



幼若ラットを用いた中期イニシエーション活性検索法に関する実験病理学的研究

浅岡由次^{1,2)} 酒井洋樹³⁾ 平田暁大⁴⁾ 佐々木 淳⁵⁾ 御領政信⁵⁾
柳井徳磨³⁾ 岡田幸助⁵⁾

要 約

in vivo 中期イニシエーション活性検索法は肝臓の前がん病変を指標として、非肝発がん物質を含めた遺伝毒性発がん物質の発がん性（イニシエーション活性）を短期間に検出できる試験系である。過去の報告から、本試験系では被験物質投与期間に肝臓における高い肝細胞増殖活性と十分な代謝酵素活性が必要であることが知られているため、従来法では被験物質投与期間に肝細胞増殖活性の誘導を目的とした肝部分切除等の細胞増殖刺激が用いられている。しかしながら、細胞増殖刺激には解決すべき種々の課題が残されているため、本研究では成長に伴う高い肝細胞増殖活性を有すると推察された幼若ラットを用いて、細胞増殖刺激を必要としない中期イニシエーション活性検索法の開発を試みた。その結果、実験1では、生後4週齢前後のラットの肝臓は高い肝細胞増殖活性および十分な肝代謝酵素（Cytochrome P450）の発現を有していることが示され、実験2では、生後4週齢ラットを用いた*in vivo* 中期イニシエーション活性検索法は、被験物質投与期間に細胞増殖刺激を必要とせずに既知の発がん性物質である1,2-dimethylhydrazineのイニシエーション活性を従来法に比べて簡単、早期に、また用量依存的、投与期間依存的に検出できることが示された。本研究より、細胞増殖刺激を必要としない生後4週齢ラットを用いた*in vivo* 中期イニシエーション活性検索法は細胞増殖刺激を用いた従来法よりも動物福祉の観点で優れており、さらに被験物質の反復投与時におけるイニシエーション活性検出感度を大きく改善し、幅広い化学物質の発がん性評価に有用と考えられた。

キーワード：イニシエーション，肝細胞増殖活性，前がん病変，ラット，発がん性評価

¹⁾ 岐阜大学大学院連合獣医学研究科病態獣医学連合講座 ²⁾ 東レ株式会社医薬研究所安全性研究室

³⁾ 岐阜大学応用生物科学部応用生物科学学科獣医学過程獣医病理学分野

⁴⁾ 岐阜大学生命科学総合研究支援センター実験動物分野

⁵⁾ 岩大支会 岩手大学農学部獣医学科獣医病理学研究室

緒 言

医薬品をはじめとした化学物質の発がん性評価は、従来、げっ歯類に被験物質を生体投与して形成されたがん病変を病理組織学的に評価するがん原性試験によって行われている。がん原性試験は約3年もの期間ならびに莫大な労力および資金を必要とするために多種の被験物質の評価には適していない。一方、多くの既知の発がん性物質が変異原性発がん物質であることから、化学物質の発がん性リスク評価として、Ames試験をはじめとした細菌や哺乳類の細胞を用いた*in vitro* 遺伝毒性試験および小核試験をはじめとした*in vivo* 遺伝毒性試験が行われている [1, 14]。しかしながら、がん原性試験と遺伝毒性試験の評価のエンドポイントが大きく異なるために両試験の結果が必ずしも一致しないことが数多く報告されている。そのため、遺伝毒性試験のように短期間でありながら、がん原性試験のように*in vivo* でのがん病変形成をエンドポイントとする中期発がん性試験法の開発が進められている。

“がん”がイニシエーション、プロモーション、そしてプログレッションの段階を経て形成されるという多段階発がん説に基づいた*in vivo* 中期発がん性試験は、げっ歯類に既知のイニシエーション処置またはプロモーション処置を施すことによってがん病変が形成されやすい状況を人為的につくり、被験物質における発がん性作用のうちのイニシエーション作用またはプロモーション作用を早期に検出する試験法である [12, 15, 24, 27, 30]。プロモーション作用を検出するラットを用いた*in vivo* 中期プロモーション活性検索法（伊東モデル、多臓器発がんモデル）は、既に多くの既知の発がん性物質を用いてその有用性が確認されており、化学物質の発がん性評価に広く用いられている [16, 17]。一方、イニシエーション作用を検出する試験系として、ラットを用いた*in vivo* 中期イニシエーション活性検索法が開発され、こちらも既に26種の既

知の発がん性物質を用いてその有用性が確認されている [22]。

ラットを用いた*in vivo* 中期イニシエーション活性検索法は、肝臓を用いて被験物質のイニシエーション作用と人為的な既知のプロモーション処置によって誘発された前がん病変を、そのバイオマーカーである glutathione S-transferase placental form (GST-P) を用いて評価することにより、遺伝毒性発がん性物質のイニシエーション作用を比較的早期に評価できる試験法である [24]。発がん性物質が有するプロモーション作用は可逆的で臓器特異的であるのに対して、イニシエーション作用は不可逆的で非臓器特異的であることから [19]、本検索法では肝発がん物質だけでなく非肝発がん物質の発がん性（イニシエーション活性）を肝臓で評価できることが大きな利点である。

発がん過程において、細胞増殖は遺伝毒性発がん物質の作用によるDNAの変異および表現型の変異（イニシエーション）だけでなく、イニシエートされた細胞の単一性増殖（プロモーション）にも大きく関係している [7, 8]。また、多くの発がん性物質の代謝活性化にはcytochrome P450 (CYP) のような薬物代謝酵素が大きく関わっている [13]。*in vivo* 中期イニシエーション活性検索法においても、被験物質のイニシエーション作用を十分に検出するために、被験物質投与期間に肝臓における高い肝細胞増殖活性と十分な薬物代謝酵素活性が必要である。したがって、従来の*in vivo* 中期イニシエーション活性検索法では、肝部分切除、肝傷害化学物質投与、絶食などの細胞増殖刺激が被験物質投与期間に高い肝細胞増殖を誘導するために用いられているが [2, 9, 23]、細胞増殖刺激による動物の精神的・身体的苦痛および個体差の増大、細胞増殖刺激と被験物質の影響の相乗効果による毒性発現などが本試験法の課題として残っている。これまでの*in vivo* 中期イニシエーション活性検索法は細胞増殖刺激による肝細胞増殖活性の

誘導が約1日程度しか持続しないため、被験物質のイニシエーション活性を単回投与または1日以内の分割反復投与でしか評価できない課題も有している [24].

以上より、従来の細胞増殖刺激を用いた中期イニシエーション活性検索法はその有用性が確認されているものの、細胞増殖刺激の労力および動物に対する負荷などの解決すべき課題があることから、細胞増殖刺激を用いない新たな中期イニシエーション活性検索法の開発が必要と考えられた。そこで、本研究では成長過程のために肝細胞増殖活性が高いと推察される幼若動物に着目し、実験1では、細胞増殖刺激を用いない中期イニシエーション活性検索法で求められる高い肝細胞増殖活性および十分な肝薬物代謝酵素を有するラットの週齢を見出すために、化学物質の毒性試験で一般的に用いられるSprague-Dawley {CrI : CD (SD)} (SD) ラットの生後4日、16日、30日、8週、12週の雌雄の肝臓における、肝細胞増殖活性ならびに代表的な薬物代謝酵素であるCYPの肝臓における発現を調べた。実験2では、発がん性試験で一般的に用いられる雄Fischer (F344/DuCrI CrIj) ラットを用いて、先の実験結果から得られた中期イニシエーション活性検索法に用いるために最適な週齢の肝臓が高い肝細胞増殖活性と十分な肝CYP酵素活性を有するかどうかを確認した後、その最適な週齢を用いた細胞増殖刺激を必要としない中期イニシエーション活性検索法の有用性について、既知の遺伝毒性大腸発がん物質で非肝発がん物質である1,2-dimethylhydrazine (DMH) を被験物質として用いて評価した [29, 31].

材料と方法

1 動物

実験1：日本チャールズリバー（日野）より妊娠21日の妊娠Sprague-Dawley {CrI : CD (SD)} (SD) ラットを購入し、1週間馴化させた後に

自然出産させた。出産後、仔は生後21日まで母獣とともに飼育し、生後21日以降は離乳するとともに個別飼育した。さらに日本チャールズリバーより生後7および11週齢の雌雄のSDラットを購入し、1週間馴化させた後に実験に用いた。固形飼料（CE-7；日本クレア，東京）および水は自由摂取させた。

実験2：雄Fischer (F344/DuCrI CrIj) ラットを日本チャールズリバー（厚木）より購入した。げっ歯類繁殖用飼料（CA-1，日本クレア）および水は自由摂取させた。生後4週、4.5週および8週のラットの肝細胞増殖活性および肝CYP酵素活性を調べる実験では、生後3週および7週の雄ラットを購入し、1または1.5週間馴化させた後に実験に用いた。生後4週齢ラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法の実験では、生後3週を購入し、1週間馴化させた後に実験に用いた。

飼育環境については12時間の明暗サイクル、湿度60%、温度22℃±2℃とし、動物の取り扱いについては、岐阜大学動物実験取り扱い規則および岐阜大学応用生物科学部動物実験指針を遵守した。

2 動物実験プロトコール

実験1：生後4日、16日、30日、8週、12週の雌雄の肝臓を実験に用いた。動物は体重を測定した後、生後4日齢は過剰量のpentobarbital（ネンブタール®；大日本住友製薬，大阪）麻酔で、生後4日齢以外はisoflurane（フォーレン®；Abbott laboratories, Abbott park, IL, USA）麻酔下放血で安楽死させ、肝臓を採取した。肝臓のCYPの遺伝子発現量および酵素活性の測定試料は直ちに液体窒素にて急速冷凍して-80℃で保存し、肝細胞増殖活性の測定試料については4℃の4%パラホルムアルデヒドで24時間固定し、常法に従ってパラフィン切片を作製した。得られたパラフィン切片はhematoxylin eosin (HE) 染色および免疫染色

に供した。実験に用いた生後4日齢, 16日齢, 30日齢, 8週齢および12週齢の雌雄の体重範囲 (g) は, それぞれ (雄: 12.0-14.0, 雌: 11.4-13.7), (雄: 29.6-33.2, 雌: 27.5-31.7), (雄: 74.8-101.6, 雌: 64.0-94.2), (雄: 242.9-306.1, 雌: 165.4-195.4) および (雄: 384.5-430.2, 雌: 222.4-260.4) であった。

実験2: 生後4週, 4.5週および8週のラットの肝細胞増殖活性および肝CYP酵素活性を調べる実験では, ラットに生理食塩水に溶解させた100mg/kgの5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を単回腹腔内投与し, 対照群には生理食塩水を5mL/kg単回腹腔内投与した。投与後1時間にisoflurane (フォーレン®; Abbott laboratories) 麻酔下で放血殺して肝臓を採取した。肝臓は切り出した後, CYPの酵素活性測定試料は直ちに液体窒素にて急速冷凍して-80°Cで保存し, 肝細胞増殖活性測定用試料は10%formaldehydeで24時間固定して常法に従ってパラフィン切片を作製した。得られたパラフィン切片はHE染色およびBrdU免疫染色に供した。生後4週, 4.5週および8週の雄ラットの体重範囲 (g) はそれぞれ (61.0-67.1), (51.4-80.2) および (168.7-181.8) であった。

次に生後4週齢ラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法の試験デザインを図1に示す。生後4週齢のラットを, 1mg/kg/dayのDMH単回経口投与群, 1mg/kg/dayのDMHの4日反復経口投与群, 4mg/kg/dayのDMH単回経口投与群, 4mg/kg/dayのDMHの4日間反復経口投与群, 16mg/kg/dayのDMH単回経口投与群, 4mg/kg/dayのDMHの8日間反復経口投与・非プロモーション処置群 (非プロモーション処置群), 溶媒 (生理食塩水) 経口投与群 (対照群) の6群に群わけした。なお, DMH初回投与時のラットの体重範囲は52.1-73.3gであった。非プロモーション処置群を除いたすべてのラットはDMH初回投与時から1週間基本餌 (CA-1) で飼育した後, 0.015%の2-acetylaminofluorene (2-AAF) を混じたCA-1で2週間飼育し, その後再度基本餌で1週間飼育した。さらにDMH初回投与時から2週間後に, 非プロモーション処置群を除いたすべてのラットにcorn oilで希釈した0.8ml/kgのcarbon tetrachloride (CCl₄) を単回経口投与した。DMH初回投与時から4週間後に (生後8週), diethyl ether麻酔下で放血殺し, 肝臓を採材した。肝臓は切り出した後, 10%

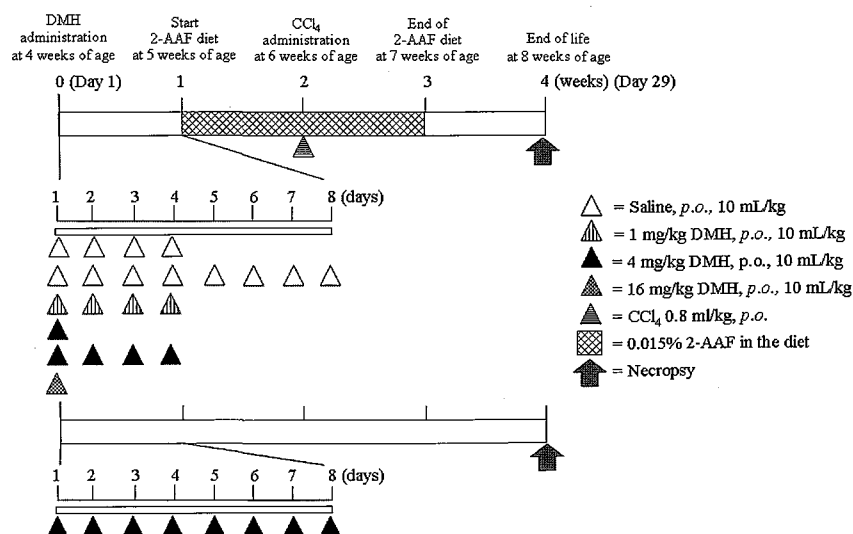


図1 生後4週齢の雄Fischerラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法の動物実験プロトコルの試験デザイン。詳細は材料と方法を参照。2-AAF: 2-acetylaminofluorene, DMH: 1,2-dimethylhydrazine。

formaldehydeで24時間固定して常法に従ってパラフィン切片を作製した。得られたパラフィン切片はHE染色およびGST-P免疫染色に供した。

3 定量的リアルタイムPolymerase Chain ReactionによるmRNA発現量解析

常法に従って、肝臓からRNAを抽出後にcDNAを合成し、12種のCYP分子種 (CYP1A2, CYP2A1, CYP2A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C6, CYP2C11, CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18, CYP3A23) のmRNA発現量の測定をPlatinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG kit (Invitrogen) を用いてABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) にて実施した [4]。プライマーはNational Center for Biotechnology Information GenBank (www.ncbi.nih.gov) から得た目的遺伝子の塩基配列情報を基にして、Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にて設計した。

4 肝ミクロソーム画分の抽出

Pearceらの方法 [4, 21] を参考にして、肝臓からミクロソーム画分を抽出後、ミクロソーム試料を -80°C で保存した。ミクロソーム試料の蛋白量は、Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いてBradford法により測定した。

5 肝ミクロソーム画分における総CYP蛋白量の測定

Omura and Satoの方法 [20, 4] を参考にして、ミクロソーム試料を亜ジチオン酸塩による還元条件下で一酸化炭素ガスに反応させ、450 nmおよび490nmの吸光度を測定し、その吸光度差から測定試料中のCYP蛋白量を算出した。

6 肝ミクロソーム画分におけるCYPの酵素活性測定

過去に報告された論文 [3-6, 18, 25, 32] の方法を参考にして、肝ミクロソーム試料のEthoxyresorufin *O*-deethylase (CYP1A) 活性, testosterone 7α -hydroxylase (CYP2A) 活性, testosterone 16β -hydroxylase (CYP2B) 活性, testosterone 2α -hydroxylase (CYP2C) 活性, testosterone 6β -hydroxylase (CYP3A) 活性, Chlorzoxazone hydroxylase (CYP2E) 活性をmicroplate readerまたはhigh-performance liquid chromatography (HPLC) を用いて測定した。

7 免疫組織化学的検査

実験1では、肝細胞増殖活性を調べるために、常法に従って細胞分裂期のバイオマーカーであるphospho-histone H 3 (p-histon) をrabbit polyclonal anti-p-histon抗体 (Ser 10, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて免疫染色し、IPAP-WIN image processor for analytical pathology (Sumika Technoservice Corp., 宝塚) を用いて1,000個以上の肝細胞からp-histon標識肝細胞率を画像解析により算出した [4]。

実験2では、肝細胞増殖活性および肝臓内に誘発された前がん病変の数および面積を調べるために、過去に報告された論文 [2] 方法を参考にして、細胞分裂期のバイオマーカーであるBrdUおよび前がん病変のバイオマーカーであるGST-Pをそれぞれmouse monoclonal antibody against BrdU抗体 (DAKO Cytomation Inc.) およびrabbit polyclonal antibody against rat GST-P抗体 (MBL, 名古屋) を用いて免疫染色した。BrdU標識肝細胞率は、IPAP-WIN image processor for analytical pathologyを用いて、BrdU免疫染色標本の2,000個以上の肝細胞から画像解析により算出し、GST-P陽性細胞巢の数および面積は、デジタルスライドスキャナー

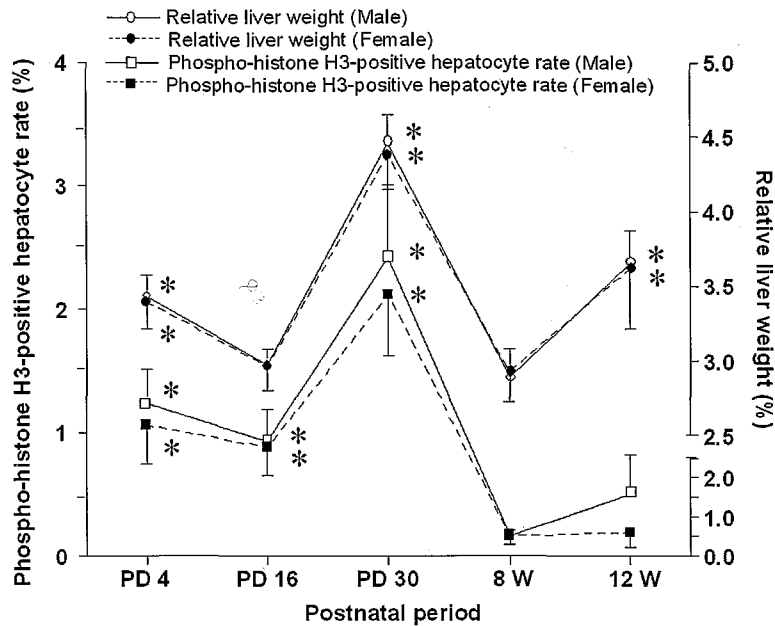


図2 肝重量およびp-histon標識肝細胞率 (M期細胞) の成長に伴う変化. グラフは各群6-20匹の平均値および標準偏差を示す. * P<0.01, significantly different as compared with values for same sex rats aged 8 weeks. PD: postnatal day, W: week.

NanoZoomer Digital Pathology (浜松ホトニクス, 浜松) および画像解析ソフトeCognition Developer version 7 (Definiens Inc., Munich, Germany) を用いて, 直径0.1mm以上のGST-P陽性肝細胞巣を検出して算出した [3].

8 統計処理

体重比重量, p-histon標識肝細胞率, mRNA発現量および酵素活性, BrdU標識肝細胞率, GST-P陽性巣の単位肝臓面積あたりの数及び面積のデータにおいて, 平均値および標準偏差を算出した. SASシステム前臨床パッケージ Version 5.0 (SASインスティテュートジャパン, 東京) を用いて, 実験1では, 生後8週または12週の同性に対する各日齢および週齢の差について, Bartlett等分散検定で等分散の場合はDunnettの多重検定を実施し, 不等分散の場合はF検定後に2群間の検定 (Student's-t検定またはAspin-Welchの検定) を実施した. また, 各日齢および週齢の性差についても, F検定後に2群間の検定 (Student's-t検定または

Aspin-Welchの検定) を実施した. なお, いずれの検定も有意水準は1%未満とした. 実験2では, 肝重量 (実重量および体重比重量), BrdU標識肝細胞率について, F検定後に2群間の検定 (Student's-t検定またはAspin-Welchの検定) を実施し, GST-P陽性巣の単位肝臓面積あたりの数及び面積についてはBartlett等分散検定後に多群の検定 (Dunnettの多重検定またはSteelの多重検定) を実施した. なお, いずれの検定も有意水準は5%未満とした.

結 果

1 生後4日, 16日, 30日, 8週, 12週の雌雄SDラットの肝細胞増殖活性および肝臓におけるCYPの発現の解析 (実験1)

肝重量および肝細胞増殖活性の成長に伴う変化: 体重および肝実重量は生後4日から12週にかけて, 成長とともに増加したが, 体重比肝重量は生後4日および16日で生後8週以降とほぼ同じで, 生後30日で生後8週以降と比較して約1.5倍を示した (図2). p-histon標識肝細胞率

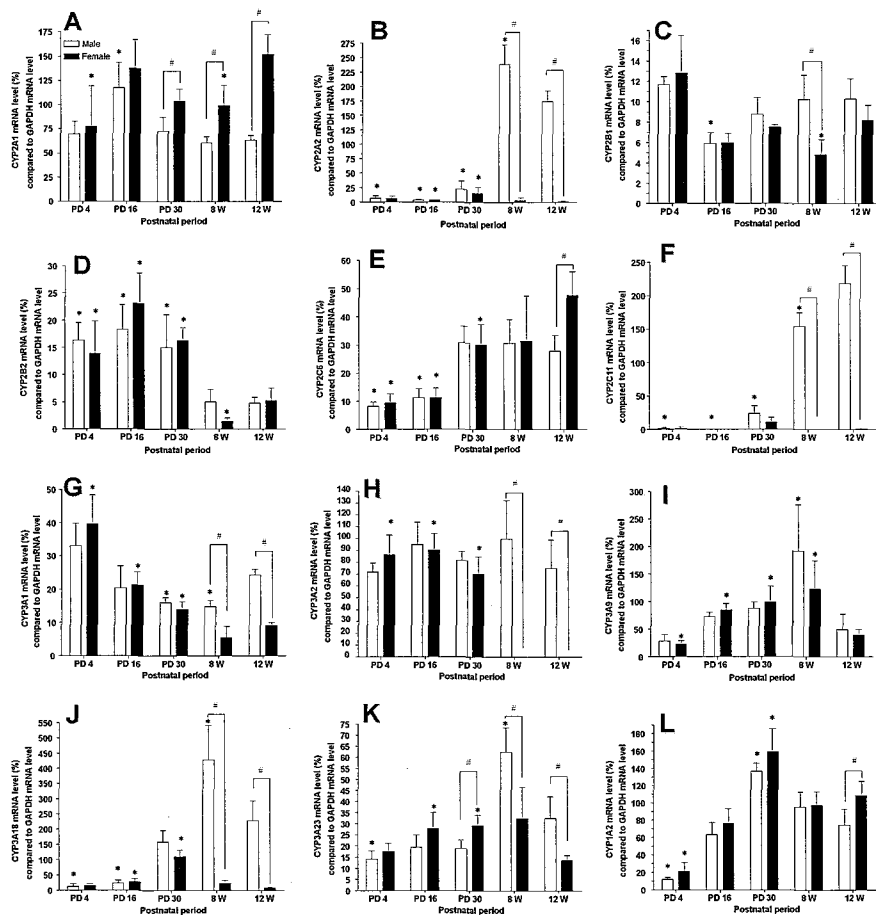


図3 肝臓における各CYP分子種のmRNA発現量の成長に伴う変化。CYP2A1, CYP2A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C6, CYP2C11, CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18, CYP3A23, CYP1A2のmRNA発現量をそれぞれA, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, Lに示す。グラフは各群6匹の平均値および標準偏差を示す。
 * $P < 0.01$, significantly different as compared with values for same sex rats aged 12 weeks. # $P < 0.01$, significantly different between values for male and female rats.
 W: week.

は生後8週と比較して生後4日および16日は約3-4倍、生後30日は約10倍高い値を示した。生後4日から8週にかけて、p-histon標識肝細胞率に明らかな性差は認められなかった。

肝臓におけるCYP分子種のmRNA発現量の成長に伴う変化：肝臓における各CYP分子種のmRNA発現量を図3に示す。肝臓における雌雄のCYP2B1, 雄のCYP2A1およびCYP3A2ならびに雌のCYP3A23のmRNAは、生後4日で生後12週齢とほぼ同程度発現しており、その後も発現量が維持された。雌雄のCYP1A2, CYP2C6およびCYP3A9, 雄のCYP3A18およびCYP3A23ならびに雌のCYP2A1のmRNA発現量は、生後4日で低く、その後成長に伴って

増加し、生後16日または30日で生後12週齢とほぼ同程度を示した。雌雄のCYP2B2およびCYP3A1ならびに雌のCYP3A2のmRNA発現量は生後4日から30日にかけて生後12週齢と比較して著しく高い値を示した。これらのうち、雌雄のCYP2B2および雌のCYP3A2のmRNA発現量は生後30日まで高い値を維持した。また、雌雄のCYP3A1のmRNA発現量は生後30日以降に加齢とともに減少し、雌のCYP3A2のmRNAは生後8週以降では検出されなかった。また、雄のCYP2A2およびCYP2C11のmRNA発現量は生後4日から30日にかけて低く、生後8週で著しく増加した。それに対して、雌のCYP2A2, CYP2C11およびCYP3A18のmRNA発現量は、

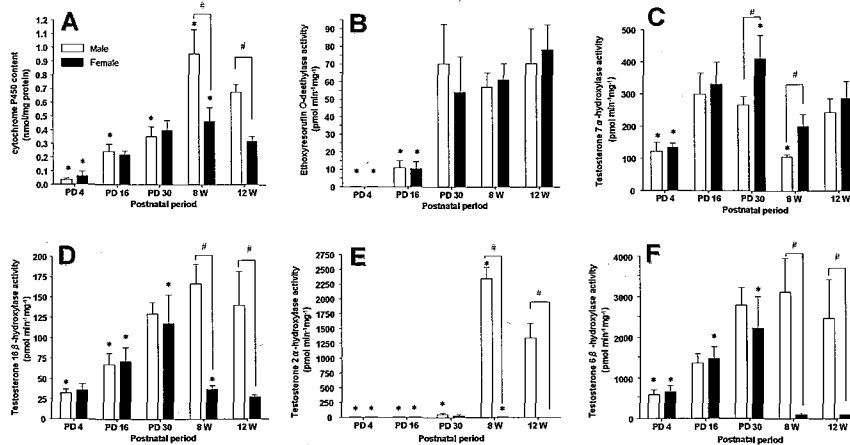


図4 肝臓における総CYP蛋白量および各CYPサブファミリーの酵素活性の成長に伴う変化。総CYP蛋白量, ethoxyresorufin *O*-deethylase活性 (CYP1A), testosterone 7 α -hydroxylase 活性 (CYP2A), testosterone 16 β -hydroxylase活性 (CYP2B), testosterone 2 α -hydroxylase活性 (CYP2C), testosterone 6 β -hydroxylase活性 (CYP3A) をそれぞれA, B, C, D, E, Fに示す。グラフは各群4-8サンプル (生後4日および16日は2-3匹分を合わせて1サンプル) の平均値および標準偏差を示す。
* P < 0.01, significantly different as compared with values for same sex rats aged 12 weeks. # P < 0.01, significantly different between values for male and female rats. PD : postnatal day, W : week.

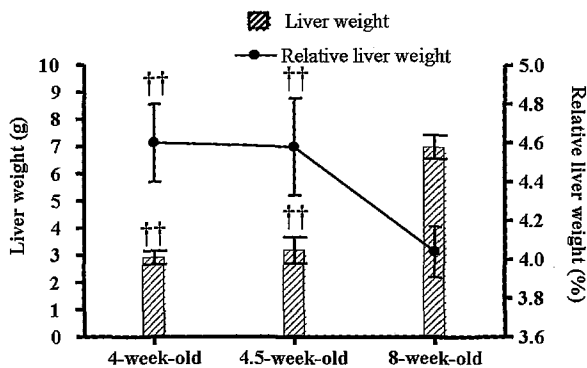


図5 生後4, 4.5, 8週齢の雄Fischerラットの肝重量。グラフは各群4-5匹の平均値および標準偏差を示す。
†† P < 0.01, significantly different as compared with values for 8-week-old rats.

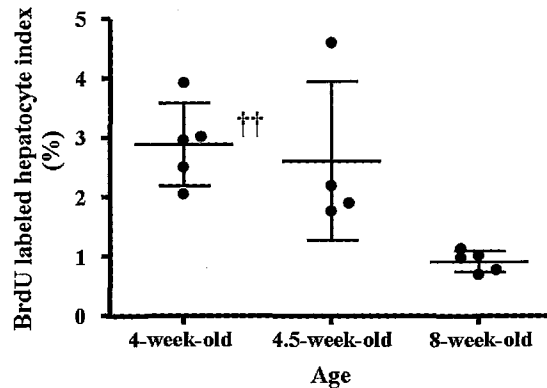


図6 生後4, 4.5, 8週齢の雄FischerラットのBrdU標識肝細胞率。中央線およびその上下線は各群の平均値および標準偏差を示す。
†† P < 0.01, significantly different as compared with 8-week-old rats.

生後4日で低いが生後30日までは緩やかに増加し、その後生後8週および12週で生後4日と同等またはそれ以下に減少した。生後8週および12週ではCYP2A1 (雄<雌), CYP2C11 (雄>雌), CYP3A1 (雄>雌), CYP3A2 (雄>雌), CYP3A18 (雄>雌), CYP3A23 (雄>雌) のmRNA発現量に明らかな性差が認められたが、生後4日, 16日および30日では、生後30日のCYP2A1 (雄<雌) およびCYP3A23 (雄>雌)

のmRNA発現量を除いて、これらのCYP分子種のmRNA発現量に明らかな性差は認められなかった。

肝臓における総CYP蛋白量の成長に伴う変化：肝臓における総CYP蛋白量は、雌雄ともに生後4日で著しく少なく、加齢とともに増加し、生後30日では雌雄ともに生後8週の雌と同程度を示した(図4)。生後8週以降では総CYP蛋白量に明らかな性差(雄>雌)が認められた。

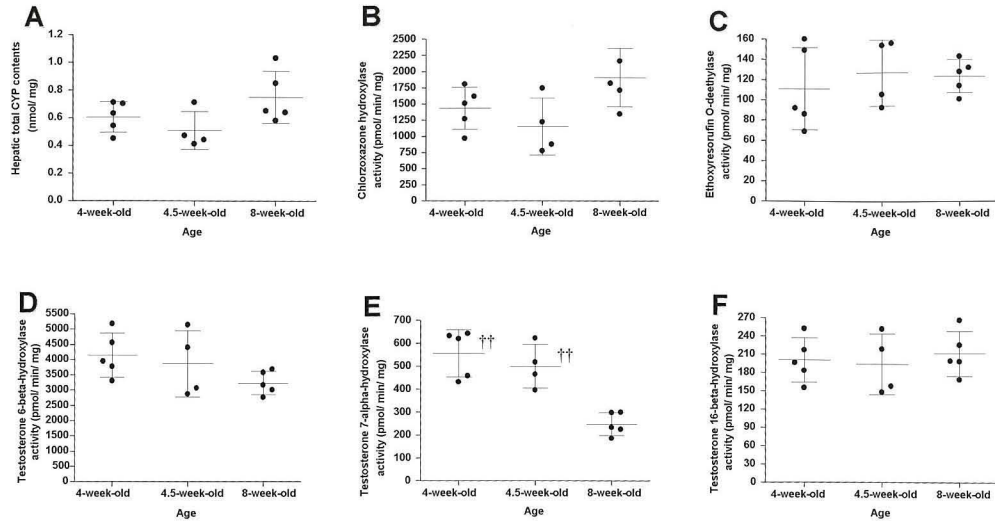


図7 生後4, 4.5, 8週齢の雄Fischerラットの肝臓における総CYP蛋白量およびCYP酵素活性. 総CYP蛋白量, Chlorzoxazone hydroxylase活性 (CYP2E), ethoxyresorufin O-deethylase活性 (CYP1A), testosterone 6 β -hydroxylase活性 (CYP3A), testosterone 7 α -hydroxylase活性 (CYP2A), testosterone 16 β -hydroxylase活性 (CYP2B)をそれぞれA, B, C, D, E, Fに示す. 中央線およびその上下線は各群の平均値および標準偏差を示す.
 $\dagger\dagger$ P < 0.01, significantly different as compared with 8-week-old rats.

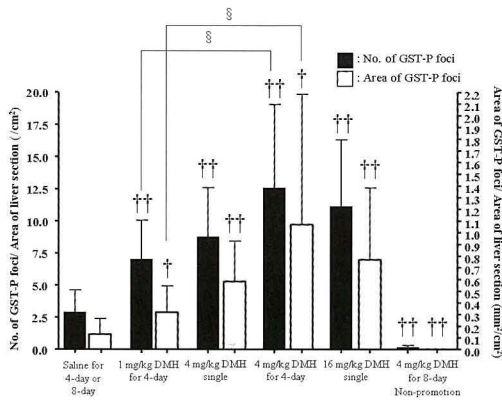


図8 生後4週齢の雄Fischerラットを用いた *in vivo* 中期イニシエーション活性検査法におけるGST-P陽性細胞巣の数および面積. グラフは各群8-17匹の平均値および標準偏差を示す (非プロモーション群は3匹). \dagger P < 0.05, $\dagger\dagger$ P < 0.01, statistically significant difference as compared with animals receiving saline. \S P < 0.05, significant difference between 1-mg/kg/day and 4-mg/kg/day in 4-day DMH administration groups. 2-AAF: 2-acetylaminofluorene, DMH: 1, 2-dimethylhydrazine.

肝臓におけるCYPの酵素活性の成長に伴う変化: 肝臓におけるCYPの酵素活性を図4に示す. CYP2Aの酵素活性は雌雄ともに生後4日で生後8週と同程度に高く, その値は生後8

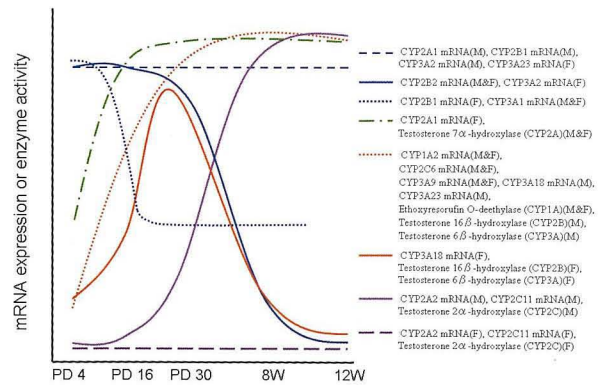


図9 ラットの肝臓における各CYP分子種のmRNA発現量および各CYPサブファミリーの酵素活性の成長に伴う変化のまとめ.
 PD: postnatal day, W: week, M: male, F: female.

週以降まで維持された. CYP2Cの酵素活性は雌雄ともに生後4日から30日まで著しく低く, 生後8週で雄が著しく上昇し, 雌が低値で維持された. CYP1Aの酵素活性は雌雄ともに生後4日で低く, 加齢とともに上昇し, 生後30日で生後12週齢とほぼ同程度を示した. 雄のCYP2BおよびCYP3Aの酵素活性はCYP1Aの酵素活性と同様な成長に伴う変化を示した. それに対し

て、雌のCYP2BおよびCYP3Aの酵素活性は、生後4日から30日まで加齢とともに上昇したが、生後8および12週で生後4日と同等またはそれ以下の低値を示した。生後8週および12週ではCYP2B (雄>雌)、CYP2C (雄>雌)、CYP3A (雄>雌) の酵素活性に明らかな性差が認められたが、生後4日、16日および30日では、生後30日のCYP2Aの酵素活性 (雄<雌)を除き、これらのCYPの酵素活性に性差は認められなかった。

2 細胞増殖刺激を必要としない幼若Fischerラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法の有用性の検討 (実験2)

生後4週、4.5週、8週のFischerラットの肝臓における肝細胞増殖活性およびCYPの酵素活性：肝臓の実重量および体重比重量を図5に示す。生後4週および4.5週の肝臓の実重量は生後8週齢と比べて著しく低い値を示したが、体重比重量は生後8週齢と比べて著しく高い値を示し、生後4週および4.5週のBrdU標識肝細胞率は、生後8週齢に比べてそれぞれ約3倍および2倍の高い値を示した (図6)。生後4週および4.5週の肝臓における総CYP蛋白量ならびにCYP1A、CYP2B、CYP2EおよびCYP3Aの酵素活性は生後8週齢とほぼ同程度を示し、生後4週および4.5週のCYP2Aの酵素活性は生後8週齢よりも約2倍の高い値を示した (図7)。

生後4週齢Fischerラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法によるDMHのイニシエーション活性の評価：生後4週齢ラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法における各群のGST-P陽性巢の数および面積を図8に示す。DMH投与群において、誘導されたGST-P陽性巢の数および面積は対照群と比較して著しく高い値を示し、DMHの投与量とGST-P陽性巢の数および面積の増加に用量依存性が認められた。さらに、1 mg/kg/dayのDMHを4日間反復経口投与した群および4 mg/kg/day

のDMHを4日間反復経口投与した群のGST-P陽性巢の数および面積は、それぞれ4 mg/kg/dayのDMHを単回経口投与した群および16 mg/kg/dayのDMHを単回経口投与した群と同程度の値を示した。一方、CCl₄および2-AAFを処置しない非プロモーション処置群のGST-P陽性巢の数および面積は対照群よりも著しく低い値を示した。

考 察

CYP2E1によって代謝活性化されるDMHに代表されるように、多くの発がん物質はCYPをはじめとした薬物代謝酵素によって代謝活性化されなければその発がん性を示さない [10, 26, 28]。代謝活性化した発がん物質が細胞内の蛋白やDNAに作用することで遺伝毒性や発がん性を示すが、その作用は細胞が増殖しているときに最も影響を受ける [7, 8, 13]。これらのより、細胞増殖刺激の代わりに幼若ラットを用いる中期イニシエーション活性検索法では、被験物質のイニシエーション活性の検出感度を高めるために、被験物質の投与期間に高い肝細胞増殖活性と代謝活性化を起こす十分な肝代謝酵素を有する週齢のラットを用いる必要がある。

実験1で得られたSDラットの肝臓における各CYP分子種のmRNA発現量およびCYPの各酵素活性の成長に伴う変化のまとめを図9に示す。生後30日の肝臓では、CYP2C11のような性特異的発現分子種を除いたCYPが生後8週以降とほぼ同程度発現しており、生後4週前後の幼若ラットの肝臓は成獣とほぼ同様な薬物代謝能を有していると考えられた。一方、p-histon標識肝細胞率は雌雄ともに生後4日から30日で生後8週と比較して高く、特に生後30日で最大となることが示された。さらに、Furukawaら [11] がWistar Hannover GALASラットを用いて生後4週から16週までの各週の肝細胞増殖活性を調べた結果、生後4週の肝細胞増殖活性が最も高いことを報告していることから、ラッ

トの肝細胞増殖活性は生後4週前後が最も高いと考えられた。以上の実験1の結果より、幼若ラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法において、被験物質の投与期間に高い肝細胞増殖活性と代謝活性化を起こす十分な肝代謝酵素を有する適切な週齢は生後4週前後と考えられた。

実験2の結果から、生後4週および4.5週のFischerラットは生後8週齢よりも約2-3倍の高い肝細胞増殖活性を有し、DMHの代謝活性化に必要なCYP2E1をはじめとしたCYPの各酵素活性も生後8週齢と同程度以上であることが示された。さらに、細胞増殖刺激を用いない生後4週齢Fischerラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法において、DMH投与群でGST-P陽性巢が対照群と比較して著しく増加した。したがって、生後4週齢ラットは生後8週齢に比べて著しく高い肝細胞増殖活性と同程度の肝臓における薬物代謝酵素を有し、その生後4週齢ラットを用いた被験物質投与期間に細胞増殖刺激を必要としない*in vivo*中期イニシエーション活性検索法は、従来の細胞増殖刺激を用いた方法と同様に代謝活性化を必要とした被験物質のイニシエーション活性を検出できることが示された。また、生後4週齢ラットにDMHの総投与量を4日間に分割反復投与した群が、DMHの総投与量を単回投与した群と同様なGST-P陽性巢の数および面積を示したことから、生後4週齢ラットを用いた中期イニシエーション活性検索法は、細胞増殖刺激が必要ないだけでなく、従来の細胞増殖刺激を用いた方法では評価できなかった被験物質の反復投与による評価も可能であると考えられた。

生後4週齢ラットを用いる他の利点として、従来の方法は通常、生後4週齢の約3倍の体重を有する生後7週前後の週齢のラットを用いるため、生後4週齢ラットを用いる本モデルは従来の方法に比べて約1/3の被験物質で評価が可能である。また、従来の方法は動物実験期

間が被験物質投与から5週間以上必要であったが、本検索法は細胞増殖刺激を用いないために初回被験物質投与後から4週間で十分評価が可能であると考えられた。

本研究より、幼若ラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法において、被験物質の投与期間に必要な高い肝細胞増殖活性と被験物質の代謝活性化を起こす十分な肝代謝酵素を有する至適な週齢は生後4週前後であることが示され、生後4週齢雄Fischerラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法は、被験物質投与期間に細胞増殖刺激を必要とせずDMHのイニシエーション活性を簡単、早期に、また用量依存的、投与期間依存的に検出できることが示された。これより、生後4週齢ラットを用いた*in vivo*中期イニシエーション活性検索法は、従来法の課題である被験物質投与期間における細胞増殖刺激に必要な労力および細胞増殖刺激が及ぼす動物への負荷を小さくするだけでなく、被験物質の反復投与による評価が可能となり、幅広い化学物質の発がん性(イニシエーション活性)の評価に有用と考えられた。近年、実験動物の取り扱いに対する配慮が強く求められるようになってきていることから、本モデルが普及していくことが望まれる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、御助言と御協力を頂きました岐阜大学の柵木利昭名誉教授、ファイザー株式会社の堀井郁夫博士および板村理央氏、東レ株式会社の宮本庸平博士、日本たばこ産業株式会社の崎村雅憲博士、大正製薬株式会社の佐藤靖博士、千葉科学大学の堀本政夫准教授ならびに岐阜大学応用生物科学部獣医学課程獣医病理学分野の皆様へ感謝致します。

引用文献

[1] Ames B, Gold L: *Biotherapy* 11, 205-

- 220 (1998)
- [2] Asaoka Y, Sakai H, Takahashi N, Hirata, A, Tsukamoto, T, Yamamoto, M, Yanai, T, Masegi, T, Tatematsu, M. : J Appl Toxicol, 25, 554-561 (2005).
- [3] Asaoka Y, Sakai H, Hirata A, Sasaki J, Goryo M, Miyamoto Y, Yanai T, Masegi T and Okada K. : J Vet Med Sci, 72, 43-53 (2010)
- [4] Asaoka Y, Sakai H, Sasaki J, Goryo M, Yanai T, Masegi T and Okada K : J Vet Med Sci, in press
- [5] Bandiera S, Ryan D, Levin W, Thomas P : Arch Biochem Biophys, 248, 658-676 (1986)
- [6] Burke M, Thompson S, Weaver R, Wolf C, Mayer R : Biochem Pharmacol, 48, 923-936 (1994)
- [7] Cayama E, Tsuda H, Sarma D, Farber, E : Nature, 275, 60-62 (1978)
- [8] Cohen S, Ellwein L : Science, 249, 1007-1011 (1990)
- [9] Espandiari P, Robertson LW, Srinivasan, C Glauert HP : Toxicology, 206, 373-381 (2005)
- [10] Fiala E : Cancer, 40, 2436-2445 (1977)
- [11] Furukawa S, Tamura T, Ogawa I, Goryo M, Okada K. : J Toxicol Pathol, 16, 81-84 (2003)
- [12] Goldsworthy T, Pitot H : J Toxicol Environ Health, 16, 389-402 (1985)
- [13] Guengerich F : Carcinogenesis, 21, 345-351 (2000)
- [14] 林 真, 鈴木雅実 : 日本トキシコロジー学会教育委員会 [編] : 臓器毒性, 毒性試験, 遺伝毒性. トキシコロジー, 第1版, 136-143, 朝倉書店, 東京 (2002)
- [15] Ito N, Shirai T, Fukushima S. : Prog Exp Tumor Res, 33, 41-57 (1991)
- [16] Ito N, Tamano S, Shirai T : Cancer Sci, 94, 3-8 (2003)
- [17] Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, Uwagawa S, Kagawa M., Ogiso T, Masui, T : Carcinogenesis 9, 387-394 (1988).
- [18] Leclercq I, Horsmans Y, Desager J : J Chromatogr A, 828, 291-296 (1998)
- [19] 三森国敏 : 日本トキシコロジー学会教育委員会 [編] : 臓器毒性, 毒性試験, 発がん性. トキシコロジー, 第1版, 143-157, 朝倉書店, 東京 (2002)
- [20] Omura T, Sato R : J Biol Chem, 239, 2370-2378 (1964)
- [21] Pearce R, McIntyre C, Madan A, Sanzgiri, U, Draper, A., Bullock, P, Cook, D, Burton L, Latham, J, Nevins C, Parkinson A : Arch Biochem Biophys, 331, 145-169 (1996)
- [22] Sakai H, Tsukamoto T, Yamamoto M, Kobayashi K, Yuasa H, Imai T, Yanai T, Masegi T, Tatematsu M : Cancer Lett 188, 33-38 (2002)
- [23] Sakai H, Tsukamoto T, Yamamoto M, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Masegi T, Tatematsu M : Jan J Cancer Res, 92, 1018-1025 (2001)
- [24] Sakai H, Tsukamoto T, Yamamoto M, Yanai T, Masegi T, Inada K, Nakanishi H, Tatematsu M : Cancer Lett, 148, 59-63 (2000)
- [25] Schenkman J, Thummel K, Favreau L : Drug Metab Rev, 20, 557-584 (1989)
- [26] Sohn O, Ishizaki H, Yang C, Fiala, E : Carcinogenesis, 12, 127-131 (1991)
- [27] Tatematsu M, Hasegawa R, Imaida K, Tsuda H, Ito N : Carcinogenesis, 4, 381-386 (1983)
- [28] Thomas P, Bandiera S, Maines S, Ryan

- D, Levin, W : Biochemistry, 26, 2280-2289 (1987)
- [29] Thurnherr N, Deschner E, Stonehill E, Lipkin M : Cancer Res, 33, 940-945 (1973)
- [30] Tsuda H, Lee G, Farber E : Cancer Res, 40, 1157-1164 (1980)
- [31] Ward J, Yamamoto R, Benjamin T, Brown C, Weisburger J : J Am Vet Med Assoc, 164, 729-732 (1974)
- [32] Whalley P, Bakes D, Grime K, Weaver R : J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 760, 281-288 (2001)