

P-49

ラット肝二段階発がんモデルにおける p53 関連遺伝子及び増殖関連遺伝子産物の変動について

○畝山智香子、渋谷淳、高橋則行、榊富直哉、有村卓朗、高木広憲、広瀬雅雄（国立衛研・病理）

【目的】ラット肝発がん過程における p53 及び増殖関連遺伝子産物の動態を明らかにする目的で、肝中期発がん性試験法をモデルとしてプロモーション時期に投与した遺伝子傷害性を示さない発がん物質の影響を検討した。【方法】F344 ラットに DEN 200mg/kg を腹腔内投与し、その3週後に 2/3 肝部分切除を行った。DEN の投与2週後から Phenobarbital (PB) 600ppm、Diethylhexylphthalate (DEHP) 20000ppm、Thioacetamide (TAA) 400ppm などの非遺伝子傷害性発がん物質、Acetoaminophen (APAP) 10000ppm 及び α -naphthylisothiocyanate (ANIT) 500ppm などの肝毒性物質を混餌投与し、8週目に解剖し肝臓を採取した。肝組織から RNA-STAT60 により total RNA を抽出し、RNA 1 μ g を template に RT-PCR 法により、p53、PAG608、GADD45a、cyclinG、PCNA、p21、fas、fasL、IGFBP3、GADD45b、GST-P、HPRT、k-ras の mRNA 発現について、目的のバンドが検出されるサイクル数や特定サイクル数でのバンドの有無を指標に解析した。【結果及び考察】RNA 解析の結果、今回投与した薬物の投与により p53 関連遺伝子としては p21 が最も鋭敏に変動し、他に GST-P の変動が顕著であった。DEHP 投与は PCNA や cyclinG などの増殖関連因子にあまり影響せず p21 や FasL を対照群に比べて強く抑制し、TAA は p53、p21、fas、GST-P の発現を増加させ、PB は fas と GST-P 発現を増加させた。APAP と ANIT は cyclinG と p21 の発現が低下していた。以上のように DEHP は アポトーシス抑制、TAA は p53 依存的な G1/S 停止 \rightarrow アポトーシスの亢進といったように各薬物の影響はそれぞれ異なるものであった。

P-50

麴酸によるラット肝発癌修飾作用

○瀧澤 保¹、今井俊夫¹、田村 啓¹、上田 誠¹、小野寺博志¹、
安原加壽雄¹、高木久宜¹、三森国敏²、広瀬雅雄¹
(¹国立医衛研・病理、²東京農工大・家畜病理)

【目的】麴酸(KA)は、抗菌作用を有し、食品添加物として使用されている。我々はこれまで、KA の甲状腺発癌修飾作用の機序解明のため検討を行ってきたが、その過程においてマウス肝臓に対する発癌性を示唆する所見が得られた。本研究では、KA のラット肝に対する発癌修飾作用について検討した。【方法】雄性 F344 ラット 60 匹を使用し、diisopropanolnitrosamine (DHPN) 2000 mg/kg あるいは溶媒を単回皮下投与し、1 週後から 0.125、0.5 あるいは 2% の KA を 20 週間混餌投与した。エーテル麻酔下にて剖検し、肝臓を摘出、重量測定後常法に従ってパラフィン切片を作製した。HE 染色および GST-P、PCNA に対する免疫染色を行い、病理組織学ならびに細胞動態学的に検討した。【結果】DHPN 処置後の 2%KA 投与(DHPN+2%KA)群で、肝相対重量が有意に($p < 0.01$)増加し、組織学的に小肉芽腫の増加および小葉中心性の肝細胞の空胞変性が認められた。肝単位面積あたりの GST-P 陽性巣の個数および面積は、DHPN+2%KA 群ではそれぞれ 22.30 個、3745 μ m² と、DHPN 単独群での 8.48 個、531 μ m² に比べ有意に($p < 0.01$)増加した。また、GST-P 陽性巣の発現および PCNA 陽性率は、肝細胞空胞変性の顕著な動物で顕著となる傾向がみられた。2%KA 単独投与群でも、GST-P 陽性巣の個数および面積がそれぞれ 1.39 個、109.5 μ m² と、非処置群での 0.40 個、9.7 μ m² と比較して有意に($p < 0.05$)増加した。0.5%以下の KA 投与では、DHPN 前処置の有無に関わらず、明らかな変化は認められなかった。【結論】KA は肝発癌プロモーション作用を有し、単独での発癌性も示唆された。また、その原因として肝障害性との関連が考えられた。

平成13年度食品添加物安全性評価費


麴酸のF344ラットにおける肝発がん修飾作用
(伊東モデルを用いた検討)

最終報告書

平成14年2月4日

国立医薬品食品衛生研究所・病理部

瀧澤 保
上田 誠
小野寺 博志
今井 俊夫
広瀬 雅雄



要 約

麩酸のラットにおける肝発がんプロモーション作用をジエチルニトロソアミン(DEN)と部分肝切除による二段階モデル(伊東モデル)により検討した。1群25匹のF344雄性ラットに200 mg/kgのDENを単回腹腔内投与し、2週後から麩酸を0, 0.125, 0.5あるいは2%の濃度で飼料に混じて6週間投与した。また、DEN処置3週後に2/3部分肝切除を施した。その結果、実験期間中に被験物質投与に起因した死亡は認められなかった。2%投与群では摂餌量の減少を伴う軽度な体重増加の抑制がみられ、肝相対重量の増加が認められた。肝細胞の前がんがん病変の指標として知られている胎盤型グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST-P)に対する免疫染色では、2%群で単位面積あたりのGST-P陽性巣の個数および面積が有意に増加した。以上の結果から、本実験条件下では、麩酸はF344ラットに対して2%の濃度で肝発がんプロモーション作用を示し、0.5%以下では同作用を示さないことが明らかとなった。



はじめに

麹酸は味噌、醤油などの製造に用いられる麹菌、特に *Aspergillus* 属のカビから産生される抗菌性物質であり、メラニン生合成関連酵素であるチロシナーゼの阻害作用を有していることから、カニやエビの変色を防止する食品添加物として、またその美白効果から化粧品成分として用いられている。我々は、これまでに麹酸の甲状腺発がん作用に関して種々の検討を加え、麹酸の甲状腺におけるヨードの取り込みおよび有機化の阻害により血中甲状腺ホルモン低下が起こり、結果的に甲状腺-下垂体軸のネガティブフィードバック系を介して甲状腺刺激ホルモンが上昇することによるものであることを明らかにしてきた¹⁾。一方、麹酸はB6C3F1マウスに対する長期混餌投与試験(1.5および3%)において甲状腺腫瘍の他、雄1.5%群で肝腫瘍の増加傾向が、雌3%群で肝腫瘍の有意な増加が認められたことが報告されており²⁾、我々も遺伝毒性発がん物質に感受性が高いとされているp53ヘテロ欠損マウス(p53(+/-)マウス)³⁾およびその野生型マウスに1.5および3%麹酸を26週間混餌投与した結果、肝変異細胞巣および肝細胞腺腫が誘発されたことを報告した⁴⁾。これらの成績から、麹酸は甲状腺のみならず、肝発がん過程に対しても何らかの影響を及ぼす可能性が示唆される。発がん過程は、イニシエーション期およびプロモーション期を経るとされているが、麹酸がどの過程に影響を及ぼすかは不明であり、それにより麹酸の安全性評価も異なると考えられる。化学物質の肝発がんプロモーション作用を評価する試験系としては、ラットにおいて胎盤型グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST-P)陽性肝細胞細胞巣が前がん病変として知られていることから、肝発がんイニシエーターであるジエチルニトロソアミンと部分肝切除とを組み合わせ、GST-P陽性巣の発現を検出するいわゆる伊東モデルが最も頻繁に行われており、信頼性が高いと考えられている。そこで、今回伊東モデルを用いて麹酸のラットにおける肝発がん修飾作用を検討した。

実験材料および方法

1. 被験物質および投与量

麹酸(含量100.6%)はアルプス薬品工業(株)から供与され、粉末基礎飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))に0.125, 0.5および2%の濃度になるよう混合し、使用時まで冷蔵の飼料貯蔵庫で保管した。混合飼料の調製は、週1回行った。尚、本試験に先立って、これまでに実施した *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)による甲状腺二段階発がんモデルラットより採材した肝標本のGST-P陽性巣について予備的に検討した結果、2%で陽性巣発現の増加が認められ、0.5%以下の濃度では明らかな影響が認められなかったことから、本試験の投与濃度を0.125, 0.5および2%に設定した。

ジエチルニトロソアミン(DEN)は、ナカライ・テスク(株)より購入し、投与直前に生理食塩水で希釈して用いた。

2. 動物および方法

5週齢の雄性F344/DuCrjラット(SPF)100匹を日本チャールス・リバー(株)より購入し、1

週間馴化させた後、6週齢で実験に供した。動物は、DEN処置当日の体重に基づいて、各群の平均体重が近似するように1群25匹の4群に配した。動物は、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数18回/時、12時間の明暗サイクル(7~19時点灯)に制御されたバリアーシステムの飼育室で、ソフトチップ(三協ラボサービス)の床敷を敷いたプラスチックケージに1ケージあたり最大5匹ずつ収容して飼育した。ケージおよび床敷は週2回交換した。

試験スケジュールの概略をFig. 1に示した。全動物に、DEN 200 mg/kgを単回腹腔内投与した後2週間は基礎飼料(CRF-1,オリエンタル酵母工業(株))を与え、その後麩酸投与群の動物には0.125、0.5あるいは2%の麩酸添加飼料を、対照群の動物には基礎飼料をそれぞれ6週間与えた。更に、DEN処置3週後に2/3部分肝切除を行った。尚、動物には飲料水として水道水を自由に摂取させた。

試験期間中、一般状態および生死の確認を毎日行い、体重および摂餌量を週1回測定した。投与期間終了後、全生存動物をエーテル麻酔下で放血死させ、肝臓を摘出して重量を測定した。肝組織は、一部はアセトンにて固定し、残りを10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。これらの組織は常法に従ってパラフィン包埋した後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、病理組織学的検索を行った。また、GST-Pに対する免疫染色を、抗ラットGST-Pウサギポリクローナル抗体(1:2000, MBL)を用いて、ジアミノベンジジンを染色基質として、ABC法により行い、直径 $200 \mu\text{m}$ 以上のGST-P陽性巣について、その個数を求めるとともに、面積をイメージアナライザー(IPAP,住化テクノス(株))で測定し、標本単位面積あたりのGST-P陽性巣の個数および面積を算出した。

3. 統計学的処理

投与期間中の体重、肝重量およびGST-P陽性巣の個数と面積の各成績は、一元配置分散分析の後、対照群との比較を、Dunnettの検定を用いて両側検定にて有意水準5%および1%で実施した。

結 果

1. 一般状態および死亡動物

対照群を含む各群で、肝部分切除後翌日までに一部の動物が死亡した。また、剖検日当日に0.125%群の1例の死亡が確認された。これらの死亡例に関しては、その死因あるいは死亡発現と投与量との相関性の観点から、被検物質投与とは無関係と判断し、評価から除外した。剖検時の生存例数は、対照群18匹、0.125%群19匹、0.5%群23匹、2%群24匹であった。

2. 体重および摂餌量

2%群で対照群と比べ、体重増加の抑制(Fig. 2)および摂餌量の減少(Fig. 3)が認められた。投与期間を通した1日当たりの被験物質平均摂取量は、0.125%群で77 mg/kg、0.5%群で304 mg/kg、2%群で1124 mg/kgであった。

3. 器官重量

2%群で、剖検時体重が対照群に比べ低値となり、肝相対重量が増加した(Table 1)。

4. 病理組織学的検索およびGST-P陽性巣の解析

2%群の24例中7例に、小葉中心性の肝細胞空胞化が認められた(Table 2)。GST-P陽性巣に関しては、対照群における肝単位面積あたりの個数 8.42 ± 2.69 (個/cm²)および面積 0.77 ± 0.34 (mm²/cm²)に対し、2%群ではその個数および面積がそれぞれ 16.92 ± 3.18 (個/cm²)および 1.62 ± 0.39 (mm²/cm²)と対照群の約2倍となり、対照群と比較して有意に増加した(Table 3)。一方、0.5および0.125%群におけるGST-P陽性巣の発現は対照群と同程度であり、麴酸による明らかな影響は認められなかった。

考 察

麴酸の肝発がんに及ぼす影響に関しては、これまでに雌雄B6C3F1マウスに1.5および3%の濃度で混餌投与した結果、雄1.5%群で肝腫瘍の増加傾向が、雌3%群で肝腫瘍の有意な増加が認められたFujimotoらの報告¹⁾および*p53*(+/-)マウスとその野生型マウスに1.5および3%の麴酸を26週間混餌投与した結果、肝変異細胞巣および肝細胞腺腫が誘発された我々の報告²⁾がある。発がん過程は、イニシエーション期およびプロモーション期の二段階よりなると考えられているが、麴酸がこれらのいずれの過程に影響するかについては明らかではない。今回我々が採用した伊東モデルは、肝発がんイニシエーターであるDEN投与後に部分肝切除を施し、肝細胞の再生能(増殖活性)を促進することにより、化学物質の肝発がんプロモーション作用を短期で検出するのに適した系と考えられている。本実験において、麴酸は2%の濃度でGST-P陽性巣の発現増殖を対照群の約2倍まで促進した。同様の成績は、本試験に先立って実施した麴酸の甲状腺二段階発がんモデルラットより採材した肝標本を用いたGST-P陽性巣の解析でも得られている。すなわち、F344雄性ラットにDHPNを単回皮下投与した後、麴酸を20週間混餌投与した結果、2%麴酸群でのGST-P陽性巣は、対照群に比べ個数で約2.6倍、面積で約7.1倍となる有意な増加が認められ、0.5%以下の濃度では明らかな影響は認められなかった。これらの成績から、麴酸は2%濃度で肝発がんプロモーション作用を有することが明らかとなった。肝発がんプロモーション作用を示す化学物質は、薬物代謝酵素誘導物質、パーオキシゾーム増生物質、肝障害物質など多岐にわたっている。本試験および先のDHPN二段階発がんモデルラットにおいて、2%麴酸群の一部の動物で肝細胞の空胞化が認められたことおよびDHPN二段階発がんモデルラットにおいて肝病変を認める動物でGST-P陽性巣および増殖細胞核抗原(PCNA)陽性肝細胞の発現が顕著となる傾向が認められたことから、麴酸が肝細胞に何らかの影響を及ぼし、その結果肝細胞の増殖活性が亢進していることが推測され、それがプロモーション作用に関与している可能性も考えられたが、本試験がDEN投与および部分肝切除にさらに麴酸を負荷した系である点を考慮すると、麴酸の肝障害性については今後の検討課題であると考えられた。

一方、麴酸の肝発がんイニシエーション作用については、今回の試験成績から言及する

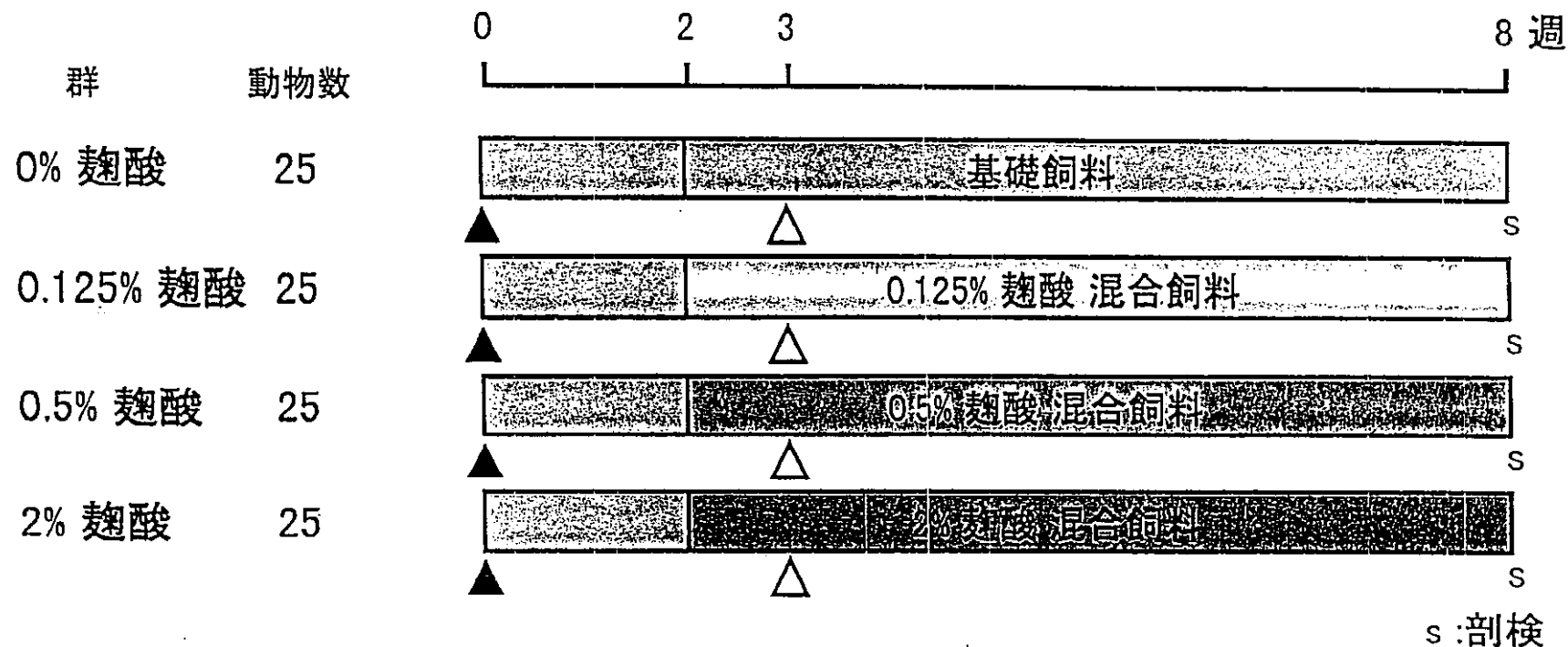
ことはできない。麴酸の変異原性については、Ames test (*S. typhimurium* TA98, TA100), Rec-assay (*B. subtilis*)ならびに染色体異常試験 (Chinese hamster ovary cell) 等の *in vitro* の試験においていくつかの陽性結果が報告されている¹⁾。また、マウス骨髄小核試験は陰性であるが、肝細胞を用いた変異原性試験の成績はない。我々は、遺伝毒性発がん物質に対して感受性が高いとされている *p53(+/-)* マウスにおける検討で、1.5% 麴酸を投与した *p53(+/-)* マウスにおける肝細胞腺腫の発現率が同一用量を負荷した野生型マウスにおける値よりもわずかに高いことを報告している²⁾。また、DHPN二段階発がん試験において、DHPNの処置なしに麴酸のみを20週間投与した動物においてもGST-P陽性巣の増加傾向が認められている。これらの点を考慮すると、麴酸の変異原性あるいは遺伝子傷害性に関して十分な検討と評価が行われているとは断言できない。従って、麴酸の肝発がん過程に及ぼす影響については、今後麴酸の発がん標的臓器の一つと考えられる肝に対する遺伝子傷害性、DNA付加体の確認等の検討を実施し、その後総合的に評価すべきであると考えられた。

参考資料

- 1) Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M., Funakoshi, T., Tamura, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., and Takahashi, M.: Promoting effects of kojic acid due to serum TSH elevation resulting from reduced serum thyroid hormone levels on development of thyroid proliferative lesions in rats initiated with *N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine*. *Carcinogenesis*, 20, 173-176, 1999.
- 2) Tamura, K., Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M., Funakoshi, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takagi, H., and Hirose, M.: Time course observation of thyroid proliferative lesions and serum levels of related hormones in rats treated with kojic acid after DHPN initiation. *J. Toxicol. Sci.*, 24, 145-155, 1999.
- 3) Tamura, K., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K., and Takahashi, M.: Inhibition of thyroid iodine uptake and organification in rats treated with kojic acid. *Toxicol. Sci.*, 47, 170-175, 1999.
- 4) Tamura, K., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takagi, H., and Hirose, M.: Dose-threshold for thyroid tumor-promoting effects of orally administered kojic acid in rats after initiation with *N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine*. *J. Toxicol. Sci.*, 26, 85-94, 2001.
- 5) Fujimoto, N., Watanabe, H., Nakatani, T., Roy, G., and Ito, A.: Induction of thyroid tumors in (C57BL/6xC3H/N)F₁ mice by oral administration of kojic acid. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 697-703, 1998.
- 6) Tennant, R.W., French, J.E. and Spalding, J.W.: Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environ. Health Persp.*, 103, 942-950, 1995.

- 7) 平成13年度厚生労働省報告. 麹酸のp53ノックアウト[p53(+/-)]マウスの甲状腺および肝臓に対する影響.
- 8) Wei, C.L., Huang, T.S., Fernando, S.Y., and Chung, K.T.: Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol. Lett.*, 59, 213-220, 1991.
- 9) Manabe, M., Goto, T., Tanaka, K., and Matsuura, S.: The capabilities of the *Aspergillus flavus* group to produce aflatoxins and kojic acid. *食総研報*, 38, 115-120, 1981.

動物 : F344/DuCrj 雄性 ラット (6週齢)



検索 : 体重, 摂餌量, 肝重量, 病理組織検査(肝), 形態計測(GST-P陽性巣の数・面積)

Fig. 1 試験デザイン

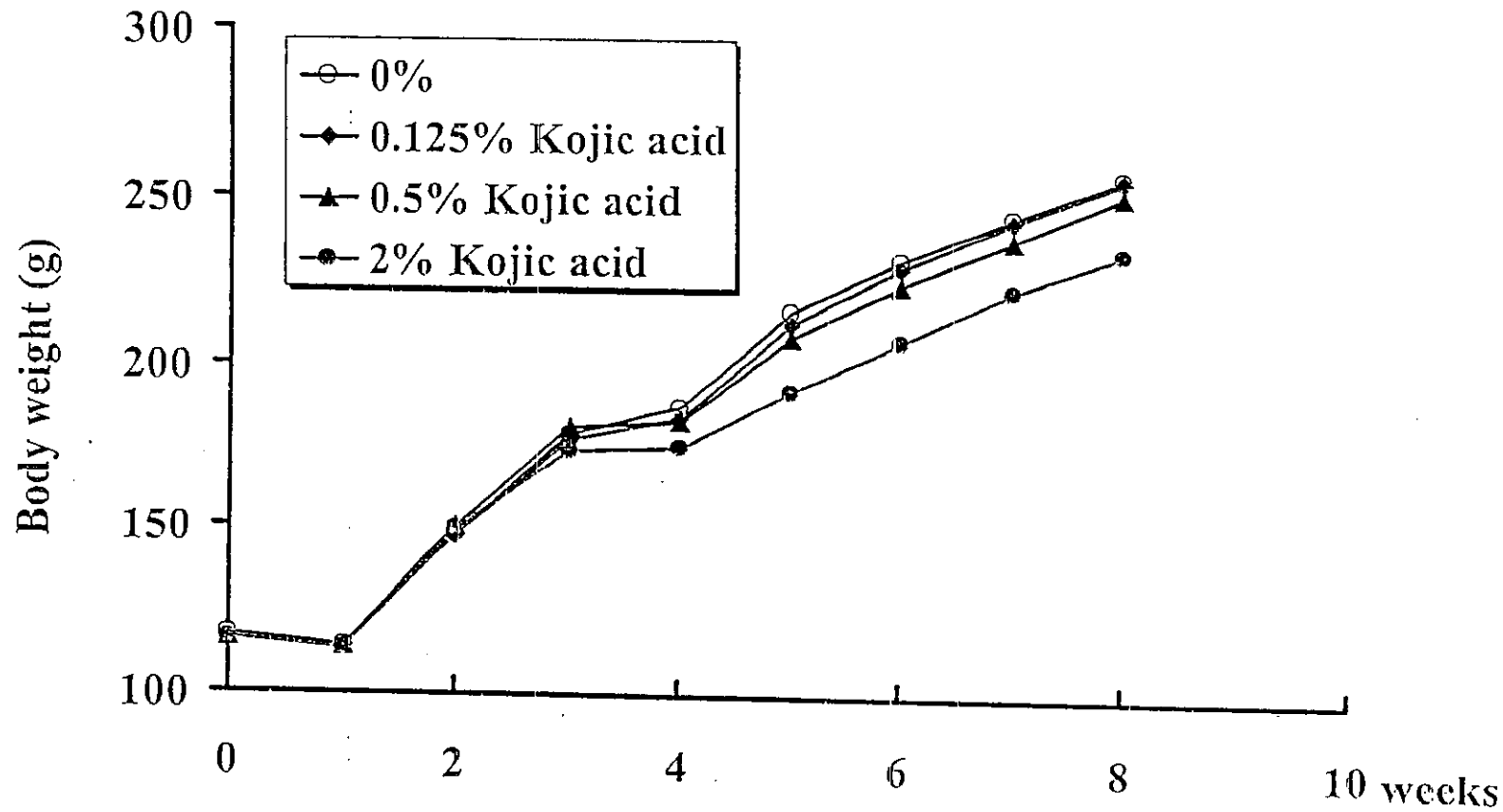


Fig. 2. Body weight changes in rats fed diet containing kojic acid for 6 weeks (week 2-8) after DEN injection at week 0. Each rat is subjected to 2/3 partial hepatectomy in week 3.

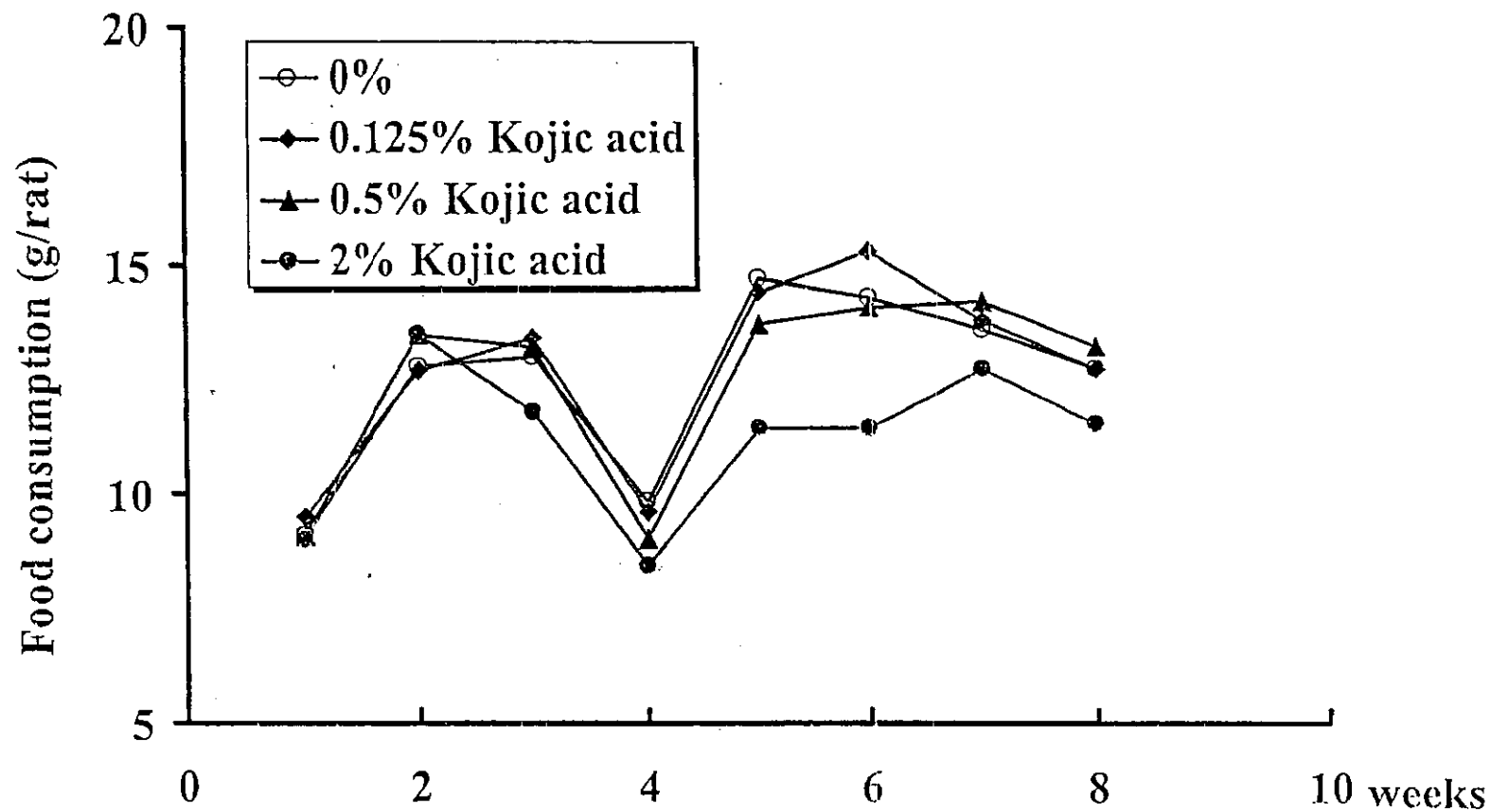


Fig. 3. Food consumption in rats fed diet containing kojic acid for 6 weeks (week 2-8) after DEN injection at week 0. Each rat is subjected to 2/3 partial hepatectomy in week 3.

Table 1 Terminal body and liver weights in rats fed diet containing kojic acid for 6 weeks after DEN initiation

Groups		No. of rats	Terminal body weights (g)	Liver weights	
Initiation	Promotion			(g)	(g/100g b.w.)
DEN	0%KA	18	256 ± 16 (119 ^a)	7.7 ± 0.8	3.0 ± 0.2
DEN	0.125%KA	19	255 ± 16 (118)	7.7 ± 0.7	3.0 ± 0.1
DEN	0.5%KA	23	250 ± 18 (116)	7.8 ± 1.2	3.1 ± 0.5
DEN	2%KA	24	233 ± 14 (99)**	7.8 ± 0.8	3.4 ± 0.2**

Each rat is subjected to 2/3 partial hepatectomy at 3 weeks after DEN injection.

a: Number in the parenthesis is shown as percent increase from initial weights.

** : p<0.01

Table 2 Hepatic lesions in rats fed diet containing kojic acid for 6 weeks after DEN initiation

	Doses (%)	0	0.125	0.5	2
	No. of rats	18	19	23	24
Vacuolation of centrilobular hepatocytes		0 ^a	0	0	7

Each rat is subjected to 2/3 partial hepatectomy at 3 weeks after DEN injection.

a: Number of animals bearing lesions

Table 3 Number and area of GST-P foci in rats fed diet containing kojic acid for 6 weeks after DEN initiation

Groups		No. of rats	Number (No./cm ²)	Area (mm ² /cm ²)
Initiation	Promotion			
DEN	0%KA	18	8.42 ± 2.69	0.77 ± 0.34
DEN	0.125%KA	19	8.17 ± 2.15	0.65 ± 0.23
DEN	0.5%KA	23	8.49 ± 2.33	0.68 ± 0.25
DEN	2%KA	24	16.92 ± 3.18**	1.62 ± 0.39**

Each rat is subjected to 2/3 partial hepatectomy at 3 weeks after DEN injection.

** : p<0.01