診断— とくに ABC 検診の現状と問題点の正しい理解のために* —. 東京: 日本メディカルセンター, 2014; 29-37.
- 6) Doguchi H., Yoshimi N. et al. The Enhancing Effects of Hyperbaric Oxygen in Mouse Skin Carcinogenesis. *J. Toxicol Pathol* 27: 67-72, 2014.
- 7) Morioka T., Yoshimi N. et al. Ionizing radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in *Mih1*-deficient mice. *Cancer Sci*, 2015 in press.
- 8) Yamada T., Wei M. et al. Inhibitory effect of raphanobrassica on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Food Chem Toxicol* 70: 107-113, 2014.
- 9) Tago Y., Wei M. et al. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing *Phaffia rhodozyma* extract. *J Toxicol Sci*, 39, 373-382, 2014.
- 10) Kakehashi A., Wei M. et al. Valerian Inhibits Rat Hepatocarcinogenesis by Activating GABA(A) Receptor-Mediated Signaling. *PLoS One* 9(11):

- e113610, 2014.
- 11) Kuwae Y, Wei M. et al. Paraneoplastic Mucicopolysaccharide Antigen-Like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*, 44, 106-115, 2015.
 - 12) Wei M. et al. Isoleucine, leucine and their role in experimental models of bladder carcinogenesis. *Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition*, Vol 1, 253-260, 2015.
 - 13) Wei M. et al. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. *Toxicol Sci*, 2015 in press.
 - 14) Yokohira M. et al. Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 66: 117-123, 2014.
 - 15) Yokohira M. et al. Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.* 27:175-182, 2014.
 - 16) Sato S., Suzuki S. et al. Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. *J Toxicol Pathol* 27: 43-49, 2014.
 - 17) Nakasuka, K., Suzuki S. et al. A case of idiopathic giant cell myocarditis with a past history of sarcoidosis. *J Card Cases*, 9: 35-39, 2014.
 - 18) Dodmane, PR., Suzuki S. et al. Characterization of intracellular inclusions in the urothelium of mice exposed to inorganic arsenic. *Toxicol Sci*, 137: 36-46, 2014.
 - 19) Oomura, M., Suzuki S. et al. Intravascular lymphomatosis mimicking primary central nervous system lymphoma: A case report and literature review. *Case Rep Neurol*, 6: 101-108, 2014.
 - 20) Arnold, LL., Suzuki S. et al. Time course of urothelial changes in rats and mice orally administered arsenite. *Toxicol Pathol*, 42: 855-862, 2014.
 - 21) Naiki, T., Suzuki S. et al. GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration resistant prostate cancer. *Carcinogenesis* 35: 1962-1967, 2014.
 - 22) Hachiya, K., Suzuki S. et al. Double-valve replacement for mitral and aortic regurgitation in a patient with Libman-Sacks endocarditis. *Intern Med*, 53: 1769-1773, 2014.
 - 23) Arima, H., Suzuki S. et al. IV injection of polystyrene beads for mouse model of sepsis causes severe glomerular injury. *J Intensive Care*, 2: 21, 2014.
 - 24) Yamashita, Y., Suzuki S. et al. Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 28: 111-117, 2015.
 - 25) Suzuki S. et al. Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. *J Toxicol Pathol*, 28: 21-26, 2015.
 - 26) 佐藤慎哉、鈴木周五 他 前立腺癌に対するHDAC阻害剤の予防および治療効果の検討. *泌尿器外科*, 27巻8号: 1217-1219, 2014.
 - 27) 佐藤慎哉、鈴木周五 他 肝癌の危険因子と発癌機序. その他の化学物質発がん(アフラトキシン、ニトロソ化合物など). *日本臨床*, 73(増刊号1): 142-146, 2015.
 - 28) Toyoda T, Ogawa K. et al. A 13-week subchronic toxicity study of ferric citrate in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 74: 68-75, 2014.
 - 29) Toyoda T, Ogawa K. et al. A 13-week subchronic toxicity study of sodium iron chlorophyllin in F344 rats. *J Toxicol Sci*, 39: 109-119, 2014.
 - 30) Onami S, Ogawa K. et al. Absence of *in vivo* genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4 week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats. *Mutagenesis*, 29: 295-302, 2014.
 - 31) Akagi J, Ogawa K. et al. Validation study of the combined repeated-dose toxicity and genotoxicity assay using *gpt* delta rats. *Cancer Sci*, 2015 in press
 - 32) Totsuka Y. et al. *In vivo* genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and L-tryptophan. *Mutat Res.*, 760: 48-55, 2014.
 - 33) Totsuka Y. et al. Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response. *Nanomaterials*, 4: 175-188, 2014.
 - 34) Kochi T, Totsuka Y. et al. A novel aromatic mutagen, 5-amino-6-hydroxy-8*H*-benzo[6,7]azepino[5,4,3-*de*]quinolin-7-one (ABAQ), induces colonic preneoplastic lesions in mice. *Toxicology Reports*, 1: 69-73, 2014.
 - 35) Goto M, Totsuka Y. et al. Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with

exocyclic etheno-DNA adducts. Free Radic Biol Med., 75: 136-146, 2014.

- 36) Yoshida I., Ibuki Y. Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 770: 9-18, 2014.
- 37) Kubota T., Ibuki Y. et al. Phosphorylation of Histone H2AX Generated by Linear Alkylbenzene Sulfonates and its Suppression by UVB Exposure. Photochem. Photobiol. 90: 845-852, 2014.
- 38) Ibuki Y. et al. Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. Carcinogenesis 35: 1228-1237, 2014.

2. 学会発表

- 1) 桐山諭和、塚本徹哉 Expression of γ -H2AX in gastric carcinogenesis in human and rodent models. 第73回日本癌学会総会、2014年、横浜
- 2) Tsukamoto, T. et al. Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model. The 8th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, 2014, Fukuoka
- 3) Takamatsu, R. Yoshimi, N. et al. Okinawan herb, *Bidens pilosa*, induces apoptosis through up-regulation of death receptor 5 in human colon carcinoma cells. 第73回日本癌学会総会、2014年、横浜
- 4) 山野荘太郎、魏 民、他 マウス肺扁平上皮癌において気管支肺胞幹細胞がオリジンである可能性. 第103回日本病理学会総会、2014年、広島
- 5) 梯アンナ、魏 民、他 ヒト肝細胞癌におけるLC-MS/MS及び*in vitro*機能解析を用いた新規特異的候補分子ターゲットの検討. 第103回日本病理学会総会、2014年、広島
- 6) 三島胡桃、魏 民、他 EHEN 誘発ラット腎発がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する. 第103回日本病理学会総会、2014年、広島
- 7) 福島昭治、魏 民、他 化学発がん物質のリスク評価における閾値問題. 第41回日本毒性学会学術年会、2014年、神戸
- 8) 石井真美、魏 民、他 ヒト肝細胞癌組織における癌幹細胞マーカーとしての CD44v9 の検討. 第11回日本病理学会カンファレンス、2014年、神戸
- 9) 下村衣里、魏 民、他 ハムスターBOP二段階胆膵管発がんモデルを用いた1,2-dichloropropaneの発がん修飾作用の検討. 第29回発癌病理研究会、2014年、いわき
- 10) 三島胡桃、魏 民、他 EHEN 誘発ラット腎発がんにおける発がん機序の解明 PI3K/Akt/mTOR signaling pathway 及び NADPH oxidase の役割. 第29回発癌病理研究会、2014年、いわき
- 11) 山野荘太郎、魏 民、他 腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用. 平成26年度がん若手研究者ワークショップ、2014年、茅野
- 12) 魏 民、他 ハムスター化学発がんモデルを用いた1,2-dichloropropaneの発がん修飾作用の検討. 第73回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 13) 石井真美、魏 民、他 ヒト NASH 肝細胞癌におけるプロテオーム解析を用いた分枝メカニズムの検討. 第73回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 14) 藤岡正喜、魏 民、他 gpt delta ラットを用いた2-AAFの肝発がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討. 第73回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 15) 梯アンナ、魏 民、他 ヒト肝細胞癌における新治療ターゲットの検索: CNPY2 及び CACHD1. 第73回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 16) Yamano S, Wei M. et al. Cancer initiating cell of lung squamous cell carcinoma in mice might be derived from the bronchiolar alveolar stem cell. 39th EAMO Congress, 2014年、Madrid, Spain
- 17) 鰐淵英機、魏 民 ヒ素の発がん機序の解明. 第60回日本病理学会秋期特別総会、2014年、浦添
- 18) 下村衣里、魏 民、他 ハムスターBOP二段階胆膵管発がんモデルを用いた1,2-dichloropropane(1,2-DCP)の発がん修飾作用の検討. 第31回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会、2014年、東京
- 19) Anna Kakehashi, Wei M. et al. CNPY2 and CACHD1 as novel molecular markers of hepatocellular carcinoma. 第31回日本毒性病理学会学術総会、2015年、東京
- 20) 藤岡正喜、魏 民、他 非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がんメカニズムの検討. 第31回日本毒性病理学会学術総会、1月29~30日、東京、2015.
- 21) 三島胡桃、魏 民、他 ラット同所同種移植による新規腎癌肺転移モデルの確立及び評価. 第31回日本毒性病理学会学術総会、2015年、東京
- 22) 下村衣里、魏 民、他 ハムスターBOP二段階胆膵管発がんモデルを用いた1,2-dichloropropane(1,2-DCP)の発がん修飾作用の検討. 第31回日本毒性病理学会学術総会、2015年、東京
- 23) 山野荘太郎、魏 民、他 腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用. 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、2015年、大津
- 24) 平山幸良、魏 民、他 肝微小環境が及ぼす転移性腎癌への影響. 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, 2015年、大津
- 25) 三島胡桃、魏 民、他 腎細胞癌肺転移新規モデルの構築及び評価. 第 14 回分子予防環境医学研究会, 2015年、大阪
- 26) 下村衣里魏 民、他 1,2-DCP 投与によるハムスターおよびマウスの肝毒性メカニズムの検討. 第 14 回分子予防環境医学研究会, 2015年、大阪
- 27) 鈴木周五、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第 103 回日本病理学会総会、2014年、広島
- 28) 佐藤慎哉、鈴木周五、他、選択的 HDAC 阻害剤による前立腺癌増殖抑制効果の検討、第 103 回日本病理学会総会、2014年、広島
- 29) 鈴木周五、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第 73 回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 30) 鈴木周五、他、Pioglitazone によるラット前立腺発癌抑制効果、第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2014年、東京
- 31) Suzuki, S. et al., Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis, SOT Annual Meeting, 2014年、San Diego, USA
- 32) 豊田武士、小川久美子、他 ラット膀胱上皮細胞における H2AX 発現の検討. 第 41 回日本毒性学会学術年会、2014年、神戸
- 33) 豊田武士、小川久美子、他 ラット膀胱に対する遺伝毒性発がん物質検出指標としての H2AX 発現. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 34) 豊田武士、小川久美子、他 ラット膀胱に対する遺伝毒性および発がん性評価指標としての H2AX. 第 31 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2015年、東京
- 35) 戸塚ゆ加里、中釜 斉 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析により発がんに関わる DNA 付加体を探索する. 第 41 回毒性病理大会、2014年、神戸
- 36) 後藤正憲、戸塚ゆ加里、他 Analyses of genotoxicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane, being responsible for occupational bile duct cancer, 第 73 回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 37) 椎崎 一宏、戸塚ゆ加里、他 Identification of the location of DNA adducts within the genome, 第 73 回日本癌学会学術総会、2014年、横浜
- 38) 池田 茜、戸塚ゆ加里、他 中国における食道癌発症要因の集学的アプローチによる解明、第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 39) 後藤正憲、戸塚ゆ加里、他 職業性胆管癌及びジクロロプロパン曝露細胞の塩基置換シグネチャー解析、第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 40) 椎崎 一宏、戸塚ゆ加里、他 ゲノム中の DNA 修飾の単分子検出方法の検討、第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 41) 秋元峻太郎、戸塚ゆ加里、他 非遺伝毒性発がん物質、1,4-ジオキサン投与ラット肝臓における DNA 付加体の網羅解析、第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 42) 伊吹裕子、豊岡達士 環境化学物質の光分解と遺伝毒性変化：リン酸化ヒストン H2AX を指標とした解析. 第 134 回日本薬学会、2014年、熊本
- 43) Ibuki, T. et al. 17- β -estradiol-induced hyperacetylation of histone H3 and change of sensitivity to UVB. The 11th Japan-China International Symposium on Health Sciences, 2014, Shizuoka
- 44) 楊光、伊吹裕子 ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇と DNA 損傷修復の遅延. 第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 45) 伊吹裕子、Vivienne Reeve: 長波長紫外線 UVA1 によるヒストン修飾変化 第 36 回日本光医学・光生物学会、2014年、大阪
- 46) 趙曉旭、伊吹裕子 フローサイトメーターの側方散乱光と histone H3 リン酸化を指標とした銀ナノ粒子の生体影響評価手法の開発. 第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京
- 47) 楊光、伊吹裕子 ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇と DNA 損傷修復の遅延. 第 43 回日本環境変異原学会、2014年、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

大腸を標的とする中・短期発がんモデルの開発に関する研究

研究分担者 吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科・腫瘍病理学講座 教授

研究要旨

本研究の目的の一つとして多施設での病変を共有化することがあり、専門にしていなかった施設での大腸病変の検索のためのマニュアルを作成するとともに、他臓器での同様の病変のマニュアル集をまとめ、研究班に共有化を実施した。今後、他施設で実験された大腸粘膜での検討を実施することができると考えられる。また、今年度は、モデルでの病変として重要と考えられる粘液涸渇巣(mucin-depleted foci; MDF)に関係すると考えられる粘液成分の解析のために、これまでに作製していた腫瘍性病変における粘膜細胞に関する Klf4 遺伝子の発現を検討し、腫瘍での発現の低下を確認した。

A. 研究目的

ヒト大腸発がん過程において、腺腫・癌連鎖仮説で説明がつかない平坦型大腸癌が最近注目されている。動物モデルでみられる mucin-depleted foci (MDF)は平坦型の前がん病変の可能性がある。そのため、従前から動物モデルでの前がん病変として認識され、発がん予測バイオマーカーとして利用されている aberrant crypt foci (ACF)との病理組織学的な経時的な変化に関して検討し、本研究目的である中・短期での発がん試験への利用の可能性を検討した。

B. 研究方法

1. 共通化マニュアル集に関しては、大腸に関しては、従来、実施してきた方法論をできるだけ簡便化させて、写真等も加えて、作成した。
2. 4週齢のF344ラットに対し、発癌剤 azoxymethane (AOM; 15 mg/kg 体重)を投与して、20~40週時での大腸発癌を誘発された大腸腫瘍の凍結検体を用いて、その杯細胞形成に関係する遺伝子と考えられている Klf4 の mRNA 発現を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、琉球大学動物実験施設の実験動物委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。

C. 研究結果

1. マニュアル集は班員全員分をまとめて、PDFとして12ページ程度にまとめた(本稿の別紙を参考)。ここへの収録は省略する。香川大から肺臓モデル実験系と国立衛研の膀胱モデルで得られた。琉球大へのホルマリン保存大腸は航空便では既存の宅配便では輸送できないことが判明したものの、船便では可能であった。現在、病変を検討している。

2. 33個の大腸腫瘍から抽出した mRNA において、Klf4 発現(GAPDH 遺伝子発現との比)は平均 0.79 であり、周辺の正常大腸粘膜の比の平均 2.15 と比べると有意な減少を認めた(下表)。前がん病変としての ACF や MDF での発現の比較を今後予定している。

| Klf4 の発現 | |
|------------------|-------------|
| | 発現量 / GAPDH |
| 正常大腸粘膜 (n=10) | 2.15 ± 0.33 |
| 大腸腫瘍 (腺腫) (n=33) | 0.79 ± 0.12 |

D. 考察

マニュアル集のまとめは、今後、研究班においてのみならず、こうした中・短期モデルでの発がん性試験としての確立に大いに役立つものと思われる。

また、大腸の前がん病変である ACF と MDF での粘液成分に關与する杯細胞発生に關与する(iPS 細胞作成にも必要な遺伝子でもあるが)Klf4 遺伝子の発現が大腸腫瘍で著明に抑制されている事実も今回確認できたので、特に MDF の病変は発がん性試験において、本研究の目的である中・短期での病変に強く関わることを示唆する結果と思われた。

E. 結論

大腸に関してはの前がん病変での発がん性予測は可能と考えられるため、短中期モデルにより、新規化学物質リスクに利用できるとと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Doguchi H., Yoshimi N. et al. The Enhancing Effects of Hyperbaric Oxygen in Mouse Skin Carcinogenesis. J. Toxicol Pathol 27: 67-72, 2014.
- 2) Morioka T., Yoshimi N. et al. Ionizing

radiation, inflammation, and their interactions in colon carcinogenesis in Mlh1-deficient mice. Cancer Sci, 2015 in press.

2. 学会発表

- 1) 高松 玲佳, 渡慶次 愛, 吉見 直己: Okinawan herb, *Bidens pilosa*, induces apoptosis through up-regulation of death receptor 5 in human colon carcinoma cells. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014. 9.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 26 年度厚生労働省研究助成金
(化学物質リスク研究事業)

短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究
サンプル取り扱いマニュアル

研究課題番号 H26 - 化学 - 指定 - 001

目 次

【一】サンプル収集マニュアル

| | |
|------------|---|
| A. 肺 | 3 |
| B. 消化管 | |
| . 胃 | 4 |
| . 大腸 | 5 |
| . 消化管の腺管分離 | 5 |
| C. 肝臓 | 7 |
| D. 膀胱 | 8 |
| E. 前立腺 | 8 |

【二】サンプルの送付について

| | |
|---------------|----|
| A. 肺 | 10 |
| B. 消化管 | |
| . 胃 | 10 |
| . 大腸 | 10 |
| C. 肝臓 | 11 |
| D. 膀胱 | 11 |
| E. 前立腺 | 11 |
| F. 凍結サンプルについて | 12 |

【一】 サンプル収集マニュアル

A. 肺

(ア) 固定方法

1. 気管より肺に固定液（10%中性緩衝ホルマリン液）を注入する。
ピンセットで気管切断口をつまんで閉じたまま、気管切断部よりやや尾側の気管本幹に注射針（ラット、マウスとも25G針を使用）を刺入する。
2. 全ての肺葉が膨らむまで固定液を注入し、すべての葉が膨らんだ直後に注入をストップする。（注入し過ぎると肺胞壁が破壊されるため、適切な圧での注入が要求される。）
3. 注入後、それぞれの肺葉を全て気管より切離し、6葉全てを固定液中に浸漬する。
4. 24~48時間、固定を行う。
5. 固定終了後すぐ切り出しを行えない場合は、固定時間終了時にエタノール浸漬へ変更する。

(イ) 切り出し（参考）

1. 全個体の肺について、一定の切り出し線で切り出しを行い病理組織切片を作成する。
2. 可能な限り1動物につき、1ブロックに収め、実験計画毎に切り出し線を一定にする。結節数がかなり少ない場合にはその結節が切片上に現れるように切り出しを行う。
3. 基本的に、肺門部に直交する線で切り出しを行う。（図1）
4. 切り出した肺を包埋し、ブロックを作成する。

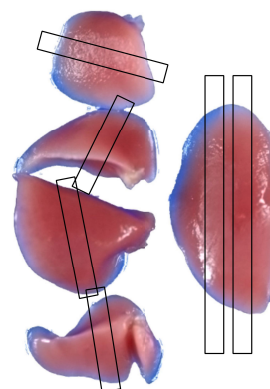


図1. 基本的に肺門部に直交する線で切り出しを行う。

(ウ) 凍結方法

香川大学への凍結サンプルは不要。静岡県立大学への送付用に凍結サンプルを採取する。凍結サンプルは2本分作成し、1本は伊吹先生、もう一本は戸塚先生へ送付する。

1. 肺摘出後、素早く1.5 mLエッペンチューブに入れ、液体窒素で凍結する。
摘出部位は香川大学へ送付する肉眼的結節のある肺以外から採取する。

B. 消化管

胃

(ア) 固定

1. 実験動物（ラット、マウス、スナネズミ等）から胃を摘出する（図 2 はマウスの写真）。
2. 大弯切開し（図 2A）、PBS で洗浄後、広げてピン（注射針などでも可）でシリコン板（発泡スチロール板でも可）に貼り付ける（図 2B）。
3. 必要に応じて凍結サンプルを採取する。
4. 適当な固定液（10%中性緩衝ホルマリン液等）で 16~24 時間程度固定する。
5. 70% エタノール浸漬に替える。
70%エタノール浸漬の状態で発送する。切り出し、包埋等その後の処理は藤田保健衛生大学の方で行う。

(イ) 切り出し

1. 前胃から十二指腸方向に短冊状に 6~8 本程度割を入れる（図 2C）。
2. 包埋カセットに入れて、パラフィン浸透機にかける。

(ウ) サンプルの凍結

1. 腺胃の胃底腺・幽門腺境界部あるいは幽門腺領域から 2~5 mm 角の検体を採取し（図 2B）、複数個に切り分け、マイクロチューブの側面に貼り付け、凍結する。

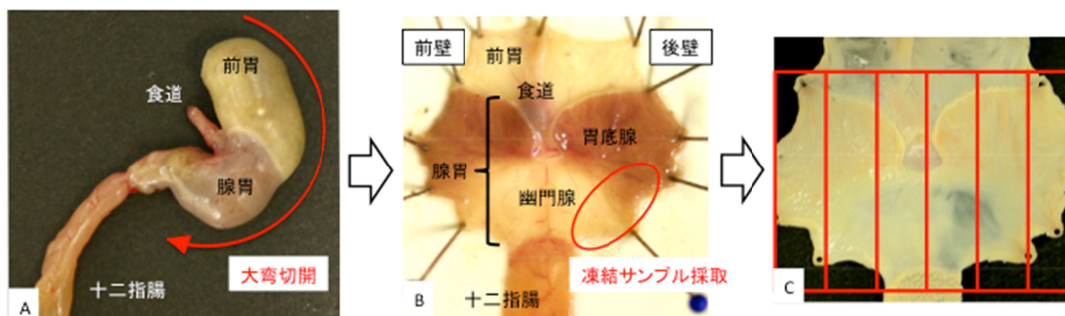


図 2. マウス胃のサンプリング方法。(A)胃を摘出後、大弯切開し、PBS で洗浄する。(B) 台湾切開後、シリコン板に貼付する。必要に応じて凍結サンプルを採取する。10%中性緩衝ホルマリン液等で固定する。(C)固定後、割を入れて 6~8 本程度の短冊を作り、包埋カセットに入れる。

・ 大腸

(ア) 固定

1. 肛門から回盲部回腸末端部までの大腸を摘出し、冷生理食塩水で大腸内部の糞便を洗い流す。
2. 周囲の余分な組織（脂肪など）を除去する。
3. 肛門部を鉗子ないし縫合糸で閉じ、回盲部から上行結腸開始部で切り離す。そこから 10 %中性緩衝ホルマリン液を約 10 mL（F344 ラットの場合）注入する。
4. 鉗子で上行結腸部を閉じ、10 %中性緩衝ホルマリン液に約 5 分間水平に浸す。
5. 腸間膜側に沿って大腸を開き、濾紙の上で伸展させる。ホッチキスで腸管の両端を濾紙に固定する。
6. 濾紙に貼り付けた大腸は、10 %中性緩衝ホルマリン液入りの容器(バット等)に浸漬し、ガラス板（10 cm 平方のものを 2~3 枚程度使用する）で上から固定する(内腔側に湾曲しているため、内腔側を伸展させるために行う)。10 %中性緩衝ホルマリン液中で 12~24 時間固定する。

(イ) サンプルの凍結

凍結材料を収集する場合、予め実験開始時より凍結用に 3 匹程度を各グループ群に追加しておくこと。

1. 外科用のメス（FEATHER surgical blade No. 24）を用いて大腸粘膜面をスクレープして収集する。
具体的には、大腸の肛門側から 1/3 ずつ、スクレープした粘膜組織を各々にアルミホイルで包み液体窒素で凍結する。
また、付加体解析用に摘出した大腸の一部をそのまま液体窒素で凍結する。
2. 凍結サンプルは - 80 で保存する。

・ 消化管の腺管分離

1. 実験動物（ラット、マウス、スナネズミ等）から消化管を単離する。
2. 胃は大弯側で、小腸・大腸は長軸方向に開く。
3. 適当量の組織（胃 1/2、小腸数 cm、大腸 1/4 から 1/2 程度）を採取する。
4. 検体を 15 あるいは 50 mL チューブに入れ、ハンクス緩衝液（Hanks' balanced salt solution , HBSS、細胞保護のため糖分を含む HBSS を使

用)で10秒×2回ボルテックスにかけて洗浄し、表面の食物残渣や粘膜を除去する。

5. 小腸、大腸は予め37℃に加温しておいた30 mM EDTA 加 HBSS に入れ、15~20分インキュベートする。胃は、粘膜内が深いので、EDTAの浸透をよくするため、粘膜内に30 mM EDTA 加 HBSS を注入し、短冊状に割を入れてから EDTA 加 HBSS に入れる。
6. 時間が来たら、5 mL ほどの HBSS に移し、10 秒×数回ボルテックスにかけ、粘膜から腺管を分離する。
7. 適当な固定液(エタノール、ホルマリン、パラホルムアルデヒド等)を入れ、細胞保護のため直ちに固定する。100%エタノールを10 mL 入れれば最終濃度が70%程度になる。
8. 800~1,500 rpm × 3分遠心し、上清を捨てる。
9. 分離腺管を適当な固定液(70%エタノール等)で置換する。懸濁後、1.5 mL チューブ等に移す。
10. 検体は-20℃あるいは4℃で保存可能である。
11. 形態学的、機能的解析あるいは遺伝子発現を解析する。図3に解析例を示す。

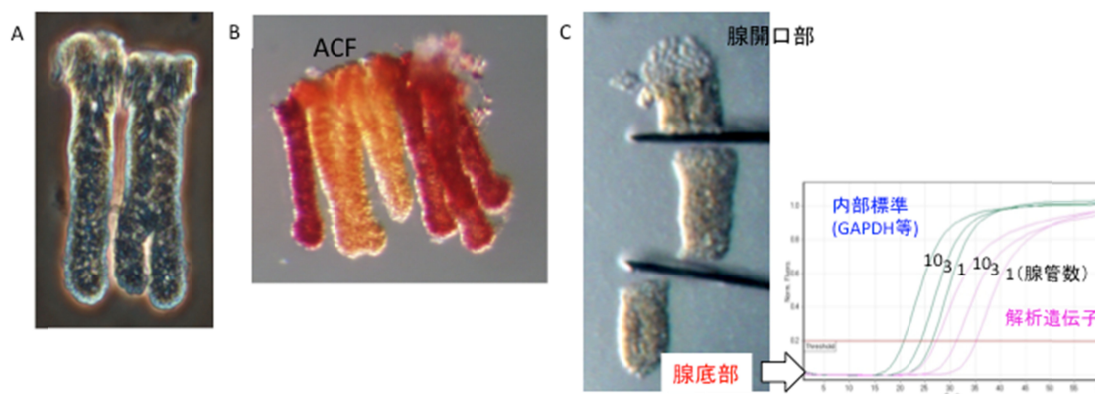


図3. ラット/マウス大腸腺管分離。(A)形態学的観察の例。左右の腺管を比較すると、左は単腺管だが右では腺底部に分枝がある。(B)機能的解析の例。正常腺管は小型でヘキソースアミナーゼ陽性(赤く染色)だが、Aberrant crypt foci (ACF)は大型でヘキソースアミナーゼ陰性である。(C)必要に応じて遺伝子障害刺激に対して感受性の高い腺底部幹細胞領域を単離し、RNA等を抽出して定量的RT-PCR等種々の解析に供する。

C. 肝臓

(ア) 固定

1. 肝臓を生理食塩水で十分に洗い、キムタオルなどで水気を拭きとった後に重量測定を行う。
2. 肝臓を切り出し、組織片を包埋カセットに入れ、10 %中性緩衝ホルマリン液にて固定する。
3. 10 %中性緩衝ホルマリン液による固定は通常 48 時間浸透固定する。また、解剖の翌日に一回は 10 %中性緩衝ホルマリン液の交換を行う。

*今回は試験的に、剖検時に肝臓を葉ごとに 3 つに分け、72 時間の 10 %中性緩衝ホルマリン液浸漬後、70%アルコールに浸漬した状態で発送する。

(イ) 切り出し

1. 図 4 の容量で切り出しを行う。
2. 外側左葉 (LL)、内側右葉 (RM) および右葉尾部 (R2) を辺縁部から 5 mm 程度の位置より約 5 mm 幅で計 3 切片切り出す。

(ウ) サンプルの凍結

魏先生用と戸塚先生用に 2 本作成する。

1. 外側左葉 (LL) の切り出しの際に生じた断片を素早く 1.5 mL エッペンチューブに入れ、液体窒素で凍結する。

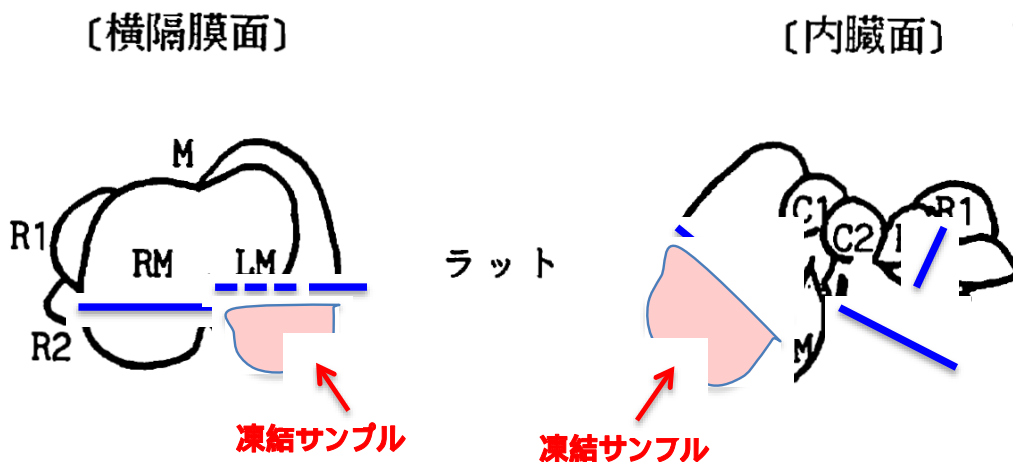


図 4. 肝臓の切り出し図

D. 膀胱

(ア) 固定

1. 尿道より 10 %中性緩衝ホルマリン液を約 0.8 mL 注入し、適度に膨らませ、糸で膀胱の付け根を結紮する。
2. 10 %中性緩衝ホルマリン液内にて 24 時間固定する。
3. 固定後、長軸に沿って正中で半割および水洗し、70%エタノール中で冷蔵保存する。(通常 1 週間以内に細切し、包埋過程に移す。)

(イ) サンプルの凍結

肉眼的に確認できる病変がない場合には、凍結を採取することは少ないが、注入前に隆起性病変が認識される場合は、半割病理組織標本用と凍結標本用を採取する。

肉眼的には認識できないが採取が必要な場合は、尿道から切断した膀胱の頂部を爪楊枝か竹串の鈍端にあて、かぶせるようにして膀胱を裏返し、粘膜上皮を掻き取ってチューブに入れるか、裏返した状態で適切な抽出溶液内にてホモジナイズし採取する。

E. 前立腺

(ア) 固定

1. 尿道の一部を含む状態で膀胱とともに前立腺を採取する。
2. 前立腺腹葉周囲の脂肪組織を剥離し、前立腺腹葉を他の葉から切り離し、臓器重量を測定する(図 5-)。
3. 背側葉および前葉は膀胱および尿道を付けたまま、単離した前立腺腹葉とともに 10 %中性緩衝ホルマリン液で 24 時間固定する。

(イ) 切り出し

1. 他の葉から切り離した前立腺腹葉はそのまま標本作製する。
2. 前立腺背側葉は 10 %中性緩衝ホルマリン液固定後、尿道に対して垂直に(水平断)、側葉および背葉が検討できる部位で切り出す(図 5-)。同部位を標本作製する。
3. 前葉は精嚢と一緒に左右少なくとも 1 片ずつ切り出し、標本作製する(図 5-)。

(ウ) サンプルの凍結

1. 腹葉は 10 %中性緩衝ホルマリン液固定する前の片側を凍結する。
2. 背側葉は周辺の脂肪織を剥離後に、片側を切り分けて凍結する。
(基本的に前葉については凍結組織を用いた検討を行うことは少ない。)

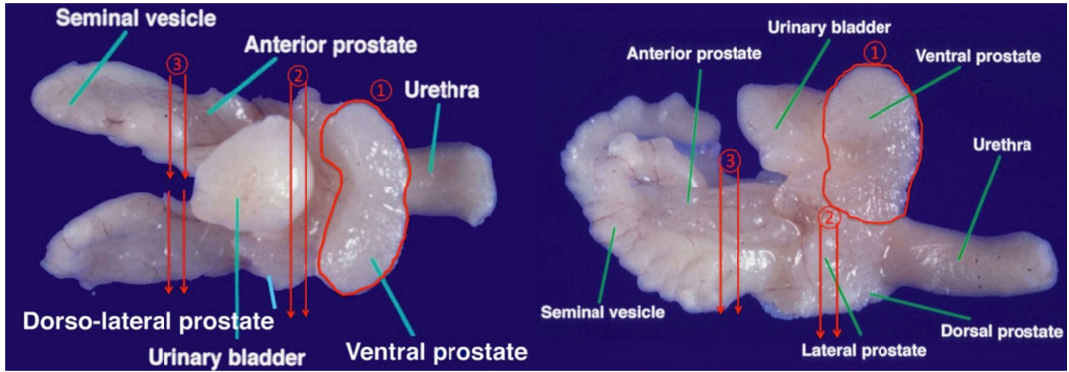


图 5. 前立腺切り出し図

【二】 サンプルの送付について

A. 肺

送付先

横平 政直 香川大学医学部腫瘍病理学

住所：〒761-0793 香川県木田郡三木町池戸 1750-1

e-mail：yokohira@med.kagawa-u.ac.jp

備考

基本的には 10 %中性緩衝ホルマリン液浸漬までを統一基準で行い、肉眼的に肺結節様の病変が有った場合には 48 時間程度でエタノール浸漬に変更し、この状態でパッキングし香川大学へ送付する(1 群につき 5 匹程度、肉眼的結節がある個体が少ない場合には 5 匹未満でも良い)。

肉眼的結節のない場合、肺の摘出、気管から肺内への 10 %中性緩衝ホルマリン液注入、10 %中性緩衝ホルマリン液浸漬までを行う。プロジェクト終了まで 10 %中性緩衝ホルマリン液浸漬状態でパッキング保存する。

余力があれば、切片作製し、組織学的な確認を行う。組織学的に病変があれば香川大学へ連絡する。

B. 消化管

I. 胃

送付先

塚本 徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科

住所：〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1 番地 98

e-mail：ttsukamt@fujita-hu.ac.jp

備考

10 %中性緩衝ホルマリン液等で固定し、翌日 70%エタノールに替え、4 で保存可。この状態で発送する。切り出し、包埋等その後の処理は藤田保健衛生大学の方で行う。

II. 大腸

送付先

吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学

住所：〒903-0215 沖縄県西原町字上原 207 番地

e-mail：yoshimi@med.u-ryukyu.ac.jp

備考

サンプルは 10 %中性緩衝ホルマリン液固定した状態で発送する。空輸はでき

ず、船便での輸送になる。もしくは70%エタノール浸漬し、クール便で送付。

C. 肝臓

送付先

魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学

住所：〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1丁目4番3号

e-mail：mwei@med.osaka-cu.ac.jp

備考

72時間10%中性緩衝ホルマリン液固定後70%エタノール浸漬の状態を送付する。

10%中性緩衝ホルマリン液固定した材料と合わせて凍結材料も送付する。

D. 膀胱

送付先

小川 久美子

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部実験病理学

住所：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

e-mail：ogawa93@nihs.go.jp

備考

膀胱のサンプルは10%中性緩衝ホルマリン液固定後、半割・洗浄し包埋カセットに入れ、70%エタノール浸漬の状態を送付する。

クール宅急便で1週間以内に送付いただけのが理想。

1群5匹あれば十分と思われる。

E. 前立腺

送付先

鈴木 周五 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学

住所：〒467-8601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

e-mail：shugo@med.nagoya-cu.ac.jp

備考

前立腺サンプルは前立腺腹葉単独と、他の部分の前立腺組織は尿道を付けたままで送付する。もしくは、腹葉前立腺や周囲脂肪織を外さず、尿道を付けたまま前立腺組織塊で固定後、送付する。

送付までに時間がかかる場合は70%エタノールに浸漬する。

F. 凍結サンプルについて

送付先

戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所発がんシステム研究分野

住所：〒104 - 0045 東京都中央区築地 5 - 1 - 1

e-mail : ytotsuka@ ncc.go.jp

送付先

伊吹 裕子 静岡県立大学環境科学研究所環境毒性学

住所：〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

e-mail : ibuki@u-shizuoka-ken.ac.jp

備考

付加体解析用サンプルは、固定前の状態で、ある程度の大きさのまま、クライオチューブ等に入れて凍結する。

胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発

研究分担者 塚本 徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

研究要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染とそれに伴って誘発される慢性炎症は、様々な遺伝子異常や発現異常を誘発する。本研究では、ヒト胃癌症例より組織アレイを作製し、胃発がん過程における γ -H2AX などの種々の DNA 損傷マーカーの有用性を検討した。術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy, NAC)を施行していない症例 79 例、NAC を施行した症例 52 例において、胃がんの胃型・腸型形質発現、NAC の有無との相関を検討した。その結果、一部で γ -H2AX を高発現する胃がん症例があったが、ATM、Mre11、NBS1 に関しては有意な相関は見られなかった。発がん初期の遺伝子異常に対する反応とがんの進展時の発現が同じ機構なのか、異なる機構なのかを見極め、発がん初期応答の解明が、腫瘍進展への指標となり得るか、さらに検討が必要と考えた。

A . 研究目的

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は胃発がんの重要なリスクファクターである。活性酸素による DNA 損傷、胃上皮細胞における Activation induced cytidine deaminase (AID) の異所性発現、遺伝子のメチル化等による発現異常等が重要な因子であるが、胃発がん初期過程における遺伝子変異、遺伝子発現異常、さらにはそれに伴う形態変化は十分明らかにされていない。

H. pylori 感染による炎症に伴って発生する活性酸素による DNA 損傷によって、Ser139 がリン酸化されたヒストン H2AX (γ -H2AX) がフォーカスを形成するが、発がん初期応答から発がんに至る過程における γ -H2AX の役割は十分解明されていない。本研究ではヒト胃癌を用いて γ -H2AX の発現を検討した。

B . 研究方法

ヒト胃癌において、術前化学療法(neoadjuvant chemotherapy, NAC)の有無、胃型・腸型形質発現と γ -H2AX の発現を検討した。胃癌ブロックより直径 8mm のパンチ生検用器具を用いがん部分を採取し、合計 18 個の 5x2 組織アレイを作製した。それらを用いて、遺伝子損傷および修復のマーカーとして、 γ -H2AX、activation-induced cytidine deaminase (AID)、p53、ATM (ataxia telangiectasia mutated)、Mre11 (meiotic recombination 11)、NBS1 (Nijmegen breakage syndrome)、胃型腸型マーカーとして、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、CDX2 の発現を検討した。MUC5AC あるいは MUC6 陽性の腫瘍を胃型、MUC2 あるいは CD10 陽性のものを腸型、胃型(G)および腸型(I)マーカーのいずれも

が陽性のものを胃腸混合型(GI)、いずれのマーカーも陰性のものをヌル型(N)と判定した。 γ -H2AX に関しては、Allred scoring system により Proportion score (PS) : 0 (陰性) 1 ($\leq 1\%$) 2 (1-10%) 3 (11-33%) 4 (34-66%) 5 (67-100%陽性); Intensity score (IS) : 0 (陰性) 1 (弱陽性) 2 (中等度陽性) 3 (強陽性) にスコアリングし、PS と IS の積 > 5 を陽性とし、統計学的に解析した。他のマーカーは 0~3 の 4 段階にスコアリングした。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、藤田保健衛生大学医学部倫理審査委員会の承認を得、インフォームド・コンセントの得られた検体を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

C . 研究結果

組織アレイを作製したヒト胃癌のうち、140 例の進行胃癌を対象とした。そのうち NAC を施行していない症例が 79 例、NAC をした症例が 52 例であった。残りは未確認のため除外した。NAC なし症例の γ -H2AX 陽性/陰性例比は、G 3/8, GI 1/22, I 3/27, GI 3/27, N 2/13、NAC あり症例では、G 3/10, GI 0/18, I 4/12, N 1/4 と、胃型腸型形質と明らかな相関性が確認できなかった。また、NAC ありなしで有意な差は確認できなかった。

ATM、Mre11 は全体に発現量が多く、NBS は逆に全体に発現量が少なく有意な差は得られなかった。

現在、腫瘍全体でなく、 γ -H2AX 陽性局在部位について胃型腸型形質、細胞増殖能等との相関性について、検索中である。

D . 考察

がんと γ -H2AX との関係を見た報告では、肝臓で、前がん病変からがんに進展するに従って、その発現が増加するとの報告がある一方で、白血病や頭頸部扁平上皮癌で H2AX 遺伝子 (*H2AFX*) の存在する染色体 11q23 領域の変異や欠失が起こるとの報告もある。また、*H2afx*(-/-)マウスでは、DNA 二重鎖切断の修復に障害が発生するとの報告もあり、がん抑制遺伝子としての側面を持つと考えられている。

本研究で解析した胃がんにおいても、一部で γ -H2AX を高発現する症例があった。発がん初期の遺伝子異常に対する反応とがんの進展時の発現が同じ機構なのか、異なる機構なのかを見極め、発がん初期応答の解明が、腫瘍進展への指標となり得るか、さらに検討が必要と考えた。

E . 結論

γ -H2AX の DNA 損傷刺激に対する応答とがん進展時の発現が同じ機構なのか、異なる機構なのかを見極め、発がん初期応答マーカーの同定が、腫瘍進展への指標となり得るか、さらに検討が必要と考えた。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okochi-Takada, E., Hattori, N., Tsukamoto, T., Miyamoto, K., Ando, T., Ito, S., Yamamura, Y., Wakabayashi, M., Nobeyama, Y., Ushijima, T. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene* 33: 2273-2278, 2014.
- 2) Toyoda, T., Yamamoto, M., Takasu, S., Ogawa, K., Tatematsu, M., Tsukamoto, T. Molecular mechanism of gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected rodent models. *Diseases* 2: 168-186, 2014.
- 3) Tsukamoto, T., Tatematsu, M. Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Neoplasia. *Curr Infect Dis Rep* 16: 402, 2014.

- 4) 塚本徹哉, 桐山諭和, 柴田知行 【ヘリコバクター・ピロリ感染胃炎を診る、治す】 *H.pylori* 胃炎除菌による胃内環境への影響 除菌による病理組織学的所見の変化. *臨牀消化器内科* 29: 337-344, 2014.
- 5) 塚本徹哉, 桐山諭和, 立松正衛. 3. 胃癌ハイリスクの病理学的背景— 発癌仮説, 前癌病変, 前癌状態—. In: 一瀬雅夫, 岡政志, 齋藤博 編. *胃癌リスクファクターとリスク診断— とくにABC検診の現状と問題点の正しい理解のために* -. 東京: 日本メディカルセンター, 2014; 29-37.

2 . 学会発表

- 1) 桐山諭和, 塚本徹哉, Expression of γ -H2AX in gastric carcinogenesis in human and rodent models, 第 73 回日本癌学会総会, 2014 年, 横浜
- 2) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Kiriya, Y., Tatematsu, M., Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model. The 8th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, 2014, Fukuoka

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

なし。

2 . 実用新案登録

なし。

3 . その他

なし。

遺伝毒性と発がん性を包括的に評価できる中期肝発がんリスク評価系の開発

研究分担者 魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

これまでの既知遺伝毒性肝発がん物質についての検討で、*in vivo* 変異原性を臓器特異的に評価できる *gpt delta* F344 ラットを用いた中期発がん性試験は、化学物質の肝発がん性および変異原性を短期間でかつ包括的に評価できることが示唆されている。これまでは *in vitro* 変異原性陽性物質を用いて本試験系の有用性を検証してきたが、併せて変異原性陰性の化学物質を用いた検討を行う必要がある。そこで、本年度は、*in vitro* 変異原性が陰性である有機ヒ素化合物 dimethylarsinic acid (DMA) のラット肝臓における *in vivo* 変異原性について検討を行なった。

動物は 10 週齢の雄性 *gpt delta* F344 ラット 12 匹を用いた。実験開始時より無処置群、92 ppm DMA 飲水投与群の各群 6 匹ずつの 2 群に分けて 13 週まで飼育し、剖検を行った。*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 変異原性の解析で、肝臓において DMA 投与が変異体頻度の有意な変化を誘発しないことを明らかにした。また、*gpt* 変異体について無処置群と比較して有意な変異スペクトラムが認められなかった。

以上の結果から、肝臓において DMA が *in vivo* 変異原性を有さないことが明らかとなった。したがって、*gpt delta* ラットを用いた本試験法は変異原性評価法として有用であることをさらに確認することができた。

A. 研究目的

環境中には多くの発がん物質が存在し、ヒト発がんの原因と目されており、大きな要因となっている。しかし、化学物質の発がん性評価を含めた安全性評価の検討は未だ不十分である。これは、現在の発がん性評価法は動物試験だけでも 2 年間という長期的検討が必要であり、莫大な経費および多数の動物数を要することから、多くの化学物質に対応することが困難なためである。一方、遺伝毒性に関しては、*in vitro* の変異原性試験により遺伝毒性の有無が決められてきたが、偽陽性になるものも多く、特異性が低いという点において現状の試験法

では問題がある。これまでの既知遺伝毒性肝発がん物質についての検討で、*in vivo* 変異原性を臓器特異的に評価できる *gpt delta* F344 ラットを用いた中期発がん性試験は、化学物質の肝発がん性および変異原性を短期間でかつ包括的に評価できることが示唆されている。本試験系が化学物質の発がん評価に有用性を担保できることを検証する必要がある。そのためにこれまで *in vitro* 変異原性陽性物質を用いて本試験系の有用性を検証してきたが、併せて変異原性陰性の化学物質を用いた検討を行う必要がある。そこで、本年度は、*in vitro* 変異原性が陰性で有機ヒ素化合物である DMA の

ラット肝臓における *in vivo* 変異原性について検討を行なった。

B . 研究方法

[材料と方法]

1 . 動物実験

動物は 10 週齢の雄性 *gpt delta* F344 ラット 12 匹を用いた。実験開始時より無処置群、92 ppm DMA 飲水投与群の各群 6 匹ずつの 2 群に分けて 13 週まで飼育し、剖検を行った。なお、DMA の 92 ppm はこれまでの報告で膀胱発がん性、肝発がん促進作用を示した用量である。基礎飼料は MF pellet を与えた。また、動物は室温 23 ± 2 、相対湿度 $50 \pm 20\%$ 、明期 12 時間の照明条件で飼育した。また、紙の床敷を入れたプラスチック製ケージに、3 匹に分けて飼育し、ケージおよびチップを週 1 回交換した。屠殺までの実験期間中は、体重、摂餌量、摂水量を週 1 回測定した。

2 . *gpt* assay

gpt アッセイでは、肝臓凍結組織から RecoverEase™ DNA Isolation Kit を用いて genomic DNA を抽出した。*in vivo* パッケージングには、Transpack Packaging Extract を用いて、抽出した DNA からトランスジェン EG10 をファージ粒子として回収した。Cre 組み換え酵素を発現している大腸菌 YG6020 株の菌液に回収したファージを加え、37 20min (静置) の後、37 20min (振とう) にて回収ファージを大腸菌 YG6020 株に感染させた。感染後の YG6020 菌液を 6-TG と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地にまいて 37 で 2 日間培養行い、*gpt* 遺伝子が不活化している変異体のコロニーを得

た。また、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数は 6-TG を含まない M9 寒天培地にまいて生じたコロニー数によって求めた。突然変異数は、6-TG を含む寒天培地にまいて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換コロニー数で除して算出した。

Spi-アッセイでは、*in vivo* パッケージングによるファージ回収までの手法は *gpt* アッセイと同様に行う。P2 溶原菌に回収したファージを加え、37 20min (静置) により回収したファージを P2 溶原菌に感染させた後、トリプティケース寒天培地にまいて 37 で一晩培養し、Spi-変異体プラークを得た。また、非溶原菌に感染させ、全ファージが溶菌してプラーク作ることに より回収プラーク数を求めた。突然変異体頻度は変異プラーク数を回収ファージ数で除して算出した。

gpt 遺伝子変異体の変異スペクトラを評価するため、得られた変異コロニーをコロニーダイレクト PCR 法によって、DNA フラグメントを増幅した。プライマーは forward に primer 1 ; 5' -TACCACTTTATCCCGCGTCAGG-3' を、reverse に primer 2 ; 5' -ACAGGGTTTCGCTCAGGTTTGC-3' を使用して、サーマルサイクラーにて *gpt* 遺伝子の ORF 456bp を含む 739bp の DNA フラグメントを増幅した。得られた PCR product を illustra MicroSpin™ S-300 HR Columns にて精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を使用して、DNA サイクルシーケンスを行った。プライマーは forward に primer A ; 5' -GAGGCAGTGCGTAAAAGAC -3' を、reverse に primer B ;

5' -CTATTGTAACCCGCCTGAAG -3' を使用して DNA サイクルシーケンスを行った。その後、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer で *gpt* 遺伝子のシーケンス解析を行い、変異スペクトラについて解析を行った。

[統計学的解析]

統計学的解析は Statlight program (Yukms Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、F 検定を用いて等分散性を解析した。等分散性であった場合は Student's T 検定を、分散にばらつきがみられた場合は Welch's T 検定を用いて解析を行った。全ての平均値は Mean ± SD として表し、P < 0.05 以下のものを統計学的に有意であるとみなした。

[倫理面への配慮]

大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取り扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないために麻酔下にて実施した。

C . 研究結果

1. 一般所見

飼育期間中における飲水量及び摂餌量について、無処置群と比較して有意な変化はみられなかった。剖検時における最終体重について、無処置群と比較して DMA 投与群で有意な変化はみられなかった。また肝臓の絶対、相対重量について有意な変化はみられなかった。

2. *gpt* assay

点突然変異頻度を評価する *gpt* アッセイの結果を Table.1 に、欠失変異を評価する Spi アッセイの結果を Table.2 に示す。 *gpt*

アッセイにおける変異体頻度が無処置群では $0.68 \pm 0.21 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では $0.62 \pm 0.43 (\times 10^{-5})$ 、Spi アッセイにおける変異体頻度は無処置群では $0.75 \pm 0.28 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では $0.76 \pm 0.17 (\times 10^{-5})$ であった。変異体頻度は、無処置群と比較して、有意な変化はみられなかった。

gpt 遺伝子の変異スペクトラについて、それぞれの変異頻度について以下に Table.3 記す。Base substitution において、Transition 変化である G:C to A:T 変化は無処置群では $0.06 \pm 0.16 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では $0.12 \pm 0.20 (\times 10^{-5})$ 、A:T to G:C 変化は無処置群では $0.08 \pm 0.19 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では 0 であった。また、同じ Base substitution において Transversion 変化である G:C to T:A 変化は無処置群で $0.10 \pm 0.17 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では $0.09 \pm 0.15 (\times 10^{-5})$ 、G:C to C:G 変化は無処置群では $0.04 \pm 0.10 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では $0.05 \pm 0.12 (\times 10^{-5})$ 、A:T to T:A 変化は無処置群では $0.04 \pm 0.17 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では 0、A:T to C:G 変化は無処置群では $0.04 \pm 0.10 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では 0 であった。Deletion 変化において、1bp 欠失変化は無処置群では $0.04 \pm 0.09 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群では $0.06 \pm 0.15 (\times 10^{-5})$ 、2bp 以上の欠失変化は無処置群では 0、DMA 投与群では $0.03 \pm 0.08 (\times 10^{-5})$ であった。Insertion 変化において 1bp 挿入変異は無処置群では 0、DMA 投与群では $0.05 \pm 0.12 (\times 10^{-5})$ であった。なお、変異スペクトラム解析においてモノクローナル変異を除いた変異頻度は無処置群が $0.40 \pm 0.19 (\times 10^{-5})$ 、DMA 投与群が $0.50 \pm 0.17 (\times 10^{-5})$ であり、各

スペクトラムにおける投与による有意な変化はいずれにおいてもみられなかった。

D . 考察

DMA は Ames 試験などの *in vitro* 変異原性試験で陰性であり、これまでに我々は *gpt delta* F344 ラットを用いた試験で、膀胱粘膜において DMA が *in vivo* 変異原性陰性であることを明らかにしてきた。今回、肝臓においても同様に *in vivo* 変異原性陰性であることが明らかとなり、*gpt delta* F344 ラットを用いた本試験系が、化学物質の変異原性評価法として極めて有用であることが示された。

E . 結論

本研究によって DMA がラット肝臓において *in vivo* 変異原性を有さないことを明らかとした。さらにその変異スペクトラムについても DMA 特異的な変化はみられなかった。本研究で得られた成果は化学物質のリスク評価・管理に寄与するものであると考えられた。

G . 研究発表

1. 論文発表

Yamada T, Wei M, Toyoda T, Yamano S, Wanibuchi H. Inhibitory effect of raphanobrassica on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. Food Chem Toxicol, 70, 107-113, 2014.

Tago Y, Fujii T, Wada J, Kato M, Wei M, Wanibuchi H, Kitano M. Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new

astaxanthin-containing Phaffia rhodozyma extract. J Toxicol Sci, 39, 373-382, 2014.

Kakehashi A, Kato A, Ishii N, Wei M, Morimura K, Fukushima S, Wanibuchi H. Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling. PLoS One, 9, e113610, 2014.

Kuwae Y, Kakehashi A, Wakasa K, Wei M, Yamano S, Ishii N, Ohsawa M, Wanibuchi H. Paraneoplastic Ma Antigen-Like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Pancreas, 44, 106-115, 2015.

Wei M, Xie Xiao-Li, Yamano S, Kakehashi A, Wanibuchi H. Isoleucine, leucine and their role in experimental models of bladder carcinogenesis. Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition, Vol 1, 253-260, 2015.

Gi M, Fujioka M, Yamano S, Shimomura E, Ishii N, Kakehashi A, Takeshita M, Wanibuchi H. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. Toxicol Sci, 2015. (In press)

2 . 学会発表

山野 荘太郎、魏 民、藤岡正喜、鰐淵英機、マウス肺扁平上皮癌において気管支肺胞幹

細胞がオリジンである可能性 . 第 103 回日本病理学会総会 4 月 24 ~ 26 日 , 広島 2014 .

梯アンナ、桑江優子、石井真美、魏 民、鰐淵英機、ヒト肝細胞癌における LC-MS/MS 及び *in vitro* 機能解析を用いた新規特異的候補分子ターゲットの検討 . 第 103 回日本病理学会総会 , 4 月 24 ~ 26 日 , 広島 , 2014 .

三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、EHEN 誘発ラット腎臓がんにおいて内因性 NADPH oxidase 阻害剤 apocynin は抑制作用を有する . 第 103 回日本病理学会総会 , 4 月 24 ~ 26 日 , 広島 , 2014 .

福島昭治、魏 民、梯アンナ、鰐淵英機、化学発がん物質のリスク評価における閾値問題 . 第 41 回日本毒性学会学術年会 , 7 月 2 ~ 4 日 , 神戸 , 2014 .

石井真美、梯アンナ、魏 民、佐谷秀行、鰐淵英機、ヒト肝細胞癌組織における癌幹細胞マーカーとしての CD44v9 の検討 . 第 11 回日本病理学会カンファレンス , 8 月 1 ~ 2 日 , 神戸 , 2014 .

下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、三島胡桃、鰐淵英機、ハムスター-BOP 二段階胆膵管発がんモデルを用いた 1,2-dichloropropane の発がん修飾作用の検討 . 第 29 回発癌病理研究会 , 9 月 1 ~ 3 日、いわき , 2014 .

三島胡桃、山野荘太郎、藤岡正喜、魏 民、下村衣里、鰐淵英機、EHEN 誘発ラット腎臓がんにおける発がん機序の解明

PI3K/Akt/mTOR signaling pathway 及び NADPH oxidase の役割 . 第 29 回発癌病理研究会 , 9 月 1 ~ 3 日、いわき , 2014 .

山野荘太郎、三島胡桃、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎臓がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用 . 平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ , 9 月 3 ~ 6 日 , 茅野 , 2014 .

魏 民、下村衣里、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、武下正憲、房 赫、鰐淵英機、ハムスター化学発がんモデルを用いた 1,2-dichloropropane の発がん修飾作用の検討 . 第 73 回日本癌学会学術総会 , 9 月 25 ~ 27 日 , 横浜 , 2014 .

石井真美、梯アンナ、桑江優子、大澤政彦、魏 民、鰐淵英機、ヒト NASH 肝細胞癌におけるプロテオーム解析を用いた分枝メカニズムの検討 . 第 73 回日本癌学会学術総会 , 9 月 25 ~ 27 日 , 横浜 , 2014 .

藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、梯アンナ、石井真美、下村衣里、三島胡桃、房 赫、鰐淵英機、gpt delta ラットを用いた 2-AAF の肝臓がん性および変異原性の包括的評価モデルの検討 . 第 73 回日本癌学会学術総会 , 9 月 25 ~ 27 日 , 横浜 , 2014 .

梯アンナ、石井真美、桑江優子、房 赫、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、ヒト肝細胞癌における新治療ターゲットの検索 : CNPY2 及び CACHD1 . 第 73 回日本癌学会学術総会 , 9 月 25 ~ 27 日 , 横浜 , 2014 .

Yamano S, Wei M, Fujioka M, Wanibuchi H, Cancer initiating cekk of lung squamous cell carcinoma in mice might be cerived from the bronchiolar alveolar stem cell. 39th EAMO Congress, 26-30 September, Madrid, Spain, 2014.

鰐淵英機、魏 民、ヒ素の発がん機序の解明 . 第 60 回日本病理学会秋期特別総会 , 11 月 20 日 , 浦添 , 2014.

下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、鰐淵英機、ハムスターBOP 二段階 腓胆管発がんモデルを用いた 1,2-dichloropropane(1,2-DCP)の発がん修飾作用の検討 . 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会 , 1 月 29 ~ 30 日 , 東京 , 2015.

Anna Kakehashi, Naomi Ishii, Min Gi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi, CNPY2 and CACHD1 as novel molecular markers of hepatocellular carcinoma. 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会 , 1 月 29 ~ 30 日 , タワーホール船堀(東京都) , 2015.

藤岡正喜、魏 民、山野荘太郎、下村衣里、三島胡桃、鰐淵英機、非遺伝毒性肝発がん物質ダンマル樹脂の発がんメカニズムの検討 . 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会 , 1 月 29 ~ 30 日 , 東京 , 2015.

三島胡桃、山野荘太郎、魏 民、鰐淵英機、ラット同所同種移植による新規腎癌肺転移モデルの確立及び評価 . 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会 , 1 月 29 ~ 30

日 , 東京 , 2015.

下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、鰐淵英機、ハムスターBOP 二段階 腓胆管発がんモデルを用いた 1,2-dichloropropane(1,2-DCP)の発がん修飾作用の検討 . 第 31 回日本毒性病理学会学術総会及び学術集会 , 1 月 29 ~ 30 日 , 東京 , 2015.

山野荘太郎、三島胡桃、山田健二、平山幸良、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎発がんモデルを用いた発がん機構の解明及び転移モデルへの応用 . 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 , 2 月 5 ~ 6 日 , 大津 , 2015.

平山幸良、山野荘太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、三島胡桃、鰐淵英機、肝微小環境が及ぼす転移性腎癌への影響 . 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 , 2 月 5 ~ 6 日 , 大津 , 2015.

三島胡桃、山野荘太郎、山田健二、藤岡正喜、魏 民、鰐淵英機、腎細胞癌肺転移新規モデルの構築及び評価 . 第 14 回分子予防環境医学研究会 2 月 13 ~ 14 日 , 大阪 , 2015.

下村衣里、魏 民、藤岡正喜、山野荘太郎、梯アンナ、鰐淵英機、1,2-DCP 投与によるハムスターおよびマウスの肝毒性メカニズムの検討 . 第 14 回分子予防環境医学研究会 , 2 月 13 ~ 14 日 , 大阪 , 2015.

H . 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

Table.1 肝臓における *gpt* 遺伝子の変異体頻度(*gpt* アッセイ)

| Organ | Groups | Animal No. | Cm ^R colonies ($\times 10^5$) | 6-TG ^R and Cm ^R colonies | MF($\times 10^{-5}$) | Mean \pm SD |
|-------|---------|------------|--|--|------------------------|-----------------|
| Liver | Control | 111 | 2.54 | 2 | 0.79 | 0.68 \pm 0.21 |
| | | 112 | 5.24 | 4 | 0.76 | |
| | | 113 | 4.62 | 2 | 0.43 | |
| | | 121 | 4.83 | 2 | 0.41 | |
| | | 122 | 4.12 | 3 | 0.73 | |
| | | 123 | 2.13 | 2 | 0.94 | |
| | | 92ppmDMA | 211 | 2.20 | 1 | |
| | 212 | 2.81 | 1 | 0.36 | | |
| | 213 | 3.75 | 1 | 0.27 | | |
| | 221 | 4.94 | 3 | 0.61 | | |
| | 222 | 3.40 | 2 | 0.59 | | |
| | 223 | 2.74 | 4 | 1.46 | | |

Table.2 肝臓における *red/gam* 遺伝子の変異体頻度(*Spi*-アッセイ)

| Organ | Groups | Animal No. | Plaques within XL-1 Blue MRA ($\times 10^5$) | Plaques within XL-1 Blue MRA (P2) | MF($\times 10^{-5}$) | Mean \pm SD |
|-------|---------|------------|---|--------------------------------------|------------------------|-----------------|
| Liver | Control | 111 | 1.93 | 1 | 0.52 | 0.75 \pm 0.28 |
| | | 112 | 2.81 | 2 | 0.71 | |
| | | 113 | 1.70 | 2 | 1.18 | |
| | | 121 | 2.00 | 2 | 1.00 | |
| | | 122 | 3.75 | 2 | 0.53 | |
| | | 123 | 3.66 | 2 | 0.55 | |
| | | 92ppmDMA | 211 | 2.27 | 2 | |
| | 212 | 2.52 | 2 | 0.80 | | |
| | 213 | 2.37 | 1 | 0.42 | | |
| | 221 | 2.47 | 2 | 0.81 | | |
| | 222 | 2.23 | 2 | 0.90 | | |
| | 223 | 2.69 | 2 | 0.74 | | |

Table.3 肝臓における *gpt* 遺伝子の変異スペクトラム

| Type of mutation | Non-treatment | | | 92ppm DMA | | |
|-----------------------|---------------|------------------------|-------------------|-----------|------------|------|
| Transition G:C to A:T | 2 | (22.2%) ^a | | 2 | (25.0%) | |
| | 0.06 | ± | 0.16 ^b | 0.12 | ± | 0.20 |
| A:T to G:C | 1 | (11.1%) | | 0 | (0%) | |
| | 0.08 | ± | 0.19 | 0 | | |
| Tranversion | | | | | | |
| G:C to T:A | 2 | (22.2%) | | 2 | (25.0%) | |
| | 0.10 | ± | 0.17 | 0.09 | ± | 0.15 |
| G:C to C:G | 1 | (11.1%) | | 1 | (12.5%) | |
| | 0.04 | ± | 0.10 | 0.05 | ± | 0.12 |
| A:T to T:A | 1 | (11.1%) | | 1 | (12.5%) | |
| | 0.04 | ± | 0.17 | 0 | | |
| A:T to C:G | 1 | (11.1%) | | 0 | (0%) | |
| | 0.04 | ± | 0.10 | 0 | | |
| Deletion | | | | | | |
| single bp | 1 | (11.1%) | | 1 | (12.5%) | |
| | 0.04 | ± | 0.09 | 0.06 | ± | 0.15 |
| Over 2bp | 0 | (0%) | | 1 | (12.5%) | |
| | 0 | | | 0.03 | ± | 0.08 |
| Insertion | 0 | (0%) | | 1 | (12.5%) | |
| | 0 | | | 0.05 | ± | 0.12 |
| Total | 9 | (100.0%) | | 8 | (100.0%) | |
| | 0.40 | ± | 0.19 | 0.50 ± | | 0.17 |

^a Number of mutations (%)^b Mutation frequency (×10⁵)

肺を標的とする中・短期発癌モデルの開発に関する研究

研究分担者 横平 政直 香川大学医学部 腫瘍病理学 准教授

研究要旨

本研究は動物の肺腫瘍モデルにおける早期病変について、将来の腫瘍化の推定が可能なマーカーの同定を目的としている。これまでにラットにおいて、肺早期病変である過形成病変に対する Napsin A の肺胞壁内細胞への高発現の有無により、腫瘍化リスクの判別の可能性が明らかになった。これは DHPN 誘発ラット肺腫瘍と quartz 誘発ラット肺（炎症性病変）の比較により確認されたものである。今回は、DHPN 以外の発がん物質により誘導された肺過形成病変について、Napsin A が同様の染色性を示すか確認するための実験である。現在、動物実験は全 32 週を終え、病理組織切片の作成を完了したところである。

A．研究目的

ラットの肺腫瘍誘発物質としては、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) (2 週間の飲水投与) が知られている。しかし、肺腫瘍発生までには約 30 週間と長期を要する。マウスでは、4-(methyl nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の腹腔内投与による肺腫瘍モデルが存在するが、これも肺腫瘍発生までに最短で 12 週間を要する。

これらのモデルにおいて、早期に過形成病変が出現するが、将来、病変が消失するものと悪性化するものが混在している。特に、最近のナノテクノロジーの発展によって、ナノ粒子の吸入毒性が問題となっている。ナノ粒子の種類によっては時に過形成病変が発生する場合があります。この病変が、将来、腫瘍化リスクが高いのか否かを判別する方法も期待されている。

以上より、本研究では肺発癌の早期病変における将来の悪性化リスクを予想可能なマーカーの検索を目的とした。このマーカーにより、上記の期待に添えるのみでなく、早期病変での悪性化のメカニズムについて、新たな病理組織学的知見を得られる可能性がある。

これまでに、肺の早期腫瘍性病変の同定に有用なマーカーの候補の検索を目的とした研究を行ってきた。DHPN により誘発された過形成は経時的に腺腫、腺癌へ進展する。DHPN 投与により肺に生じた代表的な腫瘍性病変について、複数の抗体を検討し、候補となるマーカーの検索を行った。検討した複数の抗体は Cyclin D1、Napsin A、p27、Thyroid transcription factor 1 (TTF-1)、Ki-67、Cytokeratin (CK) 7、CK 20、CK 34 E12、CK 5/6、surfactant proteins-A (SP-A)、p53、Endothelial growth factor receptor (EGF-R)、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PR)、carcinoembryonic antigen1 (CEA)、p16、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、chromogranin A および synaptophysin の 19 種類である。また、ラット肺の炎症性変化（炎症性過形成）についてもマーカーの発現を確認するための実験を行った。

各種微粒子 2mg を気管内投与後、28 日目のラット肺を用いてマーカーの発現を検討した。炎症を誘発する微粒子としては、quartz、NiO および CuO の 3 種類を用いた。これらの実験の結果、Napsin A が最有力候補として絞られた。

さらに、Napsin A は肺サーファクタント B の成熟に関与していることから、その発現機序解明を目的として、サーファクタントプロテイン (SP) の分子種である SP-A、B、C、D について染色を行い、napsin A の発現と比較検討を行った。用いた材料は DHPN 誘発 F344 雄ラット肺腫瘍（腺系腫瘍、30 週）及び quartz 誘発 F344 雄ラット肺（炎症性変化、28 日目）の固定標本である。

以上の実験から、Napsin A は、肺に発生する過形成病変の将来の腫瘍化リスクについての判別に有用であることが判明した。また、Napsin A の発現は肺サーファクタンとプロテイン-B の発現に若干の相同性を示した。

これまでの研究による Napsin A の有用性は、肺腫瘍誘発物質として、DHPN のみ使用した検討の結果である。今回の研究は、DHPN 以外の発がん物質（Urethane、dimethylnitrosamine (DMN)、Benzo[a]pyrene）により誘導された肺過形成病変についても Napsin A が同様の染色性を示すかについての確認を目的とした。

B. 研究方法

8週齢のF344ラット46匹を4群に分け、それぞれ1群:12匹、2群:13匹、3群:12匹、4群:13匹とした。実験開始の0週目から発がん物質を投与した。1群には水道水を溶媒とした0.1%DHPNをラットの自由に2週間飲水投与し、2群にはurethaneを1g/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に1g urethaneの濃度で溶解)で1週間おきに合計10回腹腔内投与した。3群では、実験開始時に30mg/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に30mg DMNの濃度で溶解)で単回の腹腔内投与を行った。4群には実験開始時にbenzo[a]pyreneを20mg/kg body weightの用量(10ml生理的食塩水に1g benzo[a]pyreneの濃度で溶解)で単回の気管内投与を行った。

なお、実験に用いた発がん物質の詳細な情報は以下のとおりである。

* DHPN: No.14027、ナカライテスク株式会社(京都)

* Urethane: CAS no. 51-79-6、東京化成工業株式会社(東京)

* DMN: CAS no.62-75-9、東京化成工業株式会社(東京)

* Benzo[a]pyrene: CAS no.50-32-8、sigma-aldrich Co.,LCC.(MO, USA)

実験開始16週目と32週目で各群約半数ずつ解剖を行い、解剖時には肺、肝、腎、膀胱、前立腺、胃、大腸を摘出した。肺では、肺内へのホルマリン注入固定と肺重量測定のため、以下の操作を行った。

(a) 摘出直後の心臓、胸腺、肺が一塊となった状態で重量を測定する。

(b) 肺に固定液を気管より注入する。肺に固定液を注入しない状態では肺胞が収縮した状態であり、病変(特に過形成)の診断が困難になる。ピンセットで気管切断口をつまんで閉じたまま、気管切断部よりやや尾側の気管本幹に注射針(25G針)を刺入する。全ての肺葉が膨らむまで固定液を注入する。注入しすぎると肺胞壁が破壊されるため、適切な圧での注入が要求される。

(c) 注入後、それぞれの肺葉を全て気管より切離し、6葉すべてを固定液中に浸漬する。気管、心臓、胸腺が残る。

(d) 残った心臓、胸腺、気管の重量を測定し、(a)から差し引くと正確な肺の実重量が算出される。

肝、膀胱、前立腺、胃、大腸については、本研究班の臓器取り扱いマニュアルに従って処理を行い、それぞれを分担研究者に送付した(napsin A以外の検討のため)。

(倫理面への配慮)

いずれの実験も動物実験に先立ち、香川大学、総合生命科学研究センター、動物実験部門の動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、その許可を得た後に同実験部門において香川大学動物実験規程に従って飼育管理した。

C. 研究結果

過去の文献に基づき、実験開始時、4群のbenzo[a]pyreneについて、70% ethanolを溶媒として使用する計画であった(20mg/kg body weightの用量、10ml 70% ethanol

に1g benzo[a]pyreneの濃度で溶解)。しかし、投与直後に死亡例が続出したため、急遽、溶媒を生理的食塩水に変更し同様の濃度、用量で投与を行った。この時、3匹が死亡し、4群について16週:5匹、32週:5匹(合計10匹)の計画に変更した。実験開始日に4群で3匹死亡例が発生したが、それ以外に死亡例はない。

16週目では最終的に、1群:6匹、2群:6匹、3群6匹、4群:5匹を解剖した。16週解剖時の体重および臓器重量を表1に示した。体重では、3群(DMN)および4群(Benzo[a]pyrene)と比べ2群(urethane)では有意な減少を認め、相対肺重量は、4群と比べ1群では有意な上昇が見られた。その他の項目に群間で有意な差は認められなかった。

16週目における摘出肺の肉眼所見は、3群(DMN)を除くすべての群で、肺表面が粗造な印象であった(図1)。また、1群(DHPN)、2群(urethane)、3群(DMN)のいずれも、肺表面に小結節が認められた。組織学的には1群ではhyperplasia、adenoma、lymphocyte infiltrationが、2群ではhyperplasia lymphocyte infiltrationが、3群と4群ではhyperplasiaが見られた(図2)。Hyperplasiaは形態的に炎症性と推測されるのを区別して評価した。肉眼的、組織学的評価のまとめを表2に示した。

32週目では最終的に、1群:5匹、2群:6匹、3群6匹、4群:5匹を解剖した。32週解剖時の体重および臓器重量を表1に示した。体重では、各群間に有意差は認められなかった。絶対及び相対肺重量は、2群および4群と比べて1群では有意な上昇が見られた。その他の項目に有意な群間差は認められなかった。

32週目における摘出肺の肉眼所見は、すべての群で、肺表面が粗造な印象であった(図3)。組織学的には1群および3群ではhyperplasia、adenoma、lymphocyte infiltrationが、2群および4群ではhyperplasia、lymphocyte infiltrationが見られた(図2)。Hyperplasiaは形態的に炎症性と推測されるのを区別して評価した。肉眼的、組織学的評価のまとめを表2に示した。

D. 考察

現在、16週および32週の解剖を終了し、病理組織学切片(HE切片)が完成したところである。予想に反して、2群(urethane)では16週でhyperplasiaが1匹に見られるのみであった。2群において、肉眼的に確認された小結節は、病理組織学的にはリンパ球浸潤巣であったと推移された。4群(benzo[a]pyrene)でも、炎症性過形成病変が見られた。

今後、Napsin Aの免疫染色を施行予定である。また、他の分担担当者も標的臓器は異なるが、多種の発がん物質を投与する検討を予定しており、肺について増殖性病変が発生した場合、それについてもNapsin Aの検討を行う予定である。これまで、膀胱腫瘍をターゲットにした多種発癌剤投与後6週のラット肺組織が送られてきたが(国立医薬品食品衛生研究所、小川久美子先生より)、組織学的に肺の増殖性病変は確認できなかった。

E . 結論

肺過形成の腫瘍化リスクの判別における Napsin A の有用性の検証を目的に実験を行っている。多種の肺発がん物質（DHPN、Urethane、DMN、Benzo[a]pyrene）により誘導された肺過形成病変について、Napsin A 様の染色性の検討を予定している。実験中間時期である 16 週の剖検を終了したところであるが、16 週について、2 群（urethane）および 4 群（benzo[a]pyrene）の増殖性病変の発生が不良であった。現在も順調に実験は進行中であり、32 週の剖検終了後に 16 週の肺と合わせて同一条件で Napsin A の免疫染色を行う予定である。

G . 研究発表

1 . 論文発表

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K., Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. Exp. Toxicol. Pathol., 66: 117-123, 2014.

Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 27(3-4):175-182, 2014.

2 . 学会発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

表1、体重および臓器重量

| Group Treatment | Wks No. | Body weight (g) | Liver | | Right Kidney | | Left kidney | | Lung | |
|------------------|---------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | Absolute (g) | Relative (%) | Absolute (g) | Relative (%) | Absolute (g) | Relative (%) | Absolute (g) | Relative (%) |
| 1 DHPN | 16 6 | 292.8±8.1 | 8.1 ±0.3 | 2.8±0.1 | 0.9 ±0.0 | 0.3 ±0.0 | 0.8 ±0.0 | 0.3 ±0.0 | 1.5 ±0.5 | 0.5 ±0.2 ^b |
| 2 Urethane | 16 6 | 277.8±11.7 ^{a,b} | 8.0 ±0.5 | 2.9±0.1 | 0.8 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 0.8 ±0.0 | 0.3 ±0.0 | 1.3 ±0.2 | 0.5 ±0.1 |
| 3 DMN | 16 6 | 302.7±19.5 | 8.6 ±0.5 | 2.8±0.1 | 0.8 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 0.9 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 1.2 ±0.1 | 0.4 ±0.0 |
| 4 Benzo[a]pyrene | 16 5 | 303.3±13.8 | 8.3 ±0.6 | 2.7±0.1 | 0.8 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 0.9 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 1.1 ±0.1 | 0.4 ±0.0 |
| 1 DHPN | 32 5 | 307.6±22.9 | 8.2 ±0.8 | 2.7±0.2 | 0.9 ±0.0 | 0.3 ±0.0 | 1.0 ±0.1 | 0.3 ±0.1 | 2.6 ±0.2 ^{c,d} | 0.9 ±0.1 ^{c,d} |
| 2 Urethane | 32 6 | 311.5±24.5 | 8.4 ±1.0 | 2.7±0.1 | 0.8 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 0.8 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 1.8 ±0.3 | 0.6 ±0.1 |
| 3 DMN | 32 6 | 321.8±21.0 | 8.7 ±0.6 | 2.7±0.3 | 0.9 ±0.0 | 0.3 ±0.0 | 0.9 ±0.0 | 0.3 ±0.0 | 2.1 ±0.5 ^d | 0.7 ±0.2 |
| 4 Benzo[a]pyrene | 32 5 | 352.1±33.1 | 9.2 ±1.0 | 2.6±0.1 | 0.9 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 0.9 ±0.1 | 0.3 ±0.0 | 1.5 ±0.3 | 0.4 ±0.1 |

^a P<0.05 vs Group 3 of 16w by Tukey-Kramer test.

^b P<0.05 vs Group 4 of 16w by Tukey-Kramer test.

^c P<0.05 vs Group 2 of 32w by Tukey-Kramer test.

^d P<0.05 vs Group 4 of 32w by Tukey-Kramer test.

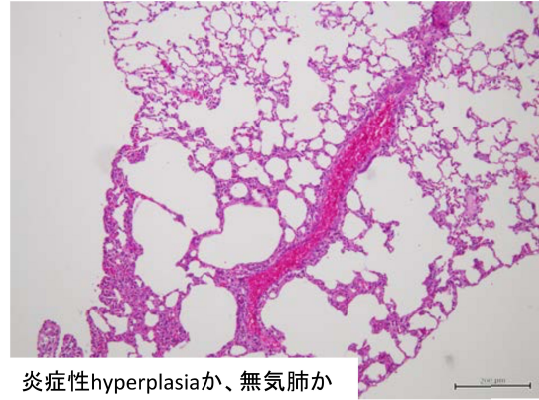
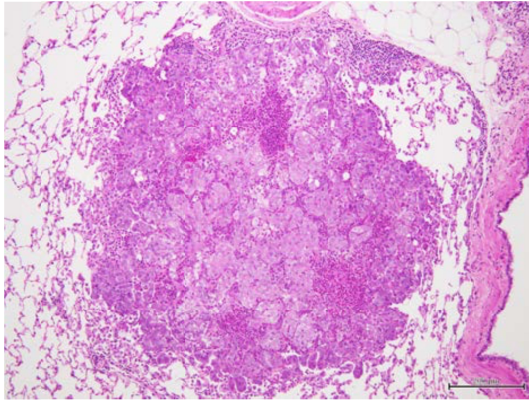
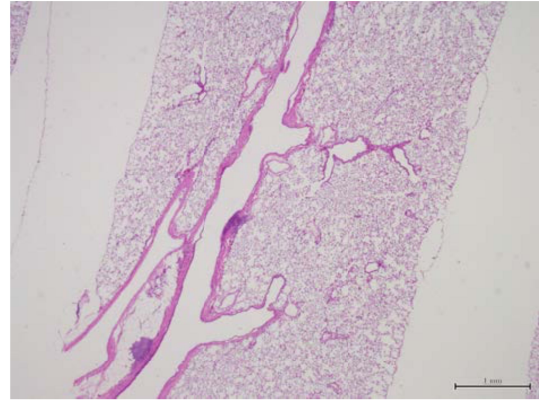
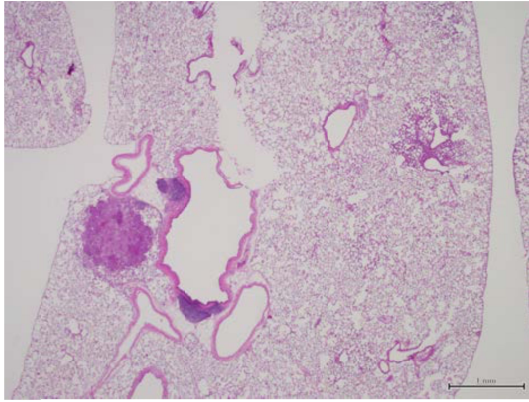
表 2、肺における病理組織学的所見

| Weeks | Treatment | No. | Histopathological findings of lung | | | |
|-------|----------------|-----|------------------------------------|--------------------------|---------|-----------------------|
| | | | Hyperplasia | Inflammatory hyperplasia | adenoma | lymphocyte (bronchus) |
| 16 | DHPN | 6 | 6 | 2 | 3 | 3 |
| 16 | Urethane | 6 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| 16 | DMN | 6 | 6 | 1 | 0 | 0 |
| 16 | Benzo[a]pyrene | 5 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| 32 | DHPN | 5 | 5 | 0 | 3 | 5 |
| 32 | Urethane | 6 | 0 | 3 | 0 | 6 |
| 32 | DMN | 6 | 4 | 0 | 1 | 6 |
| 32 | Benzo[a]pyrene | 5 | 0 | 2 | 0 | 3 |

图 1、肉眼的肺所見 (16 週)

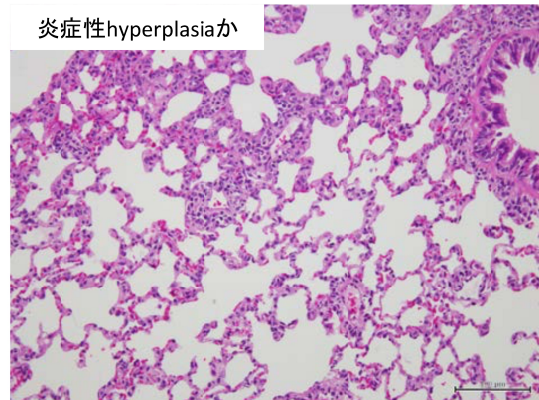
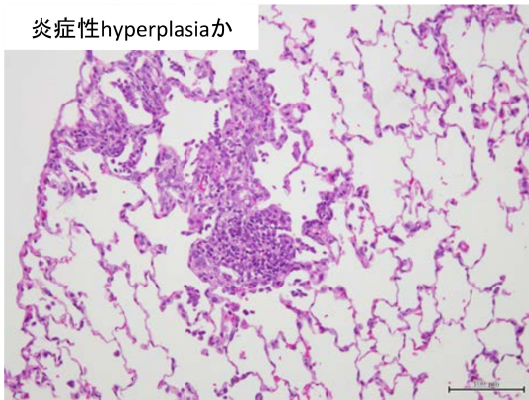
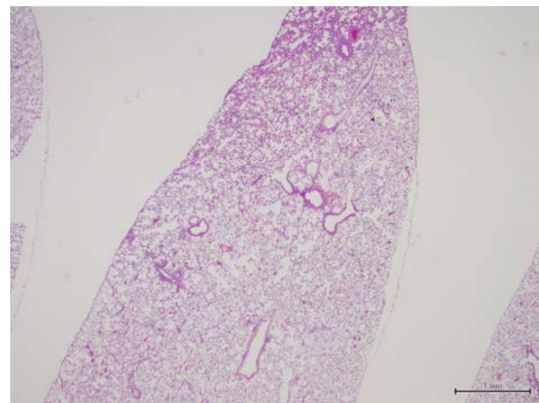
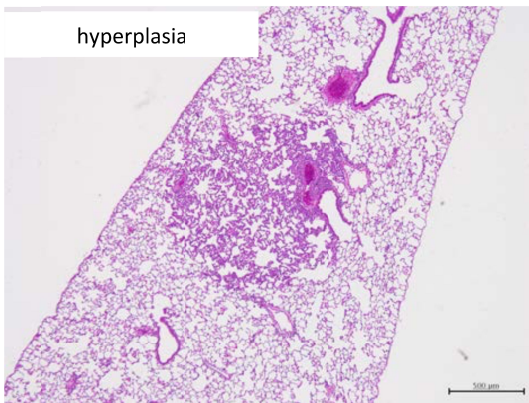


図 2、病理組織学的肺所見（16 週）



Group 1, DHPN 16w

Group 2, Urethane 16w



Group 3, DMN 16w

Group 4, Benzo[a]pyrene 16w

图 3、肉眼的肺所見 (32 週)

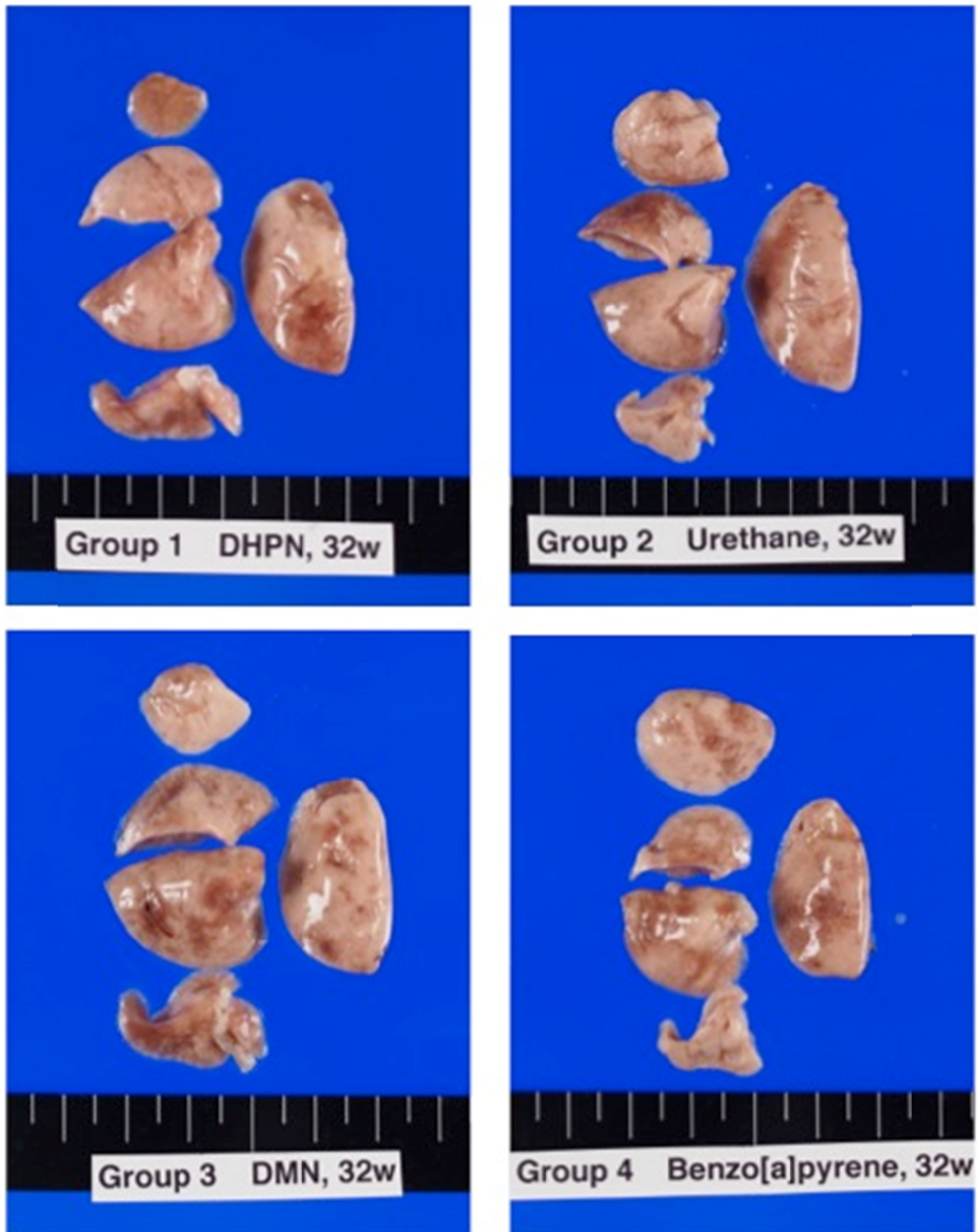
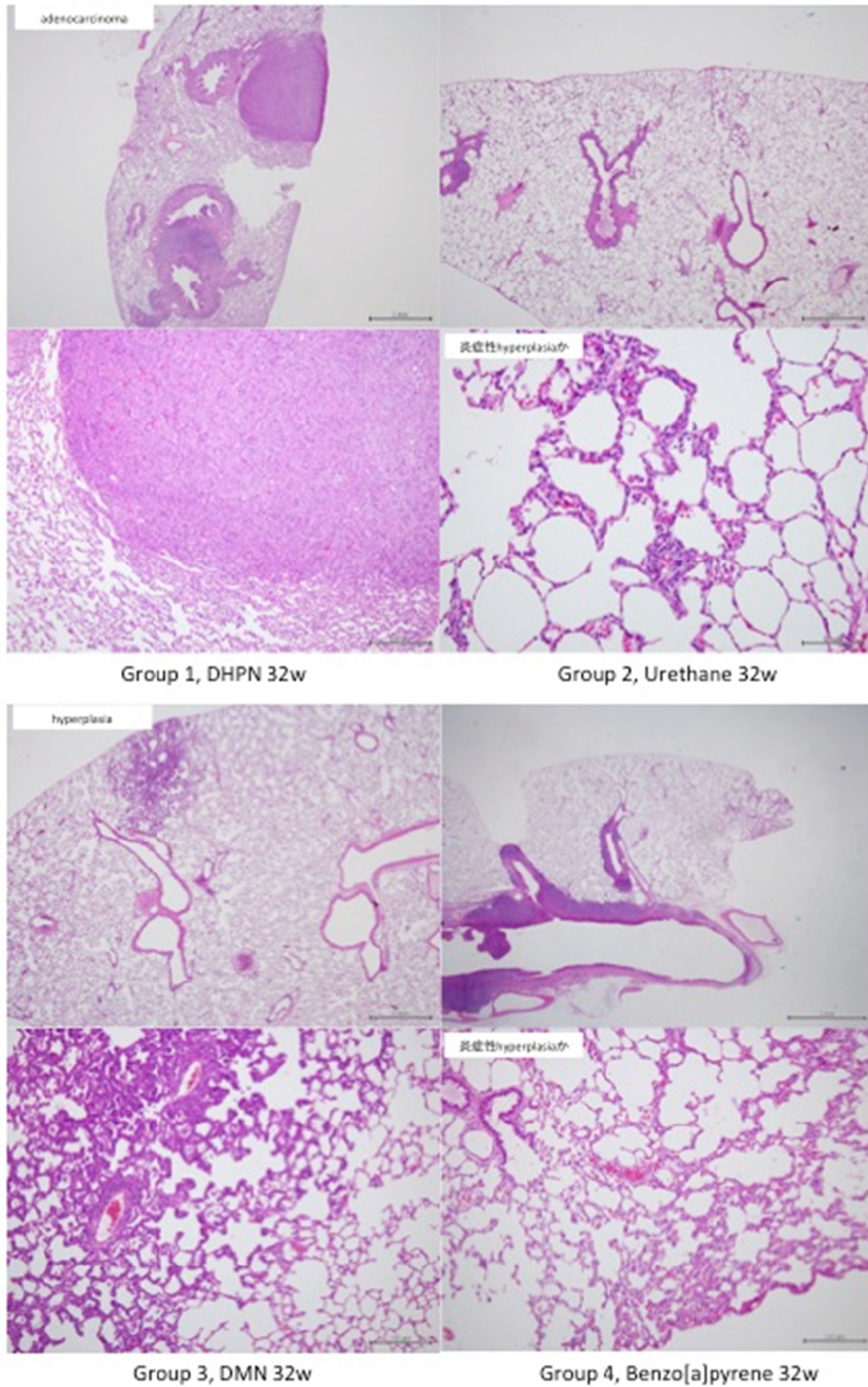


图 4、病理組織学的肺所見 (32 週)



前立腺を標的とする中・短期発癌モデルの開発

分担研究者 鈴木 周五 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 研究員

研究要旨

前立腺発がんリスク評価のための短・中期発がんモデル樹立を目的にラットを用いて検討した。我々は以前に、前立腺発がん物質である PhIP, DMAB を投与したラットにおいて、 γ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 発現が有意に上昇することを見いだした。一昨年と昨年度に渡り、前立腺発がん物質あるいは前立腺以外に標的性を示す発がん物質をラットに投与し、前立腺および他の臓器における発がん性の臓器特異性について、それぞれの臓器における γ -H2AX、HMGB2、Ki-67 標識率を検討し、HMGB2、Ki-67 については、発がん標的臓器において有意な上昇を認め、前立腺を含む臓器特異的な発がん指標となり得ることを示した。今年度は、初期だけでなく腫瘍形成後の発がん後期においても発現が存在するかを検討した結果、PhIP および DMAB により発生した腫瘍で、HMGB2、Ki-67 標識率が周囲正常上皮よりも有意に高いことを示した。また、ヒト前立腺癌においても、 γ -H2AX、HMGB2、Ki-67 標識率の有意な上昇を確認した。一方、毒性や発がん性評価において経口投与が一般的であり、動物モデル開発には経口投与での評価が重要となる。今回用いている前立腺発癌物質 DMAB および MNU は別経路で投与されており、経口投与にした場合にも、発がん性が検出可能であるかを検討した。結果、一部標識率の差があるものの、全体としては投与方法の差よりもそれぞれの化学物質に特異的な標識率を示し、被験物質が経口投与で行った場合でも問題ないことを示した。

A. 研究目的

前立腺癌は世界的に男性癌の中で4番目に多い腫瘍で、日本でも2020年には肺癌について2番目の罹患率になると予測されており、増加率が一番高いがんである。前立腺がんの原因については未だ不明な点が多いが、食事要因がその発症に深く関与していることが示唆されている。前立腺がんの発症を予防するにはその発がん因子を同定して、それらの摂取を極力抑える事が重要であると考えられ、環境中の発がん因子を同定するための短・中期発がんモデルが必要である。

発がんモデルではがん、あるいは前がん病変を指標にする事が一般的であるが、ラットの前立腺がんモデルでは前がん病変を惹起するには30-40週、がんでは50-60週必要であり、多数の被検物質をスクリーニングするには効率的ではない。そこで、これらの病変を代替する分子・遺伝子群を抽出・同定し、これらを指標にした前立腺発がんモデルの樹立を試みた。

我々は一昨年度に、前立腺発がん物質である 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) および 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) で、発現上昇を認めた3つの遺伝子、リン酸化ヒストンH2AX (γ -H2AX)、High mobility group box 2 (HMGB2) および Ki-67 について、前立腺発がん物質に対する特異性を検討した

結果、HMGB2 および Ki-67 で比較的良好な結果が得られた。一方、 γ -H2AX は標識率が0.02%と低いこともあり、解析範囲による値の変動が大きくなる恐れがあり、検出マーカーとして使用するには不相当である可能性が示唆された。

また、昨年度は上記の前立腺組織において発がん物質検出マーカーとして有益な遺伝子が他の臓器においても同様に用いることが可能であるかを、肝、腎および大腸組織において検討した結果、HMGB2 および Ki-67 標識率は肝、腎組織において比較的有益な結果を得た一方で、 γ -H2AX 標識率は対照群で低いこともあり、有意な結果は少なかった。大腸組織においては、HMGB2 が対照群で標識率95%と高く使用困難で、Ki-67 および γ -H2AX いずれも他臓器に比べ良好な結果を得られなかった。

今年度は、これら3つの遺伝子発現について腫瘍性病変が形成された時期においても、上昇しているかをラット及びヒト前立腺腫瘍組織を用いて検討した。また、種々の化学物質の毒性変化を検討する場合、飲水、摂餌および胃内強制投与など、経口投与が主体であるが、DMAB や N-Methyl-N-nitrosourea (MNU) については、それぞれ皮下や腹腔内投与による発がん試験が主体であり投与方法によっては、発がん性が確認出来ない可能性がある。そこで、等しい用量を別の経路で投与した際に、前立腺発癌に対する上記3つの遺伝

子の発現が同等であるかを検討した。

B . 研究方法

6週齢 F344 雄ラットに、PhIP 100 mg/kg で週 2 回強制胃内投与を 10 週間行い、60 週齢で屠殺剖検した前立腺腹葉において認められた腫瘍病変、6 週齢 F344 雄ラットに、DMAB 50 mg/kg で皮下に 2 週間に 1 回を 20 週間行い、60 週齢で屠殺剖検した前立腺腹葉において認められた腫瘍病変およびヒト前立腺癌を含む前立腺組織について、免疫組織染色を行い、 γ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

6 週齢 F344 雄ラットに、前立腺発がん物質である DMAB、MNU、前立腺以外の臓器に対する発がん物質として Dimethylnitrosamine (DMN)(標的臓器：肝、腎)、1,2-Dimethylhydrazine (DMH)(標的臓器：大腸)を単回投与した。投与経路は、それぞれ皮下投与(DMAB、DMH)もしくは腹腔内投与(MNU、DMN)とともに、すべての物質に対して胃内強制投与を用いた。投与 2 日後に前立腺、肝、腎、大腸を摘出し、ホルマリン固定および一部は凍結組織を採取した。免疫組織染色を行い、 γ -H2AX, HMGB2 および Ki-67 の標識率を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮については、名古屋市立大学動物実験委員会から動物実験の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護に十分に配慮した。また、ヒト前立腺組織については、名古屋市立大学大学院医学研究科「ヒト遺伝子解析研究倫理審査委員会」で承認された症例を用いて検討し、個人情報保護についても十分に配慮した。

C . 研究結果

PhIP および DMAB 誘発の前立腺腫瘍性病変において、HMGB2 および Ki-67 標識率は周囲正常前立腺上皮に比べ、有意に上昇した。一方、 γ -H2AX 標識率は染色性に問題があり、正常上皮及び腫瘍性病変において差が見られなかった。ヒト前立腺組織においては、正常前立腺上皮に比べ、 γ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 標識率いずれも腺癌で有意な上昇を認めるとともに、組織形態の指標である Gleason grade の上昇に比例して、各標識率の有意な上昇を確認した。

投与経路の違いによる各標識率の違いを検討した結果、一部で異なる標識率が存在するものの、総じて DMAB および MNU 投与による有意な上昇を投与経路に関わらず、 γ -H2AX、HMGB2 および Ki-67 いずれにおいても認められた。ただし、今回の結果では、Ki-67 標識率が他の 2 つに比べ有意差が乏しい結果だった。一方で、前立腺に標的性のない発がん物質 DMN、DMH いずれも投与方法にかかわらず、

対照群とほぼ同様の標識率だった。

E . 研究発表

1 . 論文発表

外国語論文

- 1) Sato, S., Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Komiya, M., Long, N., Kato, H., Sagawa, H., Yamashita, Y., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. *J Toxicol Pathol*, 27: 43-49, 2014.
- 2) Nakasuka, K., Ito, S., Miyata, K., Inomata, M., Yoshida, T., Tamai, N., Suzuki, S., Murakami, Y., Sato, K., Suzuki, S., Eishi, Y., Morimoto, S.: A case of idiopathic giant cell myocarditis with a past history of sarcoidosis. *J Card Cases*, 9: 35-39, 2014.
- 3) Dodmane, PR., Arnold, LL., Muirhead, DE., Suzuki, S., Yokohira, M., Pennington, KL., Dave, BJ., Lu, X., Le, XC., Cohen, SM.: Characterization of intracellular inclusions in the urothelium of mice exposed to inorganic arsenic. *Toxicol Sci*, 137: 36-46, 2014.
- 4) Oomura, M., Sakakibara, N., Suzuki, S., Wakita, A., Mori, Y., Kamimoto, K.: Intravascular lymphomatosis mimicking primary central nervous system lymphoma: A case report and literature review. *Case Rep Neurol*, 6: 101-108, 2014.
- 5) Arnold, LL., Suzuki, S., Yokohira, M., Kakiuchi-Kiyota, S., Pennington, KL., Cohen SM.: Time course of urothelial changes in rats and mice orally administered arsenite. *Toxicol Pathol*, 42: 855-862, 2014.
- 6) Naiki, T., Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Kawai, N., Tozawa, K., Etani, T., Sato, S., Suzuki, S., Shirai, T., Kohri, K., Takahashi, S.: GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration resistant prostate cancer. *Carcinogenesis*, 35: 1962-1967, 2014.
- 7) Hachiya, K., Wakami, K., Tani, T., Yoshida, A., Suzuki, S., Suda, H., Ohte, N.: Double-valve replacement for mitral and aortic regurgitation in a patient with Libman-Sacks endocarditis. *Intern Med*, 53: 1769-1773, 2014.
- 8) Arima, H., Hirate, H., Sugiura, T., Suzuki, S., Takahashi, S., Sobue, K.: IV injection of polystyrene beads for mouse model of sepsis causes severe glomerular injury. *J Intensive*

Care, 2: 21, 2014.

- 9) Yamashita, Y., Nagasaka, T., Naiki-Ito, A., Sato, S., Suzuki, S., Toyokuni, S., Ito, M., Takahashi, S.: Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. Mod Pathol, 28: 111-117, 2015.
- 10) Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kuno, T., Punfa, W., Long, N., Kato, H., Inaguma, S., Komiya, M., Shirai, T., Takahashi, S.: Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. J Toxicol Pathol, 28: 21-26, 2015.
- 11) 佐藤慎哉、鈴木周五、内木綾、白井智之、高橋智：前立腺癌に対する HDAC 阻害剤の予防および治療効果の検討。泌尿器外科，27 巻 8 号：1217-1219，2014。
- 12) 佐藤慎哉、内木綾、鈴木周五、高橋智：肝癌の危険因子と発癌機序。その他の化学物質発がん（アフラトキシン、ニトロソ化合物など）。日本臨床，73（増刊号 1）：142-146，2015。

2. 学会発表

- 1) 鈴木周五、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月、広島。
- 2) 佐藤慎哉、鈴木周五、他、選択的 HDAC 阻害剤による前立腺癌増殖抑制効果の検討、第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月、広島。
- 3) 鈴木周五、他、ラットにおける前立腺発がん物質早期検出マーカーの確立、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月、横浜。
- 4) 鈴木周五、他、Pioglitazone によるラット前立腺発癌抑制効果、第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2014 年 1 月、東京。
- 5) Suzuki, S. et al., Apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, suppresses rat prostate carcinogenesis、SOT Annual Meeting、2014 年 3 月、San Diego。

F. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質検出系の開発

研究分担者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長
研究協力者 豊田 武士 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究要旨

本研究は、短・中期に膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質を検出できる指標の探索を目的としている。昨年度までに、DNA 二重鎖切断のマーカーである H2AX が、膀胱に対する遺伝毒性/発がん性の指標として利用し得る可能性が示唆された。平成 26 年度は、H2AX のマーカーとしての特異性を詳細に検討するため、前年度までの実験結果の定量的解析を行うとともに、膀胱を標的とししない遺伝毒性発がん物質を加えた追加の動物実験を実施した。6 週齢の雄 F344 ラット各群 10 匹に、0.025% 2-acetylaminofluorene (2-AAF)、1% *p*-cresidine、0.02%/0.01% dimethylarsinic acid (DMA)、0.04% glycidol、0.001% *N*-nitrosodiethylamine (DEN) および 0.005% acrylamie (AA) を 4 週間飲水 (2-AAF/*p*-cresidine のみ混餌) 投与し、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖し、膀胱上皮での H2AX 発現を免疫組織化学的に検索した。4 週時点において、遺伝毒性膀胱発がん物質を投与した 4 群 (*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine; BBN, 2-nitroanisole; 2-NA, 2-AAF, *p*-cresidine) すべてで H2AX 陽性細胞は有意に増加した。一方、膀胱を標的とししない遺伝毒性発がん物質では、3 群 (glycidol, DEN, AA) とともに H2AX 発現は変化しなかった。2 週間の休薬後、全群で H2AX 発現は減少したが、BBN, 2-NA, 2-AAF 群では対照群よりも有意に高い発現レベルを維持していた。以上の結果から、H2AX 免疫染色によって、遺伝毒性膀胱発がん物質を短期間 (4 週間) の投与で検出し得ることが示唆された。

A . 研究目的

近年、発がん過程における DNA 損傷・修復経路の重要性が明らかにされつつあり、特に DNA 二重鎖切断はゲノム不安定性の原因となる深刻な傷害と認識されている。DNA に二重鎖切断が生じると、ヒストン構成タンパクの一種である H2AX が速やかにリン酸化され、H2AX を形成する。がん化における H2AX の役割には不明な点が多く、中でも膀胱がんとの関連についての研究は非常に少ない。

本研究は、膀胱を標的とする遺伝毒性発がん物質を短・中期に検出できる指標の探索を目的としている。昨年度までに、遺伝毒性膀胱発がん物質 (BBN/2-NA) あるいは非遺伝毒性膀胱発がん物質 (メラミン/ウラシル) 等を投与したラット膀胱における H2AX 発現を、免疫組織化学的に検討した。その結果、BBN および 2-NA を 4 週間投与したラット膀胱上皮細胞には、H2AX の発現が高頻度に認められた一方、対照群にはほとんど観察されなかった。2 週間の休薬後、すべての群で H2AX 陽性細胞は減少したが、BBN および 2-NA 群では一定数の残存が認められた。以上の結果から、H2AX は膀胱に対する遺伝毒性/発がん性の指標として利用し得る可能性が示唆された。

平成 26 年度は、膀胱に対する遺伝毒性/発がん性検出指標としての H2AX の特異性を詳細に検討するため、前年度までの実験結果の定量的解析とともに、膀胱を標的とししない遺伝毒性発がん物質を加えた追加の動物実験を実施し、膀胱上皮細胞における H2AX および細

胞増殖マーカーとして Ki67 の発現を免疫組織化学的に検索した。

B . 研究方法

6 週齢の雄 F344 ラットに、実験 1 (前年度までに実施) として 0.05% *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN)、1.8% 2-nitroanisole (2-NA)、2% 2,2-bis (bromomethyl)-1,3-propanediol (BMP)、0.1% phenethyl isothiocyanate (PEITC)、3%メラミンおよび 3%ウラシルを、また実験 2 (今年度実施) として 0.025% 2-acetylaminofluorene (2-AAF)、1% *p*-cresidine、0.02% dimethylarsinic acid (DMA)、0.04% glycidol、0.001% *N*-nitrosodiethylamine (DEN) および 0.005% acrylamie (AA) を 4 週間混餌 (BBN, DMA, glycidol, DEN, AA は飲水) 投与した。DMA 群において、投与 3 週目に毒性によると思われる死亡例が認められたため、最終週の投与濃度を 0.01%に変更した。各群 10 匹を用い、投与終了時に 5 匹、2 週間の休薬後に 5 匹を解剖した。膀胱を採材し、尿路上皮での H2AX および Ki67 の発現を免疫組織化学的に検索した。各個体あたり最低 3,000 個の膀胱上皮細胞を測定し、1,000 個あたりの H2AX/Ki67 陽性細胞数を算出した。さらに、cell population の解析として、基底層 (basal cell)、中間層 (intermediate cell) および表層 (umbrella cell) ごとの H2AX/Ki67 陽性細胞の割合についても併せて計測した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

H2AX は膀胱上皮細胞の核内にドット状の foci として観察された (図 1)。4 週間の投与終了時点において、膀胱上皮での H2AX 陽性細胞は対照群 (1,000 細胞あたり 0.9 ± 0.6 個) と比較し、遺伝毒性膀胱発がん物質 (BBN, 2-NA, 2-AAF, *p*-cresidine) を投与した 4 群ではいずれも有意に増加した ($49 \pm 11 \sim 111 \pm 37$) (図 2)。一方、膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質 (glycidol, DEN, AA) では、3 群ともに H2AX 発現の変化は認められなかった ($0.7 \pm 0.4 \sim 2.2 \pm 2.0$)。2 週間の休薬後、すべての群で H2AX 発現は減少したが、遺伝毒性膀胱発がん物質のうち 3 種 (BBN, 2-NA, 2-AAF) の投与群では、対照群よりも有意に高い発現レベルを維持していた。Ki67 発現は遺伝毒性膀胱発がん物質を投与した 4 群、および PEITC (過形成誘発、遺伝毒性+)、メラミン/ウラシル (非遺伝毒性膀胱発がん物質) の 3 群で増加し、休薬後にはすべての群で対照群と同じレベルにまで低下した (図 3)。

cell population の解析では、4 週時点での H2AX/Ki67 陽性細胞はほとんどの群で basal cell の割合が高かったが、PEITC および BMP/DMA 群ではそれぞれ intermediate cell と umbrella cell の割合が高かった (図 4 および図 5)。休薬後、basal cell が減少し、intermediate/umbrella cell が増加する傾向が認められた。

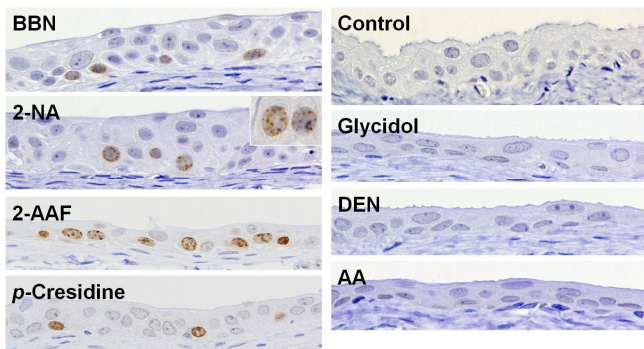


図 1. ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 発現

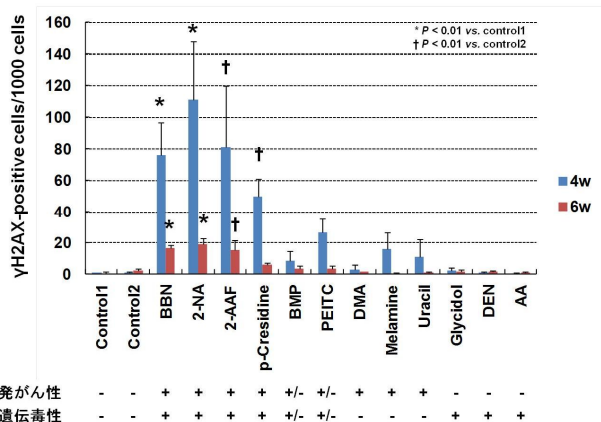


図 2. ラット膀胱粘膜上皮細胞における H2AX 陽性細胞

胞の定量解析

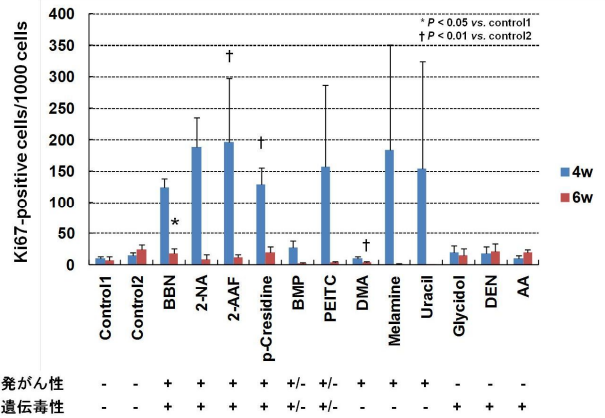


図 3. ラット膀胱粘膜上皮細胞における Ki67 陽性細胞の定量解析

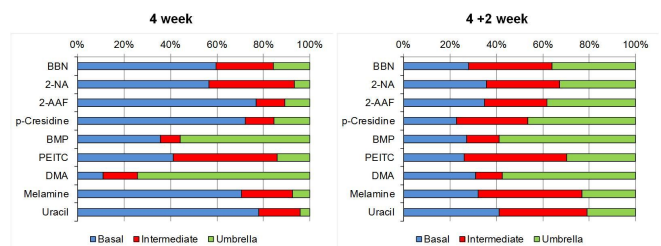


図 4. H2AX 陽性細胞における basal/intermediate/umbrella cell の割合

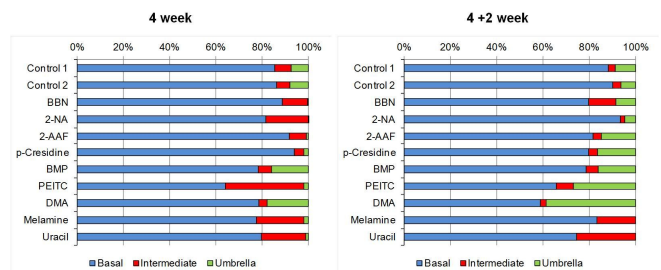


図 5. Ki67 陽性細胞における basal/intermediate/umbrella cell の割合

D. 考察

ラット膀胱粘膜における H2AX 発現は遺伝毒性膀胱発がん物質 (BBN, 2-NA, 2-AAF, *p*-cresidine) の投与で有意に増加した一方、膀胱を標的としない遺伝毒性発がん物質 (glycidol, DEN, AA) では変動がみられなかった。これらの結果から、H2AX は膀胱に対する遺伝毒性発がん物質の早期検出指標として有効である可能性が示唆された。

H2AX 発現は 2 週間の休薬後にほとんどの群で減少し、DNA 修復の進行、またはアポトーシスによる除去が考えられた。陽性細胞の主体は intermediate/umbrella cell へとシフトし、basal cell の DNA 修復能が比較的高いが、損傷を残したまま分化を続けている可能性がある。

BBN/2-NA/2-AAF は休薬後も有意に高い H2AX 発現を維持していた。BBN と 2-NA は比較的短期間の投与で発がんに至ることから、休薬後に残存した DNA 損傷が後の発がんに関与している可能性がある。*p*-cresidine

の2年間がん原性試験では、最初の膀胱腫瘍が検出されるまで51週を要しており、*p*-cresidineによる膀胱発がんには長期間の継続的な曝露が重要であるかもしれない。

BMP/DMA 群では、H2AX/Ki67 陽性細胞における umbrella cell の割合が高い傾向がみられた。両物質とも、発がん機序として酸化ストレスを介した DNA 損傷が示唆されている。今回の結果は、BMP/DMA が誘導する早期の酸化ストレスに対し、umbrella cell の感受性が比較的高い可能性を示している。

PEITC は細胞内での活性酸素種の誘導を通じた、がん細胞の増殖抑制効果が期待されている一方、膀胱に対しては過形成を誘発し、長期投与では発がんにも至ることが報告されている。PEITC 群の H2AX/Ki67 発現は intermediate cell に多く認められた。BMP/DMA との異なる感受性については、過形成の存在が関与している可能性があるが、より詳細な検討が必要である。

メラミン/ウラシルは膀胱結石の物理的刺激による発がん機序で知られている。4週時には全例に結石の形成と過形成が認められ、Ki67 発現はびまん性に増加した。一方、H2AX 陽性細胞の分布は散発的で、局所における炎症や増殖活性の亢進を反映していると考えられた。

E . 結論

本研究の結果から、H2AX 免疫染色によって、遺伝毒性膀胱発がん物質を短期間(4週間)の投与で検出し得る可能性が示唆された。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of ferric citrate in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 74: 68-75, 2014
- 2) Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Nishikawa A, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of sodium iron chlorophyllin in F344 rats. *J Toxicol Sci*, 39: 109-119, 2014
- 3) Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Absence of *in vivo* genotoxicity of

3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4 week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats. *Mutagenesis*, 29: 295-302, 2014

4) Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Absence of *in vivo* genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4 week comprehensive toxicity study using F344 *gpt* delta rats. *Mutagenesis*, 29: 295-302, 2014

5) Akagi J, Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Validation study of the combined repeated-dose toxicity and genotoxicity assay using *gpt* delta rats. *Cancer Sci*, in press

2. 学会発表

- 1) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、小川久美子 . ラット膀胱に対する遺伝毒性および発がん性評価指標としての H2AX . 第 31 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京、2015 年 1 月 30 日
- 2) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、小川久美子 . ラット膀胱に対する遺伝毒性発がん物質検出指標としての H2AX 発現 . 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 26 日
- 3) 豊田武士、曹永晩、赤木純一、水田保子、鈴木勇、平田直、小川久美子 . ラット膀胱上皮細胞における H2AX 発現の検討 . 第 41 回日本毒性学会学術年会、神戸、2014 年 7 月 4 日

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし

網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価

研究分担者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム方)の構築に取り組んできた。これまでに、分析手法の構築や付加体同定に用いるデータベースの構築等を行い、ジクロロメタン及びジクロロプロパンの遺伝毒性評価を *in vivo* モデルを用いて行った。本研究では、非遺伝毒性発がん物質である 1,4-ジオキサン¹の遺伝毒性の評価を、ラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、LC-MS を用いたアダクトーム解析（付加体の網羅的解析）により検討した。1,4-ジオキサンはラットに肝臓がんを誘発することが知られている非遺伝毒性発がん物質であり、その発がんメカニズムについては未だ良くわかっていない。本研究では、1,4-ジオキサンをラットに投与し、肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。1,4-ジオキサンを 0, 20, 200 及び 5000 ppm の濃度で飲水投与した後、肝臓における DNA 付加体を質量分析機器を用いて解析した。その結果、1,4-ジオキサン投与により、付加体の総数は増加する傾向が観察されたが、必ずしも 1,4-ジオキサンの濃度とは関連しなかった。付加体の網羅解析により得られたデータの生物統計解析を行なったところ、各投与群毎のクラスターに分類されることがわかった。また、1,4-ジオキサンの投与に相関する付加体として、酸化ストレスや炎症由来の DNA 付加体を含む幾つかがスクリーニングされた。

A . 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験（変異原性試験）、コメットアッセイ（DNA 損傷試験）、小核試験（染色体異常試験）などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考え。これまで我々は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめてきた。また、昨年度は確立した LC-TOF-MS による DNA アダクトーム法を用いて、ヒトが曝露しうる化学物質が誘発する DNA 損傷性の評価ならびに新規 DNA 付加体の解析を行なった。今年度は、非遺伝毒性発がん物質のリスク評価をラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、DNA アダクトーム法で行う事の妥当性について検討した。1,4-ジオキサンはラットに肝臓がんを誘発することが知られている非遺伝毒性発がん物質であり、その発がんメカニズムについては炎症が関与する事が示唆されているものの、未だ良くわかっていない。本研究では、1,4-ジオキサンをラットに投与し、発がん標的臓器である肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。

B . 研究方法

1,4-ジオキサンを 0, 20, 200 及び 5000 ppm の濃度で、雄性 F344 ラット（各群それぞれ 5 匹）に 16 週間飲水投与した後、肝臓を摘出し、DNA を抽出した。各種ヌクレアーゼにより DNA をモノヌクレオシドに分解し、DNA 付加体を質量分析機器を用いて解析した。得られたデータを主成分（PCA）解析により解析し、ジオキサン投与に相関する付加体の抽出を実施した。抽出した DNA 付加体の同定は、独自に構築した DNA 付加体データベースとの比較により行った。抽出した付加体の各サンプル中の存在量は、定量分析用の質量分析機器（Waters Quattro Pt LC-MS/MS）により分析した。

（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C . 研究結果

1,4-ジオキサンを投与したマウス肝臓DNAのアダクトーム解析を行なった結果を図 1 に示す。溶媒対象と比較し、1,4-ジオキサン投与により、付加体の総数は増加する傾向が観察されたが、必ずしも1,4-ジオキサンの濃度とは関連しなかった。更に、主成分（PCA）解析を行なったところ、各投与群毎のクラスターに分類され、1,4-ジオキサン投与に相関する付加体として、複数個の付加体が抽出された（図 2 及び 3）。このうち、1,4-ジオキサン

5000ppm投与群からは6つの特異的な付加体が検出された。検出された特異的な付加体の m/z 値および溶出時間をDNA付加体データベースと比較した結果、炎症及び酸化ストレス由来の付加体であることが示唆された(表1)。

D. 考察

1,4-ジオキサンを投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅的な解析を行なったところ、1,4-ジオキサン投与に相関するものとして、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よって1,4-ジオキサン投与により、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質1,4-ジオキサンの発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後、本解析で抽出された1,4-ジオキサンに相関する付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう事が必要である。更に、アダクトーム法の他の遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん物質のリスク評価への応用についても検討を行なう。

図1 1,4-ジオキサン投与群及びコントロール群のDNA付加体マップ

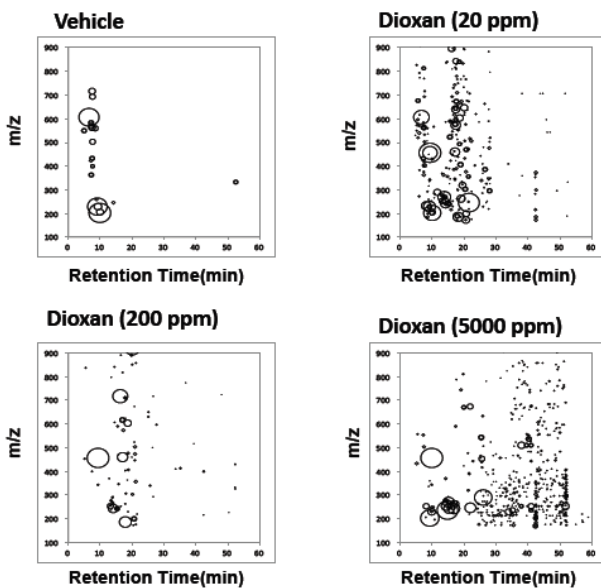


図2 PCA解析の結果

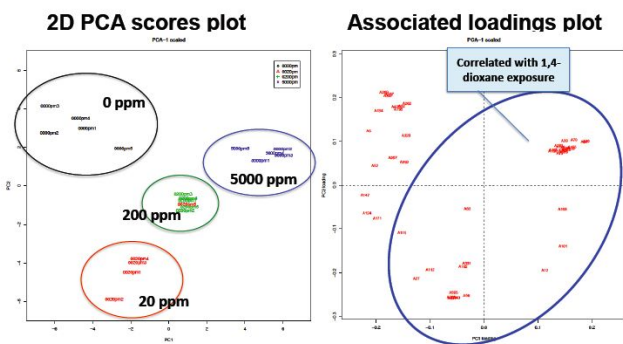


図3 PCA解析により抽出された付加体のヒートマップ

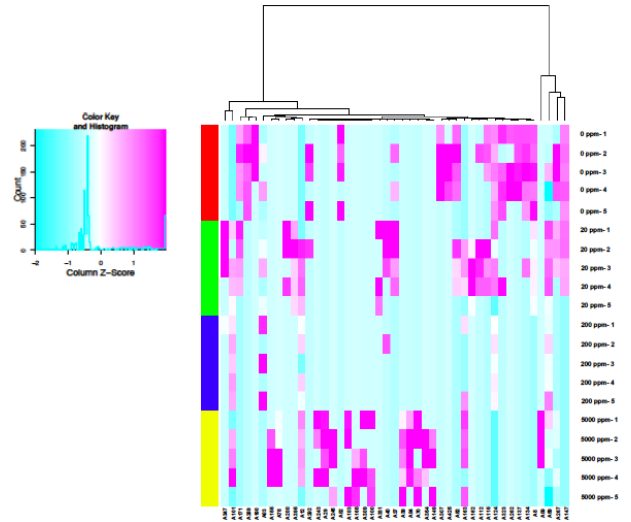


表1

| Adducts | M/Z [M+H] | Comparing with DNA adduct database [M+H] | Derivation |
|---------|-----------|---|---------------------------------------|
| A37 | 508.656 | d(G[8-3]T), d(G[8-5m]T [508.1792] | Oxidation (Cross-link) |
| A155 | 301.212 | 8-oxo-dG [301.1295 (+NH ₃)], propano-dC [301.1547 (+NH ₃)], Unknown adduct in model reaction [301.1379 (+NH ₃), Oxidized Linoleic acid], [301.1279 (+NH ₃), NH ₄ Br], [301.1579 (+NH ₃), MNU], [301.1789 (+NH ₃), MNU] | Oxidation (ROS), acrolein, Alkylation |
| A183 | 273.129 | Unknown adduct in model reaction [273.1459 (+NH ₃), NaNO ₂] | Inflammation |
| A243 | 339.142 | Unknown adduct in model reaction [339.1348 (+Na), Oxidized arachidonic acid], [339.2148 (+Na), NaNO ₂] | Inflammation |
| A354 | 674.728 | Unknown adduct | - |
| A389 | 257.14 | FodU [257.0773], O ⁶ -MedT [257.1137], Unknown adduct in model reaction [257.126, MNU], [257.1583 (+K), Oxidized DNA], [257.1379 (+NH ₃), NH ₄ Br] | Oxidation, Alkylation |

E. 結論

1,4-ジオキサンをラットに投与し、肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。その結果、1,4-ジオキサン投与により、付加体の総数は増加する傾向が観察された。付加体の網羅解析により得られたデータの生物統計解析を行なったところ、1,4-ジオキサンの投与に相関する付加体として、酸化ストレスや炎症由来のDNA付加体を含む幾つかがスクリーニングされた。これらの結果から、1,4-ジオキサン投与により、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質1,4-ジオキサンの発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後は、本解析で抽出された1,4-ジオキサンに相関する付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性について

ても検討を行なう必要がある。更に、アダクトーム法の他の遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん物質のリスク評価への応用についても検討を行なう必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H. In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and l-tryptophan. *Mutat Res.* 2014, 760:48-55.
2. Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K. Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response. *Nanomaterials*, 2014, 4: 175-188.
3. Kochi T, Shimizu M, Totsuka Y, Shirakami Y, Nakanishi T, Watanabe T, Tanaka T, Nakagama H, Wakabayashi K, Moriwaki H. A novel aromatic mutagen, 5-amino-6-hydroxy-8*H*-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABAQ), induces colonic preneoplastic lesions in mice. *Toxicology Reports* 2014, 1: 69-73.
4. Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Yamada H, Totsuka Y, Matsuda T, Nakagama H, Sugimura H. Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med.* 2014, 75: 136-146.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里、中釜 斉、質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析により発がんに関わる DNA 付加体を探索する Exploration of DNA adducts contributing to cancer development using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 41 回毒性病理大会. 2014 年 7 月

2. 後藤正憲、戸塚ゆ加里、土原一哉、三牧幸代、尾島英知、柴田龍弘、落合淳志、中釜斉 Analyses of genotoxicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane, being responsible for occupational bile duct cancer, 日本癌学会第 73 回大会. 2014 年 9 月
3. 椎崎 一宏、後藤 正憲、荒井 康仁、濱 奈津子、柴田 龍弘、中釜 斉、戸塚 ゆ加里, Identification of the location of DNA adducts within the genome, 日本癌学会第 73 回大会. 2014 年 9 月
4. 池田 茜、加藤 護、柴田龍弘、黒坂 功、林 櫻松、松島芳隆、遠藤 治、中釜 斉、戸塚ゆ加里、中国における食道癌発症要因の集学的アプローチによる解明、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
5. 後藤正憲、三牧幸代、久保正二、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里、職業性胆管癌及びジクロロプロパン曝露細胞の塩基置換シグネチャー解析、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
6. 椎崎 一宏、後藤 正憲、濱 奈津子、荒井 康仁、柴田 龍弘、中釜 斉、戸塚 ゆ加里、ゲノム中の DNA 修飾の単分子検出方法の検討、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月
7. 秋元峻太郎、加藤 護、柴田龍弘、遠藤 治、魏 民、中釜 斉、鰐淵英機、福島昭治、戸塚ゆ加里、非遺伝毒性発がん物質、1,4-ジオキササン投与ラット肝臓における DNA 付加体の網羅解析、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

ヒストン修飾を指標とした *in vitro* 発がんリスク評価系の開発

研究分担者 伊吹 裕子 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科 教授

研究要旨

本研究ではヒストンの化学修飾に焦点をあてた新規 *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、最終的に本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系との対比検討を行うことにより、その有用性を確認することを目標としている。これまでに、中・短期動物発がん実験系において、各組織でヒストン H2AX のリン酸化（ γ -H2AX）の検出が可能であることが示されている。これを発がんリスク評価系としてさらに推し進めるために、本年度は、 γ -H2AX 検出における偽陽性検出の可能性を評価した。ヒト培養細胞を、界面活性剤処理、pH 変化、熱処理など、様々な条件で培養した。その結果、 γ -H2AX は、DNA 損傷を誘導しない特定の界面活性剤で顕著に誘導されること、pH を酸性に傾けると誘導されることが判明した。また、細胞がアポトーシスを誘導した際も顕著なリン酸化が認められた。 γ -H2AX は、高感度な DNA 損傷マーカーとして、化学物質による DNA 損傷性評価に使用されるが、これら DNA 損傷以外のいくつかの要因においても誘導されることも認識して γ -H2AX の誘導を評価する必要があることが示された。

A. 研究目的

本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系において、化学物質を作用した動物の各組織でヒストン H2AX のリン酸化（ γ -H2AX）の検出が可能であることが示されている。 γ -H2AX は高感度な DNA 損傷マーカーであることは *in vitro* の実験で証明されているが、*in vivo* において γ -H2AX の検出を発がんリスクマーカーとして推し進めるためには、本来の化学物質による DNA 損傷を原因とする γ -H2AX の誘導と、偽陽性を含めたそれ以外の原因による誘導を区別して評価できるようにする必要がある。本年度は、DNA 損傷を原因としない γ -H2AX の誘導、並びに偽陽性検出の可能性について検討し、 γ -H2AX の発がんリスクマーカーとしての評価とその注意事項について明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ヒト培養細胞株（A549 肺上皮細胞）に界面活性剤作用、熱ショック処理、pH 変化などを行い、一定時間で培養した後、Western blotting 及び免疫染色法により、 γ -H2AX 誘導変化を解析した。

Western blotting: 細胞を回収後、ヒストンを抽出、12.5% ゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。1% skim milk/T-PBS 溶液で 1/2800 希釈した一次抗体 Rabbit anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG antibody (Merck Millipore. Co., USA)、二次抗体 Rabbit anti-IgG-HRP (Jackson Immuno Research Lab., USA) を反応後、ECL+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて検出した。

免疫染色法: 35mm ガラス底ディッシュに細胞を播種し、培養後、各種化学物質等を作用した。6%ホルマリンで固定、2% Triton X-100 で透過処理した後、

一次抗体 Mouse anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG, (Millipore. Co., USA)、二次抗体 FITC conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., USA) をいずれも 1/200 希釈して使用した。蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus Co., Japan)、Axio vision Ver.2.05 (Carl Zeiss Co. Ltd., Germany) で撮影を行った。画像解析には Image J 1.46 (Broken Symmetry Software, USA) を使用した。

C. 研究結果

過剰量の化学物質や熱など作用後、アポトーシスが誘導されると、顕著な γ -H2AX の誘導が認められた。免疫染色では、アポトーシスに移行すると考えられる細胞は、DNA 損傷に基づくリン酸化パターンとは明らかな違いを示した (Fig. 1)。

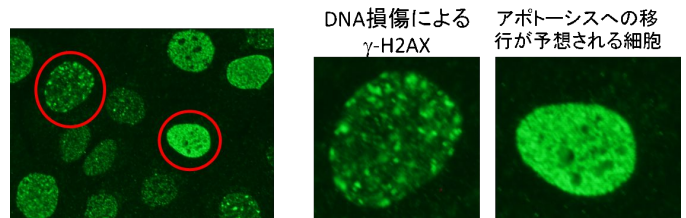


Fig. 1 アポトーシスによる γ -H2AXの誘導

DNA 損傷能を有しないとされる化学物質作用においても γ -H2AX の誘導が確認された。特に、界面活性剤によるリン酸化は顕著であった。Fig.2 に各種界面活性剤による γ -H2AX の誘導を示す。Tween 20, Triton X, NP-40 いずれの界面活性剤においても、顕著な γ -H2AX の誘導が認められた。一方、同じ界面活性剤である SDS では、同様の γ -H2AX の誘導は認められなかった。

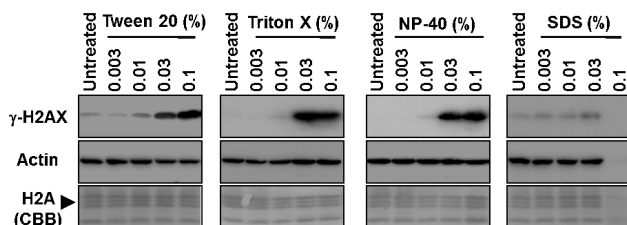


Fig. 2 各種界面活性剤による γ -H2AXの誘導

また、 γ -H2AXの誘導は、低pH処理においても誘導された。pHを4-5に調整すると、顕著な γ -H2AXが認められたが、pHを高くした場合は誘導はわずかしが認められなかった (Fig. 3)

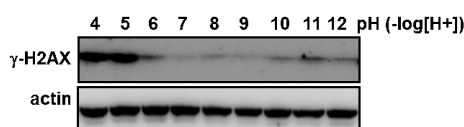


Fig. 3 pH変化による γ -H2AXの誘導

D. 考察

γ -H2AXの組織免疫染色の際、アポトーシスによるリン酸化と、DNA損傷やその他要因によるリン酸化を区別する必要があると考えられた。今回示した培養細胞の免疫染色のように、ヒストン染色パターンで区別ができるか否か、検討する必要がある。

また、DNA損傷能を有さないと報告されている化学物質においても顕著な γ -H2AXが認められる場合があることが示された。界面活性剤は、遺伝毒性や発がんの報告は少なく、各種産業などで使用されている。Tween 20、Triton X、NP-40において、濃度依存的に γ -H2AXが誘導されたのにもかかわらず、同じ界面活性剤であるSDSにおいて誘導されなかった理由については不明であるが、誘導メカニズムの解明においてヒントを与えるものとなると考えている。pHの変化による γ -H2AX誘導についても同様に、その誘導メカニズムは不明である。

E. 結論

組織免疫染色におけるポジティブな γ -H2AXのデータは、DNA損傷能を有する化学物質による作用以外に、幾つかの要因による誘導の可能性がある。組織免疫染色の際、それらを加味して、慎重に評価されるべきと考えられた。界面活性剤やpH変化により γ -H2AXが誘導された機構については不明であり、今後解析していく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- I. Yoshida and Y. Ibuki. Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. *Mutat. Res.-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 770, 9-18 (2014).
- T. Kubota, T. Toyooka, X. Zhao, Y. Ibuki. Phosphorylation of Histone H2AX Generated by Linear Alkylbenzene Sulfonates and its Suppression by UVB Exposure. *Photochem. Photobiol.* 90, 845-852 (2014).
- Y. Ibuki, T. Toyooka, X. Zhao, I. Yoshida. Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. *Carcinogenesis* 35(6), 1228-1237 (2014).

2. 学会発表

- 伊吹裕子, 豊岡達士: 環境化学物質の光分解と遺伝毒性変化: リン酸化ヒストンH2AXを指標とした解析. 日本薬学会第134回年会(熊本) 2014年3月
- Y. Ibuki, T. Toyooka, G. Yang, M. Matsushita: 17- β -estradiol-induced hyperacetylation of histone H3 and change of sensitivity to UVB. The 11th Japan-China International Symposium on Health Sciences (Shizuoka) Nov. 2014.
- 楊光, 吉田唯真, 伊吹裕子: ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇とDNA損傷修復の遅延. 第27回変異原機構研究会(愛知) 2014年6月.
- 伊吹裕子, Vivienne Reeve: 長波長紫外線UVA1によるヒストン修飾変化 第36回日本光医学・光生物学学会(大阪) 2014年7月.
- 趙曉旭, 伊吹裕子: フローサイトメーターの側方散乱光とhistone H3リン酸化を指標とした銀ナノ粒子の生体影響評価手法の開発. 第43回日本環境変異原学会(東京) 2014年12月.
- 楊光, 伊吹裕子: ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇とDNA損傷修復の遅延. 第43回日本環境変異原学会(東京) 2014年12月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|--|---|-----------------------|--|---------------------|-----|------|---------|
| 塚本徹哉, 桐山諭 和, 立松 正衛 | 3. 胃癌ハイリス クの病理学的背景 - 発癌仮説, 前癌 病変, 前癌状態- | 一瀬雅夫, 岡政志, 齋 藤博 | 胃癌リスクフ ァクターとリ スク診断 - とくにABC検 診の現状と問 題点の正しい 理解のために - | 日本メデ ィカルセ ンター | 東京 | 2014 | 29-37 |
| Wei M, Xie Xiao-Li, Yamano S, Kakehashi A, Wanibuchi H | Isoleucine, leucine and their role in experimental models od bladder carcinogenesis. | Bendich, Adrianne | Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition | Humana Press | | 2015 | 253-260 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|---------------------|----|-----------|------|
| Tsukamoto, T., Tatematsu, M. | Role of Helicobacter pylori in Gastric Neoplasia. | Curr Infect Dis Rep | 16 | 402 | 2014 |
| Toyoda, T., Yamamoto, M., Takasu, S., Ogawa, K., Tatematsu, M., Tsukamoto, T.. | Molecular mechanism of gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected rodent models. | Diseases | 2 | 168-186 | 2014 |
| Okochi-Takada, E., Hattori, N., Tsukamoto, T., Miyamoto, K., Ando, T., Ito, S., Yamamura, Y., Wakabayashi, M., Nobeyama, Y., Ushijima, T. | ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. | Oncogene | 33 | 2273-2278 | 2014 |
| 塚本徹哉, 桐山諭和, 柴田知行 | 【ヘリコバクター・ピロリ感染胃炎を診る、治す】H. pylori胃炎除菌による胃内環境への影響 除菌による病理組織学的所見の変化. | 臨床消化器内科 | 29 | 337-344 | 2014 |
| Yamada T, Wei M, Toyoda T, Yamano S, Wanibuchi H. | Inhibitory effect of raphanobrassica on Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. | Food Chem Toxicol | 70 | 107-113 | 2014 |
| Tago Y, Fujii T, Wada J, Kato M, Wei M, Wanibuchi H, Kitano M. | Genotoxicity and subacute toxicity studies of a new astaxanthin-containing Phaffia rhodozyma extract. | J Toxicol Sci | 39 | 373-382 | 2014 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|-----------------------|----------|---------|------|
| Kakehashi A, Kato A, Ishii N, <u>Wei M</u> , Morimura K, Fukushima S, Wanibuchi H. | Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling. | PLoS One | 9 | e113610 | 2014 |
| Kuwae Y, Kakehashi A, Wakasa K, <u>Wei M</u> , Yamano S, Ishii N, Ohsawa M, Wanibuchi H. | Paraneoplastic Mucin-Like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. | Pancreas | 44 | 106-115 | 2015 |
| <u>Gi M</u> , Fujioka M, Yamano S, Shimomura E, Ishii N, Kakehashi A, Takeshita M, Wanibuchi H. | Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. | Toxicol Sci | In press | | 2015 |
| Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Niinomiya F, Kinouchi S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K. | Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. | Exp. Toxicol. Pathol. | 65 | 925-932 | 2013 |
| Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Niinomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. | Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. | J. Toxicol. Pathol. | 27 | 175-182 | 2014 |
| Toyoda T, Cho YM, Mizutani Y, Akagi J, <u>Ogawa K</u> | A 13-week subchronic toxicity study of ferric citrate in F344 rats | Food Chem Toxicol | 74 | 68-75 | 2014 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|------------------|-----|---------|------|
| Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Nishikawa A, <u>Ogawa K</u> | A 13-week subchronic toxicity study of sodium iron chlorophyllin in F344 rats | J Toxicol Sci | 39 | 109-119 | 2014 |
| Onami S, Cho YM, Toyoda T, Horibata K, Ishii Y, Umemura T, Honma M, Nohmi T, Nishikawa A, <u>Ogawa K</u> | Absence of <i>in vivo</i> genotoxicity of 3-monochloropropane-1,2-diol and associated fatty acid esters in a 4 week comprehensive toxicity study using F344 <i>gpt</i> delta rats | Mutagenesis | 29 | 295-302 | 2014 |
| Onami S, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Yoshida M, Nishikawa A, <u>Ogawa K</u> | A 13-week repeated dose study of three 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters in F344 rats | Arch Toxicol | 88 | 871-880 | 2014 |
| Sato, S., <u>Suzuki, S.</u> , Naito, A., Komiyama, M., Long, N., Kato, H., Sagawa, H., Yamashita, Y., Shirai, T., Takahashi, S. | Establishment of an invasive prostate cancer model in transgenic rats by intermittent testosterone administration. | J Toxicol Pathol | P27 | 43-49 | 2014 |
| Nakasuka, K., Ito, S., Miyata, K., Inomata, M., Yoshida, T., Tamai, N., Suzuki, S., Murakami, Y., Sato, K., <u>Suzuki, S.</u> , Eishi, Y., Morimoto, S. | A case of idiopathic giant cell myocarditis with a past history of sarcoidosis. | J Card Case | 9 | 35-39 | 2014 |
| Dodmane, PR., Arnold, L., Muirhead, DE., <u>Suzuki, S.</u> , Yokohira, M., Pennington, KL., Dave, B., J., Lu, X., Le, XC., Cohen, SM. | Characterization of intracellular inclusions in the urothelium of mice exposed to inorganic arsenic. | Toxicol Sci | 137 | 36-46 | 2014 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--------------------|----|-----------|------|
| Oomura, M., Sakakibara, N., Suzuki, S., Wakita, A., Mori, Y., Kamimoto, K. | Intravascular lymphomatosis mimicking primary central nervous system lymphoma: A case report and literature review. | Case Rep Neurol | 6 | 101-108 | 2014 |
| Arnold, LL., Suzuki, S., Yokohira, M., Kakiuchi-Kiyota, S., Pennington, KL., Cohen SM. | Time course of urothelial changes in rats and mice orally administered arsenite. | Toxicol Pathol | 42 | 855-862 | 2014 |
| Naiki, T., Naiki-Ito, A., Asamoto, M., Kawai, N., Tozawa, K., Etani, T., Sato, S., Suzuki, S., Shirai, T., Kohri, K., Takahashi, S. | GPX2 overexpression is involved in cell proliferation and prognosis of castration resistant prostate cancer. | Carcinogenesis | 35 | 1962-1967 | 2014 |
| Hachiya, K., Wakami, K., Tani, T., Yoshida, A., Suzuki, S., Suda, H., Ohte, N. | Double-valve replacement for mitral and aortic regurgitation in a patient with Libman-Sacks endocarditis. | Intern Med | 53 | 1769-1773 | 2014 |
| Arima, H., Hirate, H., Sugiura, T., Suzuki, S., Takahashi, S., Sobue, K. | IV injection of polystyrene beads for mouse model of sepsis causes severe glomerular injury. | Intensive Care Med | 2 | 21 | 2014 |
| Yamashita, Y., Nagasaka, T., Naiki-Ito, A., Sato, S., Suzuki, S., Toyokuni, S., Ito, M., Takahashi, S. | Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. | Mod Pathol | 28 | 111-117 | 2015 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|------------------------|-----|-----------|------|
| Suzuki, S., Naiki-Ito, A., Kuno, T., Punfa, W., Long, N., Kato, H., Inaguma, S., Komiya, M., Shirai, T., Takahashi, S. | Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. | J Toxicol Pathol | 28 | 21-26 | 2015 |
| 佐藤慎哉、鈴木周五、内木綾、白井智之、高橋智 | 前立腺癌に対するHDAC阻害剤の予防および治療効果の検討. | 泌尿器外科 | 27 | 1217-1219 | 2014 |
| 佐藤慎哉、内木綾、鈴木周五、高橋智 | 肝癌の危険因子と発癌機序. その他の化学物質発がん(アフラトキシン、ニトロソ化合物など) | 日本臨床 | 73 | 142-146 | 2015 |
| Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H. | In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and l-tryptophan. | Mutat Res. | 760 | 48-55 | 2014 |
| Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K. | Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response. | Nanomaterials | 4 | 175-188 | 2014 |
| Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Yamada H, Totsuka Y, Matsuda T, Nakagama H, Sugimura H. | Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts. | Free Radical Biol Med. | 75 | 136-146 | 2014 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|---|-----|---------|------|
| Kochi T, Shimizu M, <u>Totsuka Y</u> , Shirakami Y, Nakanishi T, Watanabe T, Tanaka T, Nakagama H, Wakabayashi K, Moriwaki H. | A novel aromatic mutagen, 5-amino-6-hydroxy-8H-benzo[6,7]azepino[5,4,3-de]quinolin-7-one (ABQ), induces colonic preneoplastic lesions in mice. | Toxicology Reports | 1 | 69-73 | 2014 |
| I. Yoshida and <u>Y. Ibuki</u> | Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. | Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis | 770 | 9-18 | 2014 |
| T. Kubota, T. Toyooka, X. Zhao, <u>Y. Ibuki</u> | Phosphorylation of Histone H2AX Generated by Linear Alkylbenzene Sulfonates and its Suppression by UVB Exposure. | Photochemistry & Photobiology | 90 | 845-852 | 2014 |
| <u>Y. Ibuki</u> , T. Toyooka, X. Zhao, I. Yoshida | Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. | Carcinogenesis | 35 | 1228-37 | 2014 |

**平成26年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発**

研究班員名簿

| 区分 | 名前 | 所属 | 職名 |
|-------|--------|---------------------------------------|-------|
| 研究代表者 | 吉見 直己 | 琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学 | 教授 |
| 研究分担者 | 塚本 徹哉 | 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 | 准教授 |
| | 魏 民 | 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 | 准教授 |
| | 横平 政直 | 香川大学医学部腫瘍病理学 | 准教授 |
| | 鈴木 周五 | 名古屋市立大学大学院医学研究科・実験病態病理学 | 研究員 |
| | 小川 久美子 | 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター 病理部実験病理学 | 部長 |
| | 戸塚 ゆ加里 | 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野 | ユニット長 |
| | 伊吹 裕子 | 静岡県立大学環境科学研究所環境毒性学 | 教授 |
| 協力者 | 西川 秋佳 | 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター 病理部実験病理学 | センター長 |