

氏名（本（国）籍）	鈴木 裕 太（愛知県）
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 教授 柳 井 徳 磨
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第368号
学 位 授 与 年 月 日	平成24年9月18日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	香料物質エストラゴールのげっ歯類における肝発がん メカニズムに関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 丸 尾 幸 嗣 副査 帯広畜産大学 教 授 佐 藤 栄 輝 副査 岩 手 大 学 教 授 御 領 政 信 副査 東京農工大学 教 授 渋谷 淳 副査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨 副査 岐 阜 大 学 教 授 西 川 秋 桂

論 文 の 内 容 の 要 旨

エストラゴール（ES）は、バジル、アニスなどのハーブに含まれる天然のアリルベンゼン化合物であり、香料として使用される。ESの構造類似体であるサフロールやメチルオイゲノールは、ラットおよびマウスで発がん性が認められ、ヒトに対する発がんの可能性も考えられている。ESについても、マウスにおいて肝発がん性が確認され、また、肝臓で主に cytochrome P450（CYP）と sulfotransferase（SULT）に触媒され、DNA と共有結合できる究極発がん代謝物に代謝されることが知られているが、種々の遺伝毒性試験では、明らかな陽性結果は確認されておらず、ES のげっ歯類での肝発がんメカニズムは明らかでない。そのため、本研究ではラットにおける肝発がんの可能性、次いでレポーター遺伝子導入ラットを用いて *in vivo* 遺伝毒性について検討した。さらに、マウスの肝臓中における ES の代謝活性化に関与する SULT 活性に性差があることに着目して、雌雄の *gpt delta* マウスを用いて ES の遺伝毒性および発がんメカニズムについて検討した。

第一に、ES のラットにおける発がん性について検討した。6 週齢の雄性 F344 ラットに 600 mg/kg の用量で ES を強制経口投与し、投与 4, 8 および 16 週に剖検し、肝臓を用いた glutathione S-transferase placental form (GST-P), proliferating cell nuclear antigen

(PCNA) 免疫組織化学的解析および LC-MS/MS による ES 特異的 DNA 付加体定量解析を行ったところ、ES 投与群において、投与 4 週から GST-P 陽性肝細胞巢が検出され、その数および面積の経時的増加がみられ、PCNA 陽性指数も投与 4 および 8 週で増加を示した。ES 特異的 DNA 付加体 ES-3'-N⁶-dG, 3'-8-dG および 3'-N⁶-dA は、投与 4 および 8 週に検出された。ラット肝前がん病変を検出できる中期アッセイとして確立している GST-P 陽性肝細胞巢の発現と推移から、ES がマウスだけでなくラットにおいても肝発がん性を有する可能性が示唆された。PCNA 免疫組織化学染色を用いた細胞増殖活性の評価では、増殖活性亢進がみられたことから、ES が発がんプロモーター活性を有することが示唆された。また、ES 特異的 DNA 付加体が ES 投与群の肝臓から検出されたことから、遺伝毒性イニシエーション活性を有する可能性もある。

第二として、ES のラットにおける *in vivo* 遺伝毒性の評価を行った。6 週齢の雄性 *gpt delta* ラットに 0, 22, 66, 200 および 600 mg/kg の用量で ES を 4 週間強制経口投与したところ、600 mg/kg 投与群で投与開始後 1 および 2 週に 5 例中 3 例の死亡がみられた。肝臓を用いた *gpt* アッセイでは、200 mg/kg 投与群で突然変異頻度 (MF) は有意な高値を示し、PCNA 陽性指数との相関性がみられた。変異スペクトラム解析では、200 mg/kg 投与群において AT:GC transition 頻度の有意な増加がみられ、さらに ES 特異的 DNA 付加体定量解析では、主要な DNA 付加体として ES-3'-N⁶-dA が検出された。200 mg/kg 投与群でみられた MF の高値は、細胞増殖活性の亢進と ES-3'-N⁶-dA 形成による AT 塩基対の変異頻度の増加によると考えられた。これらのことから、ES は少なくとも高用量暴露されたラットにおいて遺伝毒性および発がん性が誘発される可能性が示唆された。

第三として、ES のマウスにおける *in vivo* 遺伝毒性の評価を行った。6 週齢の雌雄の *gpt delta* マウスに、ES を 0, 37.5, 75, 150 および 300 mg/kg の投与量で 13 週間強制経口投与したところ、雌の最高用量群で投与 1 週に 1 例の死亡がみられたため、投与 2 週以降は投与量を 250 mg/kg に変更した。以前の C57BL/6 マウスにおける報告と同様、*gpt delta* マウスにおいても雌の肝臓中 *Sult1a1* mRNA 発現レベルは、雄の同じ投与量群と比較して有意に高値を示した。雌の ES 特異的 DNA 付加体数は最高用量群を除いたすべての群で雄よりも高値を示した。*gpt* 遺伝子の MF は、雌の 75 mg/kg 以上の投与群で有意な高値を示したが、雄で有意な高値を示したのは最高用量群のみであった。骨髓小核試験では群間に差はみられなかった。これらのことから、SULT1A1 を介した特異的 DNA 修飾とそれによる遺伝毒性は、マウスの ES 誘発肝発がん性の早期に関連する事象であることが示唆された。

以上のことから、ES は、ラットにおいても肝発がん性を有すること、その発がんメカニズムに遺伝毒性メカニズムが関与していることが示された。さらに、その発がんメカニズムには、ES の SULT 代謝物によって形成される特異的 DNA 付加体が関与した突然変異に加

えて、細胞増殖活性などのその他の要因が関与している可能性が考えられた。本研究は、SE のげっ歯類における肝発がんメカニズムの解明に有用な情報を提供し得るものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

エストラゴール (ES) は、バジルなどのハーブに含まれる天然のアリルベンゼン化合物であり、香料として使用されている。ES の構造類似体であるサフロールでは、ラットおよびマウスで発がん性が知られ、ヒトに対する発がんの可能性が考えられている。ES はマウスで肝発がん性を有しており、肝臓で主に cytochrome P450 (CYP) と sulfotransferase (SULT) に触媒され、DNA と共有結合できる究極発がん代謝物に代謝されることが知られている。しかし、種々の遺伝毒性試験では、陽性の結果は示されておらず、ES による肝発がん性のメカニズムは明らかでない。そのため、本研究では、ラットにおける肝発がんの可能性を調べ、次いでレポーター遺伝子導入ラットを用いて、*in vivo* 遺伝毒性について検討した。さらに、マウスの肝臓中における ES の代謝活性化に関与する SULT 活性に性差があることに着目して、雌雄の *gpt delta* マウスを用いて ES の遺伝毒性について解析し、発がんメカニズムについて検討した。

第一にラットにおける ES の発がんの可能性について評価した。6 週齢の雄性 F344 ラットに 600 mg/kg の用量で ES を強制経口投与し、投与 4, 8 および 16 週に剖検したところ、ES 投与群では、投与 4 週から GST-P 陽性肝細胞巢が検出され始め、経時的にその数および面積の増加傾向がみられ、PCNA 陽性指数も投与 4 および 8 週で増加がみられた。ES 特異的 DNA 付加体 ES-3'-*N*⁶-dG, 3'-8-dG および 3'-*N*⁶-dA は、投与 4 および 8 週で検出された。これらの結果から、ES がマウスだけでなくラットにおいても肝発がん性を有する可能性が示唆された。PCNA 免疫組織化学染色を用いて細胞増殖活性を評価した結果、増殖活性亢進がみられたことから、ES が発がんプロモーター活性を有する可能性が示唆された。同時に、ES 特異的 DNA 付加体が ES 投与群の肝臓から検出されたことから、遺伝毒性イニシエーション活性を有している可能性も示唆された。

第二として、ES のラットにおける *in vivo* 遺伝毒性を評価する実験を行った。6 週齢の雄性 *gpt delta* ラットに 0, 22, 66, 200 および 600 mg/kg の用量で ES を 4 週間強制経口投与したところ、600 mg/kg 投与群で投与開始後 1 および 2 週に 5 例中 3 例の死亡例がみられた。肝臓を用いた *gpt* アッセイの結果、200 mg/kg 投与群で突然変異頻度 (MF) の有意な高値がみられ、PCNA 陽性指数との相関性が示された。変異スペクトラム解析の結果、200 mg/kg 投与群において AT:GC transition の頻度が有意に増加し、ES 特異的 DNA 付加体定量解析の結果、DNA 付加体 ES-3'-*N*⁶-dA が検出されたことに一致した。200 mg/kg 投与群でみられた MF の高値は、細胞増殖活性の亢進と ES-3'-*N*⁶-dA 形成による AT 塩基対の変異頻度の増加によると考えられた。また、ES は高用量で暴露されたラットで遺伝毒性および発がん性を発現する可能性が示唆された。

第三としては、ES のマウスにおける *in vivo* 遺伝毒性の評価を行った。6 週齢の雌雄の *gpt delta* マウスに ES を 0, 37.5, 75, 150 および 300 mg/kg の用量で 13 週間強制経口投与したところ、雌の最高用量群において投与 1 週に 1 例の死亡がみられたため、投与 2 週以降は最高投与量を 250 mg/kg に変更した。*gpt delta* マウスでは、雌の肝臓中 *Sult1a1* mRNA 発現レベルは、雄の同じ投与量群と比較して有意な高値を示した。雌の ES 特異的 DNA 付加体量は最高用量群を除いたすべての群で雄よりも高値を示した。*gpt* 遺伝子の MF は、雌の 75 mg/kg 以上の投与群で有意な高値を示したが、雄で有意な高値を示したのは最高用量群のみであった。骨髓小核試験の結果、群間に差はみられなかった。これらのことから、SULT1A1 を介した特異的 DNA 修飾とそれによる遺伝毒性は、マウスの ES 誘発肝発がん性の早期に関与する重要な事象と考えられた。

以上のことから、ES はラットにおいても肝発がん性を有すること、さらにその肝発がんメカニズムに遺伝毒性メカニズムが関与していることが示唆された。さらに、その発がんメカニズムには、ES の SULT 代謝物によって形成される特異的 DNA 付加体による突然変異だけでなく、細胞増殖活性などのその他の要因の関与が考えられた。本研究は、げっ歯類における ES の肝発がんメカニズムの解明において、有用な情報を提供すると思われる。

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

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats
著 者 名 : Suzuki, Y., Umemura, T., Hibi, D., Inoue, T., Jin, M., Ishii, Y., Sakai, H., Nohmi, T., Yanai, T., Nishikawa, A. and Ogawa, K.
学術雑誌名 : Archives of Toxicology
巻・号・頁・発行年 : in press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of *gpt* delta rats treated with potassium bromate
著 者 名 : Umemura, T., Tasaki, M., Kijima, A., Okamura, T., Inoue, T., Ishii, Y., Suzuki, Y., Masui, N., Nohmi, T. and Nishikawa, A.
学術雑誌名 : Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 257(1-2):46-52, 2009
- 2) 題 目 : Effects of co-treatment of dextran sulfate sodium and MeIQx on genotoxicity and possible carcinogenicity in the colon of *p53*-deficient mice
著 者 名 : Okamura, T., Ishii, Y., Suzuki, Y., Inoue, T., Tasaki, M., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Umemura, T. and Nishikawa, A.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 35(5):731-741, 2010
- 3) 題 目 : Enhancing effects of carbon tetrachloride on *in vivo* mutagenicity in the liver of mice fed 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline (MeIQx)
著 者 名 : Okamura, T., Ishii, Y., Suzuki, Y., Inoue, T., Tasaki, M., Kodama, Y., Nohmi, T., Mitsumori, K., Umemura, T. and Nishikawa, A.
学術雑誌名 : The Journal of Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 35(5):709-720, 2010
- 4) 題 目 : Investigation of carcinogenicity for levamisole administered in the diet to F344 rats
著 者 名 : Hibi, D., Imazawa, T., Kijima, A., Suzuki, Y., Ishii, Y., Jin, M., Umemura, T. and Nishikawa, A.
学術雑誌名 : Food and Chemical Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 48(12):3321-3326, 2010

- 5) 題 目 : Oxidative DNA damage and reporter gene mutation in the livers of *gpt* delta rats given non-genotoxic hepatocarcinogens with cytochrome P450-inducible potency
著 者 名 : Tasaki, M., Umemura, T., Suzuki, Y., Hibi, D., Inoue, T., Okamura, T., Ishii, Y., Maruyama, S., Nohmi, T. and Nishikawa, A.
学術雑誌名 : Cancer Science
巻・号・頁・発行年 : 101(12):2525-2530, 2010

- 6) 題 目 : Uterine carcinosarcoma in a 2-year-old female Wistar Hannover GALAS rat
著 者 名 : Takami, S., Ogawa, K., Umemura, T., Hibi, D., Ishii, Y., Okamura, T., Tasaki, M., Inoue, T., Suzuki, Y., Jin, M., Cho, Y.M. and Nishikawa, A.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 24(1):63-67, 2011

- 7) 題 目 : Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose
著 者 名 : Ishii, Y., Suzuki, Y., Hibi, D., Jin, M., Fukuhara, K., Umemura, T. and Nishikawa, A.
学術雑誌名 : Chemical Research in Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 24(4):532-541, 2011

- 8) 題 目 : Kinetics and pathogenicity of equine herpesvirus-9 infection following intraperitoneal inoculation in hamsters
著 者 名 : El-Nahass, E., El-Habashi, N., Nayel, M., Kasem, S., Fukushi, H., Suzuki, Y., Hirata, A., Sakai, H. and Yanai, T.
学術雑誌名 : Journal of Comparative Pathology
巻・号・頁・発行年 : 145(2-3):271-281, 2011

- 9) 題 目 : Site-specific *in vivo* mutagenicity in the kidney of *gpt* delta rats given a carcinogenic dose of ochratoxin A
著 者 名 : Hibi, D., Suzuki, Y., Ishii, Y., Jin, M., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y., Yanai, T., Nohmi, T., Nishikawa, A. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Toxicological Sciences
巻・号・頁・発行年 : 122(2):406-414, 2011

- 10) 題 目 : Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats
著 者 名 : Jin, M., Kijima, A., Suzuki, Y., Hibi, D., Inoue, T., Ishii, Y., Nohmi, T., Nishikawa, A., Ogawa, K. and Umemura, T.
学術雑誌名 : Toxicology
巻・号・頁・発行年 : 290(2-3):312-321, 2011