

氏名（本籍）	酒井洋樹（岐阜県）			
学位の種類	博士（獣医）			
学位記番号	獣医博乙第52号			
学位授与年月日	平成14年3月13日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
学位論文題目	化学物質のがん原性予知に関する実験病理学的研究： ラット肝臓を用いた中期イニシエーション活性検索法 について			
審査委員	主査	岐阜大学	教授	柵木利昭
	副査	帯広畜産大学	教授	松井高峯
	副査	岩手大学	教授	岡田幸助
	副査	東京農工大学	教授	三森国敏
	副査	岐阜大学	教授	武脇義

論文の内容の要旨

in vitro 短期発がん性スクリーニング法と長期がん原性試験の間のギャップを解消するために、短期間で発がん性の検索が可能な中期発がん性試験法の開発が望まれている。中期発がん性試験の一つである中期プロモーション活性検索法は、すでに約 300 種の化学物質に適用され、評価に用いられている。一方、イニシエーション活性を検出のための中期発がん性試験法はいまだ確立されていない。

本研究では、5 週間で化学物質のイニシエーション活性が検索可能な中期発がん性試験法（中期イニシエーション活性検索法）を用いて、化学物質のイニシエーション活性を検索し、Ames テストおよび長期がん原性試験の結果と比較し、その有効性を検討した。また、異なる細胞増殖刺激後のラット肝臓における細胞増殖動態と cytochrome P450 (CYP) の動態を解析し、それらのイニシエーション成立への影響を検討した。さらに、中期イニシエーション活性検索法における被検物質の分割投与による加算効果も検討した。

肝部分切除（PH）による中期イニシエーション活性検索法を既知の 26 種類の発がん性あるいは変異原性化学物質に適用し、前がん病変である glutathione S-transferase placental form 陽性細胞巢(GST-P 陽性巢)の誘導を指標にして、中期イニシエーション活性検索における同法の有用性を検討した。PH 処置した雄 F344 ラットに検索物質を経口投与し、続いて、GST-P 陽性巢の形成促進のために、2-acetylaminofluorene を 0.015%混餌投与、さらに CCl₄ を経口投与し、GST-P 陽性巢は免疫染色にて検出した。

5 種の変異原性肝発がん物質を投与したところ、誘導された GST-P 陽性巢の数は対照群に比較して有意に高い値を示した。一方、変異原性非発がん物質では、有意な GST-P 陽性巢の誘導はみられなかった。同様に、非変異原性肝発がん物質、肝プロモーター、あ

るいは肝臓を標的臓器としないプロモーター投与でも、有意な GST-P 陽性巣の誘導はみられなかった。さらに、今回検索した変異原性発がん物質では、発がん標的性に関わらず、有意に高い GST-P 陽性巣の誘導を認めた。したがって、中期イニシエーション活性検索法は、イニシエーション活性の検索において、きわめて高い有用性を示した。特に臓器標的性に関わらず、変異原性物質の発がん性が短期間に評価できることが明らかとなった。

次に、中期イニシエーション活性検索法の特徴の一つである、検索物質の暴露前の肝細胞増殖刺激がイニシエーション成立に与える影響を、PH, CCl₄ および D-galactosamine(D-gal) 処置による 3 種類の細胞増殖刺激の間で比較した。実験 1 として、BrdU 標識法で各細胞増殖刺激後のラット肝臓における細胞増殖動態を、リアルタイム reverse transcriptase-polymerase chain reaction により CYP 各アイソザイムの mRNA 量、さらに immunoblotting 法によって、イニシエーターである 1,2-dimethylhydrazine(DMH)の代謝活性化に関与する CYP 2E1 タンパク質量を定量し、それぞれ処置後の変化を解析した。実験 2 として、実験 1 の結果と GST-P 陽性巣の誘導の関係を解析するために、各処置後、DMH を経時的に投与し、GST-P 陽性巣の誘導を調べた。

実験 1 において、PH および D-gal 処置後の CYP 2E1 タンパク質量の変化は少なく、対照群と大差がなかったが、CCl₄ 処置では、12 時間後に急速な減少を示し、48 時間後まで低値が持続した。BrdU 標識率では、D-gal および CCl₄ 処置では 36~72 時間後に上昇したが、D-gal 処置は、CCl₄ 処置に比較して低い値を示した。CYP 各アイソザイムの mRNA 量は PH, CCl₄ 処置後ともに 12 時間で急激に低下し、72 時間から上昇に転じ、7 日後には対照群と同レベルに回復した。実験 2 において、GST-P 陽性巣の誘導は、PH 処置では細胞増殖動態との相関性を示したが、DMH の代謝活性化に起因したと考えられる約 6 時間の時間差が認められた。一方、CCl₄ 処置では、CYP2E1 の回復に伴い、GST-P 陽性巣の誘導が高まった。D-gal 処置では、GST-P 陽性巣の誘導は低く、これは D-gal 投与での低い細胞増殖誘導に起因すると考えられた。以上より、CYP2E1 レベルを維持しつつ、細胞増殖の誘導が可能な PH 処置は、中期イニシエーション活性検索法において効果的な細胞増殖刺激法と考えられる。

イニシエーション活性の加算効果を検討するために、PH または CCl₄ 処置を細胞増殖刺激として用い、DMH をイニシエーターとした分割および単回投与において GST-P 陽性巣の誘導を比較した。PH を刺激に用いた場合、単回大量投与、少量分割投与とも総投与量が等しければ、同じ効果が得られた。これに対し、CCl₄ 処置では、総投与量が同じであっても、大量単回投与に比較して少量分割投与の方がイニシエーション活性の検出感度は高かった。さらに異なる種類のイニシエーターの併用投与(DMH+diethylnitrosamine, DMH + dihydroxy-di-N-propylnitrosamine)でも加算性が成立したことから、本試験系では、複合的発がんリスクの評価における有効性も示された。

本研究により、中期イニシエーション活性検索法の有用性さらに同法におけるイニシエーション成立に直接的に影響を及ぼす因子として、細胞増殖および代謝活性化が重要であることを明らかにした。また、被検物質の投与方法において、少量分割投与することで、副作用を軽減し、効果的にイニシエーション活性を検索できることも示唆された。同法は、医薬品開発における安全性研究だけでなく、環境衛生の分野においても多大な貢献が期待できると考える。

審 査 結 果 の 要 旨

現在、化学物質の発がん性評価に際し、長期がん原性試験は実施にあたり莫大なコストが必要である点、また変異原性を評価する短期スクリーニング法では、長期がん原性試験と結果が一致しない偽陰性、偽陽性が存在する点などが問題となっている。本研究は、この両試験の間のギャップを解消するために、5週間という短い期間で化学物質のイニシエーション活性が検索可能な中期イニシエーション活性検索法の確立を目的とした研究である。

第一章では、中期イニシエーション活性検索法を用いて、変異原性肝発がん物質、非変異原性肝発がん物質、発がんプロモーター、変異原性非発がん物質および肝臓を標的としない変異原性発がん物質のイニシエーション活性をラット肝臓の前がん病変である glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性巣の誘導により評価した。その結果、変異原性発がん物質では、発がん標的臓器に関わらず、有意に高い GST-P 陽性巣の誘導を認めた。したがって、中期イニシエーション活性検索法は、臓器標的性に関わらず、変異原性物質の発がん性を、肝臓のみの検索で短期間に評価できることを示した。

第二章では、中期イニシエーション活性検索法の特徴の一つである、検索物質の暴露前の肝細胞増殖刺激がイニシエーション成立に与える影響を肝部分切除(PH)、 CCl_4 および D-galactosamine (D-gal)処置による3種類の細胞増殖刺激の間で比較した。その結果、PH 処置では、GST-P 陽性巣の誘導は、細胞増殖動態との相関性を示したが、代謝活性化は維持されており、GST-P 陽性巣の誘導と細胞増殖動態の間には代謝活性化に起因したと考えられる時間差が見られた。一方、 CCl_4 処置では、肝小葉中心性壊死による代謝活性化の急激な低下後、代謝活性化が回復に転ずる高細胞増殖期後半で、GST-P 陽性巣が有意に誘導された。D-gal 処置では、誘導された細胞増殖活性は低く、有意な GST-P 陽性巣の誘導があったものの、その程度は PH に比較して低値を示した。以上より、細胞増殖および代謝活性化はイニシエーション成立に影響を及ぼす重要な因子であり、代謝活性化を維持しつつ、高い細胞増殖誘導が得られる PH 処置は、中期イニシエーション活性検索法において効果的な細胞増殖刺激法であることを明らかにした。

第三章において、イニシエーション活性の加算効果を検討するために、PH または CCl_4 処置を細胞増殖刺激として用い、イニシエーターの少量分割および大量単回投与において GST-P 陽性巣の誘導を比較した。その結果、PH 処置の場合、単回大量、少量分割投与とも総投与量が等しければ、同じ効果が得られた。これに対し、 CCl_4 処置では、総投与量が同じであっても、大量単回投与に比較して少量分割投与の方がイニシエーション活性の検出感度は高かった。さらに異なる種類のイニシエーターの併用投与でも加算性が成立したことから、複合的発がんリスクの評価における有効性も示された。

本研究により、中期イニシエーション活性検索法の有用性さらに同法におけるイニシエーション成立に直接的に影響を及ぼす因子として、細胞増殖および代謝活性化が重要であることが明らかにし、さらに、被検物質の投与方法において、少量分割投与することで、副作用を軽減し、効果的にイニシエーション活性を検索できる可能性があることも

示した。同法は、医薬品開発における安全性研究だけでなく、環境衛生分野においても多大な貢献が期待できる。

以上について、審査委員会全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文：

- 1) 題 目： Summation of initiation activities of low doses of the non-hepatocarcinogen 1,2-dimethylhydrazine in the liver after carbon tetrachloride administration
著 者 名： Sakai Hiroki, Tsukamoto Tetsuya, Yamamoto Masami, Yanai Tokuma, Masegi Toshiaki, Inada Ken-ichi, Nakanishi Hayao and Tatematsu Masae
学術雑誌名： Cancer Letters
巻・号・頁・発行年： 148 (1) : 59-63, 2000
- 2) 題 目： Differential effects of partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration on induction of liver cell foci in a model for detection of initiation activity
著 者 名： Sakai Hiroki, Tsukamoto Tetsuya, Yamamoto Masami, Shirai Norimitsu, Iidaka Takeshi, Yanai Tokuma, Masegi Toshiaki and Tatematsu Masae
学術雑誌名： Japanese Journal of Cancer Research
巻・号・頁・発行年： 92 (10) : 1018-1025, 2001
- 3) 題 目： Summation of initiation activities in the liver after partial hepatectomy
著 者 名： Sakai Hiroki, Tsukamoto Tetsuya, Yamamoto Masami, Hirata Akihiro, Inagami Atsushi, Shirai Norimitsu, Iidaka Takeshi, Yanai Tokuma, Masegi Toshiaki and Tatematsu Masae
学術雑誌名： Cancer Letters
巻・号・頁・発行年： 176 (1) : 1-5, 2002
- 4) 題 目： The effects of D-galactosamine- or carbon tetrachloride-induced regeneration on induction of rat liver cell foci in a model for detection of initiation activities of chemicals
著 者 名： Sakai Hiroki, Inagami Atsushi, Hirata Akihiro, Tsukamoto Tetsuya, Kobayashi Kiyoshi, Degawa Masakuni, Shirai Norimitsu, Iidaka Takeshi, Yanai Tokuma, Masegi Toshiaki and Tatematsu Masae
学術雑誌名： Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年： *in press*
- 5) 題 目： Distinction of carcinogens from mutagens by induction of liver cell foci in a model for detection of initiation activity
著 者 名： Sakai Hiroki, Tsukamoto Tetsuya, Yamamoto Masami, Kobayashi Kiyoshi, Yuasa Hirofumi, Imai Toshio, Yanai Tokuma, Masegi Toshiaki and Tatematsu Masae
学術雑誌名： Cancer Letters
巻・号・頁・発行年： *in press*

既発表学術論文：

- 1) 題 目： Arteriosclerosis associated with a natural Marek's disease infection in a Japanese Bantam (*Gallus gallus*)
著 者 名： Kawada Masasi, Yanai Tokuma, Sakai Hiroki, Yoshida Kazunori, Yamazoe Kazuaki, Ishikawa Katsuyuki and Masegi Toshiaki
学術雑誌名： Avian Pathology

- 2) 題 目： Spontaneous vascular mineralization in the brain of horses
著 者 名： Yanai Tokuma, Masegi Toshiaki, Ishikawa Katsuyuki, Sakai Hiroki, Iwasaki Toshiro, Moritomo Yasuo and Goto Naoaki
学術雑誌名： Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年： 58 (1) 35-40, 1996
- 3) 題 目： Immunohistochemical demonstration of S-phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in cattle tissues
著 者 名： Yanai Tokuma, Matsumoto Chigusa, Takashima Hisayuki, Yoshida Kazunori, Sakai Hiroki, Isowa Kouichi, Iwasaki Toshiro, Sato Yasushi and Masegi Toshiaki
学術雑誌名： Journal of Comparative Pathology
卷・号・頁・発行年： 114 (3) 265-272, 1996
- 4) 題 目： Bilateral giant myelolipoma in the adrenal of a cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*)
著 者 名： Yanai Tokuma, Taniguchi Harunari, Sakai Hiroki, Yoshida Kazunori, Kimura Naoto, Katou Akira, Oishi Yuji and Masegi Toshiaki
学術雑誌名： Journal of Medical Primatology
卷・号・頁・発行年： 25 (4) 309-312, 1996
- 5) 題 目： Ameloblastoma with prominent ossification in the mandible of a dog
著 者 名： Sakai Hiroki, Yanai Tokuma, Yoshida Kazunori, Iwasaki Toshiro, Fujioka Hirofumi, Ota Jyoji, Isowa Kouichi and Masegi Toshiaki
学術雑誌名： Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年： 58 (11) 1113-1115, 1996
- 6) 題 目： Advanced gastric carcinoma in the a de Brazza's guenon (*Cercopithecus neglectus*)
著 者 名： Yanai Tokuma, Noda Ayako, Sakai Hiroki, Murata Kouichi, Hama Natsuki, Isowa Kouichi and Masegi Toshiaki
学術雑誌名： Journal of Medical Primatology
卷・号・頁・発行年： 26 (5) 257-259, 1997
- 7) 題 目： Neuropathological study of gazelle herpesvirus 1 (equine herpesvirus 9) infection in Thomson's gazelles (*Gazella thomsoni*)
著 者 名： Yanai Tokuma, Sakai Takako, Fukushi Hideto, Hirai Katsuya, Narita Minoru, Sakai Hiroki and Masegi Toshiaki
学術雑誌名： Journal of Comparative Pathology
卷・号・頁・発行年： 119 (2) 159-168, 1998
- 8) 題 目： Proliferative potential of canine oral epulides and malignant neoplasms assessed by bromodeoxyuridine labeling
著 者 名： Yoshida Kazunori, Yanai Tokuma, Iwasaki Toshiro, Sakai Hiroki, Ohta Jyoji, Kati Shingo, Ishikawa Katsuyuki, Andrew A. Lackner and Masegi Toshiaki
学術雑誌名： Veterinary Pathology
卷・号・頁・発行年： 36 (1) 35-41, 1999
- 9) 題 目： Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, 5 and 7 using the immunohistochemical staining
著 者 名： Takashima Hisayuki, Sakai Hiroki, Yanai Tokuma and Masegi Toshiaki

学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 61 (6) 713-716, 1999

- 10) 題 目 : Clinicopathological study of canine oral epulides
著 者 名 : Yoshida Kazunori, Yanai Tokuma, Iwasaki Toshiro, Sakai Hiroki, Ohta Jyoji, Kati Singo, Minami Takeo, Andrew A. Lackner and Masegi Toshiaki
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 61 (8) 897-902, 1999
- 11) 題 目 : p53 knockout mice (-/-) are more susceptible than (+/-) or (+/+) mice to *N*-methyl-*N*-nitrosourea stomach carcinogenesis
著 者 名 : Yamamoto Masami, Tsukamoto Tetsuya, Sakai Hiroki, Shirai Norimitsu, Ohgaki Hiroko, Furihata Chie, Lawrence A. Donehower, Yoshida Kenji and Tatetatsu Masae
学術雑誌名 : Carcinogenesis
巻・号・頁・発行年 : 21 (10) 1891-1897, 2000
- 12) 題 目 : Hexosaminidase-altered aberrant crypts, carrying decreased hexosaminidase α and β subunit mRNAs, in colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats
著 者 名 : Tsukamoto Tetsuya, Fukami Hiroko, Yamanaka Shoji, Yamaguchi Akira, Nakanishi Hayao, Sakai Hiroki, Aoki Ichiro and Tatetatsu Masae
学術雑誌名 : Japanese Journal of Cancer Research
巻・号・頁・発行年 : 92 (2) 109-118, 2001
- 13) 題 目 : Detection of antibodies against *pasteurella multocida* using immunohistochemical staining in an outbreak of rabbit pasteurellosis
著 者 名 : Takashima Hisayuki, Sakai Hiroki, Yanai Tokuma and Masegi Toshiaki
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 63 (2) 171-174, 2001
- 14) 題 目 : Expression of cyclin kinase inhibitor p27^{Kip1} in skin tumours of dogs
著 者 名 : Sakai Hiroki, Yamane Tomoko, Yanai Tokuma, Shirai Norimitsu and Masegi Toshiaki
学術雑誌名 : Journal of Comparative Pathology
巻・号・頁・発行年 : 125 (2/3) 153-158, 2001
- 15) 題 目 : Lingual calcinosis circumscripta in a captive sitatunga
著 者 名 : Yanai Tokuma, Noda Ayako, Kawakami Shigehisa, Sakai Hiroki, Andrew A. Lackner and Masegi Toshiaki
学術雑誌名 : Journal of Wildlife Diseases
巻・号・頁・発行年 : 37 (4) 813-815, 2001
- 16) 題 目 : Malignant melanoma of the palpebral conjunctiva in a captive fallow deer
著 者 名 : Sakai Hiroki, Yanai Tokuma, Kawakami Shigehisa and Masegi Toshiaki
学術雑誌名 : Journal of Wildlife Diseases
巻・号・頁・発行年 : 37 (4) 816-819, 2001