

氏名(本(国)籍)	中 村 英 明 (東京都)
推薦教員氏名	岐阜大学 教授 柳 井 徳 磨
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博乙第135号
学位授与年月日	平成26年9月24日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Studies on Experimental Approach for Evaluation about Efficacy and Safety of Antioxidants (抗酸化物質の有効性および安全性に関する実験的研究)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨 副査 帯広畜産大学 教 授 古 林 与志安 副査 岩 手 大 学 教 授 御 領 政 信 副査 東京農工大学 教 授 渋 谷 淳 副査 岐 阜 大 学 教 授 海 野 年 弘 副査 岐 阜 大 学 教 授 西 川 秋 佳

学位論文の内容の要旨

抗酸化物質は生体内、食品、工業原料などにおいて酸素が関与する反応を軽減もしくは除去する物質の総称である。抗酸化物質は、種々の植物、食品添加物に含まれることから、ヒトは様々な機会にそれを摂取している。病態モデルを用いた実験的解析や疫学調査などから、抗酸化物質の摂取により、様々な生体の障害が軽減されるという報告がなされている。抗酸化物質により軽減される生体の障害は、生体内の活性酸素種の増加により生じるとされている。一方、活性酸素群は、本来、エネルギー生産、侵入異物攻撃などに際して生体内で産生されるが、生体内に備わっている抗酸化システムでは消化しきれない過剰な活性酸素群が生じる場合、生体の構造や機能を担っている脂質、蛋白質や、遺伝情報を担う遺伝子DNAを酸化することで損傷を与え、そのことが様々な生体の障害を引き起こすとされている。現在のところ、抗酸化物質の評価系については、その妥当性を検証した研究は少なく、評価方法は定まっていない。

今回、機序の異なる3種の抗酸化物質の生体に対する影響を、それぞれ3つの異なる試験系に供し、抗酸化物質の成体に及ぼす影響について調べ、その評価系の有効および妥当性について検討した。

第1章では、食品添加物として使用されているビタミンEの一種である Tocotrienol に関して、F344 ラットを用いた混餌13週間投与試験を0, 0.19, 0.75, 3%の投与用量で実施した。その結果、3%投与群で体重増加の抑制、ヘマトクリットの低値、AST, ALT および γ -GTP 活性の高値、肝臓の相対重量の高値、卵巣および子宮の相対重量の低値、副腎皮質における cytoplasmic vacuolation の減少が認められた。0.75 および 3%投与群ではヘモグロビン濃度、MCV, MCH, MCHC, 血小板数の低値、肝細胞肥大が認められた。以上の結果か

ら、中および高用量群の肝臓の変化と血液学的変化を根拠に、NOAEL は低用量群の用量である 0.19%（雄で約 120 mg/kg/d, 雌で約 130 mg/kg/d）と結論した。Tocotrienol の 13 週間混餌試験の結果から、一般的な毒性試験の系は抗酸化剤の評価には不適當である場合がある。

第 2 章では、*N*-nitrosobis(2-oxopropyl amine) (BOP) のイニシエーションによるハムスター膵発癌モデルにおいて、イニシエーション後に Protocatechuic acid (PCA) を投与した際の発がんの化学的抑制の効果を調べた。PCA は野菜や果物に含まれていることが知られている単純な構造を有する phenolic acid の一種であり、発がんモデル（肝臓、大腸、口腔、胃、膀胱、皮膚）を用いた研究においてイニシエーション時もしくはイニシエーション後の投与により発がん抑制効果を示すことが報告されている抗酸化物質である。5 週齢の雌ハムスターを用い、20 mg/kg/bw の BOP を 2 回投与した動物に、BOP 投与後 PCA を 500 または 1000ppm 混餌投与し、PCA 投与 49 週後に膵発癌に対する影響を病理組織学的検索により調べた。対照群として BOP 単独投与群を設定し、その他に PCA 単独投与群および無処置群を設けた。その結果、BOP を投与した 3 群に関して膵臓腫瘍の発生率および 1 匹あたりの発生個数に統計学的に有意差は認められなかったが、腫瘍の大きさ（直径）が 3 cm を超過する腫瘍の数に関しては PCA の高用量群にて対照群（3 群）と統計学的に有意差が認められた。また、膵臓腫瘍の重篤化の指標と考えられる膵臓近傍の横隔膜、脾臓および胃への膵臓腫瘍の浸潤の発生率は PCA の高用量群で PCA の低用量群に比べ統計学的に有意に減少していた。以上の結果より、BOP 発がんモデルにおいて、PCA の摂取は膵癌が進行（大型化、多臓器への浸潤）の過程において抑制的に働く可能性が示唆された。酸化ストレスが大きく関与する病態では、BOP 膵発癌モデルなどの実験系は、酸化ストレスに対する抗酸化物質の抑制効果を調べるうえで有用であり、また、同試験系における過酸化脂質の組織染色は有用な手技であった。

第 3 章は抗寄生虫薬として、多くの生体異物により生じる肝毒性を抑え、げっ歯類を用いた化学発がんモデルにおいて発がん抑制作用を示すことが知られている Oltipraz を、銅の蓄積により重度の黄疸を伴う肝障害を発する LEC ラットに投与し、肝障害に対する影響を調べた。雄 6 週齢の LEC ラットを 2 グループに分け、一方は Oltipraz を 400ppm 混餌投与し、一方は通常の餌にて飼育した。それぞれのグループの動物を Oltipraz 投与後 10, 15 および 25 週のタイミングで解剖し検査に供した投与 25 週解剖時の個体について血液生化学的検査を実施した結果、Oltipraz 投与群において AsT, ALT, LDH, ALP, γ -GTP および Cu の増加が認められた。また、投与 18 週における肝臓および腎臓の GSH 濃度を測定したところ、Oltipraz 投与群で有意な増加を示した。病理組織学的には、どちらの群でも核の大型化を伴う肝細胞の大型化、局所的な肝細胞壊死、Kupffer 細胞の顆粒貪食の亢進および腎尿細管細胞の肥大が認められたが、これらの変化の重篤度は Oltipraz 投与群で高かった。以上の結果から、Oltipraz の投与は LEC ラットの spontaneous な肝障害を亢進させると結論した。LEC ラットを用いた系に関しては、抗酸化物質の投与により肝障害が促進されるという結果が認められたが、酸化ストレスの発生原因が Cu の蓄積という特殊な状況によるものであり、機序を考慮した更なる解析が必要になると考えられる。

以上のことから、抗酸化物質の生体への影響を調べるためには、それぞれの物質の特徴に適した評価系の設定が必須であると考えられる。

審査結果の要旨

病態モデルを用いた実験や抗酸化物質を含む食品を摂取した影響を調べた疫学調査等の

結果により、抗酸化物質を摂取することで様々な生体の障害が軽減されるという報告がある。抗酸化物質により軽減される生体の障害は、生体内の活性酸素種の増加により生じるとされている。今回、機序の異なる3種の抗酸化物質の生体に対する影響を、それぞれ3つの異なる試験系に供し、抗酸化物質の成体に及ぼす影響について調べ、その評価系の有効および妥当性について検討した。

第1章では、食品添加物として使用されているビタミンEの一種である Tocotrienol に関して、F344 ラットを用いた混餌 13 週間投与試験を 0, 0.19, 0.75, 3%の投与用量で実施したところ、3%投与群で体重増加の抑制、ヘマトクリットの低値、AST, ALT の高値、肝臓の相対重量の高値、卵巣および子宮の相対重量の低値、副腎皮質における cytoplasmic vacuolation の減少が認められた。0.75 および 3%投与群ではヘモグロビン濃度, MCV, MCH, MCHC, 血小板数の低値、肝細胞肥大が認められた。このことから、中および高用量群の肝臓の変化と血液学的変化を根拠に NOAEL は低用量群の用量である 0.19% (雄で約 120 mg/kg/d, 雌で約 130 mg/kg/d) と結論した。一般的な毒性試験の系は抗酸化物質の生体影響を調べる系として、不適当な場合があると考えられた。

第2章では、Procatechuic acid (PCA) のがん抑制効果を評価した。N-nitrosobis(2-oxopropyl amine) (BOP)のイニシエーションによるハムスター膀胱癌モデルにおいて、イニシエーション後に PCA を投与した際の発がんの化学的抑制の効果を調べた。試験は5週齢の雌ハムスターを用い、20 mg/kg bw の BOP を2回投与した動物に、BOP 投与後 PCA を 500 または 1000ppm 混餌投与し、PCA 投与49週後に膀胱癌に対する影響を病理組織学的に調べた。その結果、BOP を投与した3群に関して膀胱腫瘍の発生率および1匹あたりの発生個数に統計学的に有意差は認められなかったが、腫瘍の大きさ直径が直径3 cmを超える腫瘍の数に関しては PCA の高用量群にて対象群(3群)との間に有意差が認められた。また、膀胱腫瘍の重篤化の指標とされる膀胱近傍の横隔膜、脾臓、胃への膀胱腫瘍の浸潤の発生率は、PCA の高用量群で低用量群に比べ有意な減少がみられた。このことから、BOP 発がんモデルにおいて、PCA の摂取は膀胱癌が進行する過程に抑制的に働く可能性が示された。

第3章では、げっ歯類に発がん抑制作用を示すとされる抗寄生虫薬の Oltipraz を、銅の蓄積により重度の黄疸を伴う肝障害を発する LEC ラットに投与し、肝障害に対する影響を調べた。雄6週齢の LEC ラットを2グループに分け、一方は Oltipraz を 400ppm 混餌投与し、一方は通常の餌にて飼育した。それぞれのグループの動物を Oltipraz 投与後 10, 15 および 25 週で解剖したところ、25 週 Oltipraz 投与群に AsT, ALT, LDH, ALP, γ -GTP および Cu の増加が認められた。また、投与18週における肝臓および腎臓の GSH 濃度を測定したところ、Oltipraz 投与群で有意な増加を示した。組織学的には、どちらの群でも核の大型化を伴う肝細胞の大型化、局所的な肝細胞壊死、Kupffer 細胞の顆粒貪食の亢進および腎尿細管細胞の肥大が認められたが、Oltipraz 投与群でより重篤であった。以上のことから、Oltipraz 投与は LEC ラットの spontaneous な肝障害を亢進させると考えられた。LEC ラットを用いた系では、抗酸化物質の投与により肝障害の促進が認められたが、酸化ストレスの発生原因が Cu の蓄積という特殊な状況によるものであり、その機序を考慮した更なる解析が必要である。

抗酸化物質に関する3つの実験系の実験結果は、抗酸化物の有効性および毒性に関する基礎的なデータであり、化合物の安全性評価の質的向上に貢献するものと思われる。

以上について、審査委員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があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Inhibitory effects of protocatechuic acid on the post-initiation phase of hamster pancreatic carcinogenesis induced by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine
著 者 名 : Nakamura, H., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K-I., Miyauchi, M., Son, H-Y. and Hirose, M.
学術雑誌名 : Anticancer Research
巻・号・頁・発行年 : 20(5B):3423-3428, 2000
- 2) 題 目 : Oral toxicity of a tocotrienol preparation in rats
著 者 名 : Nakamura, H., Furukawa, F., Nishikawa, A., Miyauchi, M., Son, H-Y., Imazawa, T., and Hirose, M.
学術雑誌名 : Food and Chemical Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 39(8):799-805, 2001
- 3) 題 目 : Enhancing effects of oltipraz on the development of spontaneous hepatic lesions in LEC rats
著 者 名 : Nakamura, H., Okazaki, K., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K-I., Miyauchi, M., Imazawa, T., Uchida, K. and Hirose, M.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 30(2):173-177, 2002

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Promoting effects of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy -2(5*H*)-furanone on rat glandular stomach carcinogenesis initiated with *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine
著 者 名 : Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I-S., Kasahara, K-I., Tanakamaru, Z., Nakamura, H., Miyauchi, M., Kinase, N. and Hirose, M.
学術雑誌名 : Cancer Research
巻・号・頁・発行年 : 59(9):2045-2049, 1999
- 2) 題 目 : Influences of long-term administration of 24*R*, 25-dihydroxy vitamin D₃, a vitamin D₃ derivative, in rats
著 者 名 : Ikezaki, S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Tanakamaru, Z., Nakamura, H., Mori, H. and Hirose, M.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Science
巻・号・頁・発行年 : 24(2):133-139, 1999
- 3) 題 目 : Carcinogenic risk assessment of MeIQx and PhIP in a newborn mouse two-stage tumorigenesis assay

- 著 者 名 : Miyauchi, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K-I., Nakamura, H., Takahashi, M. and Hirose M.
- 学術雑誌名 : Cancer Letter
- 巻・号・頁・発行年 : 142(1):75-81, 1999
- 4) 題 目 : Failure of phenethyl isothiocyanate to inhibit hamster tumorigenesis induced by *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine when given during the post-initiation phase
- 著 者 名 : Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K-I., Tanakamaru, Z., Miyauchi, M., Nakamura, H., Ikeda, T., Imazawa, T. and Hirose, M.
- 学術雑誌名 : Cancer Letter
- 巻・号・頁・発行年 : 141(1-2):109-115, 1999
- 5) 題 目 : Inhibition by methionine of pancreatic carcinogenesis in hamsters after initiation with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine
- 著 者 名 : Furukawa, F., Nishikawa, A., Lee, I-S., Son, H-Y., Nakamura, H., Miyauchi, M., Takahashi, M. and Hirose, M.
- 学術雑誌名 : Cancer Letter
- 巻・号・頁・発行年 : 152 (2) :163-167, 2000
- 6) 題 目 : Organ-dependent modifying effects of oltipraz on *N*-nitrosobis (2-oxopropyl)amine (BOP)-initiation of tumorigenesis in hamsters
- 著 者 名 : Son, H-Y., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K-I., Miyauchi, M., Nakamura, H., Ikeda. T. and Hirose, M.
- 学術雑誌名 : Cancer Letter
- 巻・号・頁・発行年 : 153 (1-2) : 211-218, 2000
- 7) 題 目 : Concurrent administration of fish meal and sodium nitrite does not promote renal carcinogenesis in rats after initiation with *N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine
- 著 者 名 : Furukawa, F., Nishikawa, A., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H-Y., Yamagishi, M. and Hirose, M.
- 学術雑誌名 : Cancer Letter
- 巻・号・頁・発行年 : 154 (1) : 45-51, 2000
- 8) 題 目 : Effects of octreotide, a somatostatin analogue, on initiation of pancreatic carcinogenesis in hamsters with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine
- 著 者 名 : Furukawa, F., Nishikawa, A., Nakamura, H., Miyauchi, M., Son, H-Y. and Hirose, M.
- 学術雑誌名 : Cancer Letter

卷・号・頁・発行年： 159 (1) : 43-48, 2000

- 9) 題 目： Modifying effects of 4-phenylbutyl isothiocyanate on *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced tumorigenesis in hamsters
著 者 名： Son, H-Y., Nishikawa, A., Furukawa, F., Lee, I-S., Ikeda, T., Miyauchi, M., Nakamura, H. and Hirose, M.
学術雑誌名： Cancer Letter
卷・号・頁・発行年： 160 (2) : 141-147, 2000
- 10) 題 目： Involvement of lipid peroxidation in spontaneous pancreatitis in WBN/Kob rats
著 者 名： Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H-Y., Uchida, K. and Hirose, M.
学術雑誌名： Pancreas
卷・号・頁・発行年： 22 (4) : 427-430, 2001
- 11) 題 目： Reporter gene transgenic mice as a tool for analyzing the molecular mechanisms underlying experimental carcinogenesis
著 者 名： Nishikawa, A., Suzuki, T., Masumura, K., Furukawa, F., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H-Y., Nohmi, T., Hayashi, M. and Hirose, M.
学術雑誌名： Journal of Experimental & Clinical Cancer Research
卷・号・頁・発行年： 20 (1) : 111-115, 2001
- 12) 題 目： Chemopreventive effects of curcumin on glandular stomach carcinogenesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and sodium chloride in rats
著 者 名： Ikezaki, S., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kudo, K., Nakamura, H., Tamura, K. and Mori, H.
学術雑誌名： Anticancer Research
卷・号・頁・発行年： 21 (5) : 3407-3011, 2001
- 13) 題 目： A repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals
著 者 名： Okazaki, K., Okazaki, S., Nishimura, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Nakamura, A., Tsuda, T., Katsumata, T., Nishikawa, A. and Hirose, M.
学術雑誌名： Archives of Toxicology
卷・号・頁・発行年： 75 (9) : 513-521, 2001
- 14) 題 目： A repeated 28-day oral dose toxicity study of 17 α - methyltestosterone in rats, based on the 'Enhanced OECD

- Test Guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals
- 著者名: Okazaki, K., Imazawa, T., Nakamura, H., Furukawa, F., Nishikawa, A. and Hirose, M.
- 学術雑誌名: Archives of Toxicology
- 巻・号・頁・発行年: 75 (11-12) : 635-642, 2002
- 15) 題目: Promoting effects of combined antioxidant and sodium nitrite treatment on forestomach carcinogenesis in rats after initiation with *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine
- 著者名: Miyauchi, M., Nakamura, H., Furukawa, F., Son, H-Y., Nishikawa, A. and Hirose, M.
- 学術雑誌名: Cancer Letter
- 巻・号・頁・発行年: 178 (1) : 19-24, 2002
- 16) 題目: A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals
- 著者名: Okazaki, K., Okazaki, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Wakabayashi, S., Tsuda, T., Katsumata, T., Nishikawa, A. and Hirose, M.
- 学術雑誌名: Archives of Toxicology
- 巻・号・頁・発行年: 76 (10) : 553-559, 2002
- 17) 題目: Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis in vitro, and in vivo mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats
- 著者名: Yamagishi, M., Natsume, M., Osakabe, N., Nakamura, H., Furukawa, F., Imazawa, T., Nishikawa, A. and Hirose, M.
- 学術雑誌名: Cancer Letter
- 巻・号・頁・発行年: 185 (2) : 123-130, 2002
- 18) 題目: Simultaneous treatment with benzyl isothiocyanate, a strong bladder promoter, inhibits rat urinary bladder carcinogenesis by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine
- 著者名: Okazaki, K., Yamagishi, M., Son, H-Y., Imazawa, T., Furukawa, F., Nakamura, H., Nishikawa, A., Masegi, T. and Hirose, M.
- 学術雑誌名: Nutrition and Cancer
- 巻・号・頁・発行年: 42 (2) : 211-216, 2002
- 19) 題目: A subchronic toxicity study of shea nut color in Wistar rats
- 著者名: Kitamura, Y., Nishikawa, A., Furukawa, F., Nakamura, H.,

Okazaki, K., Umemura, T., Imazawa, T. and Hirose, M.
学術雑誌名 : Food and Chemical Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 41 (11) : 1537-1542, 2003

- 20) 題 目 : Effects of *N*-acetylcysteine, quercetin, and phytic acid on spontaneous hepatic and renal lesions in LEC rats
著 者 名 : Kitamura, Y., Nishikawa, A., Nakamura, H., Furukawa, F., Imazawa, T., Umemura, T., Uchida, K. and Hirose, M.
学術雑誌名 : Toxicological Pathology
巻・号・頁・発行年 : 33 (5) : 584-592, 2005
- 21) 題 目 : Comparison of the physiological and morphological effects of cigarette smoke exposure at comparable weekly doses on Sprague-Dawley rats
著 者 名 : Tsuji, H., Lee, K-M., Yoshino, K., Nakamura, H., Lulham, G., Renne, R. and Yoshimura, H.
学術雑誌名 : Inhalation Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 23 (1) : 17-32, 2011