

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 松下 幸平

題 目 : Development of new medium-term animal models for predicting chemical carcinogenicity with underlying modes of action using reporter gene transgenic rat  
(レポーター遺伝子導入ラットを用いた中期発がん評価系の開発)

## 論文要旨 :

環境化学物質の発がん性評価は、げっ歯類を用いた長期発がん性試験により行われているが、これには多大な時間・動物数・コストが必要とされ、またその結果をヒトに外挿するためには mode of action を解析する必要がある。これまで、発がん性評価の迅速化を図る目的で、遺伝子改変動物を用いた代替試験法など、様々な短期あるいは中期検索法が開発された。中でもラット肝中期発がん性試験法は、肝前がん病変である glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢を指標として用いており、肝プロモーター物質の高い検出感度が知られている。しかしながら、従来の代替法においてはいずれも、発がん過程における遺伝毒性の関与など、mode of action に関する情報を得ることはできない。そこで本研究では、レポーター遺伝子導入ラットである *gpt delta* ラットを用い、肝臓と腎臓において、それぞれ *in vivo* 変異原性及びプロモーション活性を同時に検出することのできる中期発がん評価系の開発を目的とした。

第1章では、肝臓における新規評価系 GPG モデルの開発の可能性について検討した。GPG モデルでは、*gpt delta* ラットに被験物質を4週間投与した後、組織採材を目的とした部分肝切除を施し、その切除肝を用いて *gpt assay* を実施して *in vivo* 変異原性の指標とする。部分肝切除の18時間後にイニシエーション処置として diethylnitrosamine (DEN) を単回腹腔内投与し、被験物質の投与をさらに継続して、試験期間終了時の残存肝において GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施して、DEN 誘発肝前がん病変への促進作用を指標としてプロモーション活性を評価する。種々の条件検討試験の結果に基づき、DEN の投与用量を 10 mg/kg に、部分肝切除後の被験物質投与期間を 6 週間に決定した。引き続き、遺伝毒性肝発がん物質として 2-acetylaminofluorene, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone, safrole, 非遺伝毒性肝発がん物質として piperonyl butoxide, phenytoin, 非発がん物質として acetaminophen, 遺伝毒性は報告されているものの肝臓には発がん性が認められない aristolochic acid (AA) を用いて検証した結果、*gpt delta* ラットに部分肝切除を施し、*gpt assay* と GST-P 解析を組み合わせた中期発がん評価系の開発の可能性が示された。

第2章では、前章で考案したプロトコールにおいては被験物質と DEN が同時に投与されており、それらの相互作用の可能性が考えられるため、その回避を目的に被験物質の休薬期間を設けた改良プロトコールの樹立を目指した。CYP2E1 の抑制剤並びに CYP1A 及び CYP2B 誘導剤を用いて、4週間の被験物質投与が与える薬物代謝酵素活性への影響が、2週間の休薬によ

り消失することを確認した。さらに DEN 投与後に 1 週間の休薬期間を設定することとし、以下の改良プロトコールを構築した。6 週齢雄性 F344 *gpt delta* ラットに被験物質を 4 週間投与し、2 週間の休薬後に DEN を 10 mg/kg 単回腹腔内投与する。DEN 投与 18 時間前に部分肝切除を実施し、その切除肝を用いて *gpt assay* を実施する。DEN 投与 1 週間後より被験物質投与を再開し、試験開始 13 週間後の残存肝において GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施する。遺伝毒性肝発がん物質の estragole (ES)、遺伝毒性腎発がん物質の AA、非遺伝肝発がん物質の  $\beta$ -naphthoflavone 及び barbital を用いた検証試験において、GPG モデルの妥当性を支持する結果が得られた。さらに、ES 投与群の残存肝において、PCNA 陽性細胞率及び細胞周期関連遺伝子の発現が上昇していたことに対し、AA 投与群においては変化がみられなかったことから、AA は肝臓において遺伝毒性を示すが、プロモーション活性を欠くために肝発がん性を示さないことが示唆された。以上より、GPG モデルは肝臓において発がん機序を考慮に入れた発がん性予測に有用であることが示された。

第 3 章では、肝臓に次ぐ主要な発がん標的臓器である腎臓において、*in vivo* 変異原性とプロモーション活性を同時に評価することのできる中期発がん性評価系 GNP モデルの開発を目的とした。種々の条件検討試験の結果に基づき、適用する動物の性別、DEN の適正投与時期及び投与用量並びに被験物質投与期間を決定し、以下の標準プロトコールを確立した。6 週齢の雌性 F344 *gpt delta* ラットに被験物質を 4 週間投与した後、2 週間の休薬後に DEN を 40 mg/kg 単回腹腔内投与する。DEN 投与の 48 時間前に片側腎摘出を施し、摘出腎を用いて *gpt assay* を実施して *in vivo* 変異原性の指標とする。DEN 投与の 1 週間後に被験物質投与を再開し、実験開始 19 週間後の残存腎において前腫瘍性病変の病理組織学的解析を行い、DEN 誘発前腫瘍性病変への促進作用を指標としてプロモーション活性を評価する。遺伝毒性発がん物質として aristolochic acid、腎プロモーター物質として potassium dibasic phosphate、phenylbutazone、陰性対照として雌性ラットにおいては発がん性を示さない  $\alpha$ -limonene を用いて検証した結果、GNP モデルの腎臓における中期発がん評価系としての有用性が証明された。

本研究により、肝臓及び腎臓における新しい中期発がん評価系を確立した。これらの試験法においては mode of action を考慮に入れた包括的な発がん性評価が期待できることから、環境化学物質のヒト発がんリスク評価の精緻化に大きく貢献することが考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	松下 幸平
審査委員	主査： 鹿児島大学 教授 三好 宣彰
	副査： 山口大学 教授 森本 将弘
	副査： 鹿児島大学 教授 宮本 篤
	副査： 鹿児島大学 教授 松元 光春
	副査： 鹿児島大学 准教授 川口 博明
題目	Development of new medium-term animal models for predicting chemical carcinogenicity with underlying modes of action using reporter gene transgenic rat. (レポーター遺伝子導入ラットを用いた中期発がん評価系の開発)
審査結果の要旨：  環境化学物質の発がん性評価は、げっ歯類を用いた長期発がん性試験により行われているが、これには多大な時間・動物数・コストが必要とされ、またその結果をヒトに外挿するためには mode of action を解析する必要がある。ラット肝中期発がん性試験法は、肝前がん病変である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢を指標とする肝プロモーター物質の高い検出感度が知られている。しかしながら発がん過程における遺伝毒性の関与等、mode of action に関する情報を得ることはできない。本研究ではレポーター遺伝子導入ラットである <i>gpt delta</i> ラットを用い、肝臓及び腎臓における <i>in vivo</i> 変異原性及びプロモーション活性を同時に検出することができる中期発がん評価系の開発を目的とした。 第 1 章では、肝臓における新規評価系 GPG モデルの開発の可能性を検討した。 <i>gpt delta</i> ラットに被験物質を 4 週間投与した後、部分肝切除及び <i>gpt assay</i> を実施して <i>in vivo</i> 変異原性の指標とした。部分肝切除 18 時間後の diethylnitrosamine (DEN) の単回腹腔内投与及び被験物質の継続投与を行い、試験期間終了時の残存肝における GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施し、DEN 誘発肝前がん病変への促進作用を指標としてプロモーション活性を評価した。DEN の投与用量を 10 mg/kg で部分肝切除後の被験物質投与継続期間を 6 週間として、2-acetylaminofluorene、2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone、safrole、piperonyl butoxide、phenytoin、acetaminophen、aristolochic acid (AA) を用いて検証した結果、 <i>gpt assay</i> と GST-P 解析を組み合わせた中期発がん評価系の開発が可能であることを示唆した。 第 2 章では、前章でのプロトコールにおいては被験物質と DEN の相互作用も考えられるため、	

(別紙様式第 10 号)

その回避を目的に被験物質の休薬期間を設定した改良プロトコールの樹立を検討した。その結果、CYP2E1 の抑制剤、CYP1A、CYP2B 誘導剤を用いて、4 週間の被験物質投与が与える薬物代謝酵素活性への影響が 2 週間の休薬により消失することを確認した。さらに DEN 投与後に 1 週間の休薬期間を設定し、6 週齢・雄・F344 *gpt delta* ラットに被験物質を 4 週間投与し、2 週間の休薬後に DEN を 10 mg/kg 単回腹腔内投与し、DEN 投与 18 時間前に部分肝切除を実施して *gpt assay* を実施した。DEN 投与 1 週間後より被験物質投与を再開し、試験開始 13 週間後の残存肝において GST-P 陽性細胞巢の定量的解析を実施した。estragole (ES)、AA、 $\beta$ -naphthoflavone、barbital を用いた検証試験においては、GPG モデルの妥当性を支持する結果が得られた。さらに、ES 投与群の残存肝において、PCNA 陽性細胞率及び細胞周期関連遺伝子の発現が上昇していたことに対し、AA 投与群においては変化がみられなかったことから、AA は肝臓において遺伝毒性を示すがプロモーション活性を欠くために肝発がん性を示さないことが示唆された。

第 3 章では、腎臓において *in vivo* 変異原性とプロモーション活性を同時に評価することが可能な中期発がん性評価系 GNP モデルの開発を目的とした。6 週齢・雌・F344 *gpt delta* ラットに被験物質を 4 週間投与した後、2 週間の休薬後に DEN を 40 mg/kg 単回腹腔内投与し、DEN 投与の 48 時間前に片側腎摘出を施し、摘出腎を用いて *gpt assay* を実施して *in vivo* 変異原性の指標とした。DEN 投与の 1 週間後に被験物質投与を再開し、実験開始 19 週間後の残存腎において前腫瘍性病変の病理組織学的解析を行い、DEN 誘発前腫瘍性病変への促進作用を指標としてプロモーション活性を評価した。aristolochic acid、potassium dibasic phosphate、phenylbutazone、 $\alpha$ -limonene を用いて検証した結果、GNP モデルの腎臓における中期発がん評価系としての有用性が示唆された。

本研究により、肝臓及び腎臓における新しい中期発がん評価系を確立した。これらの試験法は mode of action を考慮した包括的な発がん性評価が期待できることから、環境化学物質のヒト発がんリスク評価の厳密化に大きく貢献することが考えられた。

以上により、本論文は博士（獣医学）の学位論文として十分に値する内容であることを認める。