

新規に認められた含窒素芳香族異項環化合物  
aminophenylnorharman の発がん性に関する  
実験腫瘍病理学的研究

学位論文：博士(獣医学) 甲 178

飯 高 健

## 目次

|  |     |
|--|-----|
| 序文   | 1   |
| 第一章 イニシエーション作用に基づいたラット肝臓中期発がん性試験 ( <i>In vivo</i> five-week initiation assay) を用いた aminophenylnorharman の発がん性の解明 |     |
| 緒言   | 10  |
| 実験材料および実験方法  | 12  |
| 実験結果   | 15  |
| 考察   | 17  |
| 要約   | 21  |
| 第二章 p53 ノックアウトマウスを用いた aminophenylnorharman の発がん性解明   |     |
| 緒言   | 29  |
| 実験材料および実験方法  | 32  |
| 実験結果   | 37  |
| 考察   | 42  |
| 要約   | 47  |
| 第三章 Aminophenylnorharman のマウス肝臓におけるチトクローム p450 の誘導と発がん性の関連性の解明   |     |
| 緒言   | 66  |
| 実験材料および実験方法  | 69  |
| 実験結果   | 75  |
| 考察   | 79  |
| 要約   | 84  |
| 結論   | 97  |
| 謝辞   | 101 |
| 参考文献   | 102 |
| 要旨   | 126 |
| 英文要旨   | 129 |

## 【序文】

環境中の人工的に生成される、あるいは、自然界で生成される化学物質の  
人に対する発がん性が指摘されてきた(3, 62, 68, 98)。化学物質の発がん性は、そ  
の物質に対する暴露量と生体側の要因との相互作用と考えられている。十分な  
観察に基づく科学的な記載は、1775年のPott (80) による煙突掃除人夫における  
陰嚢皮膚癌の多発に関する報告が最初とされている。その後、1858年、Virchow  
(4) により刺激説が発表された。これは、十分な実験事実に基づく提唱ではない  
が、がん発生の原因考察に1つの方向性を示し、実験の作業仮説を設定するこ  
ととなった。この作業仮説に基づき、化学物質ががんを発生させることを実験  
的に最初に実証したのは、ウサギの耳にコールタールを反復塗布することによ  
り、がんの発生を確認した山極と市川 (80) の報告である。その後、1, 2, 5,  
6-dibenzanthracene がKennawayおよびHieger (80)により、3,4-benzpyrene がHieger,  
Cook および Hewett (9)により、コールタール中に含まれる発がん性主成分とし  
て示された。以降、化学物質の発がん性研究は活発になり、人工的に合成また  
は自然界に存在する発がん物質の同定、単離が行われ、実験的に化学発がん物  
質は、経皮的、経口的および静脈内または腹腔内に投与すると生体のほとんど  
全臓器にそれぞれの物質による標的性をもってがんを発生させることが判明し、

発がん因子としての化学物質の重要性が注目されるようになった。

発がんに関与する化学物質は、環境中の人工的に生成、あるいは、自然界で生成される外因性物質とヒトの生体内である条件下で合成される内因性物質に大別される。

外因性物質の多くは遺伝子障害性で突然変異原性を示し、DNA を化学的に修飾する。化学物質自体で核酸の修飾可能な化学反応性を示す直接的発がん物質 (direct carcinogen) と生体内で代謝を受けて初めて核酸修飾能を獲得する発がん前駆物質 (pro-carcinogen) に分けられる。直接的発がん物質は求電子的反応性を有しており核酸や蛋白中の求核センター (核酸中の塩基やメチオニン、チロシンなどのアミノ酸) と反応する。実験的発がんによく用いられる N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) や N-methyl-N-nitrosourea (MNU) などは直接発がん物質で、原則的に直接、接した部位に発がん性を示す。一方、環境中に存在する発がん物質の多くは、発がん前駆物質であり、化学構造に基づき、多環式芳香族炭化水素類、芳香族アミンおよび関連ニトロ化合物に分類されている。多環式芳香族炭化水素類には不完全燃焼により生ずる「すす」や煙に含まれる benzo[a]pyrene (BP) や benzo[a]anthracene (BA) , 芳香族アミンおよび関連ニトロ化合物には、肉や魚などの蛋白質を多く含む食品を加熱調理時にアミノ酸の加熱分解によって生じ、特にその焦げの部分に多く含まれる含窒

素芳香族異項環化合物 (heterocyclic amine) や diethylnitrosamine が含まれる。

一般的にタバコの煙は、ヒトの発がんの主な原因として考えられてきた (15)。実際にタバコ煙中には、さまざまなタイプの発がん物質、すなわち polycyclic aromatic hydrocarbon, N-nitrosamine 等が含まれている(42)。Sugimura ら (88) は、食品の調理で生じる煙にもタバコの煙と同様に何らかの発がんに関連する物質が含まれる可能性があるとして予測した。そこで、グラスファイバー製のフィルターに焼き魚を調理するときが発生する煙を吸着させて採取したところ、polycyclic aromatic hydrocarbon とは明らかに違う benzo[a]pyrene より高い変異原性を有する化学物質が抽出された。また、これらの煙の発生源である焼肉や焼き魚の焦げからも煙と同様に高い変異原性を示す化学物質が発見された (89)。これらの化学物質は heterocyclic amines (HCAs) と呼ばれ、肉や魚などの蛋白質を多く含む食品を加熱調理した時、アミノ酸の加熱分解産物から形成されると考えられた(55)。その後の研究で、実際にアミノ酸の加熱分解産物、すなわちトリプトファンの加熱分解産物から 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-1) と 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) (87) が、グルタミン酸の加熱分解産物から 2-Amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1) と 2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-2) (111)が、大豆グロブリンの加熱分解産物から

2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (A $\alpha$ C)と 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeA $\alpha$ C) (113)が *Salmonella* (*S.*) Typhimurium TA98 に対し変異原性を誘発する物質としてそれぞれ単離され、構造決定された。現在までに約 21 種の HCAs が見いだされている。

焼き魚、焼肉の焦げから単離された HCAs は当初 *S.* Typhimurium TA98 に対して弱い変異原性を示すか、全く変異原性を示さないとされた。しかし、polychlorinated biphenyls (PCB) を投与したラットの肝臓から得た S9 mix で処理すると *S.* Typhimurium TA98 に対し変異原性が認められた。HCAs は PCB 投与によりラット肝臓で誘導された cytochrome P450 (CYP) により代謝活性化されたと考えられた。Ishii ら(43)は PCB, 3-methylcholanthrene および phenobarbital を投与したラットの肝臓より得られた肝マイクロソームで Trp-P-1 および Trp-P-2 を代謝活性化させた。ほとんどの HCAs は CYP1A2 に代謝活性化されることにより N-水酸化が観察され、一部の HCAs では CYP1A1 あるいは他のアイソザイムによる触媒作用で活性化されることが見出された(1)。これまでに加熱調理食品あるいはアミノ酸などの加熱分解産物の中から、*S.* Typhimurium TA98 に対し変異原性を誘発する物質として約 20 種類以上の HCAs が単離、構造決定された(55)。これらの物質のうちラットおよびマウスを用いて発がん性試験を実施した 10 種類の HCAs の全てに発がん性が確認された (Table 1) (86)。ほとんどの HCAs

は肝臓に対する発がん性を有し、他にも小腸、大腸、乳腺、ジンバル腺、陰核腺等の多彩な器官・組織に対しても発がん性が認められた。また、PhIP を混餌経口投与したところマウスには高頻度にリンパ腫が発生したのに対し(20)、同様に PhIP を F344 ラットに投与したところ、雄では結腸癌、雌では乳腺癌が主に観察され(44)、動物種や性差によって標的となる器官が異なることも明らかになった。Adamson ら(1)は、IQ 20 mg/kg を週 5 日間の経口投与、平均 44 ヶ月間投与し、カニクイザルに肝細胞癌を発生させた。この腫瘍の発生は、Aflatoxin B<sub>1</sub> に比較して、短い潜伏期間で高頻度の発生率であった。HCAs の発がん作用には S9 mix による代謝活性化が必要であるが、ラット、ヒトあるいはサルから得られた S9 mix はそれぞれ同様に HCAs を代謝活性化することが可能であった。しかし、HCAs の発がん性に動物種による差、臓器特異性、性差が認められる。これらは個々の HCAs の薬力学的特徴や最終的な代謝経路に関連すると考えられた。

このように環境中には、タバコの煙、調理食品に含まれる物質を含め、変異原性や発がん性を示す物質が多く存在する。これらの物質の多くは、ごく微量にしか在しないが、組み合わせによって大きな発がんリスクを生じる可能性も考えられる。現実的にはヒトの日常生活において、これら変異原性物質あるいは発がん性物質の暴露を完全に避けることは不可能であるため、これら物質

について、ヒトの発がんに関連する有害性の評価、変異原性／発がん性の特性の把握が重要な課題である(84)。

Norharman (9H-pyrido[3,4-b]indole)は、L-tryptophan の熱分解産物であり(87), S9 mix の存在に関わらず *S. Typhimurium* TA98 株に対し変異原性を示さない。しかし、非変異原性芳香族アミンである aniline や o-toluidine と共存させ、S9 mix による代謝活性系により代謝されることにより、*S. Typhimurium* TA98 および *S. Typhimurium* YG1024 株 に対し変異原性を示すようになる(61, 63, 64)。これは、norharman と非変異原性芳香族アミンである aniline あるいは o-toluidine の共存下で、S9 mix による代謝活性系による代謝を経て両者の複合体である新規 HCAs 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (Aminophenylnorharman, APNH) が生成され (Figure 1), その後の反応によって生じた APNH はひき続き hydroxyamino derivative (誘導体) に転換され、*S. Typhimurium* TA98 および YG1024 に遺伝子変異を誘発する DNA 付加体を生じさせることで、変異原性を発現する(99)。このような点から norharman は co-mutagen といわれている。APNH の遺伝子変異の強度は、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) および 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-2)に匹敵する(101)。

Norharman は、タバコの煙、調理食品中など広く環境中に存在する(24)。

タバコの煙中の Norharman は、紙巻タバコ 1 本あたり 900~4240 ng 含まれており、タバコの主流煙、副流煙とも既知の変異原性/発がん性物質である HCAs の 100 倍量の norharman を含んでいることが報告されている(102)。普通の食事を摂取している健康なヒトの尿中にも、非経口的な栄養補給を受けている患者の尿中にも常に norharman は存在している(109)。同様に aniline は、タバコの煙中に紙巻タバコ 1 本あたり 0.1~18.1 µg の割合で (60)、また、数種の果物では 0.1~30.9 mg/kg の割合で、また、野菜中にも存在する(41)。さらに、aniline はヒトの尿中および乳汁中にも検出されている(5, 12)。これらのことから、ヒトは日常的に norharman と aniline の両方に暴露されていると考えられ、新規に発見された HCAs である APNH にヒトは日常的に暴露されている可能性は否定できない。そのため実験動物モデルを用いて APNH の発がん性の詳細なデータが必要と考えられる。

本研究において、APNH の発がん性を検索するにあたり、第一章で APNH のイニシエーション活性を中期発がん性試験 (*in vivo* five week initiation assay 法) で検討した。第二章で APNH の標的臓器と発がんメカニズムへの p53 発がん抑制遺伝子の関連を検索するために、p53 ノックアウトマウスを用いた発がん性試験を行った。さらに第三章では、マウス肝臓での APNH の代謝に関わる酵素誘導と発がん性との関連を検討した。

**Table 1 Chemical names, Abbreviations, Source and Carcinogenicity to Rodents**

| Heterocyclic amine   | Abb.            | Species | Dose  | Site(s) tumor occurred  |
|--|-----------------|---------|-------|---|
| 3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i> ]-indole     | Trp-P-1         | Rat     | 0.015 | Liver   |
|  |                 | Mouse   | 0.02  | Liver   |
| 3-Amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i> ]-indole         | Trp-P-2         | Rat     | 0.01  | Liver   |
|  |                 | Mouse   | 0.02  | Liver   |
| 2-Amino-6-methyldipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazole | Glu-P-1         | Rat     | 0.05  | Liver, small and large intestine,<br>Zymbal gland, clitoral gland       |
|  |                 | Mouse   | 0.05  | Liver, blood vessels  |
| 2-Aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazole          | Glu-P-2         | Rat     | 0.05  | Liver, small and large intestine,<br>Zymbal gland                       |
|  |                 | Mouse   | 0.05  | Liver, blood vessel   |
|  |                 | Mouse   | 0.08  | Liver, blood vessel   |
| 2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ]indole                   | A $\alpha$ C    | Mouse   | 0.08  | Liver, blood vessel   |
| 2-Amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ]indole          | Me A $\alpha$ C | Mouse   | 0.08  | Liver, blood vessel   |
| 2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoline                   | IQ              | Rat     | 0.03  | Liver, skin, small and large intestine,<br>Zymbal gland, clitoral gland |
|  |                 | Mouse   | 0.03  | Liver lung, forestomach   |
|  |                 | Rat     | 0.03  | Large intestine, oral cavity,<br>mammary gland, Zymbal gland, skin      |
| 2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoline               | MeIQ            | Mouse   | 0.01  | Liver, forestomach  |
|  |                 | Rat     | 0.04  | Liver, skin, clitoral gland, Zymbal gland                               |
| 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline             | 8-MeIQx         | Mouse   | 0.06  | Liver, lung, hematopoietic system                                       |
|  |                 | Rat     | 0.04  | Colon, breast   |
| 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine           | PhIP            | Rat     | 0.04  | Colon, breast   |
|  |                 | Mouse   | 0.04  | Lymphoid tissue   |

## 第一章

イニシエーション作用に基づいたラット肝臓中期発がん性試験 (*In vivo*  
five-week initiation assay) を用いた aminophenylnorharman の発がん性の解明

## 【緒言】

発がんにいたる過程は、イニシエーション、プロモーションおよびプログレッションの多段階のプロセスを必要とし(75), 中でもイニシエーション過程は多段階発がんプロセスの最初の重要な鍵となる。したがって、新規化合物の有するイニシエーション活性の量的な性質を分析することは、その新規化合物の発がん性を評価するにあたって、非常に重要な意義をもつ(26)。Ames 法に代表される短期 *in vitro* 変異原性試験と長期がん原性試験のそれぞれの欠点を補うことを目的に開発された *in vivo* five-week initiation assay system は、ラットを用い、2/3 肝部分切除により肝細胞増殖活性を誘導し、誘発された肝細胞増殖期にイニシエーターとして検索対象である化合物がラットに一回経口投与される(74)。その 2 週間後、強力な前癌病変形成促進として、2 - acetylaminofluorene (2-AAF) の投与を 2 週間行い、その間、細胞増殖を刺激する目的で四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) を投与する。イニシエーションが成立していれば、5 週間で前癌病変と考えられる胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性肝細胞巣が形成される。本法は、既知の 26 種類の化学物質において長期癌原性試験との相関性が検討され、*in vivo* で短期間に発がん性が評価できる試験系として開発が進んでいる(75)。ま

た、本検索法では、肝臓を標的としない物質の検索が可能であり、変異原性物質であれば、発がん性変異物質と非発がん性変異物質との識別が可能である(45, 46, 75, 94, 105)。

今回、新たに発見された変異原性ヘテロサイクリックアミンである APNH に対してラット肝臓における GST-P 陽性肝細胞巢の誘導をエンドポイントとした *in vivo* five-week initiation assay (92, 93, 95, 105)を適用し、その発がん性について検討した。

## 【実験材料および実験方法】

### 1. 供試動物

雄 F344 ラットを日本チャールス・リバー社 (Atsugi, Japan) より 6 週齢で購入し、1 週間の馴化の後実験に用いた。動物はプラスチックケージにそれぞれ 5 匹ずつ飼育し、室温は  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 60%、照明は 12 時間に維持した。飼料はオリエンタル酵母工学 (Tokyo, Japan) 社製の NME を、水は水道水をそれぞれ自由摂取させた。床敷きは木製チップを用い 1 週間ごとに交換した。実験開始時の体重は、190–200 g であった。

### 2. 試薬

APNH は S9 mix 存在下で、norharman と aniline より生成した。Norharman HCl (Katsura, Chemical, Tokyo, Japan) 40mg と aniline HCl (Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan) 20 mg を蒸留水 20 ml に溶解し、polychlorinated biphenyls (Kanechlor-500) を投与した雄 Sprague-Dawley ラットの肝臓より抽出した S9 mix 10 ml と混合し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 20 分間インキュベートした。冷却アセトニトリル 30 ml を反応液に加えた後、10,000 回転/分  $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離した。真空下で沈殿物を

除去し、50%エタノール2 ml に溶解後、高速液体クロマトグラフィー (HP1100 HPLC system, Agilent USA) にて以下の方法で分離した。HPLC カラムは TSKgel ODS-120A column (10  $\mu$ m particle size, 7.8 x 300 mm; Tosoh, Tokyo, Japan) を使用し、移動相にはアセトニトリルおよび 25mM リン酸緩衝液(pH 2.0)のの混合液を用いた。試料を添加し、アセトニトリル濃度を 30 分まで 15%で保持後、30-60 分までは 15 から 50%、その後 70 分まで 10 分間保持する勾配溶離法にて溶出した。流速は 2 ml/分とした(99)。

四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。

2-acetylaminofluorene (2-AAF)を 0.015% (w/w) 混入した飼料は、オリエンタル酵母より購入した。

### 3. 実験方法

実験プロトコールを Figure 2 に示した。F344 ラット各 15 匹を Groups 1 – 3 に、各 10 匹を Groups 4 および 5 に分けた。全てのラットにジエチルエーテル麻酔を施し、腹部を正中線で切開、肝臓を露出した。肝臓中間葉および左葉の起始部を絹糸で結紮し、切除した。Groups 1 – 3 については肝部分切除 12 および 30 時間後に 2 回 APNH 10, 3 および 1 mg/kg b.w.を経口投与した。投与用量は Kawamori ら(51)の報告に基づいて設定した。検索対象物質である APNH の投与

時点は、Sakai ら(74)の報告をもとに、代謝活性化を考慮し、肝部分切除後細胞増殖が最も高くなる時間のやや前の時間に設定した。APNH 投与後、基礎飼料を2週間与え、肝部分切除3週目より2-AAFを0.015%混入した飼料を2週間与えた。0.015%2-AAFの混餌投与中、すなわち肝部分切除後3週間目に $\text{CCl}_4$  (0.8 ml/kg b.w.)を単回経口投与した。同時に肝部分切除を行った他の2群 (Groups 4 および5の各10例)は陰性対照群とした。対照群2群のうち、Group 4は肝部分切除後、Group 1と同様にAPNH 10 mg/kg b.w.を経口投与し、2-AAFおよび $\text{CCl}_4$ 経口投与処置は行わなかった。Group 5は肝部分切除のみ施し、他の処置は行わなかった。肝部分切除5週間後、全例を安楽殺後、肝臓を採取した。肝臓は切り出しを行った後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、GST-P陽性巣検索のための免疫組織化学染色に供した。

#### 4. 免疫組織化学

Constan ら(8)の方法に従い、抗GST-P IgG抗体 (MBL, Nagoya, Japan)を用い、Avidin-biotin complex (ABC)法(38)にて染色した。肝臓組織切片単位面積あたりの直径0.1mm以上のGST-P陽性肝細胞巣について数と面積を測定した(93, 95, 105)。測定値の統計解析は、一元配置の分散分析 (ANOVA)と多重比較検定 (Dunnett法)により行った。

## 【実験結果】

### 1. 肝臓単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の面積

APNH 非投与群 (Group 5) を除く各群ラットの肝臓において GST-P 陽性肝細胞巢の発現が認められた。GST-P は肝細胞の核および細胞質に認められた (Figure 3)。

肝臓単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の面積を Figure 4 に示した。対照群である Group 5 の単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の面積は、 $0.22 \pm 0.20$  (平均値 $\pm$ 標準偏差)  $\text{mm}^2/\text{cm}^2$  であった。Group 1 (10 mg/kg), Group 2 (3 mg/kg) および Group 3 の単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の面積は、それぞれ  $3.43 \pm 1.38 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$ ,  $2.18 \pm 1.41 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  (1 mg/kg) および  $0.94 \pm 0.51 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  であり、用量相関性に有意な増加を示した。また、APNH 10mg/kgb.w.投与後 2-AAF および  $\text{CCl}_4$  の処置は行わなかった Group 4 の単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の面積は  $0.59 \pm 0.31 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  で、対照群と比較して有意な増加を示した。

### 2. 肝臓単位面積あたりの GST-P 陽性巢の発生数

肝臓単位面積あたりの GST-P 陽性巢数を Figure 5 に示した。対照群である Group 5 の単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の数は、 $2.67 \pm 1.27 \text{ foci}/\text{cm}^2$  であ

った。投与群では, Group 1 (10mg/kg), Group 2 (3mg/kg)および Group 3 (1mg/kg)の単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の数は,それぞれ  $19.34 \pm 7.20$ ,  $22.75 \pm 8.16$  および  $13.61 \pm 4.92$  /cm<sup>2</sup> であり, 対照群に比較して有意な増加が認められた。

APNH 10mg/kg b.w.投与後に 2-AAF および CCl<sub>4</sub>処置を行わなかった Group 4 における単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢数は,  $3.43 \pm 1.38$  /cm<sup>2</sup> で増加傾向を示したが, 統計学的に APNH 非投与群の Group 5 との間には有意差が認められなかった。単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の数は, Group 2 (3mg/kg), Group 3 (1mg/kg) に用量相関性の増加を示したが, 最高用量の Group 1 (10mg/kg) は Group 2 との間には有意差を示さなかった。

## 【考察】

APNH は norharman と aniline の共存下でヒト肝臓ミクロソーム分画による代謝反応により生じる両者の複合体として、最初に発見された (50)。Norharman および aniline は、タバコ煙、加熱食品や野菜などに含まれ、ヒトの生活環境に広く分布しており(100)、人体は norharman および aniline に日常的、継続的に暴露され、APNH が人体で生成されていると考えられる(27, 60, 102)。そのため APNH の発がん性についての研究は重要な意味をもつと考えられる。

*In vivo* five-week initiation assay は、変異原性と発がん性を有する遺伝毒性発がん物質の場合、GST-P 陽性肝細胞巢を誘導するが、quercetin や 6-hydroxyquinoline のような変異原性陽性であるが発がん性を有しない物質では GST-P 陽性肝細胞巢を誘導しない。GST-P 陽性肝細胞がイニシエーションの成立した細胞であることは、*in vivo* および *in vitro* の実験により明らかになっており、以上のことを踏まえると、変異原性と発がん性、特にイニシエーション活性とは、非常に酷似した現象であるが、全く同一ではないと考えられる。したがって、*In vivo* five-week initiation assay は、変異原性物質の発がん性、厳密にはイニシエーション活性が検出できる検索法である。また、肝臓を標的とした、変異原性肝発癌物質だけでなく benzo(a)pyrene や 4-nitroquinoline 1-oxide のような変異原

性陽性非肝発がん物質のイニシエーション活性を検索でき、一方、uracil, butylated hydroxyanisole および catechol のような発癌物質であっても変異原性陰性物質においては GST-P 陽性巢を誘導しない(75)。すなわち、変異原性陽性物質のうち、標的臓器にかかわらず発癌性が認められた物質のみが本検索法で陽性所見を示す(91)。

イニシエーションが成立するためには、細胞増殖による遺伝子変化の固定が必要である。また、多くの発がん性物質は、生体内で代謝を受けて発がん性を獲得する間接型発癌物質のため、代謝活性化もイニシエーション成立に影響を及ぼす (76)。*In vivo five-week initiation assay* では、肝細胞増殖刺激として2/3 肝部分切除を用いているが、肝部分切除後は細胞増殖の増減が著しく、化学物質の投与タイミングが細胞増殖の高い時期とずれると偽陰性を生じる恐れがある (46, 95)。一般にラットにおける肝部分切除後では、18-24 時間後に DNA 合成の最初のピークが起きる(54, 77)。続いて一度、増殖活性が低下した後、最初の細胞増殖に比較して弱くなるが、36 時間後に次の細胞増殖が高まる (2, 74)。*In vivo five-week initiation assay* において、1, 2-dimethylhydrazine を肝部分切除 12 および 30 時間後に投与することによって GST-P 陽性巢はより強く誘導されことが報告されている (2, 74)。細胞増殖活性のピークと GST-P 陽性肝細胞巢の誘導には時間差が存在するが、これは 1, 2-dimethylhydrazine の代謝活性化によると

考えられる(26, 76, 93)。以上のことから、本研究では、代謝活性化のために必要な時間、また、複数回投与による加算効果を利用したイニシエーション活性検出感度上昇を考慮し、肝部分切除 12 および 30 時間後に 2 回の APNH の経口投与を設定した。また、肝細胞増殖期の低用量の複数回投与は、同時期に複数回投与の合計投与量を 1 回で投与した場合と同等の効果を有し、イニシエーション活性を検索するにあたって、低用量複数回投与は肝部分切除処置後のラットに対する検索対象とする化学物質の毒性を軽減できることから、同用量の単回投与に比較して優れていることが報告されている(74)。

チトクローム P450 (CYP) 1, 2 および 3 は、肝臓において発がん性物質の代謝に最も深く関与すると報告されており(50, 54)、発癌物質は活性化過程に、多くの場合 CYP での複合的な酸化システムによる代謝活性化が必要である(2)。ヘテロサイクリックアミンに対する動物の発癌感受性は、発癌過程のイニシエーション初期段階における CYP1A2 の活性と誘導によく相関することから、CYP1A2 が代謝活性化に関与することが示唆されている(34)。一方で、ラット肝臓における CYP1A2, 2E および 3A の蛋白レベルは、肝部分切除前と後でほとんど変化しないことが報告されている (103)、したがって、肝臓におけるヘテロサイクリックアミンの代謝活性化の観点から、*in vivo* five-weeks initiation assay は、ヘテロサイクリックアミンの発がん性検出にも適していると考えられる。

ラットに肝部分切除処置を施し、12時間後および30時間後に10, 3あるいは1mg/kgのAPNHを経口投与したところ、GST-P陽性巢誘導が投与用量相関性に認められたが、さらにAPNH投与後、プロモーション処置としての2-AAFの混餌投与およびCCl<sub>4</sub>投与を行わなかった群（Group 4）においても、APNH非投与群（Group 5）に対してGST-P陽性巢が有意に誘導された。これは、4週間のAPNH混餌経口投与（50, 20および10 ppm）により、F344雄ラットの肝臓にGST-P陽性巢が誘導されたとの報告(51)と一致しており、APNHが肝臓を標的とした発がん性物質であることが強く示唆された(39)。

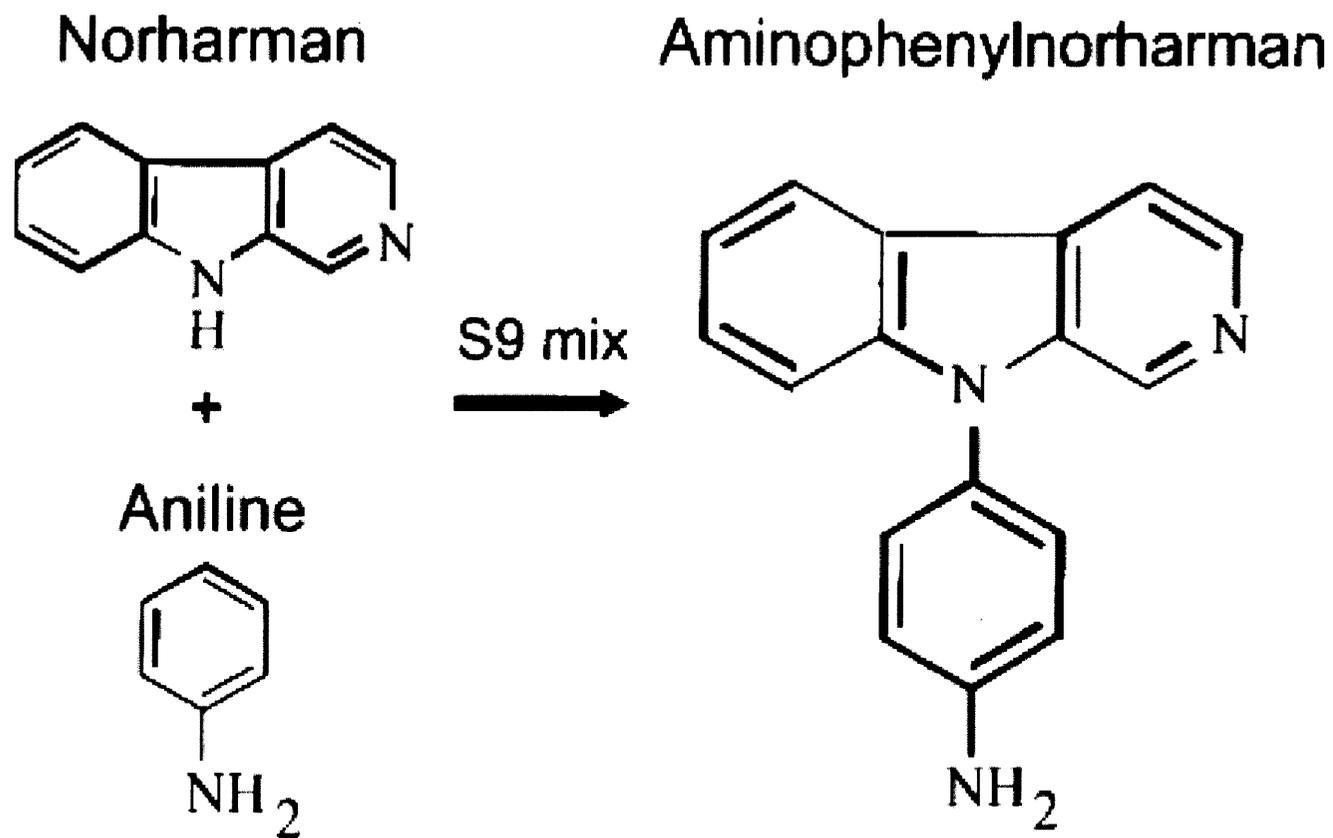
## 【要約】

新規に認められたヘテロサイクリックアミン, APNH について, イニシエーション作用検出のためのラット肝臓を用いた中期癌原性試験 (*in vivo* five-week initiation assay) により発がんイニシエーション活性の検索を行った。

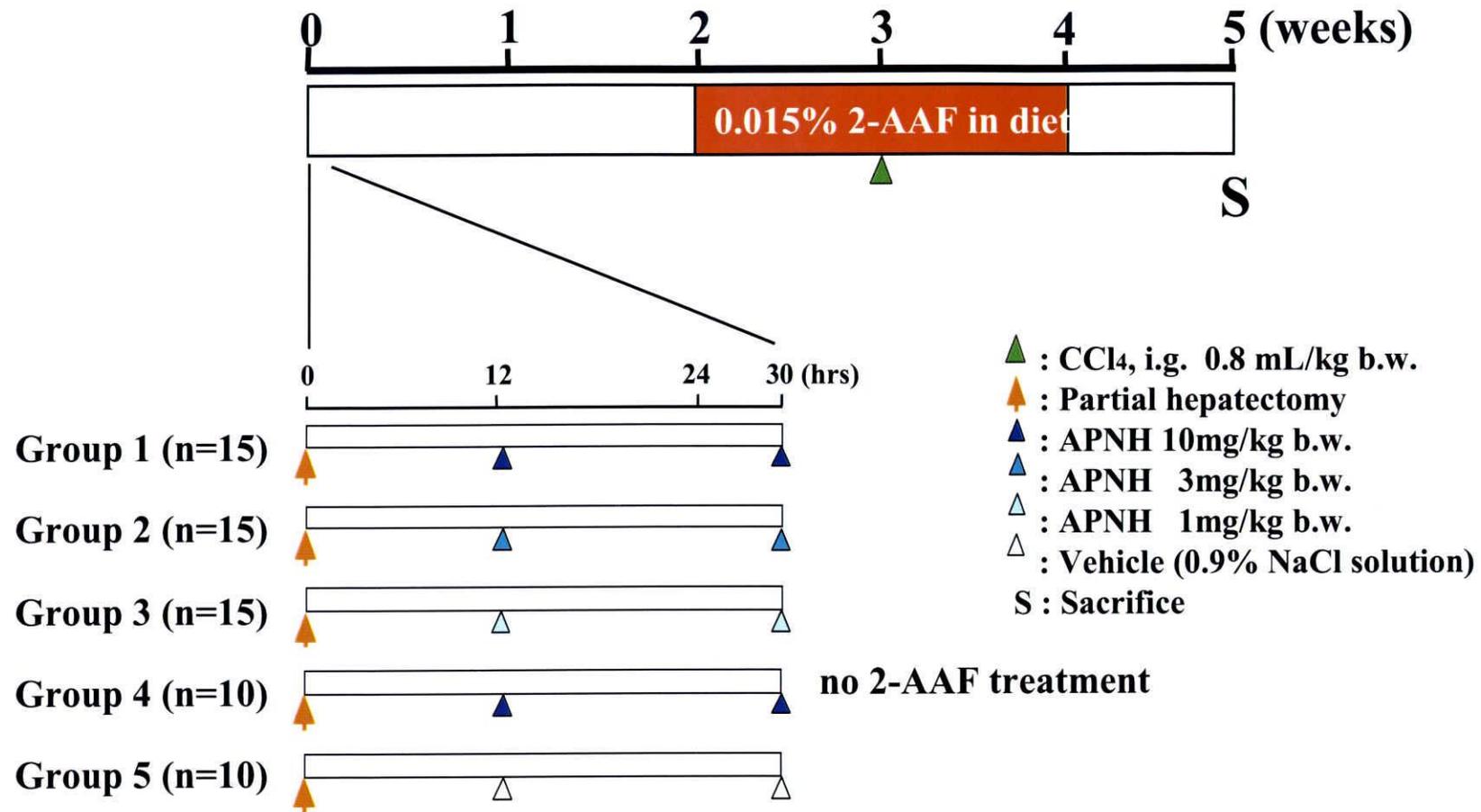
7 週齢の雄 F344 ラット 55 匹に 2/3 肝部分切除術を施し, それぞれ 10, 3, 1 および 0 mg/kg b.w. (Groups 1-3 および 5) の投与量で APNH を肝部分切除 12 時間後および 30 時間後の 2 回経口投与した。肝部分切除 2 週間後, 2 週間にわたり 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を 0.015% 混餌投与し, 同じく肝部分切除 3 週間後, 四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>, 0.8 ml/kg b.w.) を単回経口投与した。Group 4 では, 肝部分切除後, APNH を 10 mg/kg b.w. の投与量で投与し, 2-AAF, および CCl<sub>4</sub> 投与処置は行わなかった。

肝臓単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢面積は, 対照群である Group 5 の  $0.22 \pm 0.20 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  と比較して, Groups 1-3 ではそれぞれ  $3.43 \pm 1.38$ ,  $2.18 \pm 1.41$  および  $0.94 \pm 0.51 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  であり, 用量相関性の増加が認められた (Group 1-3 vs. 5  $p < 0.001$ , Group 1 vs. Group 2  $p < 0.05$ , Group 2 vs. Group 3  $p < 0.01$ )。また, GST-P 陽性肝細胞巢数においては, Groups 1-3 ではそれぞれ  $19.34 \pm 7.20$ ,  $22.75 \pm 8.16$  および  $13.61 \pm 4.92 \text{ foci}/\text{cm}^2$  であり, 対照群である Group 5 ( $2.67 \pm 1.27 \text{ foci}/\text{cm}^2$ )

に比較して有意な増加がみられた。これらのことより、APNH がイニシエーション活性を有することが示唆された。さらに、Group 4 では、単位面積あたりの GST-P 陽性肝細胞巢の面積は  $0.59 \pm 0.31 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$  であり、Group 5 群に比較して有意な増加を示したことから、APNH の肝標的性も強く示唆された。

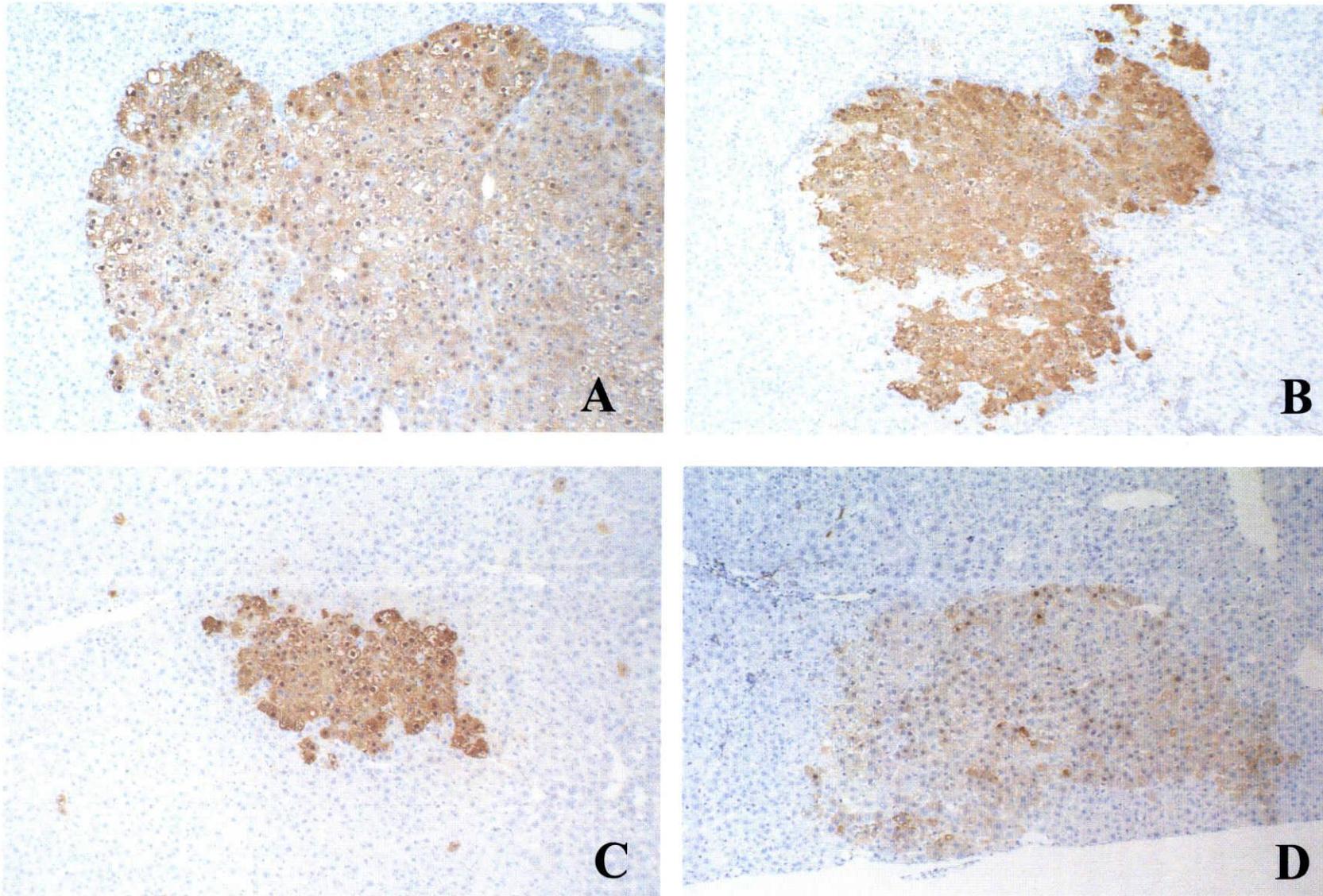


**Figure 1**  
**Formation of aminophenylnorharman from norharman and aniline in the presence of S9 mix.**

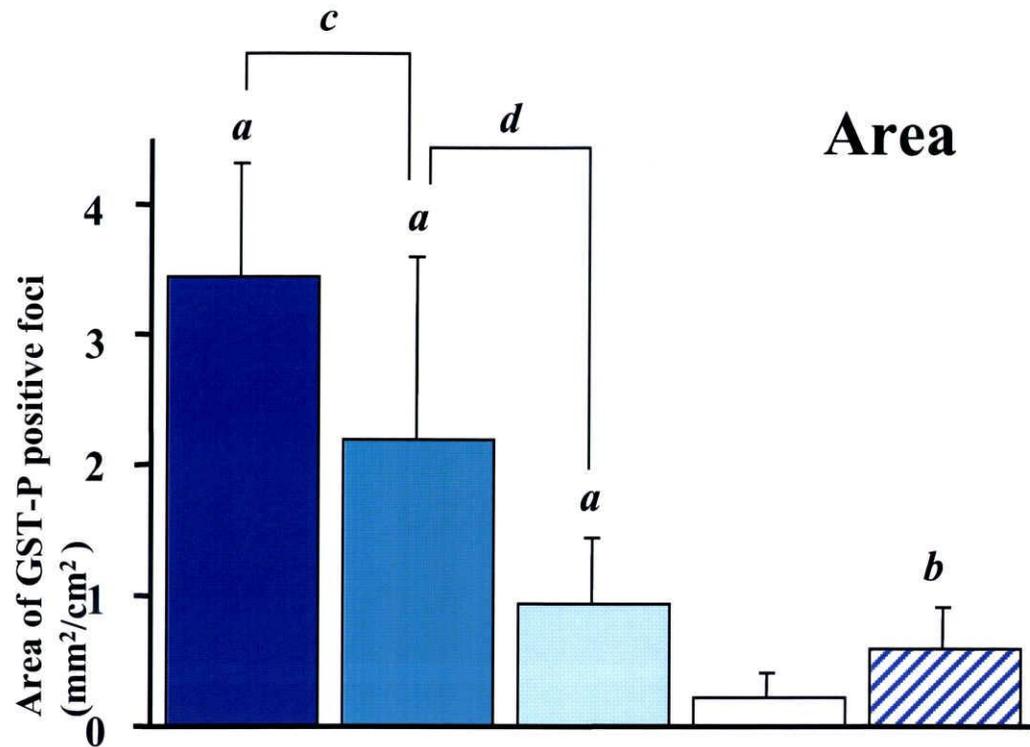


Experimental protocol for detection of initiation activity of aminophenylnorharman. Rats in Groups 1, 2, and 3 were administered APNH by oral gavage at doses of 10, 3, and 1 mg/kg twice 12 hr and 30 hr after partial hepatectomy. Following administration of APNH, rats were fed on basal diet for 2 weeks, and then diet containing 0.015 % 2-AAF for following 2 weeks. Three weeks after the APNH administration, all rats received a single dose of CCl<sub>4</sub> intragastrically at a dose of 0.8 ml/kg. Group 5 was not given APNH as a negative control. The other control group (group 4) received APNH after PH and fed basal diet only, without a 2-AAF and CCl<sub>4</sub> treatment. At the end of week 5 survivors were sacrificed and the livers were resected.

**Figure 2**

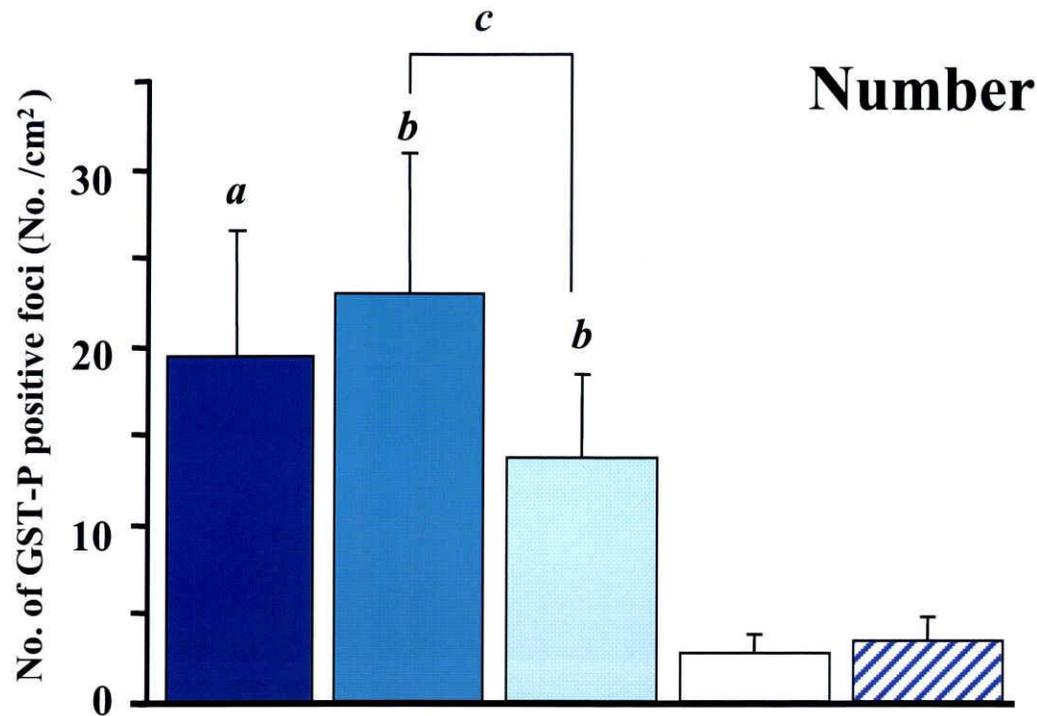


**Figure 3** Photographs of GST-P Positive Foci in rat of group 1 (A), group 2 (B), group 3 (C) and group 4 (D).



| Groups:             | 1  | 2 | 3 | 5 | 4  |                          |
|---------------------|----|---|---|---|----|--------------------------|
| APNH (mg/kg b.w.) : | 10 | 3 | 1 | 0 | 10 | <i>a</i> : $p < 0.001$   |
| AAAF treatment:     | +  | + | + | + | -  | <i>b, c</i> : $p < 0.05$ |
|                     |    |   |   |   |    | <i>d</i> : $p < 0.01$    |

**Figure 4** Areas of GST-P positive liver cell foci > 0.1 mm in diameter. Data are mean  $\pm$  S. D. values for 10-15 animals in each group. Comparisons *a*,  $p < 0.001$  vs. group 5; *b*,  $p < 0.05$  vs. group 5; *c*,  $p < 0.05$  between groups 1 and 2; and *d*,  $p < 0.05$  between groups 2 and 3.



| Groups:           | 1   | 2 | 3 | 5 | 4  |                  |
|-------------------|-----|---|---|---|----|------------------|
| APNH (mg/kg b.w.) | :10 | 3 | 1 | 0 | 10 | $a : p < 0.001$  |
| AAAF treatment:   | +   | + | + | + | -  | $b : p < 0.0001$ |
|                   |     |   |   |   |    | $c : p < 0.01$   |

Numbers of GST-P positive liver cell foci > 0.1 mm in diameter. Data are mean  $\pm$  S. D. values for 10-15 animals in each group. Comparisons  $a$ ,  $p < 0.001$  vs. group 5;  $b$ ,  $p < 0.0001$  vs. group 5; and  $c$ ,  $p < 0.01$  between groups 2 and 3.

**Figure 5**

## 第二章

*p53* ノックアウトマウスを用いた aminophenylnorharman の発がん性解明

## 【緒言】

*p53* がん抑制遺伝子は遺伝子に障害を受けた細胞の異常増殖を抑える転写調節因子を暗号化しており(59), その遺伝子産物の働きは, ゲノムに傷害を受けた細胞の細胞分裂を  $G_1$  期で停止させるために, 細胞増殖を負に制御するたんぱく質の遺伝子の転写を促進することで傷害された遺伝子の修復時間を稼ぎ, また, 修復が不可能な程度のゲノムの傷害を受けた細胞に対しては, アポトーシス促進遺伝子の転写を活性化し, その細胞をアポトーシスへ誘導する(58, 59)。つまり, 傷害を受けたゲノムが娘細胞に複製されないように働くことから, *p53* 遺伝子は“ゲノムの守護神”とされる遺伝子である(58, 59)。*p53* 遺伝子の変異は多くのヒトの腫瘍で報告されており(36, 37), *p53* 遺伝子の機能消失が発がんプロセスにおいて重要な役割を果たしていると考えられている (16, 17, 47, 97)。

近年, 胚細胞の遺伝子改変技術の進歩により, *p53* 遺伝子をノックアウト (KO) したマウスが作出され (33), 腫瘍発生における *p53* 遺伝子機能の解明や化学物質の発がん性評価に用いられている(16, 17, 47, 97)。*p53* 遺伝子の片側アレルが欠損した *p53* KO マウス (*p53* (+/-)マウス) では, 自然発生腫瘍の発生頻度が低く, 12 ヶ月齢まで生存可能であり, 12 ヶ月齢での腫瘍発生率は8%にとどまる(19, 33), さらに化学物質に対して発がん感受性が高いことから短期化学

発がん性実験に用いられている(16, 17, 96)。しかし、発がん感受性は臓器によって異なり、腺胃発癌や大腸発癌では、両側の *p53* 遺伝子アレルを正常に有する野生型 *p53* KO マウス(*p53* (+/+) マウス)と *p53*(+/-)マウスの間に有意な差は認められなかった。一方、膀胱発癌や食道発癌では、*p53* (+/-)マウスの方が、*p53* (+/+)マウスに比較して発がん感受性が高く、さらに発生した腫瘍には残存する片側 *p53* アレルに変異を示す loss of heterozygosity が認められている。これらのことから、*p53* 遺伝子の発がんへの関与は、臓器によって異なることが推察される(81, 82)。対照的に、*p53* 遺伝子の両側アレルを欠損した *p53* KO マウス (*p53* (-/-)マウス)では、早期に自然発生性腫瘍を発生し易く、4.5 ヶ月齢で約半数の個体にリンパ腫あるいは肉腫などの腫瘍が発生しはじめ、10 ヶ月齢までにはほとんど個体に腫瘍発生が認められるが(33)、*p53* (-/-)マウスを用いた化学発がん実験では、臓器にかかわらず通常の長期発がん性試験に比較し、非常に短期間に腫瘍発生を誘導できる (16, 97)。さらに、皮膚発癌や大腸発癌では、早期に悪性腫瘍を発生させることが知られている(53)。これらは、*p53* 遺伝子機能の完全な消失による、他の発がん関連遺伝子における異常の固定と蓄積の促進と考えられる。

第一章において、APNH は、変異原性のみでなくイニシエーション活性を有することが明らかにされ、さらに、ラットにおいて肝臓が標的臓器の一つで

あることが強く示唆された。続いて、本章においては、遺伝子改変操作にて発がん感受性を高めた *p53* KO マウスを用い、APNH の発がん性を評価し、さらに、発生した腫瘍について *p53* がん抑制遺伝子異常の関与の有無を検討した。

## 【実験材料および実験方法】

### 1. 供試動物

Donehower ら(18) によって作出された C57BL/6 を遺伝的背景にもつ *p53* KO マウスを用いた。*p53* KO マウスは、愛知がんセンター研究所動物施設にて繁殖、継代された。雄 5 週齢 *p53* (+/+), (+/-)および(-/-)マウスを 15 週間投与実験に、雌雄 5 週齢 *p53* (+/+)および(+/-)マウスを 40 週間投与実験に用いた。12 時間の照明サイクル下で、木製チップを敷いたプラスチックケージ内で飼育した。餌は Oriental NMF (オリエンタル酵母(株), 東京), 飲料水は水道水をそれぞれ自由に摂取させた。

遺伝子型解析は、Tsukamoto ら(107)の方法に従った。DNA は各マウスの尾の先端から QIAamp tissue kit (QIAGEN, K.K., Tokyo, Japan) を用い、抽出精製したサンプルを使用した。Taq DNA polymerase (Takara, Ohtsu, Japan), 1x polymerase-chain reaction (PCR) 緩衝液, 200 $\mu$ M dNTP, それぞれ 200nM の 5'-および 3'-primer, 2.5 $\mu$ l ゲノム DNA より PCR 反応液を調整した。マウス *p53* exon 5 – 8 の PCR primer は Table 2 に示した。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C 1 分の後、94 $^{\circ}$ C 1 分、65 $^{\circ}$ C 1 分、72 $^{\circ}$ C 1 分の 3 ステップを 35 サイクル、72 $^{\circ}$ C 10 分の温度サイクルで Takara PCR Thermal Cycler MP(Takara, Ohtsu, Japan) を用いて実施した。

PCR 産物の確認は、エチジウムブロマイドを含む3%アガロースゲル (Takara, Ohtsu, Japan) で電気泳動した後、紫外線イルミネーション下で行った。

## 2. 試薬

APNH は、S9 mix 存在下で、norharman と aniline より生成した。生成は第一章で用いた方法に準じて行った。

## 3. 実験方法

実験プロトコールを Figure 6 に示した。APNH をそれぞれ 30, 10, 3 および 0 ppm の投与濃度で混入させた飼料を日本クレアで委託製造し、入手後投与までは4℃に設定された保管庫で保存した。APNH 混餌飼料 (APNH 30, 10, 3 および 1 ppm) を5週齢の *p53* (+/+), (+/-) および (-/-) 雄マウスに15週間、5週齢の雌雄 *p53* (+/+), (+/-) マウスに40週間投与した。給餌方法は自由摂取とした。それぞれ遺伝子型および投与期間に対照群を設け、対照群には基礎飼料 (CA-1 日本クレア, 東京) のみを与えた。15週間投与群については、投与開始時より1週間間隔で体重を測定した。40週間投与群については、投与開始時より投与15週目まで1週間に1回、その後、投与40週目まで4週間に1回体重を測定した。投与15週目、あるいは40週目に生存例全例について、安楽殺後、

肉眼的に全身臓器を観察し、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および胸腺を採取した。投与 15 週目、あるいは、40 週目の投与終了以前に死亡あるいは切迫屠殺したマウスについても、同様に全身臓器を肉眼的に観察し、可能な限り、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および胸腺を採取した。なお、40 週間投与群では投与 25 週目前後の死亡あるいは切迫屠殺例について、肝臓を中心に観察し、15 週間投与群と比較して腫瘍形成などにおいて差が認められなかったため、Yamamoto ら(112)の方法を参考に投与期間を 40 週間とした。

#### 4. 組織学的検索

剖検時採取した肝臓の左葉、中間葉および右葉から各 1 片、3-5 mm の厚さのスライス片を切り出し、4%中性リン酸緩衝パラホルムアルデヒド水溶液にて浸漬固定した。中間葉は胆嚢を含めて切り出した。腎臓、脾臓、心臓、肺、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および胸腺も切り出し、4%中性リン酸緩衝パラホルムアルデヒド水溶液にて浸漬固定した。固定後、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胃腸管および胸腺を定法にてパラフィン包埋、薄切の後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、15 週間投与群については全ての臓器・組織、40 週間投与群について肝臓、胆嚢を鏡検した。肝臓の病変の組織学

的分類は、Harada ら(32)の報告に従った。

また、画像処理装置 (IPAP; Sumika Technos, Takarazuka, Japan) を用い、15 週間投与群について、肝臓病理組織標本を顕微鏡下で観察し、病変のない箇所につき 400 倍視野 5 視野あたりの肝細胞核数および肝細胞核の合計面積を計測し、肝細胞核 1 個あたりの平均面積を算出した。

#### 5. PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法による肝腫瘍の *p53* 遺伝子変異の検索

*p53* (+/+) マウスから 12 個の肝臓腫瘍、*p53* (+/-)マウスから 15 個の肝臓腫瘍を採材しそれぞれを PCR-SSCP 法(67)にて分析した。ゲノム DNA は、未染パラフィン切片の腫瘍部分から DEXPAT (Takara, Ohtsu, Japan) を使用し、Yamamoto ら(112)の方法でそれぞれ抽出した。マウス *p53* 遺伝子 exon 5 から 8 のプライマーデザインは Tsukamoto ら(107)の報告をもとにした(Table 2)。PCR は Takara PCR Thermal Cycler MP (Takara, Ohtsu, Japan) を用い、PCR 産物は、SSCP loading buffer を 20  $\mu$ l 加え、10 分 95 $^{\circ}$ Cにて加熱し、氷水にて 15 分間急冷後、0.625 x MDE polyacrylamide ゲル(FMC, Rockland, ME) / トリス・ホウ酸・EDTA 緩衝液で電気泳動を行った。8W 定電力、室温にて 18 時間電気泳動を行った後、ゲルを乾燥させ、イメージングプレート (Fuji Film, Kanagawa)に密着させ、室温にてカセッ

ト内で転写した。転写されたイメージングプレートは、BAS 2500 (Fuji Film, Kanagawa)により解析した。

## 6. 統計解析

病理組織学的検査における病変の発生頻度は、Fisher の直接法、生存曲線および生存率の統計学的解析は Kaplan-Meier 法および log rank 法を用いて解析した(72)。測定値の統計解析には、1 元配置の分散分析と多重比較検定 (Dunnett 法) を用いた。

## 【実験結果】

### 1. 体重

15 週間投与群および 40 週間投与群の平均体重増加の推移を Figure 7 に示した。各群の最終体重増加量は、それぞれの対照群と比較してほぼ投与用量に相関した減少を示した。15 週間投与群では対照群の体重増加量を 100%とした場合、各遺伝子型の 3, 10 および 30 ppm 投与群の体重増加量は、*p53 (+/+)* マウスでは、98.8%, 72.1% および 69.1%, *p53 (+/-)* マウスでは、94.6%, 93.0% および 63.6%, *p53 (-/-)* マウスでは、88.6%, 88.8% および 98.2% であった。40 週間投与群も同様に各遺伝子型の 3, 10 および 30 ppm 投与群の体重増加量は、*p53 (+/+)* 雄マウスでは、114.9%, 95.9% および 51.4%, *p53 (+/+)* 雌マウスでは、74.2%, 60.2% および 18.0%, *p53 (+/-)* 雄マウスでは、106.5%, 96.0% および 51.0%, *p53 (+/-)* 雌マウスでは、93.8%, 63.4% および 36.6% であった。

### 2. 生存率

APNH 30, 10 および 3ppm を *p53 (+/+)*, *(+/-)* および *(-/-)* マウスに 15 あるいは、40 週間投与した場合の死亡率を Figures 8 - 10 に示す。

15 週間投与において、*p53 (+/+)* マウスは APNH 30, 10 および 3ppm 群いずれの群においても、全例生存した。*p53 (+/-)* マウスでは、投与用量に相関し

て死亡率の増加が認められた。*p53* (-/-)マウスでは、APNH 非投与対照群に比較して、すべての投与群で死亡率の上昇が認められたが、投与用量相関性は認められなかった。

40 週間投与群では、*p53* (+/-)および*p53* (+/+)マウスとも 3 および 10 ppm 投与群の間で死亡率に有意差はなかったが、雌雄 *p53* (+/-)および雌 *p53* (+/+)の 30 ppm 投与群は高い死亡率を示した。

遺伝子型の違いによる APNH の感受性は、15 週間実験では、*p53* (+/-)および(-/-)マウスの 30ppm 投与群の死亡率は、*p53* (+/+)マウスの 30ppm 投与群に比較して有意に高く、*p53* (-/-)マウスでの死亡例は、他の遺伝子型に比較して最も早く、投与 2 週目より認められた。また、40 週間実験においては、雌雄 *p53* (+/-)マウス 30 ppm 投与群では、雄 *p53* (+/+)マウス 30 ppm 投与群と比較して、死亡率が有意に高かった。30 ppm 投与群の雌 *p53* (+/-)マウスと雌 *p53* (+/+)マウスの間には死亡率に有意差は認められなかった。

### 3. 病理組織学的検索

APNH の 15 週間混餌経口投与により誘発された病変およびそれらの頻度を Table 3 にまとめた。検索した臓器のうち、病変は肝臓のみに認められ、他の臓器では著変が認められなかった。APNH 15 週間投与後の各遺伝子型マウスの

肝臓に Oval cell hyperplasia (OCH)が観察された。OCH は淡青色楕円形の核と少量の塩基性細胞質を持つ小型の円形から楕円形の細胞 (oval cell) が門脈域を中心として、ほぼ肝臓実質全域への浸潤性の増殖を特徴としている (Figure 11A)。

15 週間投与において OCH は 30 ppm 投与群の *p53* (-/-)マウス 2/14 (14.3%), *p53* (+/-)マウスに 14/23 (60.9%)および *p53* (+/+) 2/10 (20.0%) にそれぞれ観察された。

APNH 30 ppm 投与群 *p53* (+/-)マウスの OCH の認められた個体の比率は、同遺伝子型の対照群のみならず、APNH 30 ppm 投与群 *p53* (+/+)および(-/-)マウスと比較して、統計学的に有意な増加が認められた。また、APNH 30 ppm および 10 ppm 投与群 *p53* (-/-)マウスの各 1 例に altered cell foci(Foci)が観察された。

APNH の 40 週間混餌経口投与により誘発された病変とそれらの発生頻度を Table 4 にまとめた。40 週間の混餌経口投与によっても、15 週間の実験と同様、検索した臓器のうち、病変は肝臓のみに認められ、他の臓器では著変が認められなかった。APNH 40 週間投与後の雌雄各遺伝子型マウスの肝臓に OCH, 各種の Foci, 肝細胞腺腫 (HCA)および肝細胞癌 (HCC)が観察された。HCA は肝小葉数個の大きさから葉と同等大までさまざまな大きさの結節で、周囲を圧排して増殖し、正常肝臓組織との境界は明瞭で、構成細胞は比較的よく分化しており、分裂像も散見していた (Figure 11B)。一方、HCC は、浸潤性を示す増殖巣で、周囲組織との境界は不明瞭、腫瘍の構造的特徴として索状あるいは腺

様を示し、腫瘍細胞に高度の異型性が認められた (Figure 11C)。40 週間投与において OCH は 30 ppm 投与群の雌雄 *p53* (+/-) および (+/+) マウスに観察され、それぞれの対照群と比較して、有意に高い発生率を示した。Foci は *p53* (+/-) 雄マウスの全ての投与群、*p53* (+/+) 雄マウスの 30 ppm 投与群、*p53* (+/-) 雌マウスの全ての投与群、*p53* (+/+) 雌マウス 10 および 30 ppm 投与群に観察された。HCA は、30 ppm 投与群 *p53* (+/-) 雌マウスで 16/46 例 (34.8%)、*p53* (+/+) 雌マウスで 12/27 例 (44.4%) に認められ、それぞれの対照群と比較して有意な増加を示した。HCC は、30 ppm 投与群 *p53* (+/-) 雌マウスで 14/46 例 (30.4%)、*p53* (+/+) 雌マウスで 10/27 例 (37.0%) に認められ、それぞれの対照群と比較して有意な増加を示した。また、30 ppm 投与群 *p53* (+/-) 雌マウス、*p53* (+/+) 雌マウスの HCC の発生率は、対応する投与用量および遺伝子型の雄マウス、すなわち 30 ppm 投与群 *p53* (+/-) 雄マウス、*p53* (+/+) 雄マウスと比較して有意に高かった ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ )。30 ppm 投与群 *p53* (+/-) 雄マウスの 1/45 例 (2.2%)、*p53* (+/+) 雄マウス 2/12 例 (16.7%) に HCC が観察されたが、有意差は認められなかった。

APNH の 15 週間混餌経口投与後の病変が認められない箇所肝細胞の強拡大像を Figure 12 に示した。肝細胞の核は、*p53* (-/-) マウスで他の遺伝子型と比較して大型であった。また、画像処理装置による定量的解析における肝細胞核の平均面積を Figure 13 に示した。対照群 *p53* (+/+), (+/-) および (-/-) マウス

の肝細胞核の平均面積は、それぞれ  $9.60 \pm 2.22$ ,  $9.33 \pm 1.33$  および  $15.15 \pm 2.25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  (平均値 $\pm$ 標準偏差) であった。30 ppm 投与群 では、*p53* (+/+), (+/-) および (-/-) マウスの肝細胞核の平均面積は、それぞれ  $7.46 \pm 1.04$ ,  $9.97 \pm 1.77$  および  $27.26 \pm 5.55 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  (平均値 $\pm$ 標準偏差) で、*p53* (-/-) マウスの肝細胞核の平均面積が対照群 *p53* (-/-) マウスに比較して有意な増加を示した ( $p < 0.001$ )。また、30 ppm 投与群 *p53* (-/-) マウスの肝細胞核の平均面積は、30 ppm 投与群 *p53* (+/+) および (+/-) マウスとの比較においても有意な増加が認められた ( $p < 0.001$ )。

#### 4. PCR-SSCP 法による *p53* 遺伝子変異の検索

雌雄 *p53* (+/-) マウスから採取した HCC 13 例および HCA 2 例、雌雄 *p53* (+/+) マウスから採取した HCC 10 例および HCA 2 例について PCR-SSCP 法による *p53* 遺伝子 exon 5-8 についての遺伝子変異の解析を行ったところ (Table 5), *p53* (+/+) および (+/-) マウスに発生した HCC および HCA に *p53* 遺伝子の変異は認められなかった (Figure 14)。

## 【考察】

APNH 投与 15 週間あるいは 40 週間混餌経口投与により *p53* ノックアウト (KO) マウスに誘発された主な変化は、体重増加抑制、死亡率の上昇および肝臓における病理組織学的変化であった。

15 週間投与試験の死亡率は、30 ppm 投与群 *p53* (+/+) マウスに比較して *p53* (+/-) および (-/-) マウスに有意な増加がみられ、*p53* (-/-) マウスで最も早期に死亡例が認められた。40 週間投与試験の死亡率は、30 ppm 投与群 *p53* (+/-) 雌雄マウス、*p53* (+/+) 雌マウスに認められた。体重増加抑制では、15 週間投与試験 *p53* (-/-) マウスを除き、15 週間および 40 週間投与試験とも死亡率の場合と同様の群に体重増加抑制が認められた。これらの変化は、肝臓に観察された変化の発現頻度とほぼ同様の傾向を示していることから、肝臓の変化に起因するものと考えられる。

15 週間投与試験において観察された OCH は、ラット、マウスに 2-AAF, aflatoxin やアゾ系染料などの種々の肝毒性物質、肝発がん性物質を投与した際に多く認められる(21, 22, 70)。肝細胞が非可逆的障害を受けた後、実質組織の再生が oval cell の増殖により始まり続いて oval cell は分化し、肝細胞に置き換わる(21, 22)。このことから、本実験で観察された OCH は APNH の肝細胞に対する

毒性作用の結果生じた変化と考えられる。15週間投与試験において、肝臓のOCHの発生率が *p53 (+/-)*マウスで最も高く、次いで *p53 (+/+)*であり、*p53 (-/-)*マウスの発生率が最も低かった。一方、15週間投与試験において *p53 (-/-)*マウスの全投与群の死亡率は、他の遺伝子型に比較して最も高く、*p53 KO* マウスの *p53* 遺伝子型に起因した発がん性物質 MNU に対する感受性の違い (112) とよく一致しており、APNHの毒性に対して、*p53 (-/-)*マウスが最も高い感受性を有していることが示唆された。これは APNH の有する肝臓に対する作用が *p53 (-/-)*マウスにおいてより強く現れ、肝細胞の再生が起きる前に死に至ったか、あるいは、APNH が遺伝毒性をもつため肝臓への作用が肝細胞の再生機構にも影響を及ぼしたと推察される。

40週間投与 30 ppm 投与群では、OCH 以外にも肝細胞変異巣、HCA、HCC の有意な増加が認められた。これらの結果から、APNH の肝臓に対する標的性は明らかである。しかし、これら肝臓の増殖性病変は、同じ遺伝子型の場合、雄に比較して雌で常に発生頻度が高く、*p53* 遺伝子の遺伝子型と増殖性病変の発生頻度との間に相関性はほとんど認められなかった。Rinn ら(115)は、雌雄無処置マウスの肝臓、腎臓、生殖腺などの遺伝子の発現に検索したところ、肝臓の薬物あるいはステロイドの代謝に関連する数種の CYP の発現パターンに雌雄差の存在が認められたことを報告している。また、Degawa ら(116)は、

BALB/c×DBA/2 F<sub>1</sub> マウスに Trp-P-1, TrpP-2 を混餌経口投与したところ、雄に比較して雌で Trp-P-1, TrpP-2 の代謝活性化に関与する CYP の増加が肝臓で見られ、腫瘍発生頻度と一致したと報告している。これらの報告から、APNH 投与による肝臓の増殖性病変発生頻度の雌雄差は、肝臓における代謝活性の雌雄差と関連性が推察された。

さらに、15 週間投与群において肝臓病理組織標本上の肝細胞核の平均面積を計測したところ、対照群 *p53* (+/-) マウスと比較して、30 ppm 投与群 *p53* (+/-) マウスの肝細胞核平均面積の有意な増加が認められ、肝細胞核の大小不同がみられた。また、30 ppm 投与群 *p53* (+/-) マウスの肝細胞核面積は、同投与量の他の遺伝子型、すなわち *p53* (+/+) および *p53* (+/-) マウスの肝細胞核面積と比較しても有意な増加を示した。肝細胞核の大小不同は、四塩化炭素、パラセタモール (アセトアミノフェン) (11)、N-ニトロソジエチルアミン(25) などの肝毒性物質の投与によって誘発される。肝細胞核の大小不同化は主に核小体の大型化によるものと考えられているが、アセトアミノフェンの毒性作用(6, 90)のように核質の変化によって生じる場合もある。さらに肝発がん性物質の暴露により肝細胞核の大型化、超微細構造の変化が生じることが報告されている (48, 104)。しかし、化学物質により誘発される細胞核大小不同と *p53* がん抑制遺伝子との関連についての報告は少ない。また、核小体の大きさは RNA 量、すなわち蛋白質合

成の程度を反映し、核小体が大きいほど細胞は活発に活動していると考えられる。本実験の結果より、*p53* (+/-) マウスが APNH により誘発される細胞核大小不同に対して最も感受性が高いと考えられた。

40 週間投与群に発生した HCC および HCA の *p53* 遺伝子の変異について PCR-SSCP 法を用いて検索したところ、APNH 投与により発生した腫瘍に *p53* 遺伝子の変異は認められなかった。これらの結果は、化学物質により C57BL/6J マウスに誘発された肝臓腫瘍に *p53* 遺伝子変異は認められなかったとする Kress ら (56)の報告と一致する。加えて、*p53* (+/-)マウスは肝発がん性物質に対して高い感受性を示さない(10, 52)との報告もある。したがって、マウスにおける肝臓腫瘍形成において、*p53* 遺伝子は標的とならないか、もしくは *p53* 遺伝子は他のメカニズムによって不活化されていると推察される(10)。

以上のことから、APNH 投与により発生した肝臓の増殖性病変は、同じ遺伝子型の場合、雄に比較して雌で常に発生頻度が高く、増殖性病変の発生に性差が関連していることから、代謝やホルモンとの関連性が示唆された。また、*p53* (+/-) マウスは APNH により誘発される肝細胞の大小不同の感受性が他の遺伝子型に比較して高いため、30 ppm 投与群 *p53* (+/-)マウスの肝臓における代謝は他の遺伝子型に比較して亢進していた可能性が示唆された。さらに、発生した腫瘍性病変に *p53* 遺伝子変異は認められず、*p53* 遺伝子と APNH による肝発

がんと直接の関連性は認められなかった(40)。

## 【要約】

本章では、APNHの発がん性について、短期の発がん性試験に有用な *p53* がん抑制遺伝子を欠損した *p53* KO マウスを用いて検索を行った。

5週齢雄 *p53* KO (-/-), (+/-)および(+/+)マウスに30, 10および3ppmのAPNHを15週間混餌経口投与し、また、5週齢雌雄 *p53* (+/-)および *p53* (+/+)マウスに30, 10および3ppmのAPNHを40週間混餌経口投与した。15あるいは40週目の投与終了時に安楽殺し剖検、肝臓を中心に全身臓器を組織学的に検索した。APNH混餌投与により肝臓にOCH、各種のFoci、HCAおよびHCCなどの多彩な増殖性病変が観察された。15週間実験では肝臓のOCHがAPNH 30ppm投与群では、*p53* (-/-), *p53* (+/-) および *p53* (+/+)マウスにそれぞれ2/14例(14.3%), 14/23例(60.9%) および 2/10例(20%)観察された。また、APNHにより誘発される肝細胞核大小不同に対しては、*p53* (-/-) マウスが最も強い感受性を示した。40週間実験において、APNH 30ppm投与群では、HCCが雌 *p53* (+/-)マウス 16/46例(34.8%) および雌 *p53* (+/+)マウス 10/27例(37.0%)に認められた。しかし、雄 *p53* (+/-)および *p53* (+/+)マウスに観察されたHCCは、それぞれ1/45例(2.2%)および2/12例(16.7%)であった。40週間実験の *p53* (+/-)および *p53* (+/+)マウスに観

察された腫瘍の *p53* 遺伝子 exon5 から 8 について、PPCR-SSCP 法により検索した結果、*p53* がん抑制遺伝子の変異は認められなかった。

これらの結果から APNH の *p53* ノックアウトマウスに対する標的臓器は肝臓であり、APNH の発がん性が示唆された。APNH の肝発がん性は、*p53* 遺伝子の変異との関連性は低く、雌でより多くの腫瘍発生が認められることから肝臓における代謝活性の雌雄差との関連性が考えられた。

**Table 2. PCR primer for SSCP analysis of mouse *p53* gene**

| Target |           | Primer Sequence            | Product length(bp) |
|--------|-----------|----------------------------|--------------------|
| Exon 5 | sense     | 5'-TCTCTTCCAGTACTCTCCTC-3' | 214                |
|        | antisense | 5'-AGGCGGTGTTGAGGGCTTAC-3' |                    |
| Exon 6 | sense     | 5'-GGCTTCTGACTTATTCTTGC-3' | 181                |
|        | antisense | 5'-CAACTGTCTCTAAGACGCAC-3' |                    |
| Exon 7 | sense     | 5'-TCACCTGGATCCTGTGTCTT-3' | 170                |
|        | antisense | 5'-CAGGCTAACCTAACCTACCA-3' |                    |
| Exon 8 | sense     | 5'-ACTGCCTTGTGCTGGTCCTT-3' | 279                |
|        | antisense | 5'-GGAGAGGCGCTTGTGCAGGT-3' |                    |

**Table 3.**

**Lesion Incidence of Liver from *p53* Knockout Mice Treated with Aminophenylnorharman for 15 weeks**

| <i>p53</i><br>geno-type | APNH<br>(ppm) | No. <sup>a</sup><br>Animals | No. of mice with lesions   |                       |
|-------------------------|---------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|
|                         |               |                             | OCH <sup>b</sup> (%)       | Foci <sup>c</sup> (%) |
| (-/-)                   | 0             | 11                          | 0 (0)                      | 0 (0)                 |
|                         | 3             | 17                          | 0 (0)                      | 0 (0)                 |
|                         | 10            | 13                          | 0 (0)                      | 1 (7.7)               |
|                         | 30            | 14                          | 2 (14.3)                   | 1 (7.1)               |
| ( +/- )                 | 0             | 11                          | 0 (0)                      | 0 (0)                 |
|                         | 3             | 21                          | 0 (0)                      | 0 (0)                 |
|                         | 10            | 21                          | 0 (0)                      | 0 (0)                 |
|                         | 30            | 23                          | 14 <sup>d,e,f</sup> (60.9) | 0 (0)                 |
| (+/+)                   | 0             | 10                          | 0 (0)                      | 0 (0)                 |
|                         | 3             | 10                          | 0 (0)                      | 0 (0)                 |
|                         | 10            | 10                          | 0 (0)                      | 0 (0)                 |
|                         | 30            | 10                          | 2 (20.0)                   | 0 (0)                 |

**a: Mice which died before the end of experiment were included, b: OCH: Oval cell hyperplasia, c: Foci: Eosinophilic, basophilic, clear or amphophilic cellular alteration foci, d: Significantly different from *p53*( +/- ) control;  $p < 0.001$ , e: from *p53*(-/-) with 30ppm of APNH;  $p < 0.05$ , f: from *p53*(+/+) with 30ppm of APNH;  $p < 0.05$ , using the Fisher's exact test.**

**Table 4.**

**Lesion Incidence of Liver from *p53* Knockout Mice Treated with Aminophenylnorharman for 40 weeks**

| sex    | <i>p53</i><br>geno-type | APNH<br>(ppm) | No. <sup>a</sup><br>Animals | No. of mice with lesions  |                       |                           |                           |
|--------|-------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
|        |                         |               |                             | OCH <sup>b</sup> (%)      | Foci <sup>c</sup> (%) | Adenoma (%)               | Carcinoma (%)             |
| Male   | ( +/- )                 | 0             | 17                          | 0 (0)                     | 0 (0.0)               | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 3             | 25                          | 0 (0)                     | 2 (8.0)               | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 10            | 20                          | 1 (5.0)                   | 1 (5.0)               | 2 (10.0)                  | 0 (0)                     |
|        |                         | 30            | 45                          | 20 <sup>e</sup> (44.4)    | 4 (8.9)               | 3 (6.7)                   | 1 (2.2)                   |
|        | ( +/+ )                 | 0             | 13                          | 0 (0)                     | 0 (0)                 | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 3             | 28                          | 0 (0)                     | 0 (0)                 | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 10            | 24                          | 0 (0)                     | 0 (0)                 | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 30            | 12                          | 4 <sup>f</sup> (33.3)     | 4 <sup>f</sup> (33.3) | 2 (16.7)                  | 2 (16.7)                  |
| Female | ( +/- )                 | 0             | 13                          | 0 (0)                     | 0 (0)                 | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 3             | 19                          | 0 (0)                     | 1 (5.3)               | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 10            | 19                          | 9 (47.4)                  | 10 (52.6)             | 4 (21.1)                  | 2 (10.5)                  |
|        |                         | 30            | 46                          | 32 <sup>d, g</sup> (63.0) | 6 (13.0)              | 16 <sup>j, d</sup> (34.8) | 14 <sup>i, k</sup> (30.4) |
|        | ( +/+ )                 | 0             | 14                          | 0 (0)                     | 0 (0)                 | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 3             | 20                          | 0 (0)                     | 0 (0)                 | 0 (0)                     | 0 (0)                     |
|        |                         | 10            | 24                          | 8 (33.3)                  | 14 (58.3)             | 9 (37.5)                  | 2 (8.3)                   |
|        |                         | 30            | 27                          | 17 <sup>h</sup> (63.0)    | 8 <sup>i</sup> (29.6) | 12 <sup>i</sup> (44.4)    | 10 <sup>i, l</sup> (37.0) |

- a: Mice which died before the end of experiment were included.**
- b: OCH: Oval cell hyperplasia.**
- c: Foci: Eosinophilic, basophilic, clear or amphophilic cellular alteration foci**
- d:  $p < 0.05$  vs.  $p53 (+/-)$  male with 30ppm APNH.**
- e:  $p < 0.001$  vs.  $p53 (+/-)$  male control group.**
- f:  $p < 0.05$  vs.  $p53 (+/+)$  male control group.**
- g:  $p < 0.001$  vs.  $p53 (+/-)$  female control group.**
- h:  $p < 0.001$  vs.  $p53 (+/+)$  female control group.**
- i:  $p < 0.05$  vs.  $p53 (+/+)$  female control group.**
- j:  $p < 0.05$  vs.  $p53 (+/-)$  female control group.**
- k:  $p < 0.001$  vs.  $p53(+/-)$  male with 30ppm APNH group.**
- l:  $p < 0.05$  vs.  $p53 (+/+)$  male with 30ppm of APNH group.**

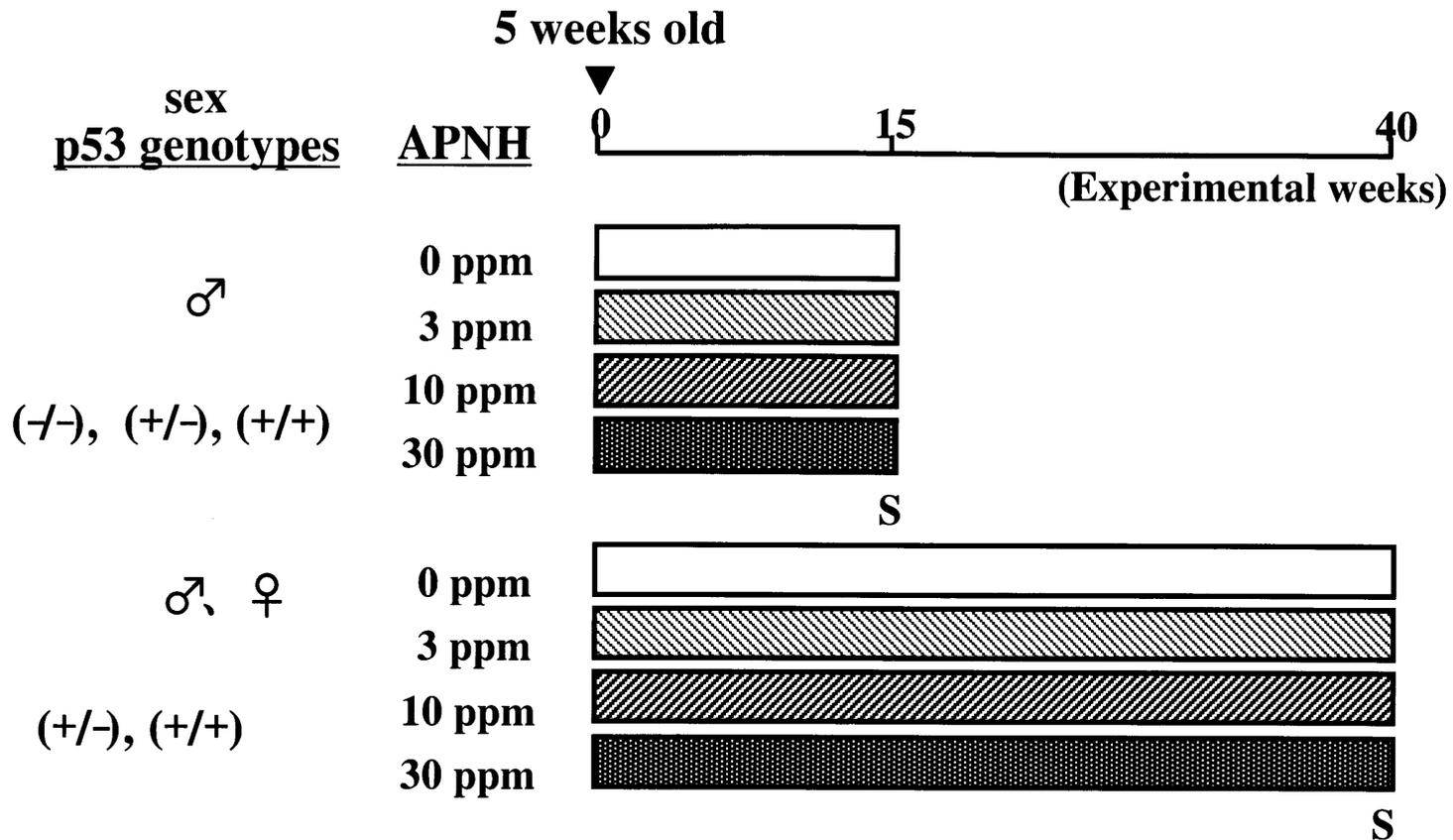
**Table 5.**

**PCR-single Strand Conformation Polymorphism analysis (SSCP) of Hepatic Tumors from *p53* Knockout Mice with Aminophenylnorharman**

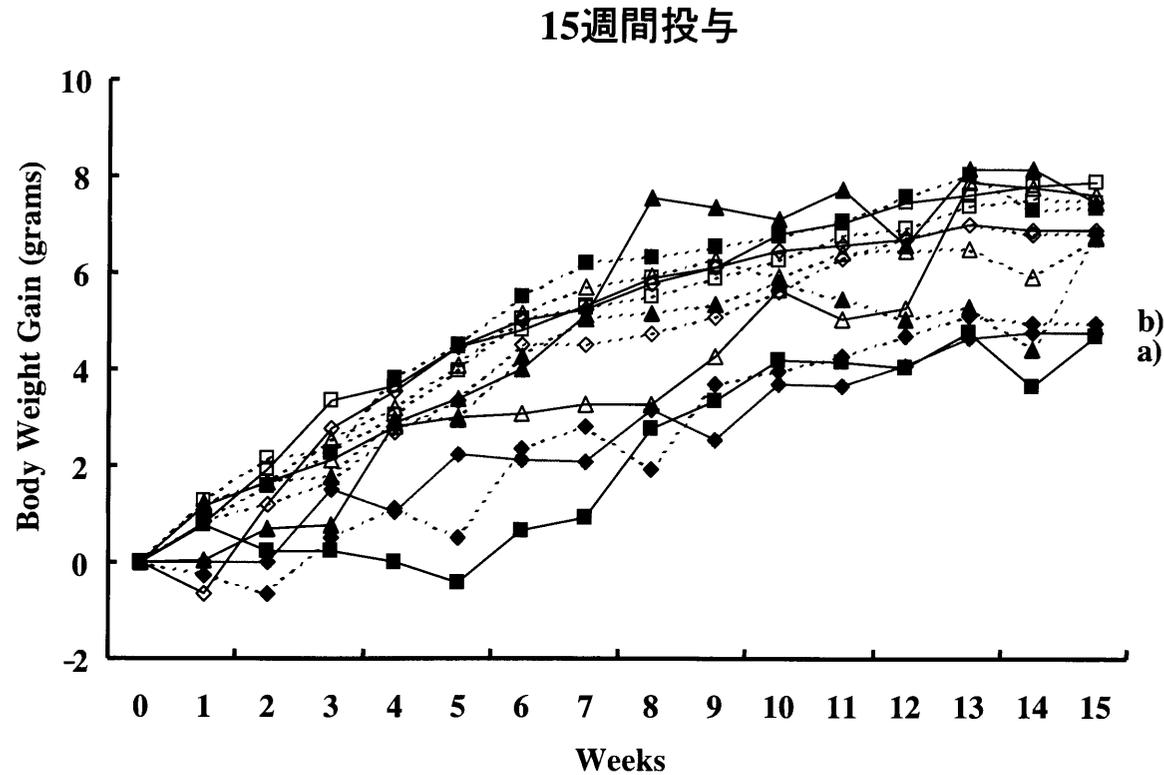
| <i>p53</i><br>geno-type | APNH<br>(ppm) | No. <sup>a</sup> of samples |           | No. of gene mutations |
|-------------------------|---------------|-----------------------------|-----------|-----------------------|
|                         |               | Adenoma                     | Carcinoma | Tumor                 |
| ( +/- )                 | 30            | 2                           | -         | 0                     |
|                         | 30            | -                           | 13        | 0                     |
| ( +/+ )                 | 30            | 2                           | -         | 0                     |
|                         | 30            | -                           | 10        | 0                     |

**PCR-SSCP analysis for exons 5-8 of *p53* gene were performed.**

**a: Mice which died before the end of experiment were included.**



**Figure 6** Experimental design. Five-week-old wild-type (+/+), heterozygous (+/-) and nullizygous (-/-) *p53* KO mice were used. APNH at 30, 10 or 3 ppm and basal diet as control were given. APNH; aminophenylnorharman, S; sacrificed.



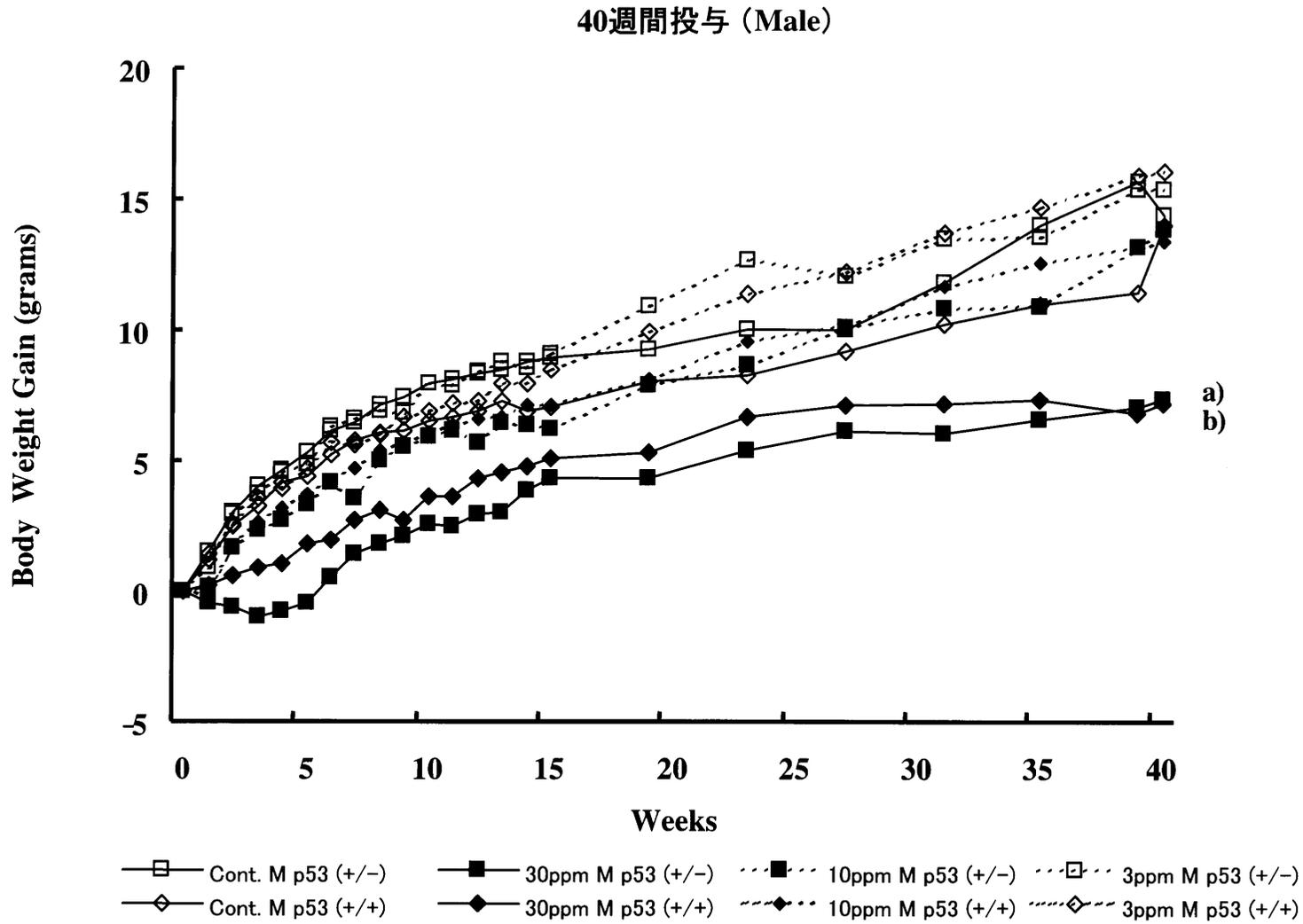
—△— Cont. p53 (-/-)    —▲— 30ppm p53 (-/-)    ...▲... 10ppm p53 (-/-)    ···△··· 3ppm p53 (-/-)  
—□— Cont. p53 (+/-)    —■— 30ppm p53 (+/-)    ...■... 10ppm p53 (+/-)    ···□··· 3ppm p53 (+/-)  
—◇— Cont. p53 (+/+)    —◆— 30ppm p53 (+/+)    ...◆... 10ppm p53 (+/+)    ···◇··· 3ppm p53 (+/+)

a: Significantly different between p53 (+/+) 30 ppm and p53 (+/+) control; p<0.05

b: Significantly different between p53 (+/-) 30 ppm and p53 (+/-) control; p<0.05

**Figure 7-A**

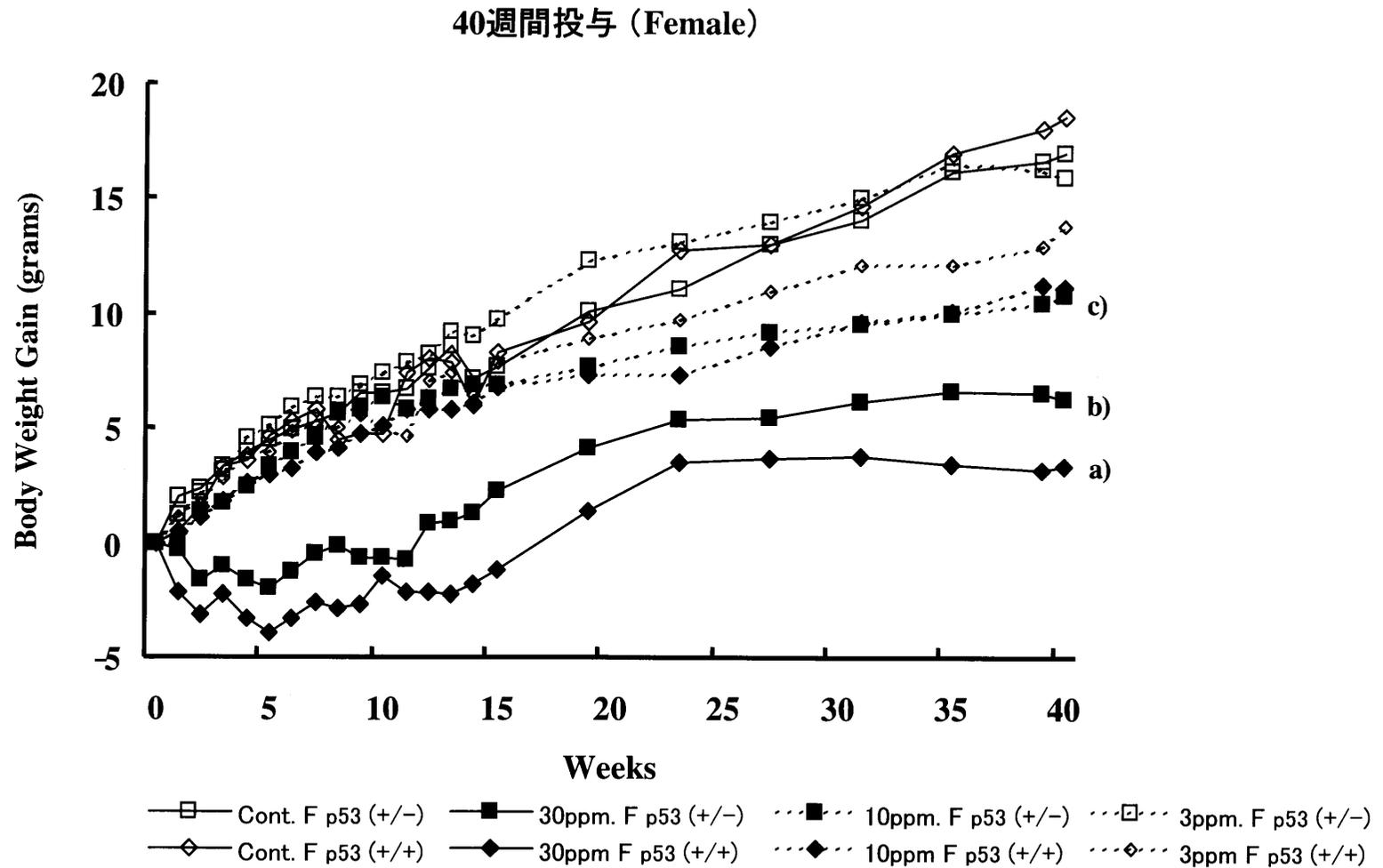
Body weight gain of p53 (+/+, +/-, -/-) male mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH for 15 weeks (A), p53 (+/+, +/-) male mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH for 40 weeks (B), and p53 (+/+, +/-) female mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH for 40 weeks (C).



**Figure 7-B**

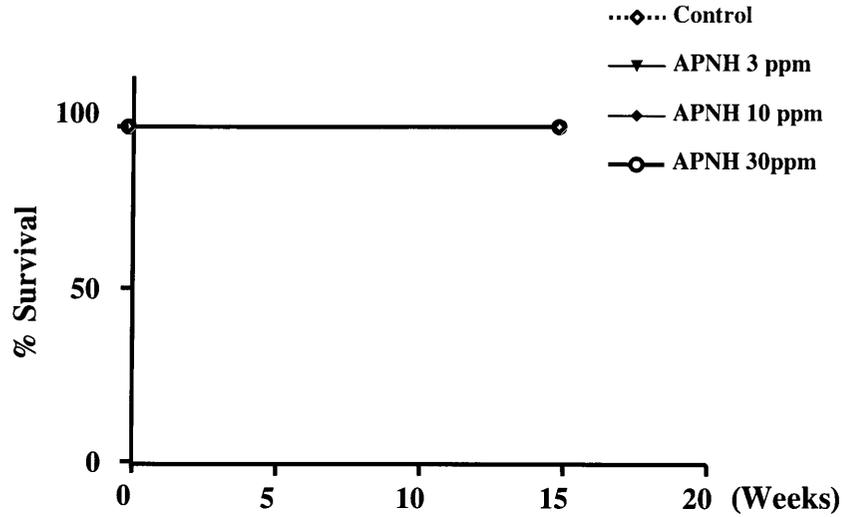
**a: Significantly different between p53 (+/+) male 30 ppm and p53 (+/+) male control;  $p < 0.001$**

**b: Significantly different between p53 (+/-) male 30 ppm and p53 (+/-) male control;  $p < 0.05$**

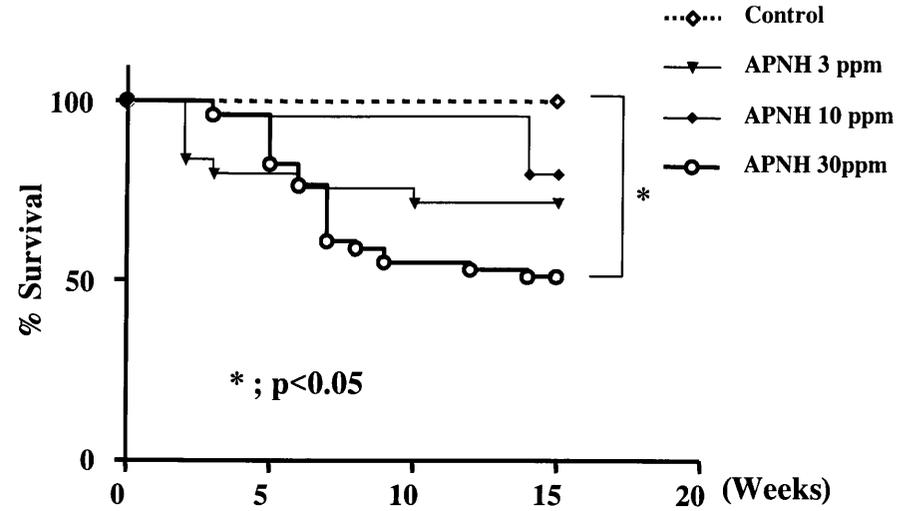


**Figure 7-C**

### *p53 (+/+)*

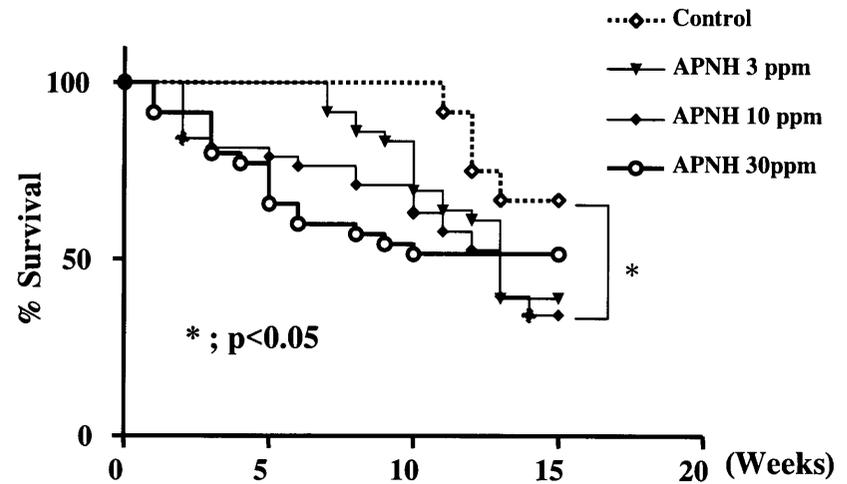


### *p53 (+/-)*



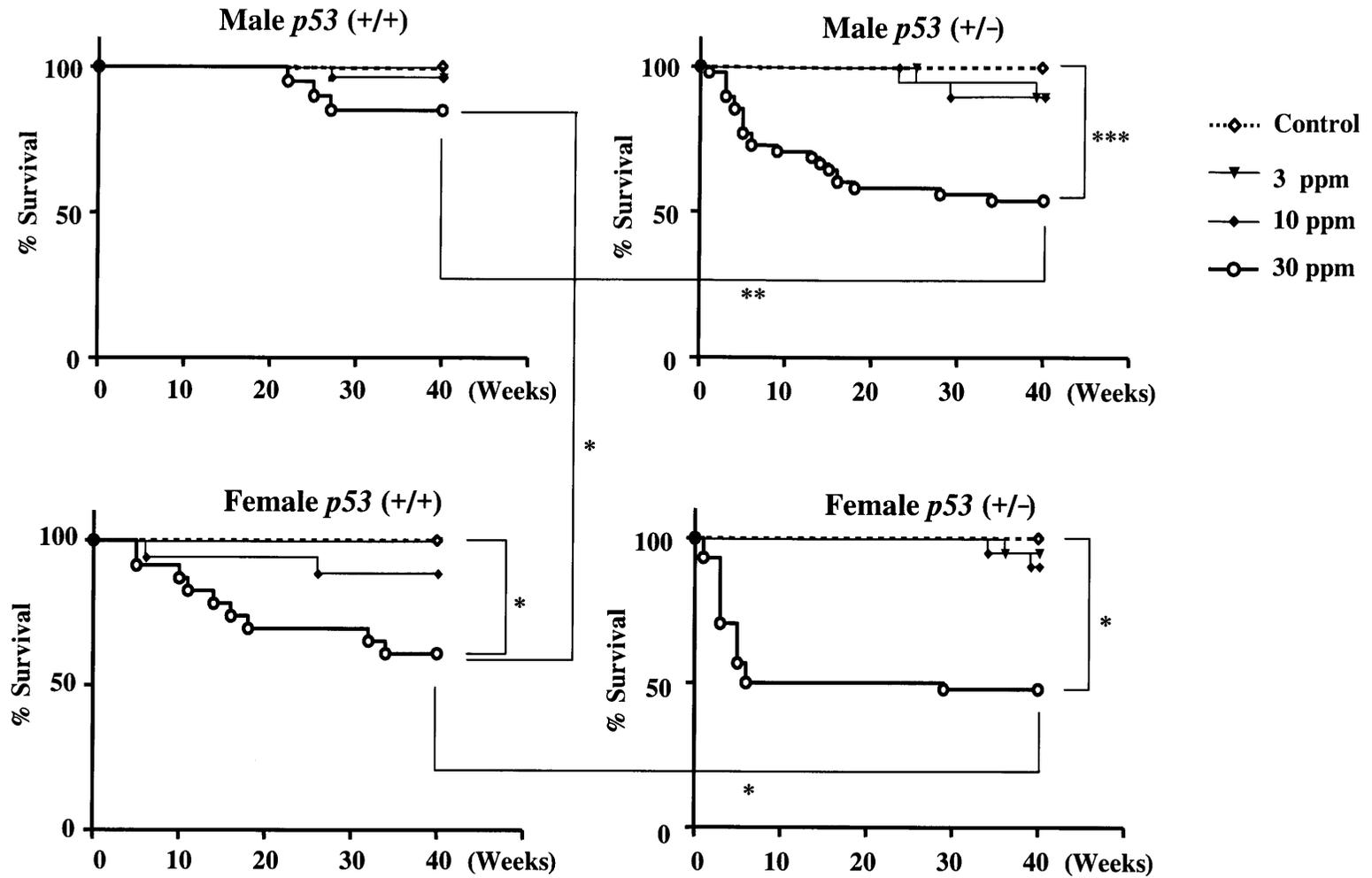
\*\*\* :  $P < 0.001$   
\*\* :  $P < 0.01$   
\* :  $P < 0.05$

### *p53 (-/-)*



Survival curves of *p53 (+/+)* mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH, *p53 (+/-)* mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH, *p53 (-/-)* mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH. At week 15, all remaining mice were sacrificed. The death rate of *p53 (-/-)* and *(+/-)* mice treated with 30 ppm of APNH were significantly higher than that of respective control group.

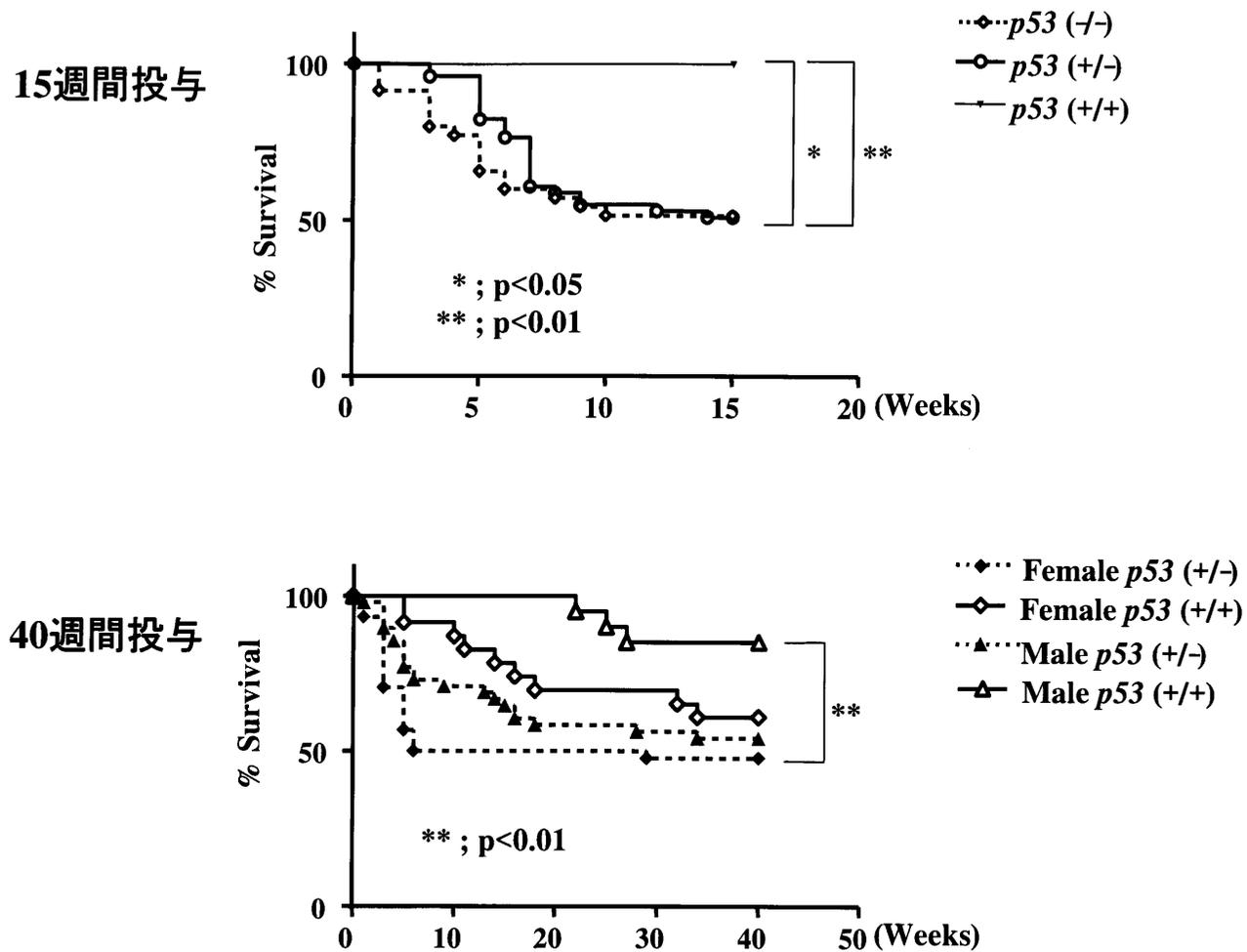
## Figure 8



**Figure 9**

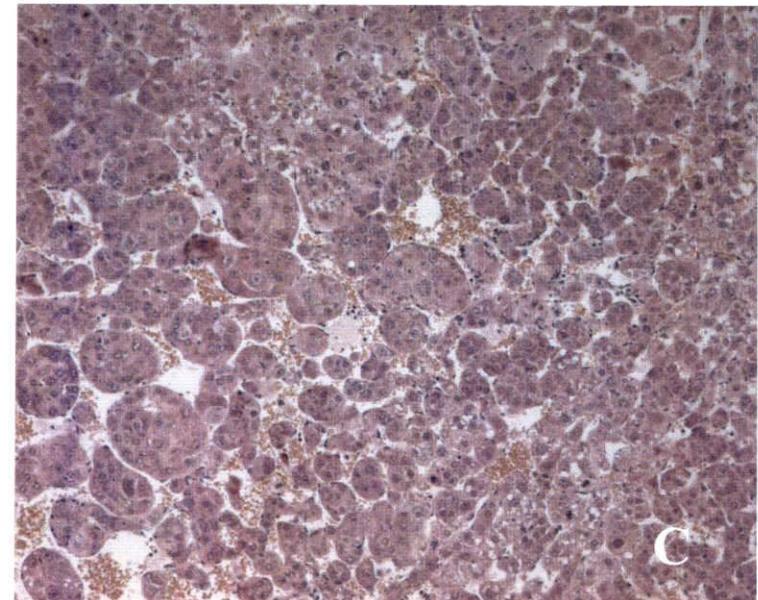
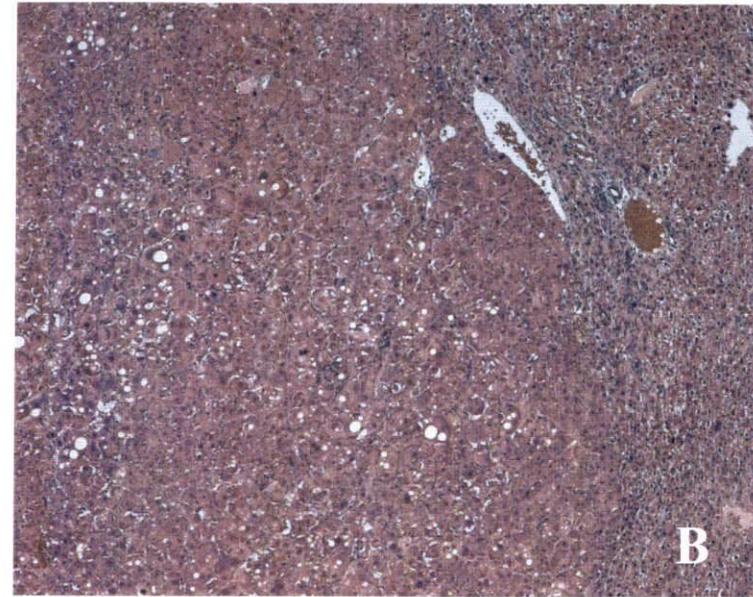
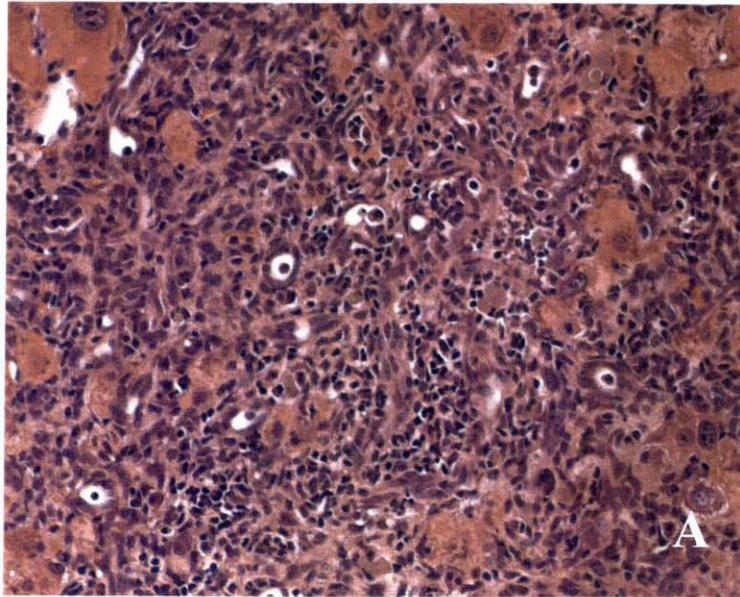
Survival curves of *p53* (+/-) male mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH, *p53* (+/+) male mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH, *p53* (+/-) female mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH and *p53* (+/+) female mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH. At week 40, all remaining mice were sacrificed

\*\*\* :  $P < 0.001$   
\*\* :  $P < 0.01$   
\* :  $P < 0.05$



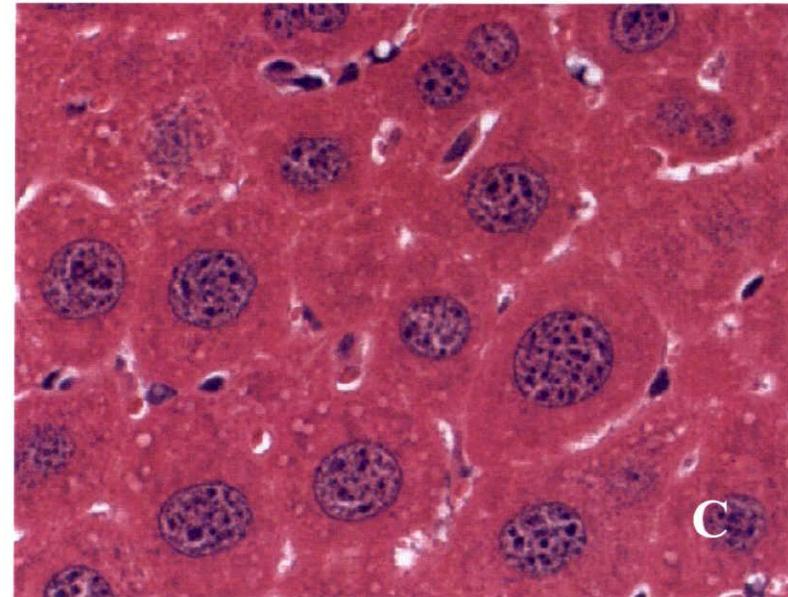
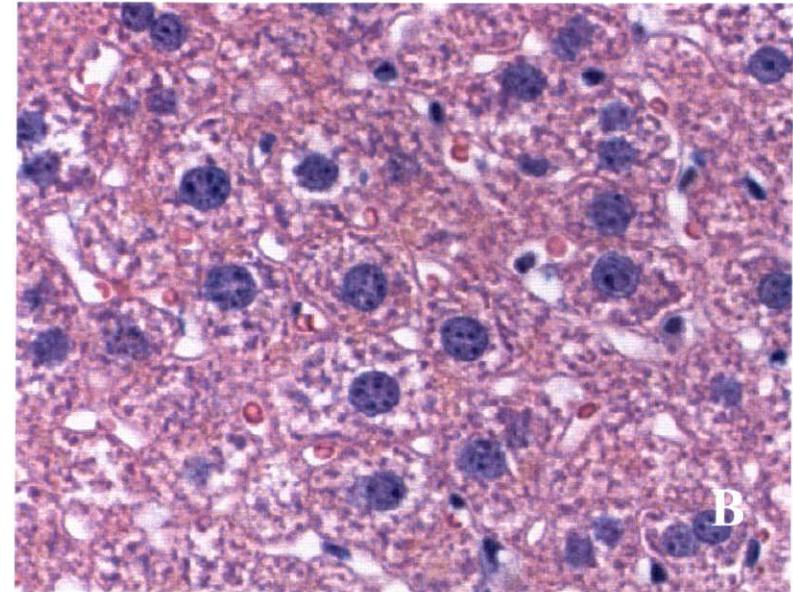
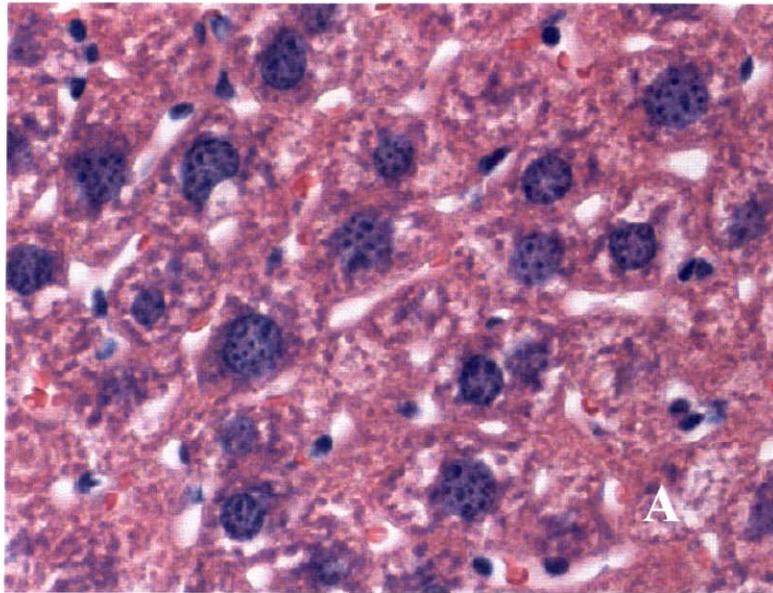
*p53*(+/+), (+/-) and (-/-) mice treated with 30 ppm of APNH for 15 weeks. The death rate of *p53*(-/-) and (+/-) mice treated with 30 ppm of APNH were significantly higher than that of *p53*(+/+) mice treated with 30 ppm of APNH. *p53*(+/+) and (+/-) male and female mice treated with 30 ppm of APNH. The death rate of *p53* (+/-) female mice treated with 30 ppm of APNH was significantly higher than that of *p53* (+/+) male mice treated with 30 ppm of APNH.

**Figure 10**



**Photographs of oval cell hyperplasia at 200x (A), hepatocellular adenoma at 50x (B) and hepatocellular carcinoma at 100x (C) in the liver of *p53* (+/-) mice treated with APNH.**

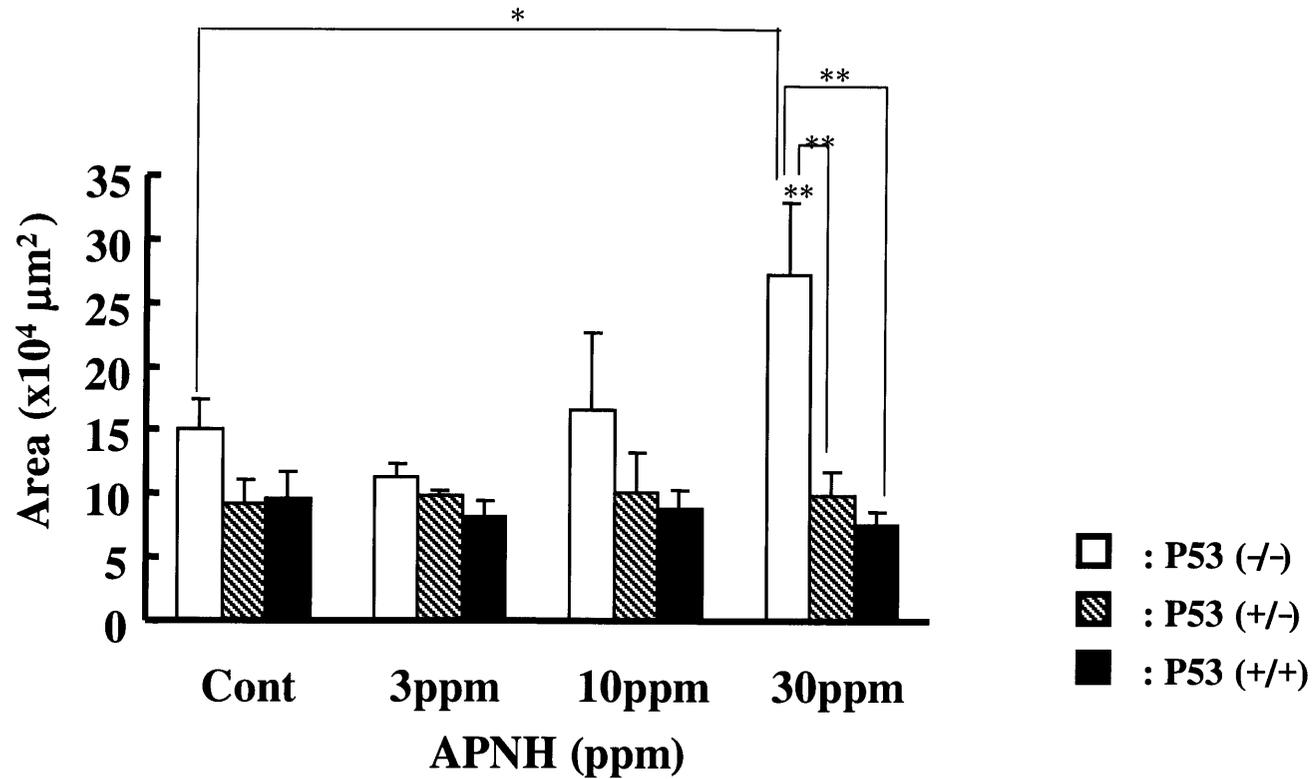
**Figure 11**



Photographs showing normal hepatic structures of a *p53* (-/-) control mouse at 400x (A) and a *p53* (+/+) mouse treated with 30 ppm of APNH at 400x (B), and liver with anisonucleosis of a *p53* (-/-) mouse treated with 30 ppm of APNH at 400x (C).

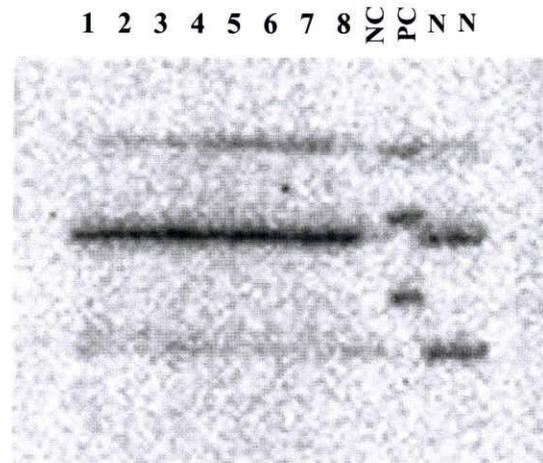
**Figure 12**

\*; p<0.05  
\*\*; p<0.001  
\*\*\*; p<0.0001



**Figure 13**

The mean area of hepatocellular nucleus of *p53* (+/+), (+/-) and (-/-) male mice treated with 30, 10 or 3 ppm APNH for 15 weeks.  
The mean area of hepatocellular nucleus of *p53* (-/-) male mice treated with 30 ppm of APNH was significantly higher than that of *p53* (+/+), (+/-) male mice treated with 30 ppm of APNH and *p53* (-/-) control male mice.



**Figure 14**

**Representative result of PCR-SSCP analysis of *p53* exon 7. Lane 1 – 8 hepatocellular carcinoma from *p53* (+/-) treated with APNH. NC; negative control, PC; positive control, N; normal tissue of liver.**

## 第三章

Aminophenylnorharman のマウス肝臓におけるチトクローム P450 の誘導と

発がん性の関連性の解明

## 【緒言】

第一章でのイニシエーション作用に基づいた肝臓における中期発がん性試験 (*in vivo* five-week initiation assay) において, APNH の経口投与により雄 F344 ラットに投与用量相関性に GST-P 陽性肝細胞巣が誘導され, 発がん過程におけるイニシエーション活性が認められた。さらにプロモーション処置を施さない群においても GST-P 陽性肝細胞巣が誘導されたことから肝標的性も示唆された。また, 第二章では, *p53* がん抑制遺伝子を機能消失させた *p53* KO マウスに APNH を 15 週間あるいは 40 週間混餌経口投与したところ, 投与用量に相関して肝臓に OCH, Foci, HCA および HCC 等の多彩な病変が観察された。しかし, *p53* (+/+) と (+/-) マウスの 40 週間の経口投与において, 2 種の遺伝子型間に発がん性の差はみられず, 誘導された肝腫瘍性病変を PCR-SSCP 法にて解析した結果においても *p53* 遺伝子の変異は検出されなかった。したがって, APNH の肝発がんにおいて, *p53* がん抑制遺伝子の変異との関連性は低いと考えられた。一方, 同実験により, 遺伝子型に関わらず, 雄に比較し雌でより多くの腫瘍発生が認められることから, 肝臓における代謝活性の雌雄差と関連性が推察された

芳香族アミン, polycyclic aromatic hydrocarbon や nitrosamine 等の化学発がん物質は, 生体内でチトクローム P450 (CYP) などの異物代謝酵素による活性化

を受けて、発がん性を獲得した究極発がん物質へと変換される間接型発がん物質、あるいは発がん前駆物質である(69)。ヘテロサイクリックアミンも間接型発がん物質であり、生体内で CYP による活性化を受けて、発がん性を示すようになる。したがって、代謝活性化がその発がん性に大きく影響すると考えられる。生体内での発がん性物質代謝活性化に大きな役割を担う CYP は複数のアイソザイムからなりそれぞれのアイソザイムの特性や誘導が器官、動物種、性別によって異なっており(110, 114)、化学発がん物質のがん原性は、動物種、性別などにより変化する CYP の特性に依存して、同一物質であってもそれぞれ異なることが予想される。ヘテロサイクリックアミンの実験動物に対する発がん性は、動物種、系統により、その強度や標的器官は異なることが知られている(85)。MeIQx は、マウスでは肝臓および前胃に対し発がん性を示すが、ラットでは Zymbal 腺、口腔、結腸、皮膚および乳腺に対し発がん性が認められる(89)。また、Trp-P-1 や Trp-P-2 などのヘテロサイクリックアミンは、雄マウスに比較し雌マウスに対し、より強い肝臓の発がん性を示すことが報告されている(13)。肝臓において、CYP1A アイソザイムがヘテロサイクリックアミンの代謝活性化に関与すると考えられている(1)。

APNH に投与により *p53* KO マウスに誘発された肝腫瘍の発生が、性差に関連して認められたこととヘテロサイクリックアミンの代謝活性化に CYP が関

与することに着目し,本章では APNH 投与による CYP 誘導の性差と APNH のがん原性との関連性について検索した。

## 【実験材料および実験方法】

### 1. 供試動物

第二章に用いた Donehower ら(16) によって作出された C57BL/6 を遺伝的背景にもつ *p53* KO マウスを用いた。12 時間の照明サイクル下で、木製チップを敷いたプラスチックケージ内で飼育した。餌は Oriental NMF (オリエンタル酵母, Tokyo, Japan), 飲料水は水道水をそれぞれ自由摂取させた。遺伝子型解析も第二章に準じて行った。

### 2. 試薬

APNH は S9 mix 存在下で, norharman と aniline より生成した。生成方法は, 第一章に準じた。

### 3. 実験方法

実験プロトコールを Figure 15 に示した。APNH 30, 10, 3 および 1 ppm を混入した飼料は日本クレア (Tokyo, Japan) に製造委託したものを購入した。また, 粉末基礎飼料 (CA-1 日本クレア, Tokyo, Japan) は APNH を 100 ppm 混入させ, 調整後 APNH 混餌飼料とした。各濃度段階の混餌飼料は, 投与まで 4 °C で保存

した。APNH 混餌飼料 (APNH 100, 30, 10, 3 および 0 ppm) を 5 週齢の *p53* (+/+), (+/-) および (-/-) 雌雄マウスに 7 日間投与した。給餌方法は自由摂取とした。雌雄それぞれの遺伝子型のマウスに対照群を設け、基礎飼料 (CA-1 日本クレア, Tokyo, Japan) のみを与えた。投与開始時および投与終了時に体重を測定した。投与 7 日目に生存例全例について、安楽殺後剖検し、肝臓を採取した後に、重量を測定した。また、肝臓の左葉を 3-5 mm の厚さに横断した後、さらに 1mm 角の立方体に細切し、液体窒素にて急速凍結、-80°C で保存した。

#### 4. 病理組織学的検索

剖検時採取した肝臓の左葉、中間葉および右葉から各 1 片、中間葉は胆嚢を含めて 3-5 mm の厚さに切り出し、4% 中性リン酸緩衝液パラホルムアルデヒド水溶液にて固定した。固定後、肝臓をパラフィンで包埋し、薄切の後、HE 染色を施し、鏡検した。

#### 5. Reverse transcription (RT)-PCR 法によるマウス肝腫瘍における CYP 1A アイソザイム mRNA の発現

マウス肝腫瘍の発生と CYP1A アイソザイムの発現の関連性を調べるために、第二章において実験に供した APNH 混餌飼料 (APNH 30, 10, 3 および 0 ppm)

を 40 週間投与した *p53* (+/+) および (+/-) 雌雄マウスのうち肝細胞癌あるいは肝細胞腺腫が発生し、PCR-SSCP 法にて検索した *p53* (+/+) マウス 25 例、*p53* (+/-) マウス 23 例の腫瘍および各遺伝子型の対照群の肝臓を用い RT-PCR 法で CYP1A アイソザイムの発現を調べた。RNA 抽出用の肝臓組織は、剖検時に肝臓左葉を 3-5 mm の厚さに横断した後、さらに 1mm 角の立方体に細切、液体窒素にて急速凍結し、RNA 抽出まで -80°C で保存したものを用いた。

凍結肝臓組織を TRIZOL Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いて総 RNA を抽出し、1 µg の総 RNA に DNase I (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を 1 µl 加え、室温で 15 分間混入 DNA の分解処理を行った。次に 1 µg の総 RNA に Oligo dT プライマーを加え、65°C 5 分間インキュベートした後、逆転写酵素 (Superscript-II reverse transcriptase, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を加え cDNA を合成した。合成した cDNA は、 $\beta$ -actin および CYP アイソザイムそれぞれの特異的なプライマー(79)と Amplitaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 0.025 U/l および緩衝液を混合し、20 µl の反応液を調製した。MgCl<sub>2</sub> の濃度は CYP1A1 および  $\beta$ -actin では 1.5 mM, CYP1A2 では 3mM とした。PCR は酵素活性化のため 95°C で 10 分間インキュベートした後、denature, annealing および extension の各ステップをそれぞれ 94°C 1 分間、55°C 1 分間、72°C 1 分間の条件にて、CYP 1A1 は 22 回、CYP1A2 および  $\beta$ -actin

は30回でPCRを行った。それぞれのPCR産物をエチジウムブロマイド添加2%アガロースゲル (Takara, Ohtsu, Japan) で電気泳動した。反応生成物の確認は、紫外線イルミネーター下にて行った。

## 6. リアルタイム RT-PCR 法による APNH 混餌暴露後のマウス肝臓における CYP 1A アイソザイム mRNA の半定量的解析

APNH 混餌暴露後のマウス肝臓における CYP1A アイソザイムの発現の変化を調べるために、APNH 混餌飼料を7日間投与した雌雄 *p53* (+/+), (+/-) および (-/-) マウスの凍結肝臓組織を用いた。

凍結肝臓組織を TRIZOL Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA) を用いて総 RNA を抽出し、上記と同様な方法で cDNA を合成した。

CYP1A1 および 1A2 の半定量的 PCR は LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を使用し、恒常的に肝細胞で発現する acidic ribosomal phosphoprotein PO (ARP) (57) を内部標準として用いた。PCR は SYBR Green PCR Core Reagents kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、Tsukamoto ら(106) および Simpson ら(83) の報告に従った。cDNA 1  $\mu$ l, dATP, dCTP および dGTP を各 20  $\mu$  M, dUTP 400  $\mu$  M, それぞれに特異的な 5'プライマーと 3'プライマー, Amplitaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA,

USA) 0.025 U/l および緩衝液を混合し、20  $\mu$ l の反応液を調製した。MgCl<sub>2</sub> の濃度は CYP1A1 では 1.5 mM, CYP1A2 および APR では 3mM とした。各プライマーの塩基配列は Table 6 に示した。PCR は酵素活性化のため 95°C で 10 分間インキュベートした後、denature, annealing および extension の各ステップをそれぞれ 95°C 30 秒, 55°C 30 秒 72°C 30 秒にて行った。増幅は 50 サイクル行った。SYBR Green の蛍光は各サイクルの extension の終わりに測定した。それぞれの PCR 終了後には、2% アガロースゲルにて、非特異的な増幅がないことを確認した。各アイソザイムの発現量は、PCR 指数増加期の任意の蛍光強度において LightCycler により測定した CYP アイソザイムのサイクル数と内部標準 ARP のサイクル数との割合から、対照群の平均値を基準として算出した。

#### 7. <sup>32</sup>P ポストラベリング法による肝臓における DNA 付加体の検索

APNH 3, 10, 30 および 100 ppm を 7 日間投与後の *p53* (+/+) 雌マウスの肝臓から病理組織学的検査および RT-PCR 用試料をそれぞれ採取後、残りの肝臓を液体窒素にて凍結し、DNA 抽出まで -80°C 凍結保存した材料を用いた。DNA は、Proteinase K (Boehringer Mannheim, Rotkreuz, Switzerland), RNase T1 (Calbiochem-Behring La Jolla, CA), RNase A (Sigma Chemical CO. St Louis, MO) によるタンパク質と RNA の除去後、フェノール、クロロホルム/イソアミル ア

ルコール (24:1 v/v) により抽出した。肝臓より抽出した DNA はマイクロコッカスヌクレアーゼ (Worthington Biochemical, Freehold, NJ) およびホスホジエステラーゼ II (Worthington Biochemical, Freehold, NJ) で処理し, Totsuka ら(100)の方法に従い,  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の改良付加体増感法 (modified adduct intensification condition) により  $^{32}\text{P}$  によりポストラベルした。 $^{32}\text{P}$  でポストラベルした試料をポリエチレンイミン (PEI) セルロース TLC シート (POLYGRAM CEL 300 PEI; Macherey-Nagel, Duren, Germany) へスポットした。DNA 付加体は, TLC シートをイメージングプレート (Fuji Film, Kanagawa, Japan) に暴露した後, Bio-Image (BAS 2000; Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan) により検出した。Relative adduct labeling (RAL) は Randerath ら(71)の方法に従い行った。各試料の測定値は, 3 回測定し, その平均値を算出した。

## 8. 統計解析

病理組織学的検査にける病変の発生頻度は Fisher の直接確立法, 生存曲線および統計学的解析は Kaplan-Meier 法および log rank 法を用いた(72)。測定値の統計解析には, 1 元配置の分散分析と多重比較 (Dunnett 法) を用いた。

## 【実験結果】

### 1. 体重, 肝重量および生存率

7日間投与後の体重と肝臓の体重に対する相対重量を Table 7 に示す。雄 *p53* (+/+), (+/-), (-/-), 雌 *p53* (+/+) および (+/-) 100ppm 投与群の最終体重は, それぞれの対照群と比較して有意な減少を示した ( $p < 0.05 \sim 0.0001$ )。それぞれの対照群の最終体重を 100%とした場合, 100 ppm 投与群各遺伝子型の最終体重は, 雄 *p53* (+/+)マウスは 74.4%, *p53* (+/-) は 61.4%, *p53* (-/-) は 69.5%, 雌 *p53* (+/+)マウスは 74.5%, *p53* (+/-) は 75.0%, *p53* (-/-) は 86.4%であった。肝臓絶対重量は雄 *p53* (+/+, (+/-), (-/-), 雌 *p53* (+/+) 100 ppm 投与群で, それぞれの対照群と比較して有意な減少を示した。肝臓の比体重値は, *p53* (+/+) および (+/-) 雄マウス投与群では投与濃度依存性に減少傾向がみられ, *p53* (+/+) および (+/-) 雄マウスとも 100 ppm 投与群においては, 対照群と比較して統計学的に有意な減少が認められた ( $p < 0.001$ )。一方, 雌マウスでは, 各遺伝子型とも肝臓の比体重値の増加がみられ, *p53* (+/-) 各投与群および *p53* (-/-) の 30, 10, 3ppm 投与群において統計学的に有意な増加が認められた。最終体重と同様に対照群の肝臓の比体重値を 100%とした場合, 100 ppm 投与群各遺伝子型の肝臓の比体重値は, 雄 *p53* (+/+)マウスは 74.4%, *p53* (+/-) 78.8%, *p53* (-/-) は 101.6%, *p53* (+/+) 雌マウスは

98.5%, *p53* (+/-) は 119.5%および *p53* (-/-) は 111.3%であった。

APNH を 100, 30, 10 および 3mg/kg の投与用量で *p53* (+/+), (+/-) および(-/-) マウスに投与したところ、全群において死亡例は認められなかった。

## 2. 病理組織学的検索

7日間混餌経口投与により誘発された病変を Table 8 にまとめた。APNH の 7日間投与により雌 *p53* (-/-)マウス 100 ppm 投与群の肝小葉周辺性に OCH を伴う壊死が認められた。7日間投与によって誘発された OCH は、第2章の15週間投与試験の 30ppm 群と同様に淡青色楕円形の核をもち、少量の塩基性細胞質をもつ小型の円形から楕円形の細胞が門脈域を中心に浸潤性の増殖が認められた (Figure 16)。他の群の肝臓に器質的な変化は認められなかった。

## 3. APNH 誘発マウス肝腫瘍における CYP 1A アイソザイム mRNA の発現

対照群を含め CYP1A1 および CYP1A2 mRNA の発現レベルはごくわずかであったが、APNH 30 ppm を 40 週間混餌投与した *p53* (+/+)雌マウス 1 例に CYP1A1 mRNA の発現亢進が認められた (Figure 17)。この個体は肝臓に HCC が観察された。

#### 4. 短期間 APNH 混餌暴露後のマウス肝臓における CYP 1A アイソザイム mRNA の発現

APNH を 7 日間投与した *p53* KO マウスの肝臓における CYP1A1 および 1A2mRNA の発現量を、内部標準とした ARP の発現量で校正し、0ppm 群の平均値、すなわち発現が誘導されていない状態を 0 とした時の各群の結果を Figure 18 に示した。

100 ppm 投与群の雌 *p53* (+/+), (+/-), (-/-) マウスおよび雄 *p53* (+/-), (-/-) マウスにおいてそれぞれの対照群と比較して CYP1A1 mRNA の発現量の有意な増加が認められ(雌 *p53* (+/+);  $p < 0.05$ , 雌 *p53* (+/-);  $p < 0.001$ , 雌 *p53* (-/-);  $p < 0.0001$ , 雄 *p53* (+/-);  $p < 0.0001$ , 雄 *p53* (-/-)  $p < 0.0001$ ), 雌 *p53* (+/+), (+/-) および (-/-), マウスにおける CYP1A1 mRNA の発現量はほぼ用量に相関していた (Figure 18-A)。また、雌 *p53* (-/-) マウスでは、100, 30, 10 および 3 ppm 投与群の全てにおいて対照群と比較して CYP1A1 mRNA 発現量の有意な増加が認められた。雌雄 APNH 30 ppm 投与群の各遺伝子型間の比較において、*p53* (-/-) 雌マウスの CYP1A1 mRNA 発現量は、*p53* 全遺伝子型の雄マウスにそれに比較して、有意に高い値を示した。また、*p53* (+/-) 雌マウスの CYP1A1 mRNA 発現量は、*p53* (+/-) 雄マウスのそれに比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に高い値を示した (Figure 18-B)。

CYP1A2 mRNA の発現量では、APNH の投与群において、*p53* 遺伝子型の

違いによる有意な差は認められなかった (Figure 18-C)。

#### 5. 肝細胞における APNH-DNA 付加体の形成

APNH 3, 10, 30 および 100 ppm を 7 日間投与後の *p53 (+/+)* 雌マウスの肝臓 DNA の付加体レベルを Figure 19 に示した。基礎飼料のみを与えた *p53 (+/+)* 雌マウス対照群には、DNA 付加体は観察されなかった。APNH を混餌投与した群では、*p53 (+/+)*雌マウス 100 ppm 群の DNA 付加体は  $4.17 \pm 1.26$  (平均値 $\pm$ 標準偏差) adducts/ $10^7$  ヌクレオチド、30 ppm 群は  $1.08 \pm 10.22$  adducts/ $10^7$  ヌクレオチド、10 ppm 群は  $0.51 \pm 0.13$  adducts/ $10^7$  ヌクレオチド、3 ppm 群は  $0.19 \pm 0.06$  adducts/ $10^7$  ヌクレオチドと投与濃度依存性の増加が認められた。

## 【考察】

APNH の 15 週間あるいは 40 週間混餌経口投与により *p53* KO マウスに誘発された変化を確認するため、7 日間の混餌経口投与を行い、APNH の肝臓における代謝について検討した。

肝臓の代謝を検討するため雌雄 *p53* (+/+), (+/-)および(-/-)マウスに APNH を 100, 30, 10 および 3 ppm の割合で基礎飼料に混合し、7 日間投与した。雌雄各遺伝子型の対照群には基礎飼料のみを与えた。投与終了時の体重は、100 ppm 投与群ではそれぞれの対照群の 61.4~86.4%であり、雌雄全ての遺伝子型で減少傾向がみられた。これは APNH の毒性によるものと考えられた。

肝臓の病理組織学的検査では、15 週間および 40 週間投与において観察された変化と本質的に同様な OCH が *p53* (-/-)雌マウスに観察された。7 日間投与で *p53* (-/-)マウスのみ OCH が観察されたことで、*p53* (-/-)マウスが APNH の毒性作用に対する高い感受性を有していることがより強く示唆された。また、主に門脈領域のみに oval cell の浸潤が認められたことから、肝発がん過程の初期段階(23)と相当すると考えられた。

一般的に、環境中の前発がん物質の多くは、肝臓をはじめ腎臓、肺、結腸など種々の臓器(90)で複数の P450 薬物代謝酵素の触媒作用により活性化され、

最終的に発がん作用をもつ代謝物に代謝される(28, 31)。ヘテロサイクリックアミンの場合は、一般的に CYP 1A1, 1A2 による代謝活性化が知られている。また、肝臓におけるヘテロサイクリックアミンの代謝活性化には、ヒトでは CYP 1A2 (29, 30, 49, 65, 78), ラット, マウスで CYP1A2 (7, 14, 24, 34)の関与が報告されている。一方、肝化学発がん物質はその発がん過程において肝臓に過形成結節を誘発し、それら過形成結節では、さまざまな酵素の偏倚が認められ、特にチトクローム P450 は活性の上昇を起こす酵素の1つで、上昇により発がんを促進すると考えられている (34)。予め dimethylnitrosamine および 2-acetylaminofluorene を投与し、肝臓に過形成結節を誘発した F344 ラットにチトクローム P450 誘導物質を投与すると、肝臓の過形成結節発達に付随して過形成結節内の CYP1A1 の増加が認められ、CYP1A2 は相反して減少した(14)。今回の実験で、APNH 30 ppm を 40 週間混餌投与し、肝臓の HCA が観察された *p53* (+/+) 雌マウス 1 例に CYP1A1 mRNA の発現の増強が認められ、CYP1A2 mRNA の発現にはほとんど変化が認められなかったことは、発がんの後期を想定した Degawa ら(14)の研究とよく一致する。

さらに APNH の発がん性と CYP との関連について検索するため、発がんの初期段階を想定して APNH をごく短期間の 7 日間投与し、肝臓の CYP 1A1 および 1A2 mRNA の誘導について調べた。雌雄マウスに APNH 100, 30, 10 お

よび 3 ppm の投与量で 7 日間投与し CYP1A1 および 1A2 mRNA 発現について解析したところ、CYP 1A1 mRNA 発現量の増加が雌の全ての遺伝子型と雄の *p53* (+/-), (-/-) の 100 ppm 投与群で認められた。30 ppm 投与群においては CYP1A1 mRNA 発現量は、全ての遺伝子型で雄に比較して雌で高い傾向が認められた。また、雌 *p53* KO マウスの 100, 30, 10 および 3 ppm 投与群の全てにおいて対照群と比較して CYP1A1 mRNA 発現量の有意な増加が認められた。CYP1A2 mRNA の発現については、APNH の投与量、*p53* 遺伝子の遺伝子型による差は認められなかった。

前述のように肝臓におけるヘテロサイクリックアミンの代謝活性化には CYP1A2 の関与が報告されているが、APNH を *p53* の KO マウスに短期間投与した場合 CYP 1A1 mRNA が発現の増加を示したことから、発がんの初期段階での肝臓におけるヘテロサイクリックアミンの代謝活性化に CYP 1A1 関与の可能性が示唆された(40)。Hashimoto ら(35)および Degawa ら(13) は、マウスでの肝発がん性において雄に比較して雌でより高感受性を示す 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) を去勢した雄マウスに投与したところ、肝臓 S9 の活性が雌と同様に増加したことから、CYP の発現が雄のアンドロジェンレベルにより調節されている可能性があるとして報告している。*p53* KO マウスに APNH を投与すると、Hashimoto ら(35)の報告と同様に、雄に比較して雌で CYP

1A1 mRNA 発現の増加が認められ、*p53* KO マウスの APNH による肝発がんにおける雌の高感受性も同様に代謝およびホルモン環境に起因することが示唆された。

APNH 投与による肝臓の DNA 付加体形成を *p53* (+/+) 雌マウスに APNH 100, 30, 10 および 3 ppm を 7 日間投与した後、<sup>32</sup>P-ポストラベリング法にて検索したところ DNA 付加体は APNH 投与濃度に相関して上昇した。

*In vitro* の実験において変異原性を有しない norharman は、同じく変異原性を有しない aniline の共存下で S9 mix に代謝されることにより APNH が生成される。APNH はさらに S9 mix の代謝により N-水酸化され N-hydroxy-aminophenylnorharman (N-OH-APNH) へ変化し (66), APNH と N-OH-APNH は *S. Typhimurium* YG1024 に対し同様の DNA 付加体を形成する (99)。F344 ラットに APNH 40 ppm を 4 週間混餌経口投与し、肝臓、腎臓、肺、結腸、精巣について APNH-DNA 付加体の形成を調べたところ、DNA 付加体の TLC シート上のパターンは *in vitro* 場合とほぼ同様のスポットとして観察され、その DNA 付加体レベルは結腸および肝臓で高く、肝臓では  $1.31 \pm 0.26$  adducts/ $10^7$  ヌクレオチドを示した (101)。投与量の相違も考慮に入れると、*p53* KO マウスを用いた本実験で得られた肝臓組織の DNA 付加体レベルとほぼ同様であると考えられる。*p53* KO マウスを用いた混餌投与試験で肝臓にさまざまな増殖性病変

が観察されたことから APNH-DNA 付加体は、肝臓前癌病変、肝増殖性病変に関与することが示唆された(40)。現時点では、観察された DNA 付加体の詳細な構造を示す報告はないが、変異原性などの生物学的特性を考慮すると他のヘテロサイクリックアミンと同様 Guanine との付加体と考えられる(99, 108)。

Norharman と aniline は我々の生活環境中に広く存在し、この 2 つの化学物質はそれぞれヒトの尿、母乳中に検出されている(5, 12, 73, 109)。F344 ラットに norharman と aniline をそれぞれ 90mg/kg 経口投与し、投与直後から 24 時間採取した尿中に APNH  $19.6 \pm 16.9$  ng が検出された。また、norharman と aniline 混合し、代謝系としてヒト肝臓マイクロソーム分画を用いて培養することにより、APNH が合成されることが確認された(100)。

ヒトの日常生活において norharman と aniline に暴露されることは避けがたく、APNH は常に体内で生成されていると考えられる。APNH の発がん性の解明はヒトの健康保持に多大な貢献すると考えられる。

## 【要約】

9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (Aminophenylnorharman, APNH)は, S9 mix 存在下で norharman と aniline の反応によって生成される新規ヘテロサイクリックで, *Salmonella Typhimurium* TA98 と YG1024 に変異原性を有する。イニシエーション作用に基づいた肝臓における中期がん原性試験 (*In vivo* five-week initiation assay) では, 10, 3 および 1 mg/kg の APNH を経口投与により肝部分切除処置後の F344 雄ラットに投与用量相関性の glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性巣の増加が認められた。また, *p53* ノックアウト (KO) マウスを用いた検索では, 肝発がん性が示唆されたが, APNH の肝発がん性は, *p53* がん抑制遺伝子の変異との関連性は認められなかった。

本実験では, APNH の肝発がん性と肝臓における APNH の代謝, DNA 付加体形成について *p53* KO マウスを用いて検索を行った。

5 週齢雌雄 *p53* KO マウス, すなわち *p53* (-/-), (+/-) および (+/+), に 100, 30, 10 および 3 ppm の APNH を 7 日間混餌経口投与した後, 安楽死させ剖検し, 肝臓について検索した。APNH 混餌投与により, *p53* (-/-)雌マウス 100ppm 投与群の肝臓に oval cell hyperplasia(OCH)が観察された。100 ppm 投与群の *p53* (+/+), (+/-), (-/-) 雌マウスおよび *p53* (+/-), (-/-) 雄マウスにおいてそれぞれの対照群と

比較して CYP1A1 mRNA の発現量の有意な増加が認められた。100 および 30ppm 投与群では、同遺伝子型の雄に比較して雌マウスで発現量が多く、さらに、*p53* (-/-)雌マウスは、*p53* (+/+)および(+/-)雌マウスに比較し有意に高い発現量を示した。また、*p53* (+/+)雌マウスの肝臓での付加物形成は、投与濃度に依存した増加を示した。

これらの結果から *p53*KO マウスの APNH におよる肝発がん と肝臓における CYP1A1 による APNH の代謝活性化との関連性が示唆された。

**Table 6. PCR primer for realtime reverse transcription (RT)-PCR analysis using a LightCycler**

| <b>Target gene</b> |                  | <b>Primer Sequence</b>                |
|--------------------|------------------|---------------------------------------|
| <b>CYP 1A1</b>     | <b>sense</b>     | <b>5'- CAGATGATAAGGTCATCACGA -3'</b>  |
|                    | <b>antisense</b> | <b>5'- TTGGGGA-TATAGAAGCCATTC -3'</b> |
| <b>CYP 1A2</b>     | <b>sense</b>     | <b>5'- CAGTATCCAAGACATCACAAG -3'</b>  |
|                    | <b>antisense</b> | <b>5'- TGTGTATCGGTAGATCTCCAG -3'</b>  |
| <b>ARP</b>         | <b>sense</b>     | <b>5'-CAGACAACGTGGGCTCCAAGCAGA-3'</b> |
|                    | <b>antisense</b> | <b>5'-CCCCGGATGTGAGGCAGCAGTTT-3'</b>  |
| <b>Bata-actin</b>  | <b>sense</b>     | <b>5'- ATGGAT-GACGATATCGCT -3'</b>    |
|                    | <b>antisense</b> | <b>5'- ATGAGGTAGTCTGTCAGGT -3'</b>    |

Table 7-A.

Male body weight and absolute liver weight of *p53* knockout mice treated with aminophenylnorharman for 7 days

| Sex  | p53<br>geno-type | APNH<br>(ppm) | Final body weight<br>(grams) | Absolute liver weight<br>(grams) | % Liver to body weight<br>ratio |
|------|------------------|---------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Male | (+/+)            | 0             | 22.9 ± 1.354                 | 1.43 ± 0.115                     | 6.27 ± 0.515                    |
|      |                  | 3             | 21.85 ± 1.488                | 1.33 ± 0.126                     | 6.09 ± 0.225                    |
|      |                  | 10            | 24.49 ± 0.734                | 1.49 ± 0.059                     | 6.01 ± 0.160                    |
|      |                  | 30            | 23.49 ± 0.892                | 1.25 ± 0.059*                    | 5.31 ± 0.057*                   |
|      |                  | 100           | 17.04 ± 0.779***             | 0.79 ± 0.025***                  | 4.66 ± 0.160**                  |
|      | ( +/- )          | 0             | 25.86 ± 1.481                | 1.60 ± 0.129                     | 6.16 ± 0.209                    |
|      |                  | 3             | 24.57 ± 0.818                | 1.39 ± 0.099*                    | 5.64 ± 0.241                    |
|      |                  | 10            | 25.68 ± 0.907                | 1.37 ± 0.118*                    | 5.32 ± 0.293                    |
|      |                  | 30            | 21.52 ± 5.971                | 1.09 ± 0.399                     | 4.93 ± 0.669                    |
|      |                  | 100           | 15.87 ± 1.764***             | 0.76 ± 0.093***                  | 4.85 ± 0.362**                  |
|      | (-/-)            | 0             | 24.43 ± 1.800                | 1.39 ± 0.024                     | 5.70 ± 0.473                    |
|      |                  | 3             | 24.70 ± 0.923                | 1.54 ± 0.111*                    | 6.23 ± 0.221                    |
|      |                  | 10            | 24.63 ± 0.657                | 1.49 ± 0.109                     | 6.03 ± 0.484                    |
|      |                  | 30            | 23.42 ± 1.195                | 1.43 ± 0.173                     | 6.07 ± 0.462                    |
|      |                  | 100           | 16.97 ± 2.958*               | 0.89 ± 0.116**                   | 5.30 ± 0.852                    |

Data indicate mean ± SD values.

Significantly different from the respective control group (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.001$ , \*\*\*;  $p < 0.0001$ ).

Table 7-B.

Female body weight and absolute liver weight of *p53* knockout mice treated with aminophenylnorharman for 7 days

| Sex    | p53<br>geno-type | APNH<br>(ppm) | Final body weight<br>(grams) | Absolute liver weight<br>(grams) | % Liver to body weight<br>ratio |
|--------|------------------|---------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Female | (+/+)            | 0             | 20.28 ± 1.519                | 0.96 ± 0.108                     | 4.73 ± 0.198                    |
|        |                  | 3             | 22.02 ± 2.333                | 1.21 ± 0.305                     | 5.66 ± 0.879                    |
|        |                  | 10            | 20.57 ± 1.244                | 1.28 ± 0.080*                    | 6.22 ± 0.108                    |
|        |                  | 30            | 16.86 ± 3.060                | 0.89 ± 0.287                     | 5.20 ± 0.759                    |
|        |                  | 100           | 15.10 ± 2.376*               | 0.65 ± 0.044**                   | 4.66 ± 0.058                    |
|        | ( +/- )          | 0             | 20.08 ± 1.14                 | 0.92 ± 0.124                     | 4.59 ± 0.466                    |
|        |                  | 3             | 21.50 ± 1.939                | 1.37 ± 0.164*                    | 6.35 ± 0.219**                  |
|        |                  | 10            | 19.64 ± 1.505                | 1.18 ± 0.108*                    | 6.02 ± 0.137*                   |
|        |                  | 30            | 21.54 ± 0.313*               | 1.27 ± 0.032*                    | 5.91 ± 0.087*                   |
|        |                  | 100           | 15.06 ± 0.930**              | 0.83 ± 0.053                     | 5.48 ± 0.040*                   |
|        | ( -/- )          | 0             | 16.67 ± 2.181                | 0.92 ± 0.124                     | 4.59 ± 0.466                    |
|        |                  | 3             | 19.71 ± 1.823                | 1.37 ± 0.164**                   | 6.35 ± 0.219*                   |
|        |                  | 10            | 18.36 ± 0.809                | 1.018 ± 0.108*                   | 6.02 ± 0.137*                   |
|        |                  | 30            | 18.56 ± 2.398                | 1.27 ± 0.032*                    | 5.91 ± 0.087*                   |
|        |                  | 100           | 14.40 ± 1.746                | 0.83 ± 0.053*                    | 5.48 ± 0.040                    |

Data indicate mean ± SD values.

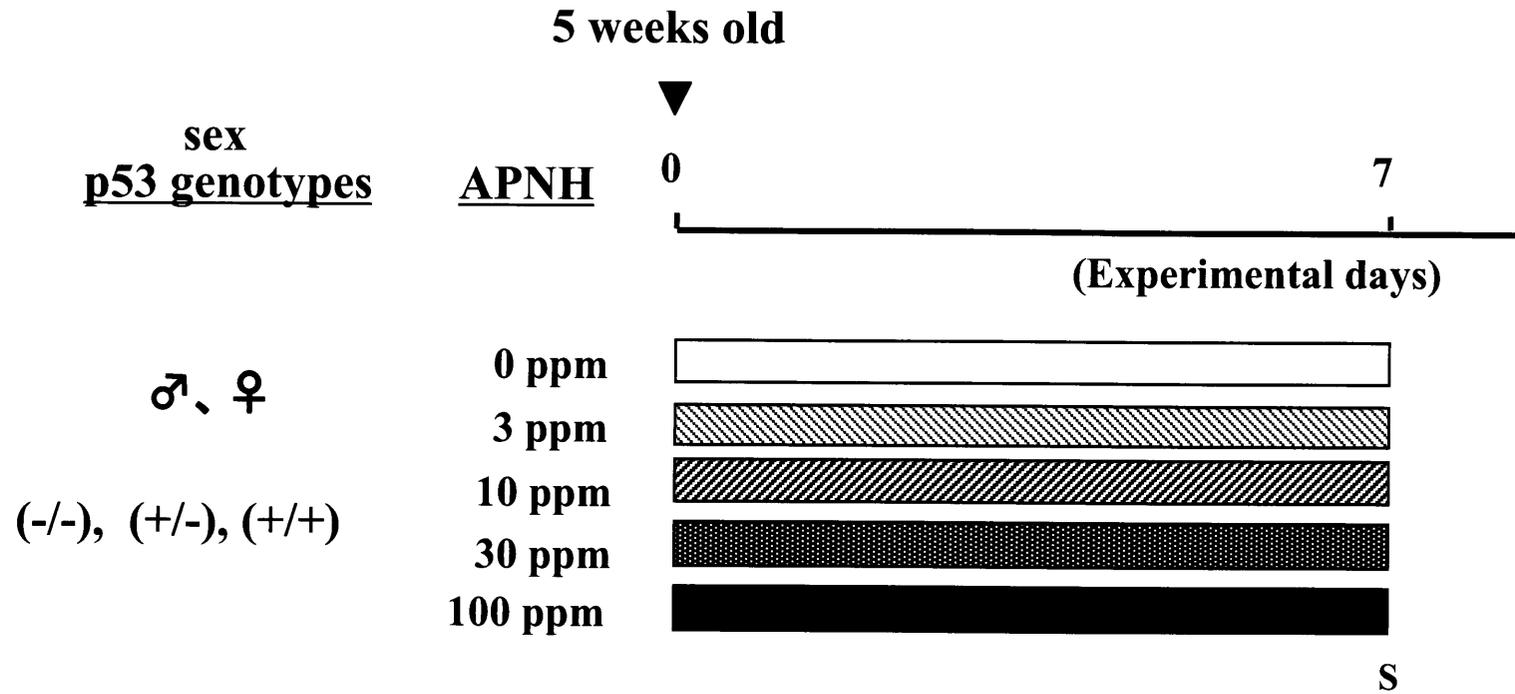
Significantly different from the respective control group ( $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.001$ , \*\*\*;  $p < 0.0001$ ).

**Table 8.**

**Lesion incidence of liver from *p53* knockout mice treated with aminophenylnorharman in for 15 weeks**

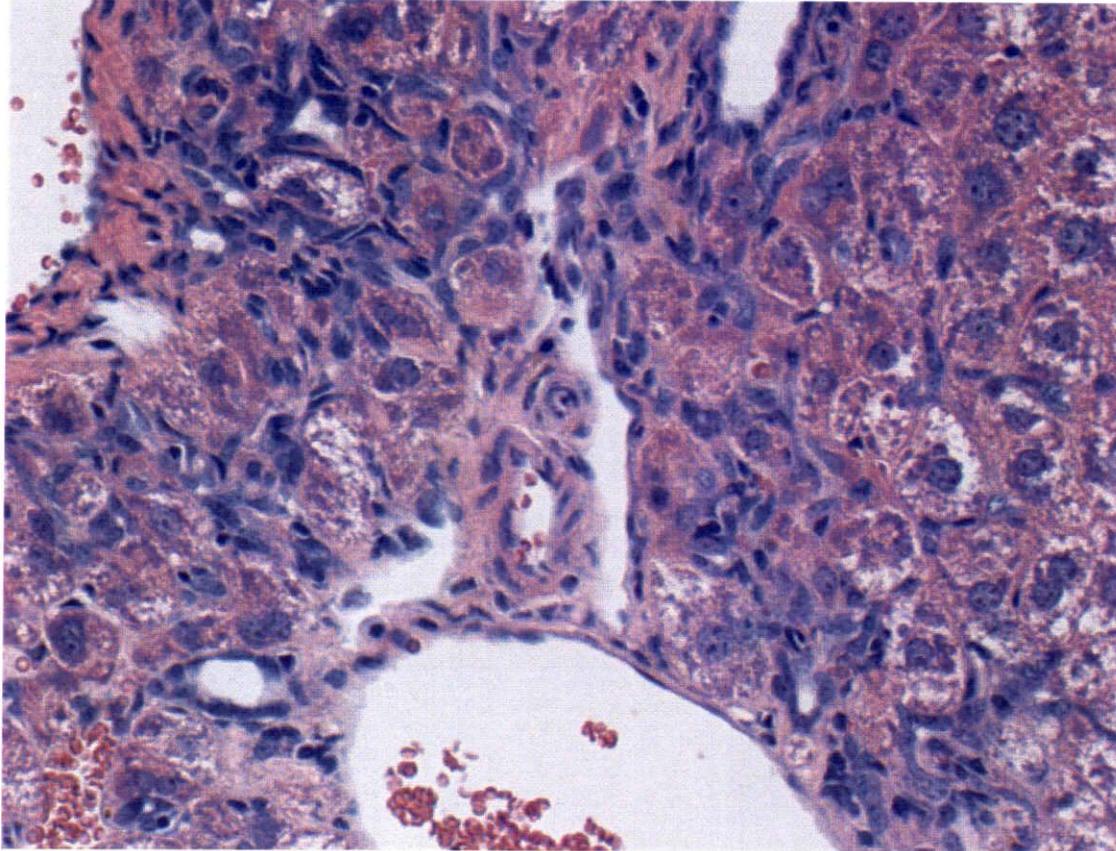
| sex    | p53<br>geno-type | APNH<br>(ppm) | No.<br>Animals | No. of mice with lesions<br>OCH <sup>a</sup> (%) |
|--------|------------------|---------------|----------------|--|
| Male   | (-/-)            | 0             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 3             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 10            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 30            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 100           | 4              | 0 (0)  |
|        | ( +/- )          | 0             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 3             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 10            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 30            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 100           | 4              | 0 (0)  |
|        | ( +/+ )          | 0             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 3             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 10            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 30            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 100           | 4              | 0 (0)  |
| Female | (-/-)            | 0             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 3             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 10            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 30            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 100           | 4              | 4 (100) <sup>b</sup>                             |
|        | ( +/- )          | 0             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 3             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 10            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 30            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 100           | 4              | 0 (0)  |
|        | ( +/+ )          | 0             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 3             | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 10            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 30            | 4              | 0 (0)  |
|        |                  | 100           | 4              | 0 (0)  |

**a: OCH: Oval cell hyperplasia, b: Significantly different from *p53*(-/-)female control;  $p < 0.05$  using the Fisher's exact test.**



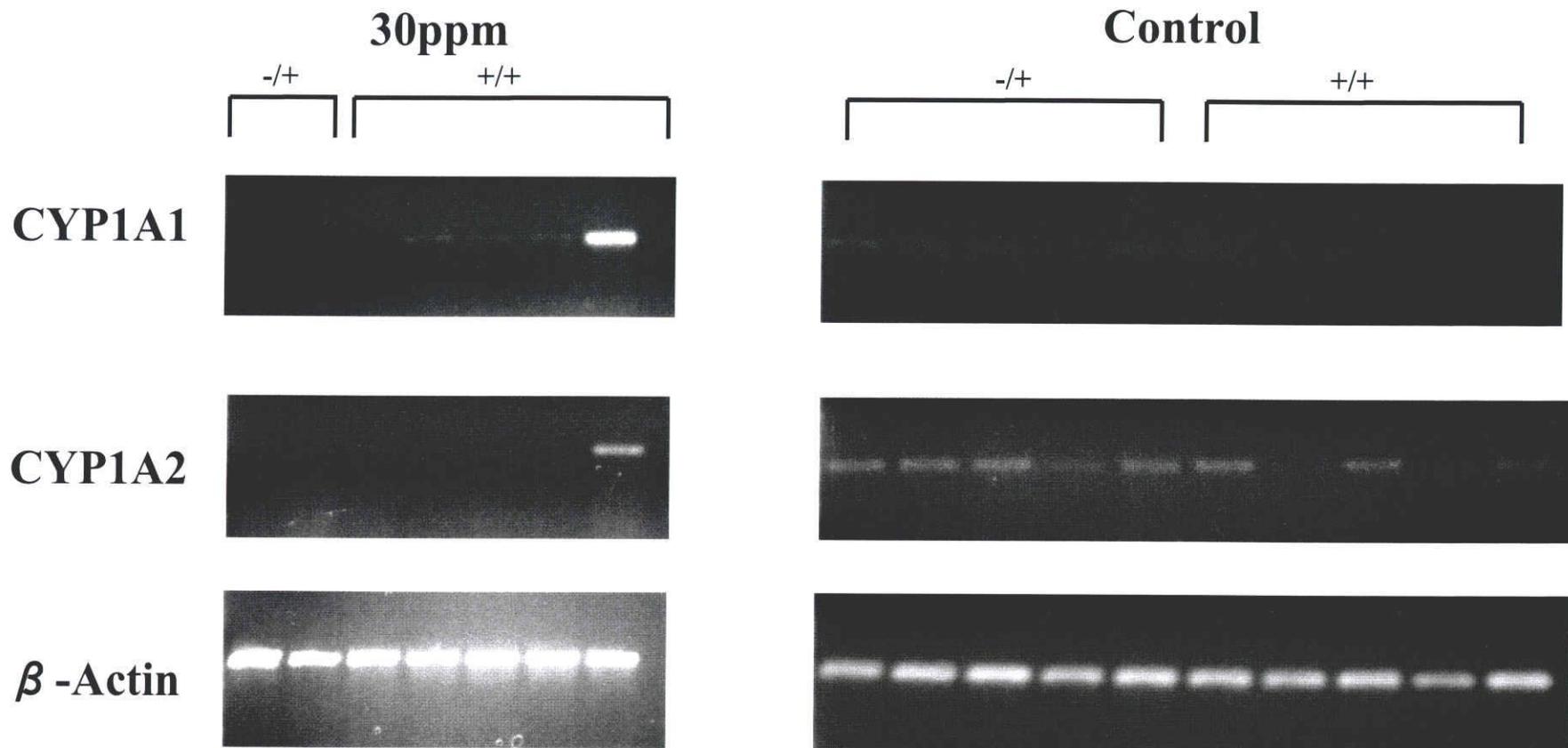
**Experimental design.** Five-week-old wild-type (+/+), heterozygous (+/-) and nullizygous (-/-) *p53* KO mice were used. APNH at 100, 30, 10 or 3 ppm and basal diet as control were given. APNH; aminophenylnorharman, S; sacrificed.

**Figure 15**



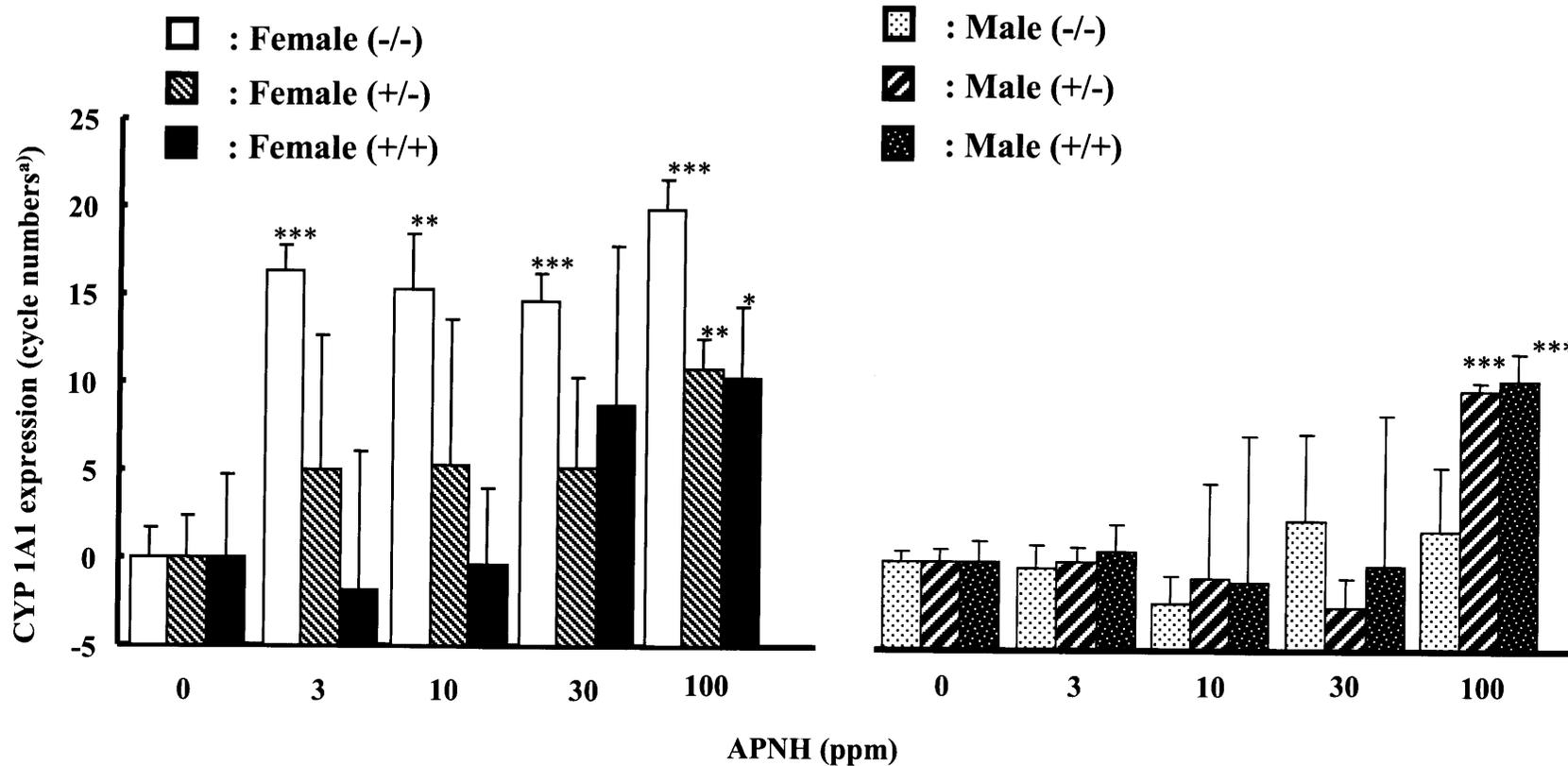
**Figure 16**

**Photographs of oval cell hyperplasia at 200x in the liver of *p53* (-/-) mice treated with 100 ppm of APNH.**



**Figure 17**

CYP 1A1 and CYP 1A2 m RNA gene expression in the liver of *p53* (+/-) and (+/+) with and without APNH treatment. One-microgram aliquots of RNA extracted from liver of control and APNH treated mice of the two genotypes were reverse-transcribed and analyzed by PCR using specific primers for the CYP 1A1, CYP 1A2 and  $\beta$ -actin genes.

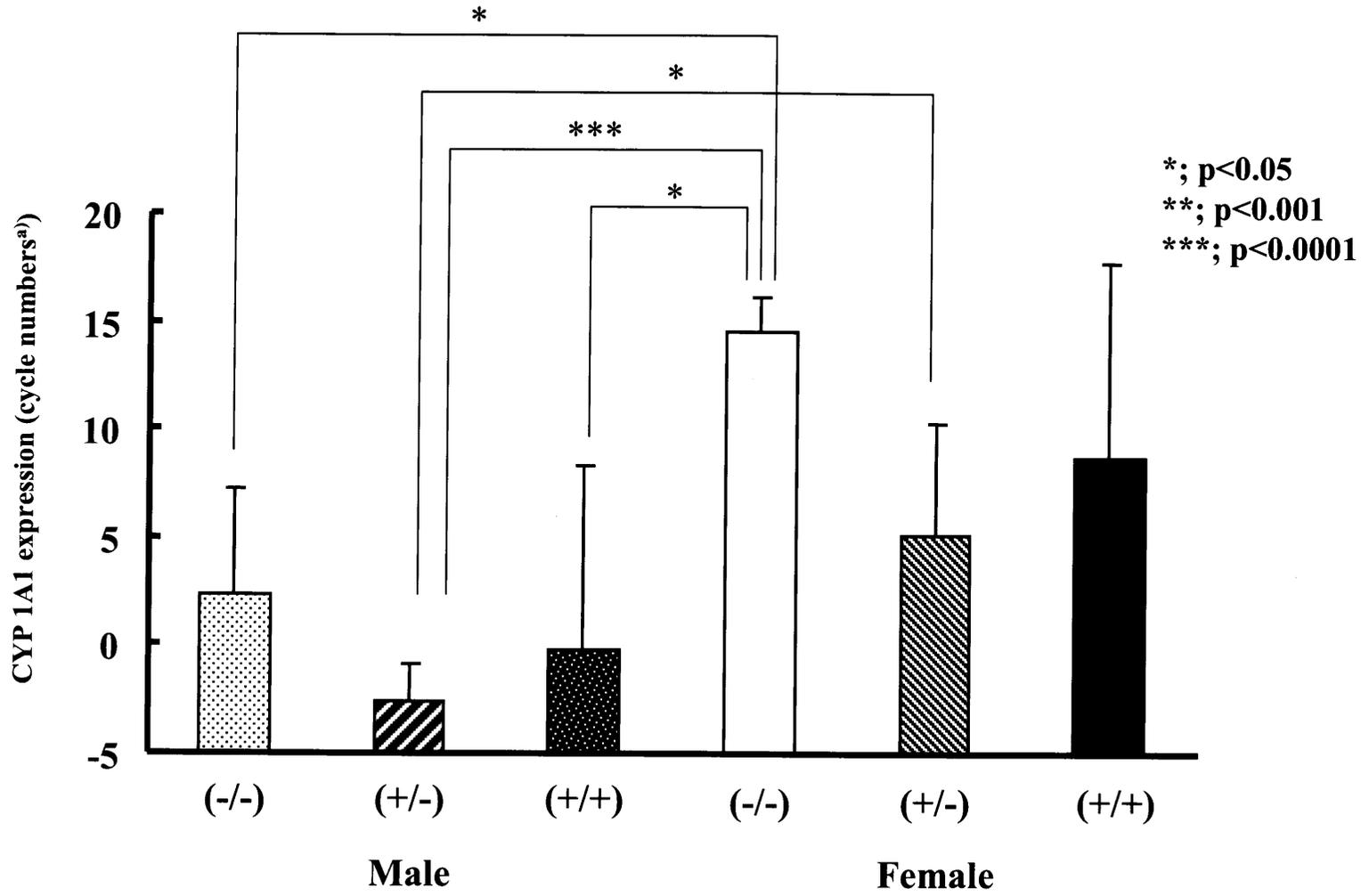


Significantly difference from respective control; \* :  $P < 0.05$  , \*\* :  $P < 0.001$  , \*\*\*;  $p < 0.0001$

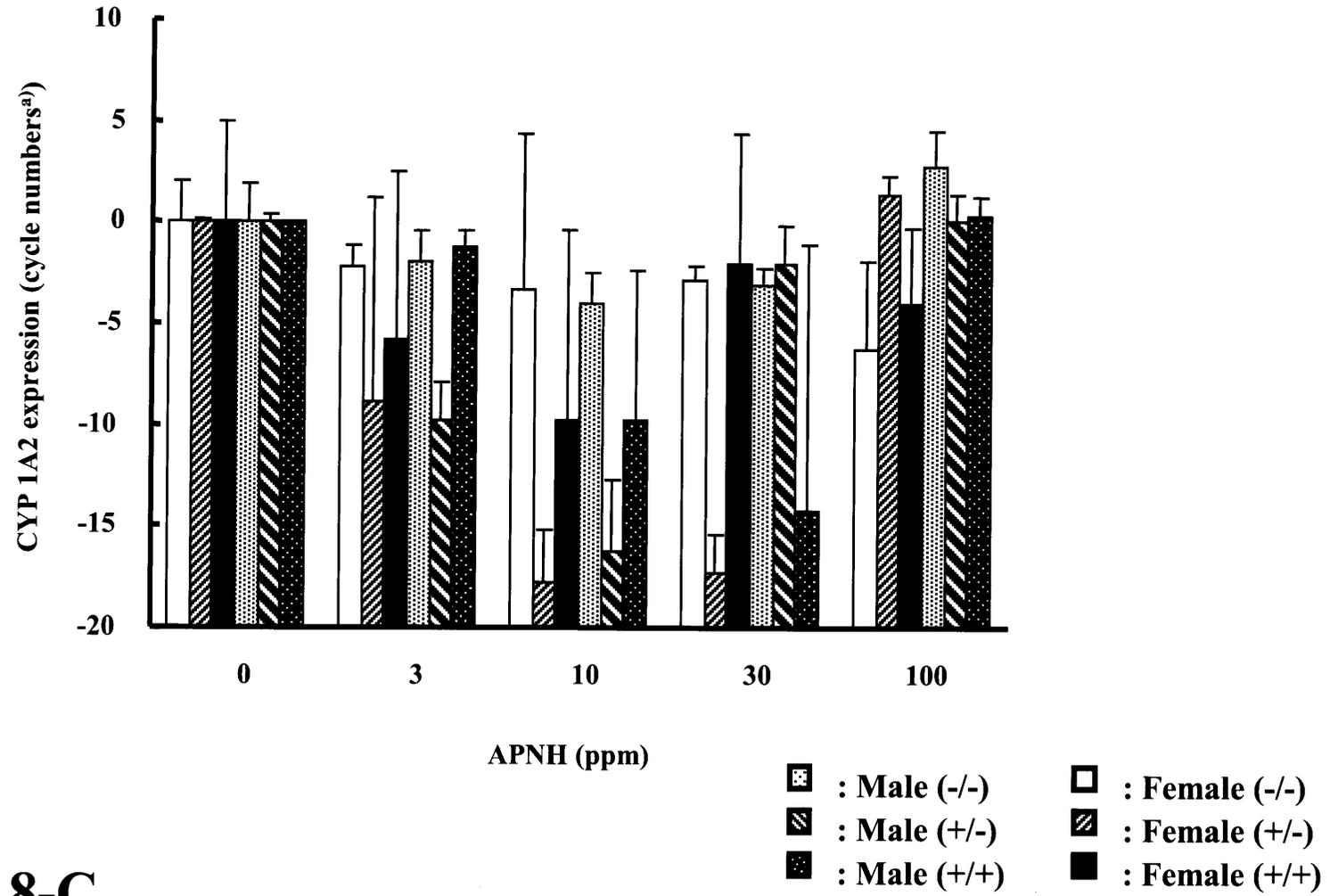
## Figure 18-A

Relative quantitation of CYP 1A1 normalized with respect to ARP in livers of three genotypes male and female mice treated with APNH for 7 days (A) and both sexes of three genotypes mice treated with 30 ppm of APNH for 7 days (B). Relative quantitation of CYP 1A2 normalized with respect to ARP in livers of both sexes three genotypes mice treated with APNH for 7 days (C).

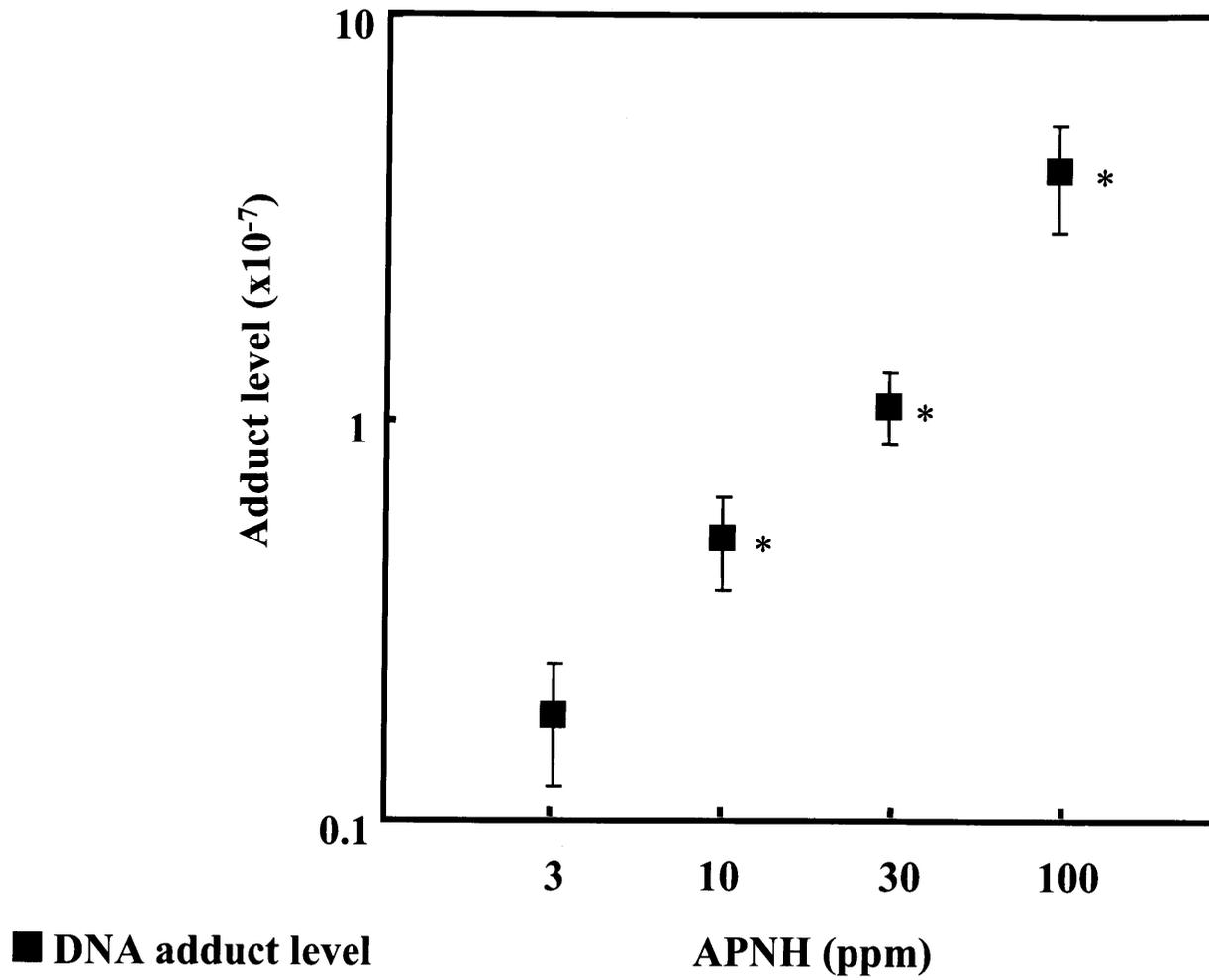
a ; Data are expressed by the cycle numbers of each enzyme relative to that of controls.



**Figure 18-B**



**Figure 18-C**



**Figure 19**

DNA adduct formation in liver from *p53* (+/+) female mice treated with APNH for 7 days

## 【結論】

本研究では、新規ヘテロサイクリックアミン aminophenylnorharman (APNH) を用いイニシエーション作用に基づいた肝臓における中期がん原性試験 (*In vivo* five-week initiation assay) および遺伝子改変動物を用いた発がん性試験を行い、APNH の発がん性について検討し、さらに APNH の代謝と発がんとの関連性について解析した。本研究は大きく分けて、以下の3つの研究からなる (Figure 20)。

第1に、イニシエーション作用に基づいた肝臓における中期がん原性試験 (*in vivo* five-week initiation assay) により APNH の発がん過程におけるイニシエーション活性の検索を行った。

その結果、肝臓の glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性巢面積の検索において、APNH を投与していない対照群と比較して、10mg/kg b.w.投与群、3mg/kg b.w.投与群および 1mg/kg b.w.投与群に用量相関性の増加が認められた。GST-P 陽性巢数においては、APNH 投与群、APNH を投与しない対照群に比較して有意な増加がみられた。これらのことより、APNH が発がん過程においてイニシエーション活性を有することが示唆された。さらに、APNH 10mg/kg b.w.投与後 2-AAF, CCl<sub>4</sub> 処置を行わない群では、GST-P 陽性巢面積が APNH を投与しない対照群に比較して有意な増加を示したことから、APNH の肝臓に対する標

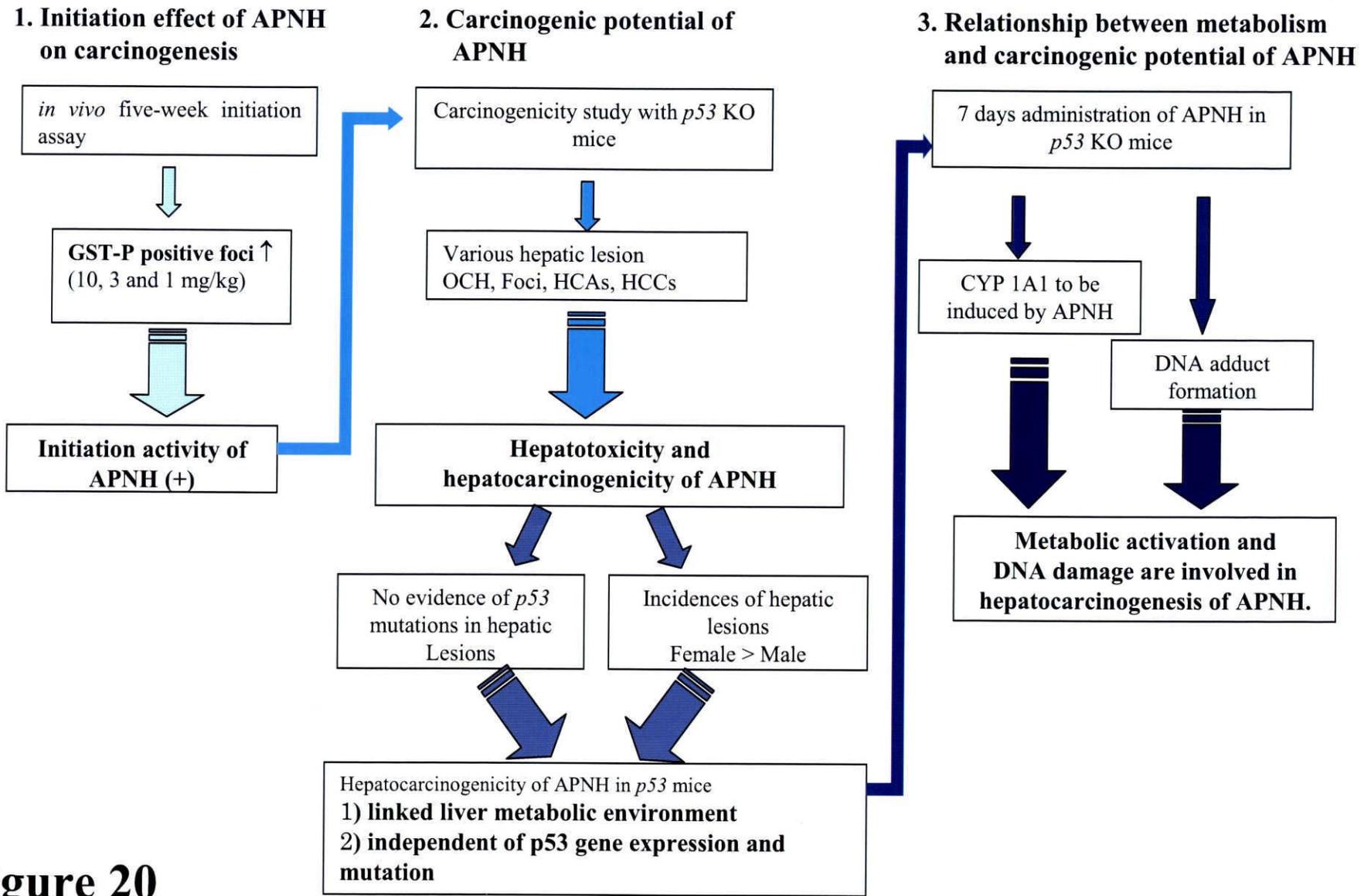
的性も強く示唆された。

第2に、APNHの発がん性と*p53*がん抑制遺伝子の関係について、*p53*がん抑制遺伝子を欠損した*p53*ノックアウト (KO) マウスを用いて検索を行った。

その結果、APNH混餌投与により肝臓に oval cell hyperplasia (OCH), altered cell foci (Foci), 肝細胞腺腫(HCA), 肝細胞癌(HCC)等の多彩な病変が観察された。APNH投与15週後では肝臓のOCHがAPNH 30ppm投与群の*p53* (-/-), *p53* (+/-) および *p53* (+/+)マウスにそれぞれ 2/14 (14.3%), 14/23 (60.9%) および 2/10 (20%)観察された。APNH投与40週後の安楽殺例では、HCCがAPNH 30ppm投与群の雌*p53* (+/-)マウス 16/46 (34.8%) および雌*p53* (+/+)マウス 10/27 (37.0%)に認められた。しかし、雄*p53* (+/-)および*p53* (+/+)マウスに観察されたHCCは、それぞれ 1/45 (2.2%)および 2/12 (16.7%)であった。40週屠殺例*p53* (+/-)および*p53* (+/+)マウスに観察された腫瘍の*p53*がん抑制遺伝子 exon 5 から 8 について、PCR-single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP法)により検索したところ、*p53*がん抑制遺伝子の変異は認められなかった。

これらの結果からAPNHの*p53* KOマウスに対する標的臓器は肝臓であり、APNHの肝発がん性が示唆された。APNHの肝発がん性は、*p53*がん抑制遺伝子の変異との関連性は低く、雌でより多くの腫瘍発生が認められることから代謝あるいはホルモン環境との関連性が考えられた。

第3に, 肝臓でのチトクローム P450 (CYP)による代謝と APNH による肝臓腫瘍形成との関連性について検討し, さらに, APNH の肝臓における DNA 付加体の意義についても検討した。APNH による *p53* KO マウスにおける肝臓腫瘍形成は *p53* がん抑制遺伝子の有無に影響されないが, APNH 投与により肝臓の CYP 1A1 mRNA が誘導されることが明らかになった。さらに, 肝臓において, APNH 投与濃度依存性に DNA 付加体が増加した。以上のことから, 肝臓腫瘍形成に CYP 1A1 による APNH の代謝活性化が関与することが示唆された。



**Figure 20**

新規に認められた含窒素芳香族異項環化合物aminophenylnorharmanの発がん性に関する実験腫瘍病理学的研究

## 【謝辞】

本研究を終えるにあたり、終始御指導と御高閲を賜った岐阜大学大学院連合獣医学研究科の柵木利昭教授，松井高峯教授，岡田幸助教授，三森国敏教授，丸尾幸嗣教授に謹んで感謝の意を表します。

また，本研究を進めるにあたり懇篤な御指導と御助言を頂きました愛知県がんセンター研究所立松正衛副所長，および腫瘍病理学部の塚本徹哉室長，山本昌美技師，岐阜大学応用生物科学部家畜病理学教室柳井徳磨助教授および酒井洋樹助手に深甚なる謝辞を表します。

本研究の遂行に際し，終始暖かい御理解御協力を頂いたファイザー株式会社中央研究所堀井郁夫博士，浜田悦昌博士，橘 正克博士および関係者各位に深く感謝いたします。

## 【参考文献】

1. Adamson, R. H., Thorgeirsson, U. P., Sugimura T. (1996). Extrapolation of heterocyclic amine carcinogenesis data from rodents and nonhuman primates to humans. *Archives of Toxicology. Supplement.* 18, 303-318.
2. Aitio, A., Aitio, M. L., Camus, A. M., Cardis, E. and Bartsch, H. (1991). Cytochrome P-450 isozyme pattern is related to individual susceptibility to diethylnitrosamine-induced liver cancer in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 146-156.
3. Ames, B. N. and Gold, L. S. (1998). The causes and prevention of cancer: The role of environment. *Biotherapy.* 11, 205-220.
4. Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 357, 539-545.
5. Bayoumy, K. E., Donahue, J. M., Hecht, S. S. and Hoffmann, D. (1986). Identification and quantitative determination of aniline and toluidine in human urine. *Cancer Res.* 46, 6064-6067.
6. Burns, W. A., Wander, Weide, G., Goldstein, L. I. and Chan, C. H. (1974). Cytoplasmic crystalline regions in hepatocytes of liver biopsy specimens. *Archives of Pathology.* 97, 43-45.

7. Buter, J. T., Tang, B. K., Pineau, T., Gelboin, H. V., Kimura, S. and Gonzalez, F. J. (1996). Role of CYP 1A2 in caffeine pharmacokinetics and metabolism: studies using mice deficient in CYP 1A2. *Pharmacogenesis*. 6, 291-296.
8. Constan, A. A., Yang, R. S., Baker, D. C. and Benjamin, S. A. (1995). A unique pattern of hepatocyte proliferation in F344 rats following long-term exposures to low levels of a chemical mixture of groundwater contaminants. *Carcinogenesis*. 16, 303-310.
9. Cook, J. W., Hewett, C. L. and Hieger, I. (1933). The isolation of cancer-producing hydrocarbon from coaltar. Parts I, II and III. *J. Chem. Soc.* 395-405.
10. Dass, S. B., Bucci, T. J., Heflich, R. H. and Casciano, D. A. (1999). Evaluation of the transgenic *p53*<sup>+/-</sup> mouse for detecting genotoxic liver carcinogens in a short-term bioassay. *Cancer Lett.* 143, 81-5.
11. Datt, S. and Bhattacharyya, P. (2001). Effect of a harbal protein CI-1, purified from *Carjanus indicus* on the ultrastructural study of hepatocytes, in models of liver failure in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 77, 11-18.

12. DeBruin, L. S., Pawliszyn, J. B. and Josephy, P. D. (1999). Detection of monocyclic aromatic amines, possible mammary carcinogenesis, in human milk. Chem. Res. Toxicol. 12, 78-82.
13. Degawa, M., Kojima, M. and Hashimoto, Y. (1985). Sex-dependent induction of hepatic enzymes for mutagenic activation of a tryptophan pyrolysate component, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, by feeding in mice. Cancer Res. 45, 96-102.
14. Degawa, M., Miura, S. and Hashimoto, Y. (1991). Expression and induction of cytochrome P450 isozymes in hyperplastic nodule of rat liver. Carcinogenesis. 12, 2151-2156.
15. Doll, R. (1977). Strategy for detection of cancer hazards to man. Nature. 265, 589-596.
16. Donehower, L. A. (1996). The *p53*-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. Semin. Cancer Biol. 7, 269-278.
17. Donehower, L. A., Godly, L. A., Aldaz, C. M., Pyle, R., Shi, Y. P., Pinkel, D., Gray, J., Bradley, A., Medina, D. and Varmus, H. E. (1996). The role of *p53* loss in genomic instability and tumor progression in a murine mammary cancer model. Prog Clin Biol Res. 395, 1-11.

18. Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Butel, J. S. and Bradley, A. (1992). Mice deficient for *p53* are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature*. 356, 215-221.
19. Donehower, L. A., Harvey, M., Vogel, H., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Park, S. H., Thompson, T., Ford, R. J. and Bradley, A. (1995). Effects of genetic background on tumorigenesis in *p53*-deficient mice. *Mol. Carcinog.* 14, 16-22.
20. Esumi, H., Ohgaki, H., Kohzen, E., Takayama, S. and Sugimura, T. (1989). Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 1176-1178.
21. Evarts, R. P., Nagy, P., Marsden, E. and Thorgerirsson, S. S. (1987). A precursor-product relationship exists between oval cell and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis*. 8, 1737-1740.
22. Factor, V. M., Radaeva, S. A. and Thorgerirsson, S. S. (1994). Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am. J. Pathol.* 145, 409-422.

23. Farber, E. (1956) Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 16, 45-77.
24. Flammang, T. J, Von Tungeln, L. S., Kadlubar, F. F. and Fu, P. P. (1997). Neonatal mouse assay for tumorigenicity: alternative to the chronic rodent bioassay. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26, 230-240.
25. Giri, R. K. and Das, B. R. (1996). Differential expression of c-jun and c-myc in N-nitroso diethylamine-induced hepatic oncogenesis in AKR mice. *Cancer Letters.* 109, 121-127.
26. Grasl-Kraupp, B., Luebeck, G., Wagner, A., Löw-Baselli, A., de Gunst, M., Waldhor, T., Moolgavkar, S. and Schulte-Hermann, R. (2000). Quantitative analysis of tumor initiation in rat liver: role of cell replication and cell death (apoptosis). *Carcinogenesis.* 21, 1411-1421.
27. Gross, G. A., Turesky, R. J., Fay, L. B., Stillwell, W. G., Skipper, P. L. and Tannenbaum, S. R. (1993). Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings. *Carcinogenesis.* 14, 2313-2318.

28. Guengerich, F.P. (2000). Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 21, 345-351.
29. Guengerich, F. P., Humphreys, W. G., Yum, C. H., Hammons, G. J., Kadluber, F. F., Seto, Y., Okazaki, O. and Martin, M. V. (1992). Mechanisms of cytochrome P450 1A2-mediated formation of N-hydroxy arylamines and heterocyclic amines and their reaction with guanyl residues. *Princess Takamatsu Symp.* 23, 78-84.
30. Guengerich, F. P. and Shimada, T. (1991). Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 391-407.
31. Guengerich, F. P. and Shimada, T. (1998). Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat. Res.* 400, 201-213.
32. Harada, T., Enomoto, A., Boorman, G. A. and Maronpot, R. R. (1999). Liver and Gallbladder. *In: Maronpot RR, Boorman GA, Gaul BW, [eds] Pathology of the mouse.* pp. 119-183. Cache. River. Press, Vienna.
33. Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Butel, J. S., Bradley, A. and Donehower, L. A. (1993). Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in *p53*-deficient mice. *Nat. Genet.* 5, 225-229.

34. Hashimoto, Y. and Degawa, M. (1995). Induction of cytochrome P450 isoforms by carcinogenic aromatic amines and carcinogenic susceptibility of rodent animals. *Pharmacogenetics*. 5, S80-S83.
35. Hashimoto, Y., Degawa, M., Kojima, M. and Hishinuma, T. (1982). Induction of carcinogen activation enzyme(s) by feeding of a carcinogenic tryptophan pyrolysate correlates to sex difference in the carcinogenesis of mouse. *Gann*. 73, 508-510.
36. Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. and Harris, C. C. (1994). Database of *p53* gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucl Acids Res*. 22. 3551-3555.
37. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. C. (1991). *p53* mutations in human cancers. *Science*. 253, 49-53.
38. Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. (1981). Use of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 29,577-580.

39. Iidaka, T., Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M. (2004). Detection of initiation and promoting activity of aminophenylnorharman with a five-week *in vivo* initiation assay. *J. Toxicol. Pathol.* 17, 1-5.
40. Iidaka, T., Tetsuya, T., Totsuka, Y., Hirata, A., Sakai, H., Shirai, N., Yamamoto, M., Wakabayashi, K., Yanai, T., Masegi, T., Donehower, L. A. and Tatematsu, M. Lack of elevated liver carcinogenicity of aminophenylnorharman in *p53*-deficient mice. *Cancer Lett.* In Press.
41. International Agency for Research on Cancer (IARC). (1982). Aniline and Aniline Hydrochloride. *In: IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 27.* pp36-61. IARC Scientific Publications, Lyon.
42. International Agency Research Cancer (IARC). (1986). Tobacco Smoking. *In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals Humans, Vol. 38.* Int. Agency Res. Cancer, Lyon.

43. Ishii, K., Ando, M., Kamataki, T., Kato, R. and Nagao, M. (1980). Metabolic activation of mutagenic tryptophan pyrolysis products (Trp -P-1 and Trp-P-2) by a purified cytochrome P-450-dependent monooxygenase system. *Cancer Letters*. 9, 271-276.
44. Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama, S. and Sugimura, T. (1991). New colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*. 12, 1503-1506.
45. Ito, N., Imaida, K., Tamano, S., Hagiwara, A. and Shirai, T. (1998). Medium-term bioassays as alternative carcinogenicity tests. *J. Toxicol. Sci.* 23, 103-106.
46. Ito, N., Tsuda, H., Tatematsu, M., Inoue, T., Tagawa, Y., Aoki, T., Uwagawa, S., Kagawa, M., Ogiso, T., Masui, T., Imaida, K., Fukushima, S. and Asamoto, M. (1988). Enhancing effects of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats--an approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis*. 9, 387-394.

47. Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in *p53*-mutant mice. *Curr. Biol.* 4, 1-7.
48. Jezequel, A. M. and Orlandi, F. (1972). Fine morphology of human liver as a tool in clinical pharmacology. *In: Orlandi, F. and Jezequel, A. M. [eds] Liver and Drugs.* pp. 145-192. Academic Press, New York.
49. Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Matsuda, N., Ishii, K. and Kato, R. (1983). A high-spin form of cytochrome P-450 highly purified from polychlorinated biphenyl-treated rats. Catalytic characterization and immunochemical quantitation in liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* 24, 189-222.
50. Kawajiri, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1991). P450 and human cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 1325-1335.
51. Kawamori, T., Totsuka, Y., Ishihara, J., Uchiya, N., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2001). Induction of liver preneoplastic lesions by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline, in male F344 rats. *Cancer Lett.* 163, 157-161.
52. Kemp, C. J. (1995). Hepatocarcinogenesis in *p53*-deficient mice. *Mol. Carcinogen.* 12, 132-136.

53. Kemp, C. J., Donehower, L. A., Bradley, A. and Balmain, A. (1993). Reduction of *p53* gene dosage does not increase initiation or promotion but enhance malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell*. 74, 813-822.
54. Kobayashi, K., Mutai, M., Goto, K., Inada, K., Tsukamoto, T., Nakanishi, H. and Tatematsu, M. (1997). Effects of carbon tetrachloride administration on initiation of liver cell foci by the non-hepatocarcinogens N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and benzo(a)pyrene (B(a)P). *Cancer Lett.* 118, 55-60.
55. Kotsonis, F. N., Burdock, G. A. and Flamm, W. G. (1996). Food Toxicology, *In*: Klassen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J., [eds.] Casarett and Doull's Toxicology; The Basic Science of Poisons-5<sup>th</sup> ed., pp. 943-944. McGraw-Hill, New York.
56. Kress, S., Konig, J., Schweizer, J., Lohrke, H., Bauer-Hofmann, R. and Schwarz, M. (1992). *p53* mutations are absent from carcinogen-induced mouse liver tumors but occur in cell lines established from these tumors. *Mol. Carcinogen.* 6(2), 148-158.

57. Krowczynska, A. M., Coutts, M., Markrides, S. and Brawerman, G. (1989). The mouse homologue of the human acidic ribosomal phosphoprotein PO: a highly conserved polypeptide that is under translational control. *Nucleic Acids Res.* 17, 6408.
58. Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V. and Kastan, M. B. (1992). Wild-type *p53* is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 89, 7491-7495.
59. Levine, A. J. (1997). *p53*, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88, 323-331.
60. Luceri, F., Giuseppe, P., Moneti, G. and Dolara, P. (1993). Primary aromatic amine from side-stream cigarette smoke are common contaminants of indoor air. *Toxicol. Ind. Health.* 9, 405-413.
61. Mori, M., Totsuka, Y., Fukutomo, K., Yoshida, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1996). Formation of DNA adducts by the co-mutagen norharman with aromatic amines. *Carcinogenesis.* 17, 1499-1503.
62. Nagao, M., Ochiai, M., Ushijima, T., Watanabe, M., Sugimura, T. and Nakagama, H. (1998). Genetic determinant and environmental carcinogens. *Mutation Research.* 402, 85-91.

63. Nagao, M., Yahagi, T., Honda, M., Seino, Y., Matsushima, T. and Sugimura, T. (1977). Demonstration of mutagenicity of aniline and *o*-toluidine by norharman. Proc. Jpn. Acad. 53B, 34-37.
64. Nagao, M., Yahagi, T. and Sugimura, T. (1978). Differences in effects of norharman with various classes of chemical mutagens and amounts of S-9. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83. 373-378.
65. Oda, Y., Aryal, P., Terashita, T., Gillam, E. M. J., Guengerich, F. P. and Shimada, T. (2001). Metabolic activation of heterocyclic amines and other procarcinogens in *Salmonella Typhimurium umu* tester strains expressing human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1, and 3A4 and human NADPH-P450 reductase and bacterial *O*-acetyltransferase. Mutat. Res. 492, 81-90.
66. Ohnishi, S., Murata, M., Oikawa, S., Totsuka, Y., Takamura, T., Wakabayashi, K. and Kawanishi, S. (2001). Oxidative DNA damage by an N-hydroxy metabolite of the mutagenic compound formed from norharman and aniline. Mutation Research. 494. 63-72.

67. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 5, 874-879.
68. Perera, F. P. and Weinstein, I. B. (1982). Molecular epidemiology and carcinogen – DNA adduct detection: New approaches to studies of human cancer causation. *J. Chronic Dis.* 35, 581-600.
69. Pitot III, H. C. and Dragan, Y. P. (1996). Chemical Carcinogenesis. *In: Klassen, C. D., Amdur, M. O. and Doull, J., [eds.] Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons-5<sup>th</sup> ed., pp. 201-267. McGraw-Hill, New York.*
70. Popp, J. and Cattley, R. C. (1991). Hepatobiliary System. *In: Haschek WM, Rousseaux CG, [eds.] Handbook of Toxicologic Pathology. pp. 279-314. Academic Press, San Diego.*
71. Randerath, E., Agrawal, H.P., Weaver, J. A., Brodelon, C. B. and Randerath, K. (1985). <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of DNA adducts persisting for up to 42 weeks in the skin, epidermis and dermis of mice treated topically with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*. 6, 1117-1136.
72. Rosner, B. (1995). *Fundamentals of Biostatistics*. Duxbury Press, Wadsworth Publishing Co., Belmont, CA.

73. Riffelmann, M., Muller, G., Schmieding, W., Popp, W. and Norpoth, K. (1995).  
Biomonitoring of urinary aromatic amines and arylamine hemoglobin adducts in  
exposed workers and nonexposed control persons. *Int. Arch. Occup. Environ.  
Health.* 68, 36-43.
74. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Hirata, A., Inagami, A., Shirai, N.,  
Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M. (2002). Summation of  
initiation activities in the liver after partial hepatectomy. *Cancer Lett.* 176, 1-5.
75. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Kobayashi, K., Yuasa, H., Imai, T.,  
Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M. (2002). Distinction of carcinogens from  
mutagens by induction of liver cell foci in a model for detection of initiation  
activity. *Cancer Lett.* 188, 33-38.
76. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi,  
T. and Tatematsu, M. (2001). Differential effects of partial hepatectomy and  
carbon tetrachloride administration on induction of liver cell foci in a model for  
detection of initiation activity. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 1018-1025.

77. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Yanai, T., Masegi, T., Inada, K., Nakanishi, H. and Tatematsu, M. (2000). Summation of initiation activities of low doses of the non-hepatocarcinogen 1,2-dimethylhydrazine in the liver after carbon tetrachloride administration. *Cancer Lett.* 148, 59-63.
78. Shimada, T., Iwasaki, M., Martin, M. V. and Guengerich, F. P. (1989). Human liver microsomal cytochrome p-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by *umu* gene response in *Salmonella* Typhimurium TA1535/pSK1002. *Cancer Res.* 49, 3218-3228.
79. Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Ishikawa, T. (2000). Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *PNAS.* 97, 779-782.
80. Shimkin, M.B. and Triolo, V.A. (1969). History of chemical carcinogenesis: some prospective remarks. *Prog. Exp. Tumor Res.* 11, 1-20.
81. Shirai, N., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Iidaka, T., Sakai, H., Yanai, T., Masegi, T., Donehower, L. A. and Tatematsu, M. (2002). Elevated susceptibility of the *p53* knockout mouse esophagus to methyl-*N*-amyl nitrosamine carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 23, 1541-1547.

82. Shirai, N., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Iidaka, T., Sakai, H., Yanai, T., Masegi, T., Donehower, L. A. and Tatematsu, M. (2002). Tongue carcinogenic susceptibility of *p53* deficient mice to methyl-*N*-amyl nitrosamine. *J. Toxicol. Pathol.* 15, 209-214.
83. Simpson, D. A., Feeney, S., Boyle, C. and Stitt, A. W. (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Molecular Vision.* 6, 178-183.
84. Sugimura, T. Multistep carcinogenesis: A 1992 perspective. (1992). *Science.* 258, 603-607.
85. Sugimura, T. (1995). History, present and future of heterocyclic amines, cooked food mutagens. *In*: Adamson, R. H., Gustafsson, J-A., Ito, N, Nagao, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Yamazoe, Y., [eds.] *Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Heterocyclic amines in cooked foods: possible human carcinogen.* pp. 214-231. Princeton Scientific Publishing, New Jersey.
86. Sugimura, T. (1997). Overview of carcinogenic heterocyclic amine. *Mutation Research.* 376, 211-219.

87. Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y. and Itai, A. (1977).  
Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products.  
Proc. Jpn. Acad. 53, 58-61.
88. Sugimura, T., Nagao, M., Kawachi, T., Honda, M., Yahagi, T., Seino, Y., Sato, S., Matsukura, N., Matsushima, T., Shirai, A., Sawamura, M. and Matsumoto, H. (1977). Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods, *In*: Hiatt, H. H., Watson, J. D. and Winston, J. A., [eds.] *Origins of Human Cancer*. pp. 1561-1577. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
89. Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nagao, M. and Ohgaki, H. (1989). Heterocyclic amines in cooked food, *In*: Taylor, S. L. and Scanlan, R. A., [eds.] *Food Toxicology; A Perspective on the Relative Risks*. pp. 31-55. Marcel Dekker, New York.
90. Svoboda, D. and Higginson, J. (1968). A comparison of ultrastructural changes in rat liver due to chemical carcinogens. *Cancer Research*. 28, 1703-1709.

91. Tatematsu, M. (1997). Medium and long-term *in vivo* carcinogenesis bioassays and mutagenicity testing. *Environ. Mutagen. Res.* 19, 91-95.
92. Tatematsu, M., Mera, Y., Ito, N., Satoh, K. and Sato, K. (1985). Relative merit of immunohistochemical demonstrations of placental, A, B and C forms of glutathione S-transferase and histochemical demonstration of  $\gamma$ -glutamyl transferase as markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* 6, 1621-1626.
93. Tatematsu, M., Mera, Y., Inoue, T., Satoh, K., Sato, K. and Ito, N. (1988). Stable phenotypic expression of glutathione S-transferase placental type and unstable phenotypic expression of gamma-glutamyltransferase in rat liver preneoplastic and neoplastic lesions. *Carcinogenesis.* 9, 215-220.
94. Tatematsu, M., Miyata, Y., Mizutani, M., Hananouchi, M. and Hirose, M. (1977). Summation effect of N-butyl-n-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazoly)formamide, N-2-fluoroenylacetamide, and 3,3'-dichlorobenzidine on urinary bladder carcinogenesis in rats. *Gann.* 68, 193-202.

95. Tatematsu, M., Tsuda, H., Shirai, T., Masui, T. and Ito, N. (1987). Placental glutathione S-transferase (GST-P) as a new marker for hepatocarcinogenesis: *in vivo* short-term screening for hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 15, 60-68.
96. Tennant, R. W., French, J. E., Spalding, J. W. (1995). Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environ. Health. Perspect.* 103, 942-950.
97. Tennant, R. W., Spalding, J. and French, J. E. (1996). Evaluation of transgenic mouse bioassays for identifying carcinogens and noncarcinogens. *Mutat. Res.* 365, 119-127.
98. Tomatis, L., Aitio, A., Wilbourn, J. and Shuker, L. (1989). Human carcinogens so far identified. *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 795-807.
99. Totsuka, Y., Hada, N., Matsumoto, K., Kawahara, N., Murakami, Y., Yokoyama, Y., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1998). Structural determination of a mutagenic aminophenylnorharman produced by the co-mutagen norharman with aniline. *Carcinogenesis.* 19, 1995-2000.
100. Totsuka, Y., Kataoka, H., Takamura-Enya, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2002). *in vitro* and *in vivo* formation of aminophenylnorharman from norharman and aniline. *Mutat. Res.* 506-507, 49-54.

101. Totsuka, Y., Takamura-Enya, T., Kawahara, N., Nishigaki, R., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2002) Structure of DNA adduct formed with aminophenylnorharman, being responsible for the comutagenic action of norharman with aniline. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1288-1294.
102. Totsuka, Y., Ushiyama, H., Ishihara, J., Sinha, R., Goto, S., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1999). Quantification of the co-mutagenic beta-carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. *Cancer Lett.* 143, 139-143.
103. Trautwein, C., Rankemann, T., Obermayer-Straub, P., Niehof, M, and Manns, MP. (1997). Differences in the regulation of cytochrome P450 family members during liver regeneration. *J. Hepatol.* 26, 48-54.
104. Trump, B. F., Dees, J. H. and Schelburne, J. D. (1973) The ultrastructure of the human liver cell and its common patterns of reaction to injury. *In: Gall, E.A. and Mostofi, F. K., [eds.] The Liver.* pp. 25-36. Williams and Wilkins, Baltimore.
105. Tsuda, H., Lee, G. and Farber, E. (1980). Induction of resistant hepatocytes as a new principle for a possible short-term *in vivo* test for carcinogens. *Cancer Res.* 40, 1157-1164.

106. Tsukamoto, T., Fukami, H., Yamanaka, S., Yamaguchi, A., Nakanishi, H., Sakai, H., Aoki, I. and Tatematsu, M. (2001). Hexosaminidase-altered aberrant crypts, carrying decreased hexsaminidase  $\alpha$  and  $\beta$  subunit mRNAs, in colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 109-118.
107. Tsukamoto, T., Takahashi, T., Ueda, R., Hibi, K., Saito, H. and Takahashi, T. (1992). Molecular analysis of the protein tyrosine phosphatase gamma gene in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 52. 3506-3509.
108. Turesky, R. J., Rossi, S. C., Welti, D. H., Lay, J. O. and Kadlubar, F. F. (1992). Characterization of DNA adducts formed *in vitro* by N-Hydroxy-2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and N-ydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline at the C-8 and N<sup>2</sup> atoms of Guanine. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 479-490.
109. Ushiyama, H., Oguri, A., Totsuka, K., Itoh, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1995). Norharman and harman in human urine. *Proc. Jpn. Acad.* 71B, 57-60.
110. Watanabe, H. K., Hashimoto, Y., Abe, I. and Sato, H. (1982). Carcinogenicities of 3-methoxy-4-amionobenzene and related azo dyes in the mouse. *Gann.* 73, 36-140.

111. Yamamoto, T., Tsuji, K., Kosuge, T., Okamoto, T., Shudo, K., Takeda, K., Iitaka, Y., Yamaguchi, K., Seino, Y., Yahagi, T., Nagao, M. and Sugimura, T. (1978). Isolation and structure determination of mutagenic substances in L-glutamic acid pyrolysate. *Proc. Jpn. Acad.* 54B, 248-250.
112. Yamamoto, M., Tsukamoto, T., Sakai, H., Shirai, N., Ohgaki, H., Furihata, C., Donehower, L. A., Yoshida, K. and Tatematsu, M. (2000). *p53* knockout mice (-/-) are more susceptible than (+/-) or (+/+) mice to N-methyl-N-nitrosourea stomach carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 21, 1891-1897.
113. Yoshida, D., Matsumoto, T., Yoshimura, R. and Matsuzaki, T. (1978). Mutagenicity of amino- $\alpha$ -carbolines in pyrolysis products of soybean globulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 915-920.
114. Yoshimi, N., Sugie, S., Iwata, H., Mori, H. and Williams, G. M. (1988). Species and sex differences in genotoxicity of hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat, mouse, and hamster hepatocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 12, 53-64.

115. Rinn, J. L., Rozowsky, J. S., Laurenzi, I. J., Petersen, P. H., Zou, K., Zhong, W., Gerstein, M. and Snyder, M. (2004) Major molecular differences between mammalian sexes are involved in drug metabolism and renal function. *Developmental cell*. 6, 791-800.
116. Degawa, M., Hishinuma, T., Yoshida, H. and Hashimoto, Y. (1987) Species, sex and organ differences in induction of a cytochrome p-450 isozyme responsible for carcinogen activation: effects of dietary hepatocarcinogenic tryptophan pyrolysate components in mice and rats. *Carcinogenesis*. 8, 1913-1918.

## 【要旨】

新規に認められた含窒素芳香族異項環化合物，9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (Aminophenylnorharman, APNH)は，S9 mix 存在下で norharman と aniline の反応によって生成され，*Salmonella* Typhimurium TA98 と YG1024 に変異原性を発現する。その遺伝子変異の強度は既知のヘテロサイクリックアミンに匹敵する。

Norharman は，タバコの煙，食品中など広く環境中に存在し，普通の食事を摂取している健康なヒトの尿中にも，常に存在している。また，aniline は，タバコの煙，ある種の果物，野菜中に存在し，同様にヒトの尿中および乳汁中にも検出されている。これらのことから，ヒトは日常的に norharman と aniline に暴露されることは避けがたく，APNH は常に体内で生成，暴露されていると考えられる。そのため APNH の発がん性の詳細なデータが必要と考えられる。

本研究において，APNH の発がん性を検索するにあたり，イニシエーション作用に基づいた肝臓における中期発がん性試験 (In vivo five-week initiation assay) および遺伝子改変動物を用いたがん原性試験を行い，APNH の発がん性について検討した (第一，二章)。さらに APNH の代謝と発がんとの関連性について解析した (第三章)。

第1に，イニシエーション作用に基づいた肝臓における中期がん原性試験により APNH の発がん過程におけるイニシエーション活性の検索を行った。その結果，肝臓の glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性巢面積の検索において，APNH を投与していない対照群と比較して，APNH 10, 3 および 1mg/kg の各体重投与群に用量相関性の増加が認められた。GST-P 陽性巢数においては，APNH 投与群，APNH を投与しない対照群に比較して有意な増加がみられた。

これらのことより、APNH が発がん過程においてイニシエーション活性を有することが示唆された。さらに、APNH 10mg/kg 体重投与後 2-AAF, CCl<sub>4</sub> 処置を行わない群でも、GST-P 陽性巢面積が APNH を投与しない対照群に比較して有意な増加を示したことから、APNH の肝臓に対する標的性も強く示唆された。

第 2 に、APNH の発がん性と *p53* がん抑制遺伝子の関係について、*p53* がん抑制遺伝子を欠損した *p53* ノックアウト (KO) マウスを用いて検索を行った。その結果、APNH 混餌投与により肝臓に oval cell hyperplasia (OCH), altered cell foci (foci), 肝細胞腺腫 (HCA), 肝細胞癌 (HCC) 等の多彩な病変が観察された。APNH 投与 15 週後では肝臓の OCH が APNH 30ppm 投与群の *p53* (-/-), *p53* (+/-) および *p53* (+/+) マウスにそれぞれ 2/14 (14.3%), 14/23 (60.9%) および 2/10 (20%) 観察された。APNH 投与 40 週後の安楽殺例では、HCC が APNH 30ppm 投与群の雌 *p53* (+/-) マウス 16/46 (34.8%) および雌 *p53* (+/+) マウス 10/27 (37.0%) に認められた。しかし、雄 *p53* (+/-) および *p53* (+/+) マウスに観察された HCC は、それぞれ 1/45 (2.2%) および 2/12 (16.7%) であった。40 週後の安楽殺例 *p53* (+/-) および *p53* (+/+) マウスに観察された腫瘍の *p53* がん抑制遺伝子 exon 5 から 8 について、PCR-single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP 法) により検索したところ、*p53* がん抑制遺伝子の変異は認められなかった。

これらの結果から APNH の *p53*KO マウスに対する標的臓器は肝臓であり、APNH の肝発がん性が示唆された。APNH の肝発がん性は、*p53* がん抑制遺伝子の変異との関連性は低く、雌でより多くの腫瘍発生が認められることから代謝あるいはホルモン環境との関連性が考えられた。

第 3 に、肝臓でのチトクローム P450 (CYP) による代謝と APNH による肝臓腫瘍形成との関連性について検討し、さらに、APNH の肝臓における DNA 付加体の意義についても検討した。APNH による *p53*KO マウスにおける肝臓腫瘍形成は *p53* がん抑制遺伝子の有無に影響されないが、APNH 投与により肝臓の CYP

1A1 mRNA が誘導されることが明らかになった。さらに、肝臓において、APNH 投与濃度依存性に DNA 付加体が増加した。以上のことから、肝臓腫瘍形成に CYP 1A1 による APNH の代謝活性化が関与することが示唆された。

## 【英文要旨】

The novel heterocyclic amine, 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (Aminophenylnorharman, APNH), is produced by the reaction of norharman with aniline in the presence of a metabolic activation system, S9 mix, and is mutagenic to *Salmonella* Typhomurium TA98 and YG1024. Its mutagenic activity is comparable with those of known heterocyclic amines.

Norharman is widely distributed in our environment in cigarette smoke and cooked foodstuffs, and has been detected in urine samples from healthy humans eating an ordinary diet. Aniline also is presented in cigarette smoke and some kinds of vegetables, and has been found in human urine and breast-milk samples. It is thus likely that humans are continuously exposed to combinations of norharman and aniline in daily life, so that consequent formation of APNH in our bodies might be expected. Therefore, it is very important to obtain detailed data about the carcinogenicity of APNH.

For this purpose, effects of APNH were investigated in a medium term *in vivo* carcinogenesis bioassay (*in vivo* five-week initiation assay) system based on initiation activity in liver and in studies using genetically altered animals (Chapter s 1 and 2). Furthermore, the relationship between metabolic activation and carcinogenic potential was investigated.

First, initiation effects of APNH on carcinogenesis were investigated in an *in vivo* five-week initiation assay system. Analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive foci in liver sections revealed areas in groups exposed to doses of 10, 3, 1 mg/kg body weight (b.w.) APNH to be increased in a dose dependent manner, compared with the value for the control group receiving 0 mg/kg b.w. The numbers of

GST-P positive foci in groups receiving 10, 3, 1 mg/kg were also significantly higher than in the control group value. These data suggested clear initiation activity of APNH. In addition, the areas of GST-P positive foci in the group receiving 10 mg/kg b.w. APNH without 2-acetylaminofluorene and CCl<sub>4</sub> treatment was significantly increased and indicating the hepatocarcinogenic potential of APNH.

Secondly, the carcinogenic potential of APNH and the *p53* tumor suppressor gene was assessed using male and female *p53* knockout (KO) mice. Various hepatic lesions, including oval cell hyperplasia (OCH), altered cell foci, hepatocellular adenomas (HCAs) and hepatocellular carcinomas (HCCs) developed on administration of APNH in the diet. Incidences of OCH were 2/14 (14.3%), 14/23 (60.9%), and 2/10 (20%) in *p53* null homozygous (-/-), heterozygous (+/-), and wild type (+/+) mice, respectively, exposed to 30 ppm APNH for 15 weeks. At 40 weeks, HCCs had developed in 16/46 (34.8%) and 10/27 (37.0%) female *p53* (+/-) and (+/+) mice, in contrast to only 1/45 (2.2%) and 2/12 (16.7%) of their male counterparts, respectively. PCR-single strand conformation polymorphism analysis for exons 5-8 of *p53* gene was performed on tumors from *p53* (+/+) and (+/-) mice treated with APNH for 40 weeks. No evidence of *p53* gene mutations was obtained. No significant lesions related to dosing of APNH were found in other organs. These results again demonstrated hepatotoxicity and hepatocarcinogenicity of APNH. It is considered that hepatocarcinogenicity of APNH in mice could be linked to the liver microenvironment, including the metabolic and hormonal milieu, but independent of *p53* expression and *p53* gene mutations.

Thirdly, the relationship between the metabolism of APNH by cytochrome P450 (CYP) in liver and carcinogenic potential was investigated, and APNH-DNA adduct formation was also examined. Reverse transcription PCR analysis demonstrated CYP 1A1 transcription to be clearly induced by APNH administration. Furthermore, APNH-DNA adducts developed in a dose dependent manner. These results suggested

that metabolic activation of APNH induced by CYP 1A1 and DNA damage are involved in its hepatocarcinogenesis.

学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 飯高 健

主査

榎 木 利 昭



副査

松 井 高 峯



副査

岡 田 幸 助



審査委員

副査

三 森 國 敏



副査

丸 尾 幸 嗣



副査



題 目 新規に認められた含窒素芳香族異項環化合物 Aminophenylnorharman (APNH) の発がん性に関する実験腫瘍病理学的研究

審査結果の要旨

申請者は、ファイザー株式会社において医薬品の一般毒性試験やがん原性試験に従事している。また、愛知がんセンター研究所においてげっ歯類を用いた化学物質の発がん作用の病理学的研究に従事した。本研究では、*Salmonella typhomurium* TA98 と YG1024 に変異原性を発現し、タバコの煙、蛋白質を多く含む加熱食品中に存在する norharman および同様にタバコの煙、ある種の果物、野菜中に存在する aniline を同時に摂取し、ヒトを始め動物の体内で代謝により生成されると考えられている新規ヘテロサイクリックアミン、9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (Aminophenylnorharman, APNH) の発がん性についての基礎的なデータ収集し、ヒトの発がんリスク評価に寄与す

ることを目的とし、実験動物を用いた病理学的研究を行なった。

まず、イニシエーション作用に基づいた肝臓における中期発がん性試験により APNH の発がん過程におけるイニシエーション活性の検索を行なった。その結果、肝臓の glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性巢面積の検索において、APNH を投与していない対照群と比較して、APNH 10, 3 および 1mg/kg の各投与群に用量相関性の GST-P 陽性巢の面積および数の増加が認められた。このことから APNH が発がん過程においてイニシエーション活性を有することが示唆された。

次に APNH の発がん性の有無について、*p53* がん抑制遺伝子を欠損した *p53* ノックアウト (KO) マウスを用いて検索を行った。その結果、APNH 混餌投与により *p53* KO マウス肝臓に多彩な増殖性病変が観察された。観察された腫瘍について *p53* がん抑制遺伝子の変異について、PCR-single strand conformation polymorphism analysis により検索したところ、*p53* がん抑制遺伝子の変異は認められなかった。これらの結果から APNH の *p53* KO マウスに対する標的臓器は肝臓であり、APNH の肝発がん性が示唆された。APNH の肝発がん性は、*p53* がん抑制遺伝子の変異との関連性は認められなかった。

次に、雌雄 *p53* 各遺伝子型の KO マウスを用いて、肝臓でのチトクローム P450 (CYP) による代謝と APNH による肝臓腫瘍形成との関連性、さらに、APNH の肝臓における DNA 付加体についても検討した。その結果、APNH 投与により、肝臓の CYP1A1 mRNA が誘導されたが、*p53* 遺伝子型との関連性は低かった。さらに、APNH 投与濃度依存性に肝臓において DNA 付加体が増加した。

本研究により、APNH は発がん過程においてイニシエーション活性を有し、肝発がん性が示唆された。肝臓腫瘍形成に肝臓での CYP1A1 による APNH の代謝活性化および DNA 付加体形成が関与することが示唆された。また、APNH の肝発がん性は *p53* がん抑制遺伝子の変異には影響されないことが明らかになった。これらは新規ヘテロサイクリックアミン発がん性の評価において多大な貢献を示すものと考えられた。

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。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

1) 題 目 : **Detection of initiating and promoting activity of aminophenylnorharman with a five-week *in vivo* initiation assay**

著 者 名 : **Iidaka, T., Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M.**

学術雑誌名 : **Journal of Toxicologic Pathology**

巻・号・頁・発行年 : **17 (1): 1-5, 2004**

- 2) 題 目 : Lack of elevated liver carcinogenicity of aminophenylnorharman in *p53*-deficient mice  
著 者 名 : Iidaka, T., Tsukamoto, T., Totsuka, Y., Hirata, A., Sakai, H., Shirai, N., Yamamoto, M., Wakabayashi, K., Yanai, T., Masegi, T., Donehower, L. A. and Tatematsu, M.  
学術雑誌名 : Cancer Letters  
卷・号・頁・発行年 : 217 (2): 149-159, 2005

既発表学術論文

- 1) 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, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M.  
学術雑誌名 : Japanese Journal of Cancer Research  
卷・号・頁・発行年 : 92 (10): 1018-1025, 2001
- 2) 題 目 : Summation of initiation activities in the liver after partial hepatectomy  
著 者 名 : Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Hirata, A., Inagami, A., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M.  
学術雑誌名 : Cancer Letters  
卷・号・頁・発行年 : 176 (1): 1-5, 2002
- 3) 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, H., Inagami, A., Hirata, A., Tsukamoto, T., Kobayashi, K., Degawa, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
卷・号・頁・発行年 : 15 (1): 13-18, 2002
- 4) 題 目 : The effects of allyl alcohol-induced cell proliferation for detection of initiation activities of chemicals in rat liver  
著 者 名 : Okamura, M., Sakai, H., Takahashi, N., Inagami, A., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T. and Tatematsu, M.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
卷・号・頁・発行年 : 15 (2): 95-102, 2002

- 5) 題 目 : Elevated susceptibility of the *p53* knockout mouse esophagus to methyl-*N*-amyl nitrosamine carcinogenesis  
著 者 名 : Shirai, N., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Iidaka, T., Sakai, H., Yanai, T., Masegi, T., Donehower, L. A. and Tatematsu, M.  
学術雑誌名 : Carcinogenesis  
卷・号・頁・発行年 : 23 (9): 1541-1547, 2002
- 6) 題 目 : Tongue Carcinogenic Susceptibility of *p53* Deficient Mice to Methyl-*n*-amyl nitrosamine  
著 者 名 : Shirai, N., Tsukamoto, T., Yamamoto M., Iidaka, T., Sakai, H., Yanai, T., Masegi, T., Donehower, L. A. and Tatematsu, M.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
卷・号・頁・発行年 : 15 (4): 209-214, 2002
- 7) 題 目 : High susceptibility of nullizygous *p53* knockout mice to colorectal tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine  
著 者 名 : Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Iidaka, T., Hirata, A., Yanai, T., Masegi, T., Donehower, L. A. and Tatematsu, M.  
学術雑誌名 : Journal of Cancer Research & Clinical Oncology  
卷・号・頁・発行年 : 129 (6): 335-340, 2003

別紙様式第9号 (第9条関係)

最終試験結果の要旨

申請者氏名 飯高 健

主査 棚本利昭

副査 松井高峯

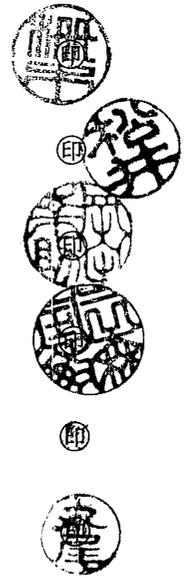
副査 岡田幸助

審査委員

副査 三森國敏

副査

副査 丸尾章朝



実施年月日

平成 17 年 1 月 25 日

試験方法

口頭 筆答

試験結果の要旨

主査及び副査の4名は、学位申請者に対し、学位論文ならびにこれに関連する授業科目(分子病理学)について平成17年1月25日に口頭により試問を行った。その結果、申請者は、岐阜大学大学院連合獣医学研究科博士課程修了者としての学力及び識見を有すると認め、博士(獣医学)の学位を与えるに十分な資格を有すると判定した。