

研究課題の概要

| | |
|---------|--|
| 研究課題名 | 化学物質による肝肥大誘導機序の解析を基盤とした肝発がんリスク評価系の構築 |
| 主任研究者 | 出川 雅邦 |
| 所属機関 | 静岡県立大学 |
| 研究成果の概要 | <p>本研究は、非遺伝毒性化合物で生ずる肝肥大の毒性学的意義を明らかにするとともに、肝発がんリスク評価系の構築に有用な指標を見出すことを目的とした。肝肥大誘発作用がある7種の非遺伝毒性化合物(肝発がん性化合物を含む)を用いて、ラットに13週間混餌投与および投与後4週間休薬し、肝肥大誘発過程における特徴を分子生物学的、生化学的、病理組織学的に解析した。その結果、13週間投与群では、分子生物学的解析により、NMDA受容体遺伝子の他、数種のDNA損傷依存性細胞増殖抑制因子やホルモン応答性遺伝子の発現変動が、肝肥大誘発の指標になる可能性を示した。また、用いた化合物全てに、あるいは肝発がん性化合物でのみ共通に発現変動する遺伝子を見出した。一方、何れの化合物でも、誘発された肝肥大は、休薬処置により生化学的、組織化学的にもほぼ正常レベルに回復した。しかし、休薬処置後でも、多数の遺伝子が発現変動していることや、薬物代謝酵素CYP2B誘導作用を有する肝発がん性化合物では持続的変化(肝細胞内の脂肪滴や8-OHdGレベルの増加など)が見られ、分子生物学的には、「肝肥大」が毒性の指標になる可能性も考えられた。以上、休薬実験による分子生物学的解析が肝肥大誘発物質の毒性や肝発がん性を評価する上で有用であることを示した。</p> |

| | |
|------|---|
| 評価所見 | <p>肝毒性の評価に肝肥大と休薬措置との関係が有効との知見は今後の基礎研究に役立つと思われる。しかし、多様な手法で解析を試み個別の成果は得られたが、多くの分担研究を的確にまとめきれていない。そのため、当初の研究目的である肝細胞肥大の意義や、肥大と発がんの関連性等について明確な結論が出されなかった。リスク評価に活用するには、更に検討が必要である。</p> |
| 評価結果 | 目標の達成は不十分であった。 |

研究成果報告書（研究要旨）

| | |
|--------|--------------------------------------|
| 研究課題名 | 化学物質による肝肥大誘導機序の解析を基盤とした肝発がんリスク評価系の構築 |
| 主任研究者名 | 所属： 静岡県立大学 氏名： 出川 雅邦（研究課題番号：0703） |

本研究は、非遺伝毒性化合物で生ずる肝肥大の毒性学的意義を明らかにするとともに、肝発がんリスク評価系の構築に有用な指標を見出すことを目的とした。肝肥大誘発作用がある7種の非遺伝毒性化合物（肝発がん性化合物を含む）を用いて、ラットに13週間混餌投与および投与後4週間休薬し、肝肥大誘発過程における特徴を分子生物学的、生化学的、病理組織学的に解析した。その結果、13週間投与群では、分子生物学的解析により、NMDA受容体遺伝子の他、数種のDNA損傷依存性細胞増殖抑制因子やホルモン応答性遺伝子の発現変動が、肝肥大誘発の指標になる可能性を示した。また、用いた化合物全てに、あるいは肝発がん性化合物でのみ共通に発現変動する遺伝子を見出し、「肝肥大から肝がんへの指標候補遺伝子」を挙げる事ができた。一方、何れの化合物で誘発された肝肥大も、休薬処置により生化学的、組織化学的变化はほぼ正常レベルに回復したが、休薬処置後でも、多数の遺伝子が発現変動していることや、薬物代謝酵素CYP2B誘導作用を有する肝発がん性化合物では持続的变化（肝細胞内の脂肪滴や8-OHdGレベルの増加など）を起こしていることが明らかとなった。これら分子生物学的解析より、「肝肥大」が毒性の指標になる可能性が考えられた。

（※主任研究者からの申し出（学術論文投稿準備）により報告書には図表等のデータを除いています。
なお、学術論文掲載後あらためて、図表を記載した報告書を掲載する予定です。）

研究成果報告書（本体）

| | |
|--------|--|
| 研究課題名 | 化学物質による肝肥大誘導機序の解析を基盤とした肝発がんリスク評価系の構築（研究期間：平成19年度～21年度） |
| 主任研究者名 | 所属： 静岡県立大学 氏名： 出川 雅邦（研究課題番号：0703） |

1. 研究の概要

研究の目的

農薬をはじめとする化学物質の中には、非遺伝毒性化合物でありながら、肝肥大（肝細胞肥大あるいは肝細胞増殖など）さらに肝がんを惹起するものが数多く知られている。しかしながら、肝肥大は形態的な定義に止まっており、化学物質による肝肥大が適応反応か悪影響かを判断するための科学的指標は見出されていない。肝肥大の発生機序の解明を基盤とした肝発がん予測の評価系の構築は、日本の化学物質のリスク評価の精度向上および迅速化を図る上で極めて有用であるばかりか、我が国のリスク評価の科学的水準を国際的に示す好機であり、その成果は積極的な国際貢献に繋がるものと考えられる。

本研究は、3年計画で、化学物質が誘発する肝肥大と薬物代謝酵素誘導、また、それらと肝細胞増殖関連因子や細胞内情報伝達関連因子などの種々遺伝子・タンパク質発現変動との関連性を分子生物学的、生化学的、病理組織学的に追究し、特に非遺伝毒性化合物で生じる肝肥大の毒性学的意義やその指標を見出すとともに、肝発がんリスク評価系の構築に有用な指標を見出すことを目的とする。

研究の内容

非遺伝毒性化合物で肝肥大を誘発する化学物質であるフェノバルビタール（PB）、クロフィブレート（CF）、ピペロニルブトキシサイド（PBO）、デカブロモジフェニルエーテル（DBDE）、β-ナフトフラボン（BNF）、インドール-3-カルビノール（I3C）、アセトアミノフェン（AA）を試料として、ラットに投与し肝肥大を誘発させ、肝肥大誘発と薬物代謝酵素誘導性、肝細胞増殖関連因子や細胞内情報伝達関連因子などの種々遺伝子・タンパク質発現変動との関連性を分子生物学的、生化学的、病理組織学的に比較検討し、非遺伝毒性化合物で生じる肝肥大の毒性学的意義やその指標を見出すとともに、肝発がんリスク評価系の構築に有用な指標を見出すことを目指した。なお、PBO、DBDEは肝腫瘍誘発性が、CFはげっ歯類において肝腫瘍誘発性が知られており、また、PB、BNF、I3Cは、肝腫瘍発生のプロモーション作用を有している。具体的に行った研究項目と分担者を以下に示す。

研究課題全般の統括と総括（出川雅邦）

動物実験（西川秋佳）

上記化合物のラットへの投与実験を3年間の研究期間で3回に分けて実施した。実施は西川が所属する国立医薬品食品衛生研究所で行った。動物実験終了後、肝臓組織片および採取血液は各分担者に送付した。

肝肥大の検討1（西川）

化合物投与ラットについて、投与期間中の体重変化、食餌摂取量の変化を観察するとともに、投与期間終了後の肝臓重量、肝臓の病理組織学的検査を実施し、肝肥大を確認するとともに、その特徴・様式の評価を行った。

肝肥大の検討2（鈴木勝士）

化合物投与ラット肝臓の肝細胞肥大様式を詳細に検討するために、電子顕微鏡を用いて微細観察を行った。

肝細胞増殖活性および肝臓 DNA の酸化的傷害性の検討（西川）

化合物投与肝臓における肝細胞増殖活性および肝臓 DNA の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを測定することにより、これらの変動が肝肥大のリスク評価の指標になりうるかを検討した。

遺伝子・タンパク質の発現変動解析

肝肥大・肝発がんのリスク評価の指標となりうる発現変動遺伝子・タンパク質の検索を行うべく、化合物投与ラット肝臓について以下の検査項目を設定した。

肝臓増殖関連因子遺伝子の発現解析（根本清光）

細胞内情報伝達関連因子遺伝子の発現解析：受容体型転写因子 CAR、PPAR α との関連性
(小澤正吾)

ホルモン応答遺伝子の発現解析（藤本成明）

薬物代謝酵素の発現解析：免疫組織化学染色（吉田 緑）

DNA マイクロアレイ法による発現変動遺伝子の網羅的解析（出川、根本）

血中生化学マーカーの変動解析（下位香代子）

化合物投与ラットから採取した血液中の生化学マーカーの変動を測定するとともに、これら変動に基づいた肝肥大と肝障害、肝臓中の脂質代謝等の関連性を多変量解析により検討した。

遺伝子改変動物を用いた肝肥大・肝腫瘍発生機序解析（西川、吉田）

PBO、DBDE、PB を CAR 遺伝子欠損マウスに投与し、肝肥大・肝腫瘍発生への CAR の役割を解析した。

化合物投与ラット肝臓の薬物代謝酵素活性の検討（布柴達男、根岸友恵）

間接変異原物質の代謝活性化を指標として、各化合物投与ラット肝臓の薬物代謝酵素活性を検討した。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果とその概要

① 動物実験（西川）

・動物実験 1（平成 19 年度実施）

非遺伝毒性物質で肝肥大を誘発する化学物質として、フェノバルビタール（PB）、クロフィブレート（CF）を選択し、これら化合物について動物実験を実施した。これら化合物はそれぞれ 500 ppm および 2,500 ppm の混餌食として投与した。なお、PB は肝発がんプロモーション作用が、CF はげっ歯類で肝発がん作用が知られている。

・動物実験 2（平成 20 年度実施）

非遺伝毒性物質で肝肥大と肝腫瘍を誘発する化学物質として、ピペロニルブトキシイド（PBO）、デカプロモジフェニルエーテル（DBDE）を選択し、これら化合物について、動物実験を実施した。これら化合物はそれぞれ 20,000 ppm および 50,000 ppm の混餌食として投与した。

・動物実験 3（平成 21 年度実施）

肝肥大作用ならびに肝発がんプロモーション作用が知られている β -ナフトフラボン（BNF）、インドール-3-カルビノール（I3C）、ならびに、肝腫瘍誘発作用や肝発がんプロモーション作用は知られておらず、肝肥大作用のみが知られているアセトアミノフェン（AA）を選択し、これら化合物について、動物実験を実施した。これら化合物はそれぞれ 5,000 ppm、2,000 ppm、12,500 ppm（AA は忌避が認められたため投与 15 日目から 10,000 ppm に変更）の混餌食として投与した。

いずれの動物実験においても、日本チャールス・リバー社より 5 週齢雌雄 F344/DuCrj ラット雌雄を入手し、6 週齢にて実験に供した。これら動物を 1 群 5 匹とし、化学物質の投与は混餌にて行い、対照群には粉末基礎飼料のみ投与した。投与スケジュールの概略を図 1 に示した。また、これらの混餌飼料を動物に 13 週間与えた後、4 週間基礎飼料で飼育し、回復性についても併せて観察した。動物は温湿度・換気回数を制御されたバリエーションシステム動物室で飼育した。餌水を自由摂取させた。動物実験については、国立医薬品食品衛生研究所実験動物委員会の承認のもとに実施した。

投与開始 3 日目、4、13 週目、休薬期間（4 週間）終了後（17 週目）に各群雌雄 5 例ずつを断頭にて安楽死させ、剖検した（解剖前日夕方より絶食）。今回の研究の標的臓器である肝臓は、重量を測定後、各葉に分割して凍結し、同じ葉を各検査時期に検索できるように、各分担研究者に送付した。断頭にて採取した血清は凍結して分担研究者に送付した。

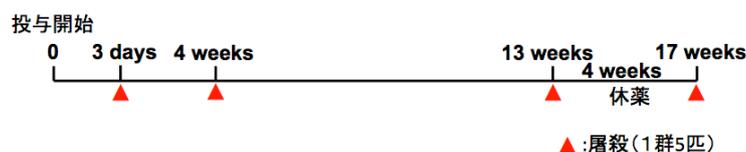


図 1 投与スケジュール

② 肝肥大の検討：肝重量測定ならびに肝臓の病理組織学的検査（西川）

・実験方法

全身の剖検後、肝重量を測定後、肝臓の一部をパラホルムアルデヒドにより固定し、HE 染色により病理組織学検査を行った。

・実験結果

動物実験 1

体重変化、食餌摂取量の変化：対照群と化合物投与群で有意な差は認められなかった。

肝臓重量変化：

実験 3 日目の検査では、PB 群の雌雄および CF 群の雄で絶対および相対肝重量が、CF 群の雌の相対肝重量が軽度ながら有意に増加した。実験 4 週目の検査では、PB 群および CF 群の雌雄で絶対および相対肝重量が有意に増加した。実験 13 週目の検査では、全ての投与群の雌雄で相対肝重量の有意な増加が観察され、絶対重量も有意に増加した。実験 17 週目の検査では、PB、CF 投与群いずれも対照群と比較して肝重量の有意な変動は見られなかった。

肝臓の病理組織学的検査：

実験 3 日目の検査では、PB 群の雄でごく軽度な小葉中心性肝細胞肥大が観察された以外、投与に関連した病理組織学的変化は認められなかった。実験 4 週目の検査では、PB 群の雌雄で軽度から中等度の小葉中心性肝細胞肥大が、CF 群の雌雄においては、びまん性肝細胞肥大が認められ、細胞質の好酸性化を伴っていた。実験 13 週目の検査では、PB 群の雌雄に軽度～中等度の小葉中心性肝細胞肥大が認められ、CF 群の雌雄では、軽度のびまん性肝細胞肥大が認められた。実験 17 週目の検査では、いずれの群においても肝細胞肥大を認めなかった。

動物実験 2

体重変化、食餌摂取量の変化：

各群において体重の有意な増加抑制が認められた。PBO 群では雌雄とも投与後 3 日目と 1 週目から実験を通して、DBDE 群では、雄は投与後 4 週目と 6 週目以降、雌は 3 週目から実験期間を通して対照群に比して有意に減少した。

食餌摂取量については、雌雄の PBO 群で投与開始直後に減少したが、その後回復した。

肝臓重量変化：

絶対重量は、投与 3 日目の雌の PBO 群を除き、各物質投与後 13 週目まで全投与群の雌雄で対照群に比し有意に増加していた。また、休薬 4 週目の 17 週目では、雄の DBDE 群のみ対照群に比し有意に増加していたが、その他の投与群では有意差は認められなかった。相対重量は、全ての投与群、休薬後を含む全実験日において、対照群に比し有意に増加していた。

肝臓の病理組織学的検査：

13 週目の対照群雄には著変は認められなかった。PBO 群においては、雄では投与 3 日目から軽度のびまん性肝細胞肥大が 5 例中 4 例に認められ、投与 4 週目になると全例に高度の同病変が見られ、13 週目までその程度はほぼ変化せず、17 週目になると程度は軽減し軽度の同病変が認められた。PBO 群の

雌では、投与3日目には肝細胞肥大は見られず、4週目から高度なびまん性肝細胞肥大が全例に認められ、13週目にはその程度は軽減し中等度となり、17週目になると同病変は認められなかった。PBO投与4~13週目の肥大した肝細胞は、細胞質が非常に大きく好酸性で、小葉辺縁部の肝細胞には好酸性物質をためた小型の空胞が観察された。DBDE群においては、雌雄とも投与13週目に軽度のびまん性肝細胞肥大が認められたが、その他の検索時点では同病変は見られなかった。DBDE投与時の肥大した一部の肝細胞の細胞質に、明るく抜けた小~中型の空胞が認められた。本実験で投与した物質により、肝臓において肝細胞壊死や炎症性変化は認められなかった。

動物実験3

体重変化、食餌摂取量の変化：

AA群において投与開始直後から混餌飼料摂取の忌避が見られ、同群の動物に消瘦がみられた。その他の群の動物の症状において投与に関連した変化は認められなかった。AA群は、投与15日目から混餌飼料中のAA用量を10,000ppmに変更した。

体重変化については、BNF群では雄の投与2週目から6週目まで、雌の投与1週目から14週目と16週目に、I3C群では雌の3週目から7週目までに、AA群では雌雄とも1週目から実験期間を通して、対照群に比し有意な体重の増加抑制が認められた。

食餌摂取量については、AA群において雌雄とも投与後2週まで混餌飼料の忌避による摂餌量の減少が観察されたが、AA用量を変更した3週目以降から同群の摂餌量は他の群とほぼ変わらず、雌では高値を示した。その他の投与群は対照群とほぼ同程度の摂餌量の推移を示した。

肝臓重量変化：

肝臓の絶対重量は、BNF群では雄の投与3日目と13週目に、雌の4週目と13週目に有意な増加を認めた。I3C群では、雄では投与3日から13週まで、雌では投与4週から13週までに絶対重量の有意な増加を認めた。AA群では、雄の投与3日目に絶対重量の有意な減少が認められた以外の変動はみられなかった。休薬後の17週目は、いずれの群にも絶対重量の有意な変動は見られなかった。肝臓の相対重量は、雌雄とも投与3日目から13週目まで全投与群において有意な増加が認められた。休薬後の17週目には、雄のBNF群とAA群のみに有意に相対重量が増加した。

肝臓の病理組織学的検査：

肝細胞肥大はBNF群のみに認められ、雄では投与4週目と13週目に、雌では13週目のみに、いずれも軽度な小葉辺縁性の肝細胞肥大であった。その他の実験時点や投与群では、光学顕微鏡レベルで明確に判別できる肝細胞肥大は認められなかった。その他、AA群において、一部の小葉の中心部に巣状肝細胞壊死が雄では投与後3日、4週目に、雌では投与3日目に認められた。AA群以外の群では、肝臓において肝細胞壊死や炎症性変化は認められなかった。

・考察

動物実験1

PB、CFいずれの化合物投与群でも、肝重量の増加、肝細胞肥大が観察された。これらの変化は、休薬により回復したため、これら化合物による肝肥大は可逆的であることが明らかとなった。また、肝細胞肥大形式は、これまでに報告されているように、PB投与群では小葉中心性肝細胞肥大が、一方、CF投与群ではびまん性肝細胞肥大が観察され、相違が認められた。

動物実験2

実験期間中の体重の推移について、雌雄のPBO群において有意な体重増加抑制が認められた。これらの群では摂餌量の減少が認められたことから、同群の体重低下は摂餌量の減少に起因すると考えられた。肝臓の相対重量は、全ての投与群の全ての実験時点において雌雄とも有意に増加した。いずれの群においても、有意差の有無にかかわらず絶対重量の増加を伴っていたことから、本実験で投与した物質は投与3日目から肝臓重量を増加させることが明らかになった。また、これらの肝重量の増加は、病理組織学的に、各物質の投与によりびまん性肝細胞肥大や空胞化を誘発したことから、病理組織学的な変化を反映したものと考えられた。病理組織学的に、本実験で投与した各物質に特徴的な形態学的変化(肝細胞の染色性、空胞の有無や性質)が認められた。この投与物質毎の変化は、肝細胞内で生じている変

化（薬物代謝酵素の誘導や細胞小器官の変化）を反映している可能性が考えられた。休薬後の投与 17 週目において、全投与群の雌雄に相対肝重量の増加と雄の PBO 群に軽度の肝細胞肥大が認められた。休薬後に見られたこれらの変化は、本実験で投与した物質が、肝細胞肥大など形態学的確認の可否に関わらず、肝細胞に対して何らかの影響を残す可能性を示唆した。

実験動物 3

AA 群において雌雄とも実験期間を通して有意な体重増加抑制が認められた。実験開始時の AA 投与用量を 12,500 ppm としていたが、AA 混合飼料摂取の忌避を認めたため、投与後 15 日目に用量を下げ、10,000 ppm とした結果、同群の摂餌量が増加した。AA 群の体重低下は、実験早期の摂餌量が顕著に少なかったためと考えられる。肝臓の相対重量は、投与 3 日から 13 週まで、雌雄の全投与群で有意に増加していた。AA 群に関しては、雄は実験期間を通して、雌は投与 3 日目に有意な体重低下や絶対肝重量の減少がみられたことから、同群の相対重量の増加は低体重に起因するものと考えた。BNF、I3C 群については、絶対重量の増加が認められたため、相対肝重量の増加は肝臓の重量増加によるものであると判断した。BNF、I3C 群では有意な肝重量の増加が認められたが、病理組織学的には BNF 群の投与 4 週（雄のみ）と 13 週（雌雄とも）のみに軽度の肝細胞肥大が確認された。BNF、I3C 群の相対肝重量値や肝細胞肥大誘発の程度は、動物実験 2 で投与した物質による結果と比較すると軽度である。このことから、BNF、I3C は肝細胞肥大を誘発するが、肝細胞に対する影響は比較的弱い可能性が示唆された。AA 群については、雌雄とも実験早期の体重増加抑制が影響したため、肝細胞肥大など肝臓に対する AA の影響が小さくなった可能性がある。雄の BNF 群では、休薬後の 17 週目においても相対肝重量の有意な増加が認められた。同群では前述の通り、BNF 投与 4 週、13 週目に軽度の肝細胞肥大が認められ、17 週目には肝細胞肥大は認められなかったことから、同群の 17 週目にみられた相対肝重量の増加は、形態学的に確認できない程度ではあるが肝細胞肥大の影響が残っている可能性がある。

③ 肝肥大の検討：電子顕微鏡を用いた肝細胞肥大の微細観察（鈴木）

・実験方法

常法に従い試料をエポキシ樹脂に包埋してブロックを作成し、厚切および超薄切片作成はウルトラミクロトーム（Leica EM-UC6）を用いた。観察および画像取込は JEM-1011 型電子顕微鏡（日本電子）および付属 BioScanCCD カメラ（Gatan）を用いた。

・実験結果および考察

（陰性）対照群

雌雄とも全週齢において顕著な変化は認められなかった。肝細胞内にはミトコンドリアが豊富で、粗面小胞体、ライソゾームなども認められた。

PB 群

厚切り切片より構造異型は認められなかった。細胞異型に関しては、核の異型性がみられ、大型のミエリン様構造物もみられた。さらに PB 投与による典型的な滑面小胞体は週齢が進むにつれて増生していた。滑面小胞体の膜に含まれる酵素によって薬物代謝が行われていたことがうかがえる。投与休止の 17 週では対照群と同様の像を示し、回復していた。

CF 群

厚切り切片より構造異型は認められなかった。細胞異型に関しても対照群と比較してあまり変化がみられなかった。既知の報告でなされている CF 投与による典型的なマイクロボディの出現は認められなかった。投与休止の 17 週では対照群と同様の像を示し、回復していた。

PBO 群

厚切切片より構造異型は認められなかった。細胞異型に関して、細胞内の脂肪滴が顕著であった。これは休薬群の 17 週でも認められた。また、13 週までは滑面小胞体および高電子密度物質も認められた。

DBDE 群

厚切切片より構造異型は認められなかった。細胞異型に関して、滑面小胞体が 3 日で顕著であり、その後経時的に減少していた。また細胞内の脂肪滴も認められ、休薬群である 17 週でも顕著にみられた。（陰性）対照群と比較して PBO 群および DBDE 群では脂肪滴が顕著にみられた。PB 投与実験などでも

脂肪滴の出現は報告されているので、薬物に対する反応と考えられる。研究項目②の光学顕微鏡観察において、PBO 群で好酸性を呈していたのは、電顕観察で認められた滑面小胞体の増生の影響が考えられる。滑面小胞体の出現が、PBO 群および DBDE 群で認められた。PB 群と同様、滑面小胞体の膜に含まれる酵素によって薬物代謝が行われていたことがうかがえる。また、非遺伝毒性発がん物質とされる PBO、DBDE においては、休薬群においても 13 週間投与群で見られた変化が持続していた。肝肥大誘発物質の肝発がんリスクを評価する上で、休薬期での評価もまた重要であると考えられる。

BNF、I3C、AA 投与群については、期間内に解析ができなかった。

④ 肝肥大のリスク評価と投与化合物の肝細胞増殖活性および肝臓 DNA への酸化的傷害性との関連性 (西川)

・実験方法

細胞増殖活性を観察するために、Ki-67 抗体による免疫組織化学染色を動物実験 1~3 の雌雄全例について行った。方法として、画像解析装置 (IPAP、住化テクノス) を用いて、無作為に抽出した肝小葉の 5 視野 (対物レンズ 20 倍) に認められた Ki-67 陽性肝細胞数と各視野に含まれる全肝細胞数を計測し、500 個の肝細胞中における Ki-67 抗体陽性肝細胞数を検索した。

また、肝臓中の酸化的 DNA 損傷の発現を検索するため、動物実験 1 については 4 週目と 13 週目、動物実験 2 については全ての投与群において、動物実験 3 においては、13 週目の雌雄の各群において 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベルを HPLC-ECD 法により測定した。

・結果

肝臓における Ki-67 抗体による細胞増殖活性の検討:

動物実験 1 においては、いずれの投与群も対照群に比し有意な変化は認められなかった。

動物実験 2 において、雄では Ki-67 陽性細胞数の有意な減少が投与後 13 週目の DBDE 群と休薬後である 17 週目の PBO 群で認められた。

動物実験 3 において、対照群に比し有意な増加が投与後 3 日目の雄の BNF 群と雌雄の I3C 群、投与後 4 週目の雌の AA 群において認められた。

肝臓における酸化的 DNA 損傷マーカー 8-OHdG レベルの検討:

動物実験 1 においては実験 4 週目と 13 週目に検索した結果、雄において PB、CF 投与 13 週群で 8-OHdG レベルの増加傾向を認めた。

動物実験 2 において、雄では、投与 13 週目の DBDE 群と 17 週目の全投与群で、8-OHdG レベルの有意な増加が認められた。投与 13 週目の雄の PBO 群では、有意差はないものの同レベルの増加傾向が認められた。また、雌では PBO 群において投与 4~17 週目に、DBDE 群では 17 週目のみに 8-OHdG レベルの有意な増加が認められた。

動物実験 3 においては、一部の群で肝細胞肥大が認められた投与 13 週目について検討を行った結果、雄では、I3C 群で増加傾向がみられたが、いずれの物質によっても、13 週間の投与により肝組織中の 8-OHdG レベルの有意な増加は認められなかった。雌では、BNF、I3C 群において有意に 8-OHdG レベルが増加していた。

・考察

動物実験 1

肝臓における Ki-67 抗体による細胞増殖活性の検討において、PB、CF いずれの投与群も有意な変化が認められなかったため、これら化合物は、細胞増殖を惹起する作用はないものと思われた。投与 13 週目の雄の PB、CF 群に認めた 8-OHdG レベルの増加傾向は、既に報告されている両物質が酸化的ストレスを誘発するという成績に符合するものと考えられた。

動物実験 2

肝組織中の 8-OHdG レベルは、休薬後の 17 週目でも全投与群で同レベルの増加を示した。本実験で用いた化合物は何れも非遺伝毒性肝発がん物質であることから、休薬後に見られた肝臓の重量、形態学的変化と酸化的 DNA 損傷マーカーレベルの増加は、各化合物の発がん性に関連する変化である可能性が示唆された。細胞増殖活性については、一部の群で Ki-67 陽性細胞数の有意な増減が見られたが、これらには雌雄共通の変化でなかったため、投与物質に起因した変化ではないと判断した。

動物実験 3

肝細胞の細胞増殖活性については、投与後 3 日目の雌雄の BNF、I3C 群で Ki-67 陽性細胞数が増加していた。しかし、投与 4 週目以降は細胞増殖活性の有意な増加はみられなかった。BNF、I3C は肝臓において発がんプロモーション作用があることが報告されているが (Shoda et al., 2000., Dewa et al. 2008., Kim et al., 1997)、投与 4 週目以降に細胞増殖活性の亢進がみられなかったことから、本実験でみられた肝細胞増殖と発がんプロモーション作用の関連性は低いと考えられる。AA 群では投与 4 週目に雌雄とも Ki-67 陽性細胞数の有意な増加 (雄) または増加傾向 (雌) がみられた。同群では小葉中心部の巣状肝細胞壊死が雄では投与 3 日目と 4 週目に、雌では 4 週目にみられた。また、同群の動物は実験早期に体重増加抑制がみられたことから、他の群で投与 3 日にみられた細胞増殖が遅れて生じたか、壊死した肝細胞の再生による細胞増殖が生じた可能性がある。雌雄の BNF 群で肝細胞肥大がみられた投与 13 週目の肝組織中の 8-OHdG レベルを検索した。その結果、雄ではいずれの投与群においても有意な変動はみられなかったが、雌では BNF、I3C 群で同レベルの有意な増加を認めた。各化合物の発がん性に関しては、ラット肝二段階発がんモデルにおいてみられる BNF による発がんプロモーション作用に、酸化的 DNA 損傷が関連することが報告されている (Dewa et al., 2008)。また、AA 投与による肝細胞の巣状壊死には酸化的ストレスが関連する (Das et al., 2010., Hinson et al., 2010) が、ラットの 2 年間の発がん性試験において AA の肝発がん性は認められていない (NTP, 1993)。I3C については、ラットの中期多臓器発がんモデルで肝発がんプロモーション作用が報告されているが (Kim et al., 1997)、酸化的 DNA 損傷との関連性についての報告はない。本実験において、雌のみであるが肝発がんプロモーション作用が知られる化合物 (BNF、I3C) の投与により 8-OHdG レベルが有意に増加したこと、また、酸化的ストレスを生じることが知られる炎症などの変化が BNF、I3C 群で見られなかったことから、8-OHdG レベルは、肝肥大誘発化学物質の発がん性を予測するマーカーになりうる可能性が示唆された。

・結論

本研究により、肝発がん性や肝発がんプロモーションを有する 6 種の肝肥大誘発学物質の何れにも細胞増殖活性の亢進作用がみられなかったことから、肝肥大から肝発がんに至る過程の早期には、細胞増殖の関与の可能性は低いことが示唆された。一方、発がんプロモーション作用が知られる化合物投与群では、何れも休薬後を含め 8-OHdG レベルが増加していたことから、この種の化合物による発がん過程には酸化的 DNA 損傷が重要な意味をもつこと、さらに、肝組織中の 8-OHdG レベルは、肝肥大誘発学物質の肝発がん性を予測する指標となる可能性が示された。

⑤ 肝肥大・肝発がんのリスク評価の指標となりうる発現変動遺伝子・タンパク質の検索

肝肥大・肝発がんのリスク評価の指標となりうる発現変動遺伝子・タンパク質の検索を行うべく、肝薬物代謝酵素遺伝子・タンパク質、肝臓増殖関連遺伝子、脂質代謝関連遺伝子、細胞内情報伝達関連遺伝子、ステロイドレセプター遺伝子、ホルモン感受性遺伝子などの発現解析を行った。以下、肝肥大や肝発がんとの関連性が示唆される知見を記す。

1) DNA 損傷依存性細胞増殖抑制因子の遺伝子発現変動について (小澤)

・背景

肝腫瘍プロモーターの代表であるフェノバルビタール (PB) をはじめ各種化学物質が惹起する肝肥大に伴い、シトクロム P450 2B ファミリー (CYP2B) の遺伝子発現の亢進がしばしば認められる。化学物質が核内受容体の一種、Constitutive Androstane Receptor (CAR) のアゴニストや活性化剤となり、CAR が核内に移行するとともに、いくつかのタンパク質リン酸化による情報伝達を経て CYP2B が誘導されると考えられている。また、CAR は肝腫瘍形成において重要な役割を演じる核内受容体であると考えられているので、肝肥大ないし肝腫瘍を惹起する種々の化学物質が CAR と相互作用した後に流れる情報伝達カスケードを明確にすることは、肝肥大の毒性学的意義を明らかにするために有用と思われる。CAR アゴニストの作用/CAR の活性化に伴ってその情報伝達系の下流に位置する遺伝子の発現が誘導される。その一例として、DNA 損傷依存性細胞増殖抑制因子 (Growth Arrest DNA damage-inducible 45a, b, g) のうち、Gadd45b が知られている。一方、Gadd45a は、UV などによって惹起される細胞の DNA 損傷に伴って発現誘導され、細胞周期の進行を止めるとともに、増殖を抑制する現象の解析の過程で見出され、細胞は増殖停止に導かれている間に DNA 損傷を修復すると考えられている。また、損傷を修復しきれない細胞はアポトーシスを誘導されて除去されることなどから、アポトーシスとの関連も指摘

されている。Gadd45g は、増殖細胞核抗原である PCNA や p21 と相互作用して細胞周期の S 期から G1 期への進行を止めることが知られている。さらに Gadd45b、Gadd45g の欠損マウスでは部分肝切除後の正常な肝再生が起らないことから Gadd45b、g は肝組織の恒常性維持に重要であると考えられている。一方、CYP2B の誘導を伴わずに肝肥大を惹起することが知られている薬剤として、クロフィブラートに代表されるペルオキシソーム増殖薬がある。これらは Peroxisome Proliferator Activated Receptor α (PPAR α) に作用し、脂肪酸代謝の変化並びに酸化ストレス誘導を起こして、肝肥大、さらに肝腫瘍を惹起すると考えられている。

そこで、動物実験 1、2 について、CAR 関連情報伝達系遺伝子、PPAR α 関連情報伝達系遺伝子、Gadd45a、b、g の肝における発現に対する影響を調べた。その結果、Gadd45a、b、g 遺伝子の発現変動が、肝肥大、肝腫瘍プロモーション作用、肝発がん性に関連しうる知見を得たので、これについて報告する。

・実験方法

動物実験 1、2 雄の各投与群から肝臓を摘出後、肝臓よりグアニジンチオシアネート法により総 RNA を調製した。mRNA レベルを Sybr green を色素とし、Applied Biosystems 7500 システムを用いた Real-time PCR 法で測定した。測定項目は、上述の DNA 損傷依存性細胞増殖抑制因子、CAR 活性化に伴い発現誘導されるシトクロム P450 2b1 (CYP2b1) 分子種とした。

・結果および考察

動物実験 1 において、PB、CF 共に肝肥大に伴い肝相対重量増加が投与 3 日目から認められ、13 週投与した後に 4 週間休薬すると肝肥大は消失するが、このような条件では、CAR の活性化剤である PB では、CYP2b1 の誘導が投与 3 日目から 13 週間までみられると共に、CAR の標的遺伝子とされる Gadd45b の発現上昇は、投与 3 日目から 4 週目までみられた。一方、Gadd45a は CF の 4 週間投与で、有意な発現低下がみられた。Gadd45g については、PB、CF 共に投与 4 週目から 13 週目まで一貫して明瞭な発現低下がみられ、発現レベルは対照群の約 5 分の 1 程度まで低下していた。PB、CF の肝肥大が明確に認められる期間、Gadd45g の発現抑制が続いており、肝肥大との関連が強く示唆された。

また、動物実験 2 より、PBO、DBDE とともに投与 3 日目から肝肥大およびそれに伴う肝相対重量増加が認められたが、これら 2 物質に特徴的なことは、13 週間投与後、4 週間休薬しても肝相対重量が対照群より統計学的有意差をもって高いまま推移したことである。すなわち、肝肥大が 4 週間の休薬で消失せず、可逆的ではなかったことを示している。PBO が発現誘導を惹起した遺伝子は、PB と類似していた。すなわち、CYP2b1 の投与 3 日目からの誘導、Gadd45b の誘導がみられたことである。PB に比較して、PBO では肝肥大が休薬後も完全には回復しなかったが、同様に、Gadd45b、CYP2b1 共に、発現レベルは対照群より統計学的に有意に高いまま推移した。特に、Gadd45b の発現レベルは投与 13 週目のレベルとほとんど同等であった。さらに、Gadd45g の発現抑制は投与 3 日目から認められ、投与後 13 週目まで、対照群の約 4 分の 1 程度であった。Gadd45g の発現抑制は、休薬後には回復した。肝腫瘍プロモーション作用を示す、あるいは肝がんを誘発する非遺伝子毒性化学物質の投与期間中、Gadd45g の発現が抑制されていることや、CAR の活性化に伴って Gadd45b の発現上昇がみられたことから、これらの遺伝子発現変動は、肝肥大に関連すると考えられる。一方、PBO と同様明瞭な肝肥大を惹起した DBDE 投与の結果は、PB、CF や PBO とは異なる特徴がみられた。すなわち、DBDE は投与 3 日目から 13 週目まで CYP2b1 を誘導したが、Gadd45b の誘導は DBDE の投与期間には認められず、むしろ休薬後に対照群より有意に高かった。休薬後の Gadd45b レベルの個体間変動は大きく、再現性について検討が必要ではあるが、投与期間中は Gadd45b の誘導が認められなかった点は、PB、PBO とは異なっていた。したがって、DBDE による CYP2b1 の誘導は、CAR の活性化に非依存的な経路で起こる可能性が示唆された。また、Gadd45g の発現が 3 日では対照群に比べて低かったが、その後投与期間 13 週目まで低下はみられなかった。

動物実験 3 の BNF、I3C については、多環式芳香族炭化水素受容体 (AhR) を活性化することで CYP1a を誘導することが知られている。AA については、高用量では肝障害を惹起することが知られている。したがって、Gadd ファミリー各遺伝子の発現変動様式を実験 1、2 と比較することは、肝肥大と Gadd ファミリーとの関連性を評価する上で極めて重要であるが、現在検討中である。

2) ホルモン応答遺伝子の発現変動 (藤本)

・目的

肝臓がんに関与することがよく知られる。疫学的にも血中テストステロンレベルと肝がんリスクが相関していることが報告され、一方で、経口避妊薬長期投与が肝がんリスクであることも知られている (Yu et al., 2001; Tanaka et al., 2000; Yu et al., 2004)。アンドロゲン受容体 (AR) 欠失マウスで肝臓がん発生が低下することは、アンドロゲン応答の肝臓がんへの関与を示す証拠である (Ma et al., 2008)。一方で、ラットの二段階発がんモデルでは、エストロゲンが強い発がんプロモーターであることが示されている (Dragan et al., 1991)。また結合アッセイによる研究で、肝臓がんに伴い性ホルモン受容体レベルが低下することが報告されてきた (Eagon et al., 1996)。そこで、本研究では、肝肥大を引き起こす化学物質により、肝臓での性ステロイドホルモン受容体とその応答遺伝子がどのように影響を受けるのかを明らかにし、毒性評価および肝臓がん予測指標としての有用性を検討した。

・実験方法

- i) ホルモン応答遺伝子の確認同定: F344 ラット、8 週齢、雌雄 16 匹ずつをチャールズブリバージャパンより購入して用いた。動物実験は、広島大学動物実験倫理委員会の承認を得、同委員会ガイドラインに沿っておこなった。動物は外科的に去勢を行い 1 週間後、17 β エストラジオール 1 mg/ペレットおよびテストステロン 50mg/ペレットを皮下に挿入し、48 時間後に屠殺して、肝臓組織を RNA 保存剤へ入れた。RNA 抽出キットを用いて、全 RNA を抽出し、oligo-dT をプライマーに MMLV-RT により逆転写して cDNA を得た。エストロゲン応答候補遺伝子として factor XII、LIFR (leukemia inhibitory factor receptor)、CD36、CYP2C13、IGFBP1、MAP (major acute phase alpha-1 protein)、calbindinD9、(CCND、Sult)、アンドロゲン応答候補遺伝子として A2M (α 2-macroglobulin)、AuG (PGCL1)、carbonic anhydrase 2、内部標準の β アクチン遺伝子について、Sybr Green 法による定量 PCR により mRNA 発現を測定した。
- ii) 動物実験 1~3 の肝臓組織において、同様の方法で mRNA を定量した。検討した遺伝子は、エストロゲン受容体 (ER) α/β 、AR、glucocorticoid receptor、mineralcorticoid receptor、thyroid hormone receptor、CYP1A1、CYP2B15、CYP2C11、CYP2C12、sulfotransferase family 1E1、PCNA、Ki67 であった。

・結果

i) ホルモン応答遺伝子の確認同定

LIFR と MAP 遺伝子発現は、雌の卵巣摘出群で低下、エストロゲン投与で上昇した。また雄でも、弱いながらエストロゲン投与群で発現増加した。一方、A2M は、雄の去勢群では有意な発現変化がなかったが、テストステロン投与群では発現上昇していた。雌でもテストステロン投与で発現上昇したが、程度は低かった。

ii) ER とエストロゲン応答遺伝子の発現

CF、PBO、DBDE、BNF、AA 投与群では、いずれも一過性または継続的に ER α が低下した。このとき、エストロゲン応答性の遺伝子である LIFR 発現も低下していた。特に PBO では、投与期間中連続的な低下がみられた。I3C では有意な低下は見られなかった。一方で、PB 投与では、ER α の変動がみられず、また LIFR 発現は上昇していた。

iii) AR とアンドロゲン応答遺伝子の発現

CF、PBO、DBDE 投与 4 週の雄で、AR 発現の低下が見られた。PB 群では、投与 4 週以後も連続的に AR が発現低下していた。アンドロゲン応答遺伝子 A2M の発現については、PB、BNF、I3C 群で一過的または連続的に低下した。なお、CF、PBO 群では低下の後に、13 週目から上昇した。

iv) その他の遺伝子の発現

CYP1A1 の発現は、DBDE、BNF、I3C により強く誘導された。PBO でも CYP1A1 の誘導が見られたが、投与 13 週まで漸増するパターンを示し特徴的であった。CYP2C1 発現上昇は、PB、PBO、DBDE、I3C で見られた。CYP2C11 は、PB 群を除く雄で一過性に低下した。特に AA では、投与期間を通じて強い発現抑制がみられた。Sult 1 A1 の発現は雄でのみみられ、PB、CF、PBO、DBDE 群で低下していた。

・考察

肝肥大を引き起こす化合物の多くは、ER α 発現およびエストロゲン応答性の LIFR 発現を低下させることが示された。ラットでの肝臓がんモデルでも、がん組織では ER、AR の結合活性が著しく低下することが報告されている (Eagon et al., 1996)。ER/LIFR 発現低下の程度と肝肥大の程度には相関はなか

った。しかし、肝がん誘発性をもつ CF では 13 週以降に ER 発現が低下しており、PBO や BNF でも継続的な低下がみられたことは、ER 応答系の低下が発がんリスクの指標になることを示唆する。ごく最近、肝がん組織のマイクロアレイを用いた解析により、LIFR が肝がん抑制遺伝子であることが示された (Okamura et al., 2010)。ER 応答系の低下が、がん抑制遺伝子 LIFR の発現を低下させて発がんリスクを高めているのかもしれない。また PB は、ER 発現レベルを変えず、LIFR を上昇させるという特徴的な作用を持つことが示された。アンドロゲン応答遺伝子である A2M の発現は、CF や PBO 群で上昇していた。A2M は、GST-P negative HCA マーカーとして報告されており (Sukuta et al., 2004)、AR 発現と A2M の発現変化もまた、肝がんの発生に関与するのかもしれない。本研究により、ER および応答遺伝子 LIFR の低下、アンドロゲン応答遺伝子 A2M 上昇が、肝がんに関わる毒性評価指標になりうることが示唆された。今後、肝臓におけるエストロゲンおよびアンドロゲン応答遺伝子を網羅的に同定してそれらを毒性指標として使うことで、より精度のよい評価指標系が構築できると考えられた。

3) 脳由来神経栄養因子遺伝子の発現変動 (根本)

・背景

神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF) およびニューロトロフィン-3 (NT-3) といった神経栄養因子は、神経系のみならず非神経系細胞の分化・増殖に関与するとされている。これら因子は、肝臓の機能維持や肝発がんへの関わりについても報告されるようになってきている。そこで、本研究では、肝肥大成立過程でのそれら神経栄養因子遺伝子の発現変動の有無を検討した。

・実験方法

動物実験 1、2 の雄雌各群の肝 total RNA を調製し、real-time RT-PCR 法により神経栄養因子 (NGF、BDNF、NT-3) およびその受容体 (TrkA、TrkB、TrkC、p75NTR) 遺伝子の発現変動を検討した。

・結果および考察

CF 投与群でのみ、神経栄養因子の一つである脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子の発現が亢進していた。BDNF 遺伝子は、alternative splicing により 4 種の mRNA を転写することが知られているが、その中でも、exon4 と exon5 を含む mRNA (BDNF ex4 mRNA) にのみ発現亢進が認められ、他の mRNA variant は発現していない、あるいは極めて低いことが示された。さらに、BDNF ex4 mRNA の発現亢進は、休薬後でも維持されていた。

本研究により、同じように肝肥大を誘発する化学物質でも、その肥大様式や異物 (薬物) 代謝酵素の誘導性の相違とともに、BDNF 遺伝子の発現亢進作用の有無が見られることが分かった。CF、PB はそれぞれ受容型転写因子 PPAR α のリガンド、CAR の活性化剤であることが知られ、これら転写因子を介した肝肥大、肝発がんへの関与が推定されている。したがって、CF 特異的に発現亢進が認められた BDNF ex4 mRNA は、PPAR α により転写活性化を受ける可能性、さらに、PPAR α のリガンドとなりうる化合物による肝肥大誘発や肝発がん性に関わる可能性が考えられた。また、CF 投与後の休薬でも発現亢進が維持されたことから、最近、発がん機構の 1 つとして注目されているエピジェネティック様遺伝子発現調節機構の関与も想定される。文献的にも、プロモーター領域の脱メチル化や脱アセチル化酵素の阻害により BDNF 遺伝子の発現が亢進したとの報告もあり、BDNF 遺伝子の転写調節領域において、エピジェネティック様遺伝子発現調節機構が働いている可能性が示唆される。今後、これら発現機構の関与の裏付けや、肝肥大過程における BDNF 高親和性受容体 TrkB の活性化状態などの解析を行うことにより、さらに BDNF と化学物質誘発性肝肥大および肝発がん性との関連性を追究する必要があると思われる。

4) NMDA 型グルタミン酸受容体 NR2C サブユニット遺伝子の発現変動 (根本、出川)

・背景

後述するように、平成 21 年度に、動物実験 1~3 の雄 13 週間投与群ならびに休薬群の肝臓 RNA を用いて、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。中でも、PB 投与群については先行して結果が得られたが、13 週間の投与群において、発現上昇率 (対照群の約 100 倍) が最も高い遺伝子として NMDA 型グルタミン酸受容体 2C サブユニット (NR2C ; Grin2C) 遺伝子が見出された。そこで、本研究では、NR2C 遺伝子の発現に注目して、その他化合物投与による発現変動を調べた。

・実験方法

動物実験 1、2 の雄各投与群の肝 total RNA について、Real-time RT-PCR 法によって、NR2C 遺伝子の発現量を測定した。

・いずれの投与群においても、投与期間依存的に NR2C 遺伝子の顕著な発現亢進が認められ、4 週間の休薬群では大幅に低下した。また、13 週での発現上昇率は、PBO>PB>CF>DBDE であった。

・考察

NR2C 遺伝子は、実験動物 1、2 のいずれの肝肥大誘発剤を用いた場合にも顕著に発現亢進することが明らかになり、肝肥大誘発における本遺伝子産物の寄与が示唆された。これまで、NMDA 受容体は、記憶や学習に関わる受容体として中枢神経系でその機能が盛んに研究されているが、肝臓での発現ならびに機能は未だ報告されておらず、今後の検討が必要である。

なお、これら実験動物 1、2 の結果は、後述するように、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析でも一致した結果を得ている。しかしながら、実験動物 3 の解析において、BNF 投与群では発現亢進が検出されなかった。

5) 異物（薬物）代謝酵素の発現変動（吉田）

・実験方法

動物実験 1、2 で HE 染色を作製した肝臓の連続切片について、CYP1A2、CYP2B および CYP3A4 の抗体を用いた免疫組織化学染色を投与群全例について行った。

・結果

各被験物質投与による肝臓中の CYP1A1、1A2、2B1 および 3A2 分子種の発現変動について、免疫組織化学的に検討した。

PBO については、CYP2B1 の発現が雌雄ともに最も強かったが、雄では CYP3A2 の発現も認められた。DBDE については、CYP1A1、1A2、2B1 いずれも雌雄ともに投与初期から発現増加が観察された。特に CYP1A1/1A2 の発現が強く、この発現増加は休薬後まで持続した。CYP3A2 の発現は、雄のみで認められた。PB は、投与初期から雌雄何れに対しても CYP2B1 および 3A2 を増加させ、さらに、CYP1A2 の増加も惹起した。CF は雄で CYP2B1 および 3A2 をびまん性に発現増加させた。

PB や PBO による CYP2B1 の誘導は、休薬により定常状態に回復したが、DBDE による CYP1A1 および 1A2 の誘導は、ほとんど回復は見られなかった。

・考察

基本実験 1 および 2 について実施した免疫組織化学染色による肝臓中の CYP の分布と程度については、観察時期、程度差および一部に性差があるものの、CF を除き用いた何れの化学物質を投与した場合にも、PB 投与群と同様に肝臓中の CYP1A2、CYP2B1 および CYP3A2 が誘導された。しかし、PB と異なる点もいくつか認められた。まず、PBO と DBDE における CYP3A2 の誘導は雄で特に顕著であった。また、DBDE では CYP1A1 の誘導が顕著であった。後述するマウスの実験においても DBDE では CYP1 ファミリーの誘導が顕著であったことから、DBDE は他の化合物より CYP1 ファミリーをより強く誘導することが明らかになった。また、CF も CYP2B の発現を増加させたが、その発現機序は PB とは異なる可能性が考えられた。

休薬処理により DBDE 以外の物質では、ほぼ定常レベルに回復したが、DBDE では CYP3A2 や CYP2B1 は回復もしくは回復傾向にあったものの、CYP1A1 および CYP1A2 の回復は認められなかった。

6) DNA マイクロアレイ法による発現変動遺伝子の網羅的解析（根本、出川）

・目的

DNA マイクロアレイ法による発現変動遺伝子の網羅的解析は、化学物質による肝肥大誘導機序の解析ならびにそれを基盤とした肝発がんリスク評価系の構築に極めて有効であると思われる。本研究では、動物実験 1~3 の雄 13 週間投与群ならびに休薬群について検討し、肝肥大成立の指標ならびに肝がん発生の指標となりうる遺伝子発現変動を検索することを目的とした。

・実験方法

動物実験 1~3 の雄 13 週間投与群ならびに休薬群の肝臓 total RNA について、各群の RNA をプールした後、Cy3 でラベル化するなど、常法に従い、Agilent 社製 DNA チップ（約 4 万遺伝子のプローブが搭載）を用いて、DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現変動の網羅的解析を行った。

・結果および考察

DNA マイクロアレイ法から得られた情報は膨大であり、ここでは一部代表的な結果について示す。

i) 13 週間投与群について

・薬物（異物）代謝酵素遺伝子

PB 投与群では CYP2B15、CYP2B21 遺伝子および CYP3A2 遺伝子が、CF 投与群では CYP4A1 遺伝子が、PBO 投与群では CYP1A1 遺伝子、CYP2B15、CYP2B21 遺伝子および CYP3A1 遺伝子が、DBDE 投与群では CYP1A1 遺伝子、CYP1A2 遺伝子、CYP2B15 遺伝子および CYP2B21 遺伝子が、BNF 投与群では CYP1A1 遺伝子と CYP1A2 遺伝子が、I3C 投与群では CYP1A1、CYP1A2 遺伝子、CYP2B15 遺伝子および CYP2B21 遺伝子が発現亢進していた。これら亢進は、既報の知見とほぼ一致していた。

・NR2C (Grin2c) 遺伝子

PB 投与群、CF 投与群、PBO 投与群、DBDE 投与群、AA 投与群で顕著な発現亢進が認められた。また、弱いながらも I3C 投与群でも発現が亢進することを見いだした。用いた 7 化合物中 BNF を除く 6 化合物で NR2C (Grin2c) 遺伝子の発現亢進が見られたため、この発現亢進は肝肥大誘発の指標候補になる可能性が考えられる。

・全投与群共通に発現変動する遺伝子

2 倍以上に上昇かつその Raw signal 値が 80 以上、あるいは、0.5 倍以下に低下かつその対照群の Raw signal 値が 80 以上という条件を設定し、全投与群で発現変動する遺伝子を絞り込んだ。その結果、Asns 遺伝子（2～13 倍の発現亢進）、Prkcdbp 遺伝子（2～5 倍の発現亢進）および Slc16a11_predicted 遺伝子（0.3～0.5 倍の発現低下）の 3 つの遺伝子が見いだされた。これらの description はそれぞれ、asparagine synthetase、protein kinase C、delta binding protein、solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)、member 11 である。これら遺伝子の発現亢進が、肝肥大の指標に、さらには、それら遺伝子産物が肝肥大の成立に関連する可能性が考えられた。

・非遺伝毒性発がん物質投与群共通に発現変動する遺伝子

2 倍以上に上昇かつその Raw signal 値が 80 以上、あるいは、0.5 倍以下に低下かつその対照群の Raw signal 値が 80 以上という条件を設定し、単独投与で発がん作用を示す PBO、DBDE 投与群ならびにげっ歯類で発がん性が認められている CF 投与群に共通に発現変動し、かつ他群では発現変動が認められない遺伝子を絞り込んだ。その結果、Scepl (serine carboxypeptidase 1) 遺伝子（2～3 倍の発現亢進）、Aig1 (Aig1 protein) 遺伝子（2～4 倍の発現亢進）、Vnn1 (vanin 1) 遺伝子（2～6 倍の発現亢進）、Duspl (dual specificity phosphatase 1) 遺伝子（0.2～0.3 倍の発現低下）、Dhrs7 (dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7) 遺伝子（0.1～0.5 倍の発現低下）の 5 遺伝子が見いだされた。これら遺伝子の発現亢進が、肝発がんを予測しうる指標に、さらには、それら遺伝子産物が肝発がんの成立に関連する可能性が考えられた。

ii) 17 週間投与（休薬処置）群について

4 週間の休薬処置にも関わらず、発現が変動する遺伝子が存在していることを示された。特に、13 週間の投与期間までに顕著に発現が認められた PBO 投与群の NR2c (Grin2c) 遺伝子、DBDE 群の CYP1A1 遺伝子の高い発現亢進は持続されていた。また、全ての投与群で共通する発現変動遺伝子や、発がん性が知られている CF、PBO、DBDE 投与群に共通して発現変動する遺伝子は見いだすこともできなかったが、CF と PBO 投与群、CF と DBDE 群、PBO と DBDE 投与群の組合せでのみ共通に発現が変動する遺伝子として、それぞれ、4 種（いずれも発現低下）、11 種（発現上昇遺伝子 4 種、発現低下遺伝子 7 種）、17 遺伝子（発現上昇遺伝子 7 種、発現低下遺伝子 10 種）が見いだされた。

これまで、薬物の休薬処置は、肝臓に限らず様々な臓器、細胞において、多くの事象が回復するものとしてほとんど研究対象とされていなかった。しかしながら、本研究では、4 週間の休薬処置にも関わらず、発現が変動する遺伝子が肝臓内で存在していることが明らかとなった。化学発がんにおいて、遺伝子の損傷や発現異常が固定化して惹起されることを考えると、休薬処置後も何らかの変動が起り続けることは何ら不思議ではない。したがって、休薬後のこれら変動の科学的意義付けは、肝肥大成立や肝がん発生の機序およびそれらのリスク評価を考える上で極めて重要である。

⑥ 血中生化学マーカーの変動と肝肥大、肝障害、肝臓中の脂質代謝等の関連性（下位）

・目的

本研究では、動物実験 1～3 について、血液中のマーカーの変動から肝肥大と肝障害、肝臓中の脂質代謝等の関連を明らかにすることを目的とした。

・実験方法

動物実験 1～3 で得られた血液に関して、17 項目（AST、ALP、ALP、BUN、LDH、クレアチニン、グルコース、遊離脂肪酸、TGL、総コレステロール（T-CH）、リン脂質、総タンパク、アルブミン、乳酸、アセト酢酸、ヒドロキシ酢酸、総ビリルビン）について検査し、肝重量の増加と相関性の高いマーカーを多変量解析（JMP7）により抽出した。

・結果

血液検査項目のうち、AST、LDH、CPK、T-BIL は溶血関連項目であるため除外することとした。肝機能パラメーターである ALT については、雄では AA の 3 日目のみ、雌では CF の 3 日目、BNF の 4 週、AA の 3 日目と 4 週に有意な上昇が見られたが顕著な上昇ではなかった。その他の化合物についてはむしろ減少するものもあり、今回使用した化合物は、今回の投与量においてどれも強い肝障害を誘発しなかった。

しかしながら、いずれの化合物も肝重量が増加した。PBO と DBDE は雌雄ともに 14 週をピークに増加し、その後も高い値を示し、休薬処理後でも対照群のレベルまでへの回復は見られなかった。なお、休薬による対照群のレベルへの回復は、PB、CF あるいは I3C を投与した雌雄群、また、BNF や AA を投与した雌群で見られた。

多変量解析を行ったところ、肝重量の増加と相関性の高いマーカーとして T-CH が抽出されたので脂質関連項目として TGL についても比較検討した。その結果、雌雄いずれも CF は T-CH が有意に減少したが、PB、PBO、DBDE、BNF は T-CH が有意に上昇した。PB、PBO と BNF は休薬により対照群のレベルまで減少したが、DBDE は休薬の効果が見られなかった。I3C は興味深いことに雄ではまったく T-CH の上昇は見られなかったが、雌では、有意な上昇が 13 週まで見られ、休薬により対照群のレベルまで減少した。一方、TGL は、雌雄ともに PBO 処理群で有意な減少が見られ、休薬しても回復しなかった。雄では他の化合物についても試験期間を通じて減少傾向が見られ、雌については、DBDE を除き減少傾向が見られた。なお、雄では DBDE を除いた、雌では DBDE と AA 除いたすべての化合物投与群で、アセト酢酸の上昇が見られた。

・考察

今回使用した化合物の多くが、T-CH や TGL に変動をもたらした。特に、DBDE と PBO の投与群では、4 週以降肝重量および T-CH の増加が見られ、それら増加は休薬により回復しなかった。また、PBO では、DBDE と異なり雌雄いずれも TGL が低下し、この低下は休薬により回復しなかった。

今回試験した化合物の多くに TGL の減少が見られたが、血中の TGL が減少する理由として、肝臓や脂肪組織において、脂肪酸合成の促進、脂肪酸分解抑制などが起こり TGL がこれらの組織に蓄積する可能性がある。また、T-CH の上昇は、HMGCR などの酵素によるコレステロール合成の亢進、CYP7A1 がかわる胆汁酸合成抑制、LPL 異常などが考えられるが、いずれにおいてもそれぞれの機能に関わる遺伝子の発現の検討結果を考え合わせる必要がある。

⑦ げっ歯類の肝肥大と肝発がんに Constitutive Androstane Receptor（CAR）が果たす役割の解析（西川、吉田）

・背景

げっ歯類における肝肥大、肝腫瘍過程において Constitutive androstane receptor（CAR）が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。CAR は、PXR、PPAR と同じサブファミリーに属する核内受容体であり、様々な薬剤などで核内移行して CYP や SULT 等の薬物代謝酵素発現を調節し、化学物質、ステロイド、胆汁酸の代謝、解毒に関与している。CAR 野生型マウスに PB を投与すると、CAR の活性化を介して Cyp2b 誘導され肝肥大の誘発、肝細胞の増殖が起こり、さらに長期間投与を続けると肝発がんを促進する。一方で CAR ノックアウトマウスでは、PB を投与しても肝肥大、肝発がんが起きず、PB によるマウスでの肝肥大・肝発がんには CAR が重要な役割を果たしていることが知られている。このように、CAR は肝肥大に深く関与しているが、肝肥大を起こす化学物質の多くは上述のように、複数の

薬物代謝酵素を誘導することから、CAR との関連性は化学物質によって様々であると予想される。したがって、げっ歯類における肝肥大・肝腫瘍発生に機序の解析に CARKO マウスは有用なモデルであると考えられる。

本研究課題は肝肥大から肝発がんに至る作用機序解明を目的とするものである。本分担研究では、さらにげっ歯類の肝肥大と肝発がんに関与する CAR が果たす役割を解析することを目的として実施した。

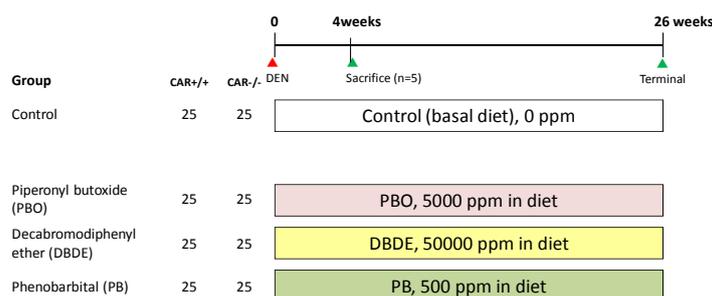
・実験方法

本解析の実験方法を図 2 に記載した。6 週齢の雄 CAR 遺伝子欠損 (CARKO) マウスおよび Wild タイプである同週齢の C3H マウスに PBO を 5,000 ppm、DBDE を 50,000ppm、PB を 500ppm の濃度で混餌投与した。短期間観察群として、各群 5 匹の Wild および CARKO マウスを投与 4 週間後に解剖し、肝臓の病理組織学的検索、免疫組織化学染色による CYP の発現および各種薬物代謝酵素遺伝子の発現を検索した。各遺伝子の mRNA 発現量 (Real-time PCR) については、個体ごとにハウスキーピング遺伝子 GAPDH 発現量で割ったうえで群平均を出し、Wild の Control 群を 1 とした。これらの被験物質はいずれも長期投与によりげっ歯類の肝腫瘍を増加させることが報告されていることから、その肝腫瘍発生に CAR 遺伝子が果たす役割を検索するため、2 段階肝発がん試験法を用いて、これらの被験物質を投与した CARKO マウスの肝腫瘍発生状況を病理学的に解析した。2 段階肝発がん試験では、diethylnitrosamine (DEN) を単回腹腔内投与し、その翌週より上述の同用量の PBO、DBDE、PB を 25 週間混餌投与した。投与期間終了後、動物を安楽死させ、肝臓を摘出して 10% 中性緩衝ホルマリン液に固定後、通常の方法により標本作製し HE 染色を施して鏡検し、肝腫瘍性病変の発生を病理組織学的に検索した。

試験系

目的: 化学物質による肝肥大誘導を介した肝発がんにおける CAR の役割を明らかにする

動物: CAR+/+ (Wild, C3H系統), CAR-/- (CARKO) マウス, 雄, 6週齢



検査項目: 体重(1回/週)、摂餌量(1回/週)、一般状態観察(毎日)

剖検時肝重量、肝臓組織学的検査、肝臓免疫組織学的検査 (Cyp2b10)

肝臓の薬物代謝酵素関連遺伝子発現 (Real-time PCR)

3

図 2 げっ歯類の肝肥大と肝発がんに関与する Constitutive Androstane Receptor (CAR) が果たす役割の解析の実験計画書

・結果

PBO 投与により Wild, KO とともに投与初期の摂餌量低値に伴い体重が減少したが、後半は回復傾向がみられた。肝重量については、Wild マウスでは全投与群で絶対・相対肝重量が有意に増加したが、CARKO マウスでは PBO で有意な増加したものの、DBDE 及び PB 投与では肝重量の増加は観察されなかった。

HE 染色による病理組織学的形態像については、Wild マウスでは全投与群で小葉中心性から小葉全域にわたる肝細胞肥大がみられた。一方、CARKO マウスでは PB 及び DBDE 投与では肝肥大は見られなかったが、PBO 群で wild と同様の明らかな肝細胞肥大が観察された。

免疫組織化学染色による CYP2B 抗体に対する肝臓での発現については、Wild マウスの DBDE、PB 投与では小葉中心性の染色領域の拡大、染色強度の増強がみられ、PBO では、小葉全域にわたる陽性像がみられた。CARKO マウスでは各群で陽性シグナルが減弱していたが、PBO では小葉全域にわたる弱い陽性像が認められた。

各薬物代謝酵素の関連遺伝子 mRNA 発現量 (Real-time PCR) については、Cyp2b10 は、Wild マウスの全投与群で顕著に増加した。CARKO マウスでは Wild に比べ、Control、DBDE 及び PB 投与では顕著に Cyp2b10 の発現が低下していたが、PBO 群では発現増加がみられた。Cyp3a11 は、Wild、CARKO マウスともに PBO で顕著に増加し、PB で僅かに増加した。Cyp1a1 は、Wild、CARKO マウスともに DBDE で顕著に増加した。Cyp1a2、1b1 も同様の傾向が認められた。Cyp4a10 は全群で Wild に比べ、CARKO マウスで高い傾向があり、CARKO の PBO 投与では強い誘導が認められた。薬物酸化反応において Cyp への電子供与に重要な酵素であるシトクロム P450 reductase は肝肥大が認められた群で発現増加が観察された。

2 段階肝発がん実験は現在動物実験が進行中である。しかし一部の動物については動物実験が終了している。一部の動物における暫定的な病理組織学的検索の結果を以下に記す。Wild マウスでは、PB、PBO、DBDE いずれの投与においても肝臓の変異巣および腺腫が対照群と比較し増加し、PBO 群では、変異巣、腺腫ともに発生頻度が高かった。病変のタイプでは、PBO、PB ともに好酸性巣および腺腫の発生が多かった。一方 CARKO マウスでは、全ての変異巣および腺腫ともに発生頻度が減少した。PB では現在のところ腺腫の発生は認められていない。今後、例数を追加し、病変の多発性についても検索の予定である。

・考察

CAR 遺伝子と肝肥大の関連性について、DBDE、PB は CARKO では Cyp2b10 発現が低下し肝肥大を誘発しなかったことから、DBDE、PB による肝肥大には CAR を介する Cyp2b10 の誘導が重要であることが分かった。一方、PBO は、CARKO においても肝肥大を誘発したことから、PBO は CAR を介さない経路が肝肥大に寄与していると考えられた。PBO は Cyp3a11 を誘導し、CARKO マウスにおいても Cyp2b10、P450 reductase が増加した。Cyp3a11 は CAR と同じ核内受容体ファミリーに属する PXR により誘導され、また PXR は Cyp2b も誘導することから、PBO は PXR を介した薬物代謝酵素誘導により肝肥大を起こす可能性が示唆された。DBDE が肝肥大を起こさなかったにもかかわらず、Cyp1a1、1a2、1b1 を強く誘導した原因は現在のところ不明である。しかし、*in vitro* で DBDE をはじめとする臭素化難燃剤は CYP1A1 活性を上げない、また、臭素化難燃剤に含まれる不純物により Cyp1 ファミリーが誘導されるという報告があった。今回 DBDE は 50,000 ppm という高濃度で投与したため、不純物の影響も大きいと考えられた。今後の検討を必要である。Cyp4a10 は Wild と比較して KO マウスで強く誘導された。CAR 活性化が Cyp4a 発現を抑制するという報告があり、この報告と一致する結果であった。しかし、CARKO の PBO 群での強い誘導については今後の検討課題である。

解析途中ではあるが、2 段階肝発がん実験結果は、肝肥大の結果と一致していなかった。CARKO マウスで肝臓の腫瘍性病変の発生が減少したことから、今回の検索物質における肝腫瘍発生には CAR 受容体が重要であると考えられた。検索物質により観察される肝細胞変異巣あるいは腺腫のタイプが異なっていたことから、CAR 受容体と腫瘍性病変のタイプの関連性についても今後検討する予定である。

⑧ 各薬剤投与ラット肝臓の薬物代謝酵素活性の検討

1) 間接変異原物質 MeIQx の代謝活性化を指標とした検討 (布柴)

・実験方法

動物実験 1~3 のラットの肝臓から、定法に従って S9 を調製した。この S9 による間接変異原 MeIQx の変異原性を Ames 試験により検討した。

・結果および考察

PB や CF、AA を投与したラット肝 S9 は、雌雄に関わらず MeIQx の代謝活性化をほとんど示さなかった。しかしその一方で、PBO、DBDE、BNF、I3C を投与したラット肝 S9 はいずれも顕著な MeIQx の代謝活性化を示し、変異原性を高めた。これらの結果は、PB や CF、AA 投与により肝臓に MeIQx の代謝に関わる CYP1A1 や CYP1A2 が誘導されなかったこと、逆に PBO、BNF、I3C、さらに DBDE 投与ではそれらの代謝酵素が誘導されることを示している。また投与後 3 日、4 週、13 週、17 週での代謝活性化能力は薬剤によって異なった。PBO、BNF、I3C の場合は投与期間中の 3 日、4 週、13 週は著しい代謝活性化能を示したが、投与停止 4 週間にはすでに代謝活性化能はコントロールレベルに減少した。一方、DBDE の場合は投与停止後も代謝活性化能は維持された。17 週で代謝活性化能が消失した PBO、

BNF、I3C では、投与停止とともにそれらの代謝酵素の誘導が低下したか、あるいは同時に UDP-グルクロン酸転移酵素やグルタチオン S-転移酵素などの抱合体形成などに関わる第 II 相薬物代謝酵素の誘導が高まったためと考えられる。

2) 間接変異原物質ベンツピレン (BaP) および N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) の代謝活性化を指標とした検討 (根岸)

・実験方法

動物実験 1、2 のラットの肝臓から、定法に従って S9 を調製した。この S9 による間接変異原 BaP および NDMA の変異原性を Ames 試験により検討した。

・結果および考察

CYP1A 群の酵素で代謝活性化されると考えられている BaP の変異原性は DBDE 投与の S9 で雌雄とも高い活性が検出され、投与 3 日目から投与中止 4 週間まではほぼ同じ活性を示した。PB、PBO でも弱い誘導活性が見られたが、興味深いことに、これら化合物投与の雄の S9 を使用した場合には投与中止後の S9 で活性の上昇が見られた。雌では反対に投与中止で活性は低下した。

NDMA の代謝活性は PB、PBO、DBDE の投与ラット S9 で誘導され雌雄同程度であった。投与 3 日目でも誘導されていたが、4 週間後に最大となり 13 週間継続した。この活性は投与中止後 4 週間未処理ラットのレベルまで低下した。その他の化合物では変異原性の増加は見られなかった。

以上の結果から、同じく肝肥大を誘導する化合物でも肝薬物代謝酵素の活性におよぼす影響には大きな違いがあることが示された。その差は動物の雌雄においてもみられた。多くの化合物では投与中止後に、活性は未処理群のレベルまで低下しており、肝機能の回復が起こっていると推定される。しかしながら、BaP の変異原性で見られたように、一部化合物投与群では投与中止後も誘導された活性が保持されることから、化合物によっては異物・薬物代謝に持続的な影響を与える可能性が示された。

まとめ

本研究は 3 年計画で、非遺伝毒性化合物で生じる肝肥大の毒性学的意義やその指標を見出すとともに、肝発がんリスク評価系の構築に有用な指標を見出すことを目的とした。非遺伝性化合物で肝肥大誘発作用があり、1) 肝発がんプロモーション作用がある化合物 (PB、BNF、I3C)、2) 肝発がん性がある化合物 (CF、PBO、DBDE) および 3) 肝発がん性はないが肝毒性がある化合物 (AA) の 3 群の化合物を用いて、ラットに 13 週間混餌投与および投与後 4 週間休薬措置 (回復試験) を行い、肝肥大と薬物代謝酵素誘導、肝細胞増殖関連因子や遺伝子傷害性 (肝発がん) との関連性を生化学的、分子生物学的、病理組織学的、遺伝毒性学的に追究した。

肝毒性の指標と考えられる肝 CYP 酵素、脂質代謝酵素や血清成分 (酵素) などへの影響を生化学的に、また、病理組織学的に分析した結果、用いた何れの化合物も投与期間を通じてそれぞれ報告されている影響を示したが、それらの影響のほとんどが、休薬により定常レベルに回復した。したがって、これら化合物による肝肥大は一見、適応と考えられた。しかしながら、特に遺伝子レベルで休薬後のその発現を調べた結果、定常レベルに回復しない遺伝子が存在することが明らかになり、用いた何れの非遺伝性肝肥大誘発化合物も肝毒性を誘発する可能性を秘めていることが示唆された。言い換えると、化学物質による肝肥大は毒性の 1 つと考えられるが、この点については、休薬後も変動している遺伝子と毒性との関連性をさらに明確にする必要がある。

各化合物を 13 週間投与および休薬した群について、分子生物学的解析 (DNA マイクロアレイ解析を含む) した結果、DNA 損傷依存性細胞増殖抑制因子、脳由来神経栄養因子や NMDA 受容体の遺伝子、ホルモン応答性遺伝子などの発現変動が肝肥大への発展に関わっている可能性が示された。さらに、用いた化合物全てに、あるいは肝発がん作用を有する化合物でのみ共通に発現変動する遺伝子を見出した。また、休薬処置においても、多数の遺伝子が発現変動していること、薬物代謝酵素 CYP2B 誘導作用を有する肝発がん物質 PBO、DBDE には共通した持続的変化 (肝細胞内の脂肪滴の増加や 8-OHdG レベルの増加など) があるなど、肝発がんの指標候補が見出された。これらの知見は、休薬時の遺伝子発現解析が、肝肥大を毒性として捉えるべきかの評価、また、非遺伝性肝肥大誘発化合物の発がん性を含めた肝毒性の評価に極めて有用であることを示している。

また、げっ歯類の肝肥大と肝発がんに関与する CAR が果たす役割の解析では、CAR 遺伝子欠損マウスに PB、

PBO、DBDE の肝発がんを誘発する肝肥大物質を短期間投与して肝肥大と薬物代謝酵素誘導を検索するとともに、これらの物質を用いたマウス 2 段階肝発がん実験を実施し、げっ歯類での肝発がん過程に CAR の果たす役割について検討した。その結果、PBO は CAR 受容体だけでなく、PXR を介した薬物代謝酵素誘導により肝肥大を起こす可能性が示唆された。DBDE の肝肥大は CAR 受容体が関与していると考えられた。解析途次ではあるが、用いたいずれの被験化合物においても CAR 遺伝子欠損マウスで肝臓の腫瘍性病変の発生が減少していることから、肝腫瘍発生には CAR 受容体が重要であることが示唆された。

引用文献

- Das J, Ghosh J, Manna P, Sil PC. Acetaminophen induced acute liver failure via oxidative stress and JNK activation: protective role of taurine by the suppression of cytochrome P450 2E1. *Free Radic. Res.* 44, 340-355, 2010.
- Dewa Y, Nishimura J, Muguruma M, Jin M, Saegusa Y, Okamura T, Tasaki M, Umemura T, Mitsumori K. β -Naphthoflavone enhances oxidative stress responses and the induction of preneoplastic lesions in a diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized rats. *Toxicol.* 244, 179-189, 2008.
- Dragan YP, Xu YD, Pitot HC. Tumor promotion as a target for estrogen/antiestrogen effects in rat hepatocarcinogenesis. *Prev. Med.* 20, 15-26, 1991
- Eagon PK, Elm MS, Epley MJ, Shinozuka H, Rao KN. Sex steroid metabolism and receptor status in hepatic hyperplasia and cancer in rats. *Gastroenterology* 110, 1199-1207, 1996.
- Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 196, 369-405, 2010.
- Kim DJ, Han BS, Ahn B, Hasegawa R, Shirai T, Ito N, Tsuda H. Enhancement by indole-3-carbinol of liver and thyroid gland neoplastic development in a rat medium-term multiorgan carcinogenesis model. *Carcinogenesis.* 18, 377-381, 1997.
- Ma WL, Hsu CL, Wu MH, Wu CT, Wu CC, Lai JJ, Jou YS, Chen CW, Yeh S, Chang C. Androgen receptor is a new potential therapeutic target for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 135, 947-955, 2008.
- National Toxicology Program. NTP Toxicology and carcinogenesis studies of acetaminophen (CAS No. 103-90-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 394: 1-274, 1993.
- Okamura Y, Nomoto S, Kanda M, Li Q, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A. Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) is detected as a novel suppressor gene of hepatocellular carcinoma using double-combination array. *Cancer Lett.* 289, 170-177, 2010.
- Shoda T, Mitsumori K, Onodera H, Toyoda K, Uneyama C, Takada K, Hirose M. Liver tumor-promoting effect of b-naphthoflavone, a strong CYP and Cx32 decrease in its hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol. Pathol.* 28, 540-547, 2000.
- Stoner G, Casto B, Ralston S, Roebuck B, Pereira C, Bailey G. Development of a multi-organ rat model for evaluating chemopreventive agents: efficacy of indole-3-carbinol. *Carcinogenesis.* 23: 265-272, 2002.
- Sukata T, Uwagawa S, Ozaki K, Sumida K, Kikuchi K, Kushida M, Saito K, Morimura K, Oeda K, Okuno Y, Mikami N, Fukushima S. alpha 2-Macroglobulin: a novel cytochemical marker characterizing preneoplastic and neoplastic rat liver lesions negative for hitherto established cytochemical markers. *Am. J. Pathol.* 165, 1479-1488, 2004.
- Tanaka K, Sakai H, Hashizume M, Hirohata T. Serum testosterone:estradiol ratio and the development of hepatocellular carcinoma among male cirrhotic patients. *Cancer Res.* 60, 5106-5110, 2000.
- Yu MC, Yuan JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 127, S72-78,

2004.

・ Yu MW, Yang YC, Yang SY, Cheng SW, Liaw YF, Lin SM, Chen CJ. Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1644-1651, 2001.

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト (論文は、添付すること。)

投稿準備中

・ Ozawa, S. *et al.* Altered expression of Gadd45 genes during development of chemical-mediated liver hypertrophy in rats.

・ Nemoto, K. *et al.* Superinduction of N-methyl-D-aspartate receptor NR2C subunit during development of chemical-mediated liver hypertrophy in rats.

・ Nemoto, K. *et al.* Hepatic gene expression profiles during chemical-mediated development of liver hypertrophy and after cessation of the chemical; risk assessment of liver cancer.

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

なし

3 今後の問題点等

・ 動物実験が 17 週間と長期に渡るため、平成 21 年度実施の動物実験 3 の完了は今年度後半となり、いくつかの項目で解析が完了しなかった。これらについては早急に完了させる予定である。特に、このうち 2 種 (BNF、I3C) は、肝発がんプロモーション作用があり、PB と併せた結果の考察は、肝発がんプロモーション活性の指標を見出すために重要であると思われる。CAR 遺伝子欠損マウスの研究項目についても同様である。

・ 本研究では、遺伝子毎にその発現の変動を考察したが、複数の組合せや遺伝子産物の機能が類似した遺伝子群での解析がさらに有用な知見をもたらすものと思われる。この点について今後さらに検討する予定である。

・ DNA マイクロアレイ法による発現変動遺伝子の網羅的解析は多くの知見をもたらす。実際に本研究でも目的に即した遺伝子の発現変動が多数見出された。これら変動遺伝子については、その遺伝子産物の量的質的意義付けをさらに行う必要がある。また、この解析は、雄での 13 週間投与群ならびに休薬処置群でのみ実施した。雌を含めた他の投与群での実施もまた、さらに有用な知見をもたらすものと思われる。

・ 休薬期間で変化する事象の重要性は、それぞれの検査項目の結果が出揃った時点でさらに深まった。特に発がんは、多くの場合、化学物質による遺伝子の損傷や発現異常が残存・固定化した結果、惹起されると考えられ、休薬後も何らかの変動が起り続けることは何ら不思議ではない。したがって、これら変動の科学的意義付けは、肝肥大の発展や肝がん発生の機序およびそれらのリスク評価のみならず、化学物質の毒性発現機序の解明に極めて重要であると思われる。本研究では非遺伝毒性物質のみで検討を行ったが、遺伝毒性物質を用いた休薬実験との比較検討もまた重要であると考えられる。

・ 本研究では、3 日間、4 週間、13 週間の投与期間ならびに 13 週間投与後の 4 週間の休薬を設定したが、これらプロトコルの妥当性を今後さらに検証する必要がある。

- ・農薬や食品添加物のより適切な安全性評価法（ADI 設定も含める）を構築するためには、本研究で見出した知見について、さらに多くの化合物で検証する必要がある。
- ・化合物投与ラット肝臓で見られた遺伝子の発現変動が、肝肥大、肝発がん、肝障害といった肝毒性にどのように関係するかを今後さらに検証・解明することが必要である。