

酸化ストレス発生系を有する非遺伝毒性発がん物質の  
発がん機序解明に関する研究

日本大学大学院獣医学研究科 獣医学専攻  
博士課程

田崎 雅子

2013

## 目次

序論	1
----	---

### 第1章 チトクロムP450誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の*gpt delta* ラットを用いた酸化的DNA損傷ならびに*in vivo*変異原性に関する検討

1.1 はじめに	8
1.2 材料および方法	12
1.3 成績	17
1.4 考察	29
1.5 小括	32

### 第2章 キノン体生成能あるいはチトクロムP450誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の*p53*欠損*gpt delta* マウスを用いた酸化的DNA損傷ならびに*in vivo*変異原性に関する検討

2.1 はじめに	34
2.2 材料および方法	36
2.3 成績	40
2.4 考察	54
2.5 小括	59

第3章 *mrf2*欠損マウスを用いたペンタクロロフェノールならびにピペロニルブ

トキシドの腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点に関する解析

3.1	はじめに	62
3.2	材料および方法	65
3.3	成績	68
3.4	考察	82
3.5	小括	85
	総括	87
	謝辞	94
	引用文献	95

## 序論

人口動態統計によると、我が国における死因の第1位は、悪性新生物、いわゆるがんで、平成24年のデータでは、がんによる死亡者は125万6254人と、死因の28.7%を占めている[54]。がんの発生要因として、喫煙、細菌やウイルスなどの感染症、食物中の成分（塩分等）や化学物質など、様々な要因が関与していると考えられている。特に現代社会においては食事で摂取する食品添加物やタバコなどの嗜好品等を含めると、環境中に存在する化学物質の約80%が発がんとの関連性が疑われている[18]。従って、種々の化学物質の発がんリスクを適切に評価し、管理することが、我々が健全な生活を営む上で極めて重要であるといえる。

化学物質の発がん性は、げっ歯類を用いた長期発がん性試験において腫瘍の発生を病理組織学的に解析する方法で検出される。しかしながら、その結果を得るまでには、費用と時間を要するため、化学物質の発がん性を予測する方法として、1975年にサルモネラ菌を用いた遺伝毒性試験（Ames試験）が開発され、極めて簡便にその発がん性のスクリーニングを行うことができるようになった。げっ歯類に発がん性を示すことが知られていた物質のうち、約90%がAmes試験で陽性を示すことが報告されており[66]、げっ歯類を用いた発がん性試験と高い相関を示す主要な試験として位置付けられるようになった。

しかし、米国毒性評価計画（National Toxicology Program）において化学物質の発がん性試験の結果が蓄積されてくると、サルモネラ菌に突然変異を誘発せず（Ames試験陰性）、動物に発がん性を誘発する、いわゆる非遺伝毒性発がん物質が存在することが明らかとなり、発がん性が認められた化学物質の約40%がAmes試験では陰性を示すことが報告された[47]。代表的な非遺伝毒性発がん物質とし

て、塩素化合物（四塩化炭素、クロロホルム）、有機塩素殺虫剤（ディールドリ  
ン、DDT、クロデン）、ペルオキシゾーム増殖剤（DEHP、クロフィブレート）、  
ステロイドホルモン（エストラジオール、ジエチルスチルベストロール）等が挙  
げられる。

これまで、非遺伝毒性発がん物質の発がん機序として、細胞増殖の活性化、細  
胞死の抑制、細胞分化の抑制、細胞障害等による反応性（代償性）細胞増殖など  
が考えられてきた。近年では、化学物質がもつ酸化作用[118]、酸化還元サイクル  
の亢進による活性酸素の発生[115]、活性酸素消去系酵素であるグルタチオンの枯  
竭[34]、薬物代謝酵素チトクローム P450（CYP）の酵素誘導とこれによる代謝過  
程[125]など、様々な反応経路を介して生体内にもたらされる酸化ストレスが細胞  
に増殖刺激を与え、発がん性を示すという機序も考えられるようになった[52、128、  
129]。また、酸化ストレスは、細胞の増殖活性を亢進させるだけではなく、DNA  
塩基にも損傷を与え（酸化的 DNA 損傷）、遺伝子変異を生じることが報告されて  
いる [20、45、121]。グアニンの酸化体である 8-ヒドロキシデオキシグアノシ  
ン（8-OHdG）は、アデニンとの誤対合を生じ、GC から TA への塩基置換変異や欠  
失変異を生じることが知られている[5、17、21、95]。8-OHdG は、その特異的な  
修復酵素であるオキソグアニングルコシダーゼ（OGG1）により塩基除去修復が  
行われるが、その修復過程で DNA の二本鎖切断を伴う大型の欠失変異が生じる  
[22、59、132]。これらのことから、酸化ストレスを発生す非遺伝毒性発がん物  
質は、生体内で酸化的 DNA 損傷を生じ、遺伝子変異を誘発する（*in vivo* 変異原  
性を有する）と考えられている。

遺伝毒性発がん物質は、暴露量を低減してもその発がんリスクはゼロにはなら

ない、すなわち閾値がないとされ、食品添加物や残留農薬、動物用医薬品などで、一日許容摂取量(一生涯摂取しても影響が生じないとされる一日あたりの摂取量)が設定されていない。一方、非遺伝毒性発がん物質は、発がん作用に閾値が存在するとの概念に基づき、一日許容摂取量が設定可能とされる。そのため、酸化ストレス発生系を持つ非遺伝毒性発がん物質の発がん機序を明らかにすることは、化学物質のリスク分類を行う上で、極めて重要な意味を持つと考えられる。

これまで、複雑な生体内反応を介して生じる活性酸素が遺伝子にもたらす影響やその腫瘍形成への関与を解析することは困難であった。近年、遺伝子改変動物の作出技術は飛躍的な革新を遂げ、様々な疾病の病態発現の解析や発がん研究に遺伝子改変動物が多用されるようになった。

*gpt delta* マウスならびにラットは、突然変異を検出できるレポーター遺伝子(生体内の変化を検出するために導入された外来遺伝子)を組み込んだ  $\lambda$  ファージ DNA をマウスあるいはラットの受精卵にマイクロインジェクションすることにより作出された動物で、全身の細胞にレポーター遺伝子を持っている。この動物に化学物質を投与した後、標的臓器からゲノム DNA を抽出し、*in vitro* パッケージング法により回収したファージ粒子を大腸菌に感染させて動物の体内で生じた遺伝子変異を検出することができる (*in vivo* mutation assay) [63]。従って、*gpt delta* マウスならびにラットを用いた解析から、生体内で生じる活性酸素が遺伝毒性的に作用し発がんを誘発することが示唆される非遺伝毒性発がん物質の発がんメカニズムに関する有用な知見を得ることが可能である。

*p53* 遺伝子は、DNA 修復やアポトーシスに関わるがん抑制遺伝子として知られており[3、56]、近年では、その発現蛋白質が抗酸化酵素群の転写因子として働く

ことも報告されている[32、65、104]。これらの機能を有する *p53* 遺伝子が欠損した *gpt delta* マウスは、ゲノム DNA が不安定性になることが想定されるため、酸化ストレス発生系を有する非遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性的作用の検出に有用であると考えられている。

多くの抗酸化酵素群の転写を調節し、生体内酸化防御機構の重要な因子として知られる Nrf2(nuclear factor E2 p45-related factor 2)が欠損したマウスも作出され[35]、酸化ストレスの生体に及ぼす影響の研究に応用されている。

本論文では、非遺伝毒性発がん物質の生体に与える酸化ストレスが、発がんを誘発するメカニズムを解明することを目的に、酸化ストレス発生系が異なる3種の非遺伝毒性発がん物質であるピペロニルブトキシド (PBO)、フェノバルビタール (PhB)、ペンタクロロフェノール (PCP) を対象に、前述の遺伝子改変動物にそれぞれ投与して、標的臓器である肝臓中の酸化的 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性を検討し、腫瘍形成過程における酸化ストレスの関与や作用点等について解析した。

第1章では、CYP 誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の酸化的 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性について検討した。薬物代謝酵素であるチトクローム P450 のうち、CYP 1A と 2B は、薬物を代謝する過程で効率的に活性酸素を発生することから、これらの酵素誘導能をもつ非遺伝毒性発がん物質は、酸化ストレスを発生させ DNA に酸化的損傷を与えて発がんを誘発することが示唆されている。PBO は、ピレトリンの殺虫共力剤として農薬に、また、玄米の害虫であるコクゾウムシの防虫剤として食品添加物にも登録されている物質で、マウス・ラットの肝臓において、CYP1A、2B ファミリーの酵素を誘導する。また、PhB は、抗不安薬

や抗てんかん薬として、臨床現場において広く使用されている医薬品で、マウス・ラットの肝臓に CYP2B ファミリーの酵素を誘導する。本章では、両物質の投与により誘導される CYP の違いに注目し、*gpt delta* ラット に PBO と PhB の発がん用量をそれぞれ混餌投与し、肝臓における酸化的 DNA 損傷、ならびに *in vivo* 変異原性について検討した。

第 2 章では、キノン体生成能あるいは CYP 誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の酸化的 DNA 損傷と *in vivo* 変異原性について検討した。本章では、第 1 章で検討した PBO、PhB に加え、生体内でキノン体となり酸化還元サイクルを介して、活性酸素を発生することが知られている PCP の酸化的 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性についても検討した。PCP は、水田の除草剤や木材の防腐剤として使用されていた農薬で、マウス肝臓に発がん性を示し [67]、ヒトに対して全身中毒作用を引き起こすことから、1990 年に農薬登録が失効しており、現在では生産されていない [77]。PCP は、それ自体が酸化するか、あるいは酵素反応的な酸化作用によりキノン体となることで、テトラクロロヒドロキノン (TCHQ)、テトラクロロベンゾキノン (TCBQ) の反応により酸化還元サイクルが生じる。特に、テトラクロロセミキノン (TCSQ) と TCBQ の間で生じる反応において、活性酸素を効率的に発生することが報告されている [74、110]。本章では、PCP、PBO、PhB の 3 種の非遺伝毒性肝発がん物質を、酸化ストレスに対して高感受性を示すことが予想される *p53* 欠損 *gpt delta* マウスに、それぞれ発がん用量で混餌投与し、標的臓器である肝臓中の酸化的 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性について解析した。

第 3 章では、第 1 章ならびに第 2 章の解析から、肝臓において酸化的 DNA 損



傷をもたらすことが明らかとなった PCP および PBO を、生体内酸化防御機構の重要な因子である Nrf2 の遺伝子欠損マウスに長期反復投与し、腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点について解析することにより、環境中に広く存在する非遺伝毒性発がん物質のリスクを評価することを目的とした。

## 第 1 章

チトクロム P450 誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の  
*gpt delta* ラットを用いた酸化的 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性  
に関する検討

## 1. 1 はじめに

化学物質は、生体への暴露により、それ自体がもつ酸化作用[118]、酸化還元サイクルの亢進による活性酸素の発生[115]、活性酸素消去系酵素であるグルタチオンの枯渇[34]、薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) の酵素誘導とその代謝過程[125]など、様々な経路を経て活性酸素を発生させ[51]、生体に酸化ストレスをもたらす。酸化ストレスは、細胞周期に関与する転写活性因子を活性化させ細胞の増殖活性を亢進させることから、発がん促進的に作用すると考えられており[52、128、129]、非遺伝毒性発がん物質の発がん機序に酸化ストレスの関与が疑われている[59、124]。非遺伝毒性発がん物質の暴露による活性酸素の産生経路、酸化的 DNA 損傷、遺伝子変異、発がんの関係を調べることは、化学物質の安全性ならびに潜在的ハザードを評価するために重要である

酸化ストレスの発生には、臓器特異性があることが特徴である。化学物質の暴露による酸化ストレスの発生には、化学物質自体が酸化作用を有する場合を除き、生体内で代謝を受ける必要がある。このような理由から、従来の遺伝毒性試験では、酸化ストレス発生系を有する非遺伝毒性発がん物質の遺伝毒性を検出できないと考えられる。

CYP は様々な物質を代謝し、物質酸化の過程で活性酸素種を発生させることが報告されている[76、88、94]。通常、代謝過程で発生する活性酸素量は少ないと言われるが[126]、CYP の酵素誘導能を有する化学物質の多くは、遺伝毒性試験で陽性を示さないものの、げっ歯類への投与で発がん性を示す[15、16、43]ことから、CYP の酵素誘導・代謝亢進により発生する酸化ストレスが発がんの主な原因と考えられている。中でも、CYP 1A と 2B ファミリーの酵素は、薬物

を代謝する過程で効率的に活性酸素を発生することから、この種の CYP 誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質は、生体内で酸化ストレスを発生させ、酸化的 DNA 損傷を引き起こし、がんを誘発すると考えられている。

活性酸素は、DNA 塩基に付加体を生じ、酸化的 DNA 損傷を引き起こす[20、45、121]。グアニンの酸化体である 8-OHdG は、アデニンとの誤対合を生じ、GC から TA への塩基置換変異や欠失変異を引き起こすことが知られている[5、17、21、95]。通常、8-OHdG の修復酵素であるグルコシダーゼ OGG1 により塩基除去修復が行われるが、その修復過程で DNA の二本鎖切断を伴う大型の欠失変異が生じることがある[22、59、132]。これらのことから、非遺伝毒性発がん物質のうち、CYP 誘導能を有する物質は、生体内で酸化的 DNA 損傷を生じ、遺伝子変異を引き起こすと考えられる。

レポーター遺伝子導入動物は、長期発がん性試験と同様の投与方法で化学物質を暴露させることが可能であり、生体内で代謝を受けて遺伝毒性作用を獲得することが示唆されている化学物質について、その作用を検出できる評価系として有用である。なかでも *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* mutation assay は、化学物質の暴露による点突然変異ならびに欠失変異を検出できる新しい評価系として近年開発された[64、79]。

*gpt delta* ラットは、導入遺伝子として組み込んだ  $\lambda$ EG10 DNA 上に大腸菌 *gpt* 遺伝子が組み込まれている。大腸菌の *gpt* はグアニンのフォスホオリボシルトランスフェラーゼ (*gpt*) をコードしており、野生型 *gpt* 遺伝子を持つ大腸菌は 6-チオグアニン (6-TG) 存在下では生育できない。しかし *gpt* 遺伝子に変異を持つ大腸菌は 6-TG を含む M9 寒天培地上でコロニーを作ることができる。

このような原理に基づき、*gpt* 遺伝子に変異を持つ大腸菌を選択することが可能である。 $\lambda$ EG10 を *in vitro* パッケージングによりファージ粒子として回収した後、Cre 部位特異的組み換え酵素を発現する大腸菌 YG6020 に感染させると、 $\lambda$ EG10 上にある *loxP* 配列に挟まれた領域が Cre 組み換え酵素により切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-TG とクロラムフェニコール (Cm) を含む M9 寒天培地で培養すると、プラスミド上の *gpt* が変異により不活化した大腸菌のみが 6-TG 含有培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地に播種して生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求めることが可能であり、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除して突然変異頻度 (MF) を算出できる。

また、*gpt delta* ラットは、 $\lambda$ EG10 ファージの *red/gam* 遺伝子をもち、欠失変異を Spi-セレクションにより検出することを特徴とする。野生型の  $\lambda$ EG10 ファージが大腸菌に感染すると  $\lambda$  ファージは大腸菌内で複製を繰り返して、大腸菌の溶菌斑 (プラーク) を生じる。これに対し大腸菌の染色体上に P2 ファージの DNA が挿入された P2 溶原菌では、野生型の  $\lambda$  ファージが感染してもプラークを生じない。この野生型の  $\lambda$  ファージの P2 溶原菌に対する表現型を Spi<sup>+</sup> (Sensitive to P2 interference) と呼ぶ。一方、*red/gam* 両遺伝子機能が不活化している変異体ファージは P2 溶原菌に対してもプラークを形成することができる (Spi<sup>-</sup> 表現型)。*red/gam* 遺伝子にそれぞれ独立した点突然変異が同時に生じる確率は非常に低いため、Spi<sup>-</sup> 表現型は *red/gam* 両遺伝子機能の不活化によりもたらされる欠失型の変異が生じたことを意味する。*In vitro* パッケージングによって  $\lambda$ EG10DNA を回収し、これを P2 溶原菌に感染させると Spi 変異体プラ

ークを得ることができ、非溶原菌に感染させると全ファージが溶菌してプラークをつくるので、ファージの回収効率が求められる。従って、変異プラーク数を回収ファージ数で除すことで突然変異体頻度を算出することができる。

従来の遺伝毒性試験では陰性を示していた CYP 誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質について、酸化的 DNA 損傷ならびに遺伝子変異を誘発する可能性を精査することは、その発がん機序を解明する上において重要である。本章では、CYP 誘導能を有し[123]、活性酸素を発生させて酸化的 DNA 損傷を与えることにより腫瘍を誘発することが示唆されている非遺伝毒性肝発がん物質の PBO [80、103]あるいは PhB[7]を *gpt delta* ラットに投与し、CYP 誘導により生じる酸化ストレスが酸化的 DNA 損傷をもたらす可能性ならびに *in vivo* 変異原性を有する可能性について検討した。

## 1.2 材料および方法

本動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の承諾を得て実施した。

### 1) 化学物質

PBO、PhB は、和光純薬工業株式会社（大阪、日本）より購入した。

### 2) 実験動物

6週齢雄のF344系 *gpt delta* マウスは、日本 SLC 株式会社（静岡、日本）より購入した。木製チップを入れたポリカーボネート製のケージ内に5匹ずつ収容し、バリアーシステムの動物飼育室内で、温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 5\%$ 、換気回数18回、12時間の明暗周期の環境条件下で飼育した。基礎飼料としてCRF-1（日本チャールスリバー株式会社、神奈川、日本）を与えた。餌と飲料水は自由摂取させた。

### 3) 投与方法および投与後の処置

1群5匹の動物に、PBOを20,000 ppmあるいはPhBを500 ppmで4あるいは13週間混餌投与した。PBOとPhBの投与濃度は、過去に実施された発がん性試験を参照し設定した [7、80、103]。対照群には、基礎飼料のみを与えた。投与期間終了後、動物はメキシフルランによる深麻酔下で安楽殺し、ラットの肝臓の一部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。その後、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）ならびに免疫組織

化学的染色を行った。また、*Cyp 1A1*、*Cyp 1A2*、*Cyp2B1* の mRNA 発現量の測定を目的として、RNA later（アプライドバイオシステムズジャパン社、東京、日本）に浸漬し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。さらに、肝臓の一部は、8-OHdG 量の測定と *in vivo* mutation assay のため、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

4) リアルタイム PCR による *Cyp 1A1*、*1A2*、*2B1* の mRNA 発現の定量解析

RNA later に浸漬し、凍結保存していた肝臓から RNeasy Mini kit（キアゲン社、東京、日本）を用いてトータル RNA を抽出した。得られたトータル RNA を用いて、High capacity cDNA Reverse Transcription kit（アプライドバイオシステムズジャパン社）を使用して cDNA を作製した。PCR 反応は、TaqMan fast Universal PCR Master mix ならびに TaqMan Gene Expression assay（アプライドバイオシステムズジャパン社）を用い、Applied Biosystems 7900HT FAST real-time RT-PCR システム（アプライドバイオシステムズジャパン社）にて行った。プライマーは、ラット *Cyp1A1*、ラット *Cyp1A1*、ラット *Cyp2B1*、TaqMan Rodent GAPDH Control reagents（アプライドバイオシステムズジャパン社）を用いた。目的とする遺伝子の mRNA 発現量は、GAPDH の mRNA 発現量との比で表した。

#### 5) 8-OHdG の測定

8-OHdG の測定は、既法[45、75、118]に従い実施した。凍結保存した肝臓から、DNA Extractor WB Kit（和光純薬工業株式会社）を用いて核 DNA を抽出した。Lysis buffer には、核 DNA の自己酸化するのを防ぐため、デフェロキサ



ミンメシレート（シグマケミカル社、セントルイス、ミズーリー州、米国）を添加した。回収した核 DNA は、nuclease P1（ヤマサ醤油社、千葉、日本）とアルカリフォスファターゼ（シグマケミカル社）を用い、デオキシヌクレオチドへと消化した。8-OHdG の測定は、HPLC-UV-ECD で行った。LC ポンプは、Gynkotec 480（Gynkotec 社、ジャーメリング、ドイツ）を、カラムは ULTRASPHERE ODS（GILSON 118、ミドルトン、ウィスコンシン州、米国）、ECD は Coulochem II（ESA 社、ベッドフォード、マサチューセッツ、米国）を使用した。移動相には、10mM リン酸一ナトリウム塩/メタノール混液（96：4）を流速 1.0mL/min で液送し、分析カラムで分離した後、デオキシグアニン（dG）を UV290nm で、8-OHdG を ECD300mV で検出した。8-OHdG 量は、8-OHdG/10<sup>5</sup>dG として算出した。

#### 6) 免疫組織化学的染色

パラフィン包埋薄切切片を用いて、以下に示す方法で免疫組織化学的検討を行った。

細胞増殖活性の定量解析を行う目的で、抗マウス Proliferation cell nuclear antigen（PCNA）モノクロナール抗体（希釈率 1:100、Dako 社、グロストルupp、デンマーク）を用いて、ABC 法により免疫組織化学的染色を行い、1 視野の正常肝細胞 200~300 個あたりの PCNA 陽性細胞数を測定し、1 個体あたり 5 視野について解析して、PCNA 陽性細胞率を算出した。

ラット肝前がん病変のマーカーである glutathione S-transferase placental form（GST-P）の陽性細胞巢の定量解析を行う目的で、抗 GST-P ポリクロナール抗

体（希釈率 1 : 1000、 MBL 社、名古屋、日本）を用いて、アビジン - ビオチンペルオキシターゼコンプレックス（ABC）法により免疫組織化学的染色を行い、直径 0.2 mm以上の GST-P 陽性細胞巣、単位面積あたりの数ならびに面積、切片上の肝臓の面積を IPAP イメージングアナライザー（住化社、大阪、日本）で測定した。

#### 7) *In vivo mutation assay*

6-TG selection は既報[79]に従って実施した。ラット肝臓からゲノム DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングにより  $\lambda$ EG10 DNA をファージとして回収した。6-TG selection のために、ファージを Cre 部位特異的組み換え酵素を発現する大腸菌 YG6020 に感染させ、*gpt* 遺伝子とクロラムフェニコール耐性遺伝子 (CAT) を持つマルチコピープラスミドとして保持させた。ファージを感染させた大腸菌は、6-TG と Cm を含む M9 寒天培地で 37°C 条件下にて培養し、コロニーを 4 日目に回収した。一方、*in vitro* パッケージングにおけるファージの回収数は、6-TG を含まない Cm 含有 M9 寒天培地上に生育した Cm 耐性コロニー数より求めた。*gpt* 遺伝子変異体頻度 (*gpt* MF) は、6TG と Cm に耐性を示したコロニー数を Cm 耐性コロニー数で除して算出した。*gpt* 遺伝子に生じた変異を調べるため、*gpt* をコードする 456 塩基を含む 739 塩基のフラグメントを PCR で増幅し、その PCR 産物の塩基配列を 3730xl DNA Analyzer（アプライドバイオシステム社）を用いて解析した。

Spi- selection は、*in vitro* パッケージングにより回収したファージを、回収ファージ数確認のために *E.coli* XL-1 Blue MRA 株と、変異検出のため *E. coli*

XL-1Blue MRA P2 株を培養した。ファージを感染させた大腸菌は、molten lambda-trypticase soft ager に懸濁し、lambda-trypticase 寒天培地上に播種して培養した。翌日、プラークを滅菌済み硝子ピペットでパンチアウトし、SM buffer に溶解させた。表現型確認のため、ファージ溶液を XL-1 Blue MRA 株、XL-1 Blue MRA P2 株ならびに WL95P2 株を播種しプレート上にスポットした。全てのプレートでプラーク形成が認められたものを、Spi 変異体として計測した。

#### 8) 統計処理

剖検時のラットの体重ならびに肝臓重量、8-OHdG レベル、*gpt* 遺伝子の変異体頻度、GST-P 陽性細胞数と PCNA 陽性細胞率、定量的リアルタイム RT-PCR の結果は、Dunnett の多重検定後に ANOVA で検定した。 $p$  値が 0.05 未満である場合、有意と判断した。

### 1.3 成績

#### 1) 体重と肝臓重量

PBO 投与群で、体重が対照群と比較して有意に低値を示した。PBO 投与群、PhB 投与群で、肝臓の重量ならびに相対重量が対照群と比較して有意に増加した (Table1-1)。

#### 2) *Cyp1A1*、*1A2*、*2B1* の mRNA 発現レベル

PBO 投与群では、*Cyp1A1*、*1A2*、*2B1* の mRNA 発現レベルが対照群と比較して有意に上昇した。PhB 投与群では、*CYP2B1* の mRNA 発現レベルが対照群と比較して有意に上昇したが、*Cyp1A1* と *1A2* の mRNA 発現レベルには有意な差は認められなかった (Figure 1-1)。

#### 3) 病理組織学的検査

PBO ならびに PhB 投与群で小葉中心性の肝細胞肥大が認められた (Figure 1-2)。この変化は投与期間の延長とともに顕著な変化として認められた (結果は示さず)。

#### 4) 8-OHdG レベル

PBO 投与群において、8-OHdG レベルは、4、13 週間のいずれの投与期間においても対照群と比較して有意に上昇した。PhB 投与群でも投与期間の延長とともに 8-OHdG レベルの上昇傾向が認められたが、対照群との間に統計学的に有意な差は認められなかった (Table 1-2)。

## 5) *In vivo* mutation assay

PBO ならびに PhB の 4 週間投与におけるラット肝 DNA 中の *gpt* 遺伝子変異体頻度を Table 1-3 に示す。PBO、PhB 投与群の *gpt* 遺伝子の変異体頻度に、対照群と比較して有意な差は認められなかった。*gpt* 遺伝子のスペクトラム解析の結果、8-OHdG が生じる典型的な GC から TA への塩基置換変異は PBO、PhB 投与群ともに認められなかった (Table 1-4)。また、PBO、PhB の 13 週間投与においても、*gpt* 遺伝子の変異体頻度に対照群と比較して有意な差は認められなかった (Table 1-5)。

PBO と PhB の 4、13 週間投与群の *red/gam* の変異体頻度 (Spi-) を解析した結果、両投与物質のいずれの投与期間においても、対照群と比較して有意な差は認められなかった (Table 1-6、1-7)。

## 6) 免疫組織化学的染色

結果を Table 1-8 に示す。PCNA 陽性細胞率の増加が、PBO の 4 週間投与群でのみ、対照群と比較して有意に認められた。

GST-P 陽性肝細胞巢の単位面積あたりの数ならびに面積を定量解析したところ、PBO、PhB のいずれの投与群においても、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

Table 1-1. Body and liver weights of *gpt* delta rats treated with PBO or PhB.

Treatment	Control	PBO	PhB
4 weeks			
Body weight (g)	260 ± 4.20	210 ± 17.9 *	269 ± 10.5
Liver weight (g)	9.24 ± 0.49	14.8 ± 1.35 *	13.1 ± 0.47 *
Relative liver weight (g%)	3.56 ± 0.15	7.06 ± 0.21 *	4.87 ± 0.16 *
13 weeks			
Body weight (g)	352 ± 24.1	258 ± 8.10 *	341 ± 15.7
Liver weight (g)	10.3 ± 0.83	14.7 ± 0.76 *	13.8 ± 1.11 *
Relative liver weight (g%)	2.93 ± 0.08	5.69 ± 0.32 *	4.05 ± 0.15 *

\*  $p < 0.05$  vs. Control.

PBO, piperonyl butoxide; PhB, phenobarbital.

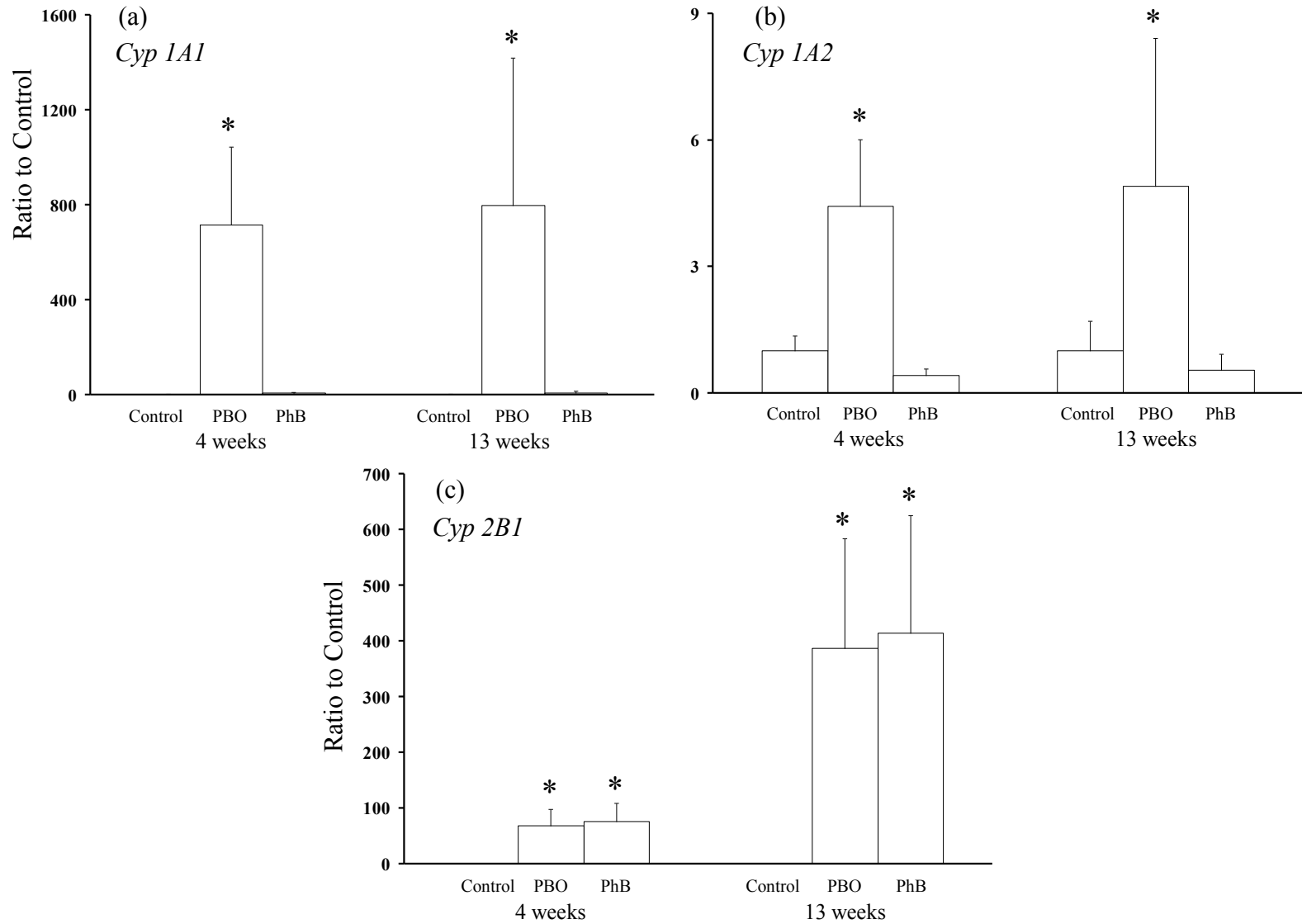


Figure 1-1.

Changes in mRNA levels of (a) *Cyps 1A1*, (b) *1A2* and (c) *2B1* in the livers of *gpt* delta rats treated with piperonyl butoxide (PBO) or phenobarbital (PhB) for 4 and 13 weeks. Values are mean  $\pm$  SD for 5 rats. \*Significantly different from Control group at  $p < 0.01$ .

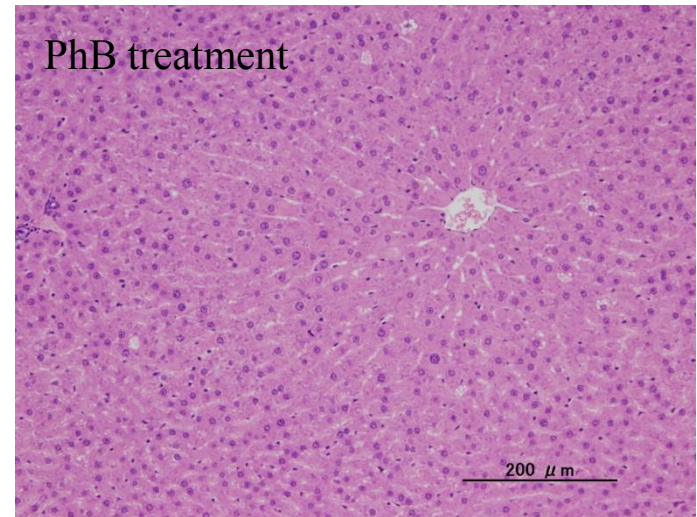
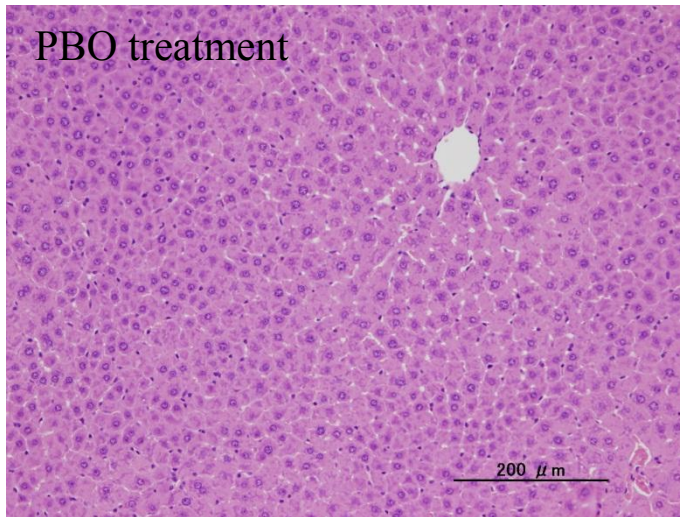
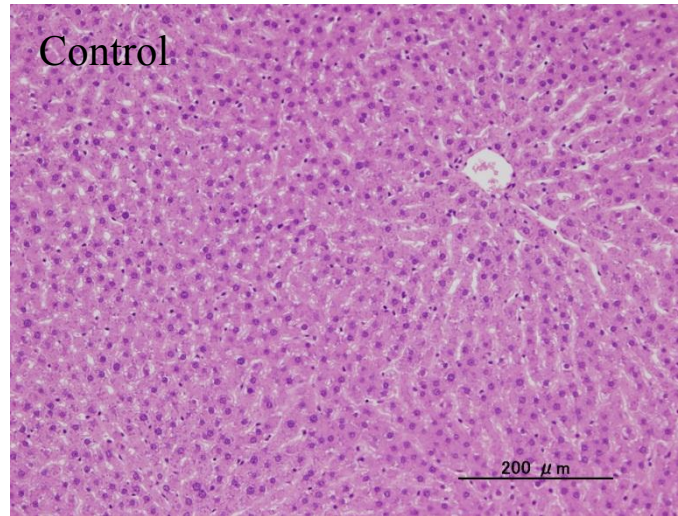


Figure 1-2.  
Histopathological features in the livers of *gpt* delta rats given piperonyl butoxide (PBO) or phenobarbital (PhB) for 13 weeks. Centrilobular hepatocytes hypertrophy was evident in the PBO- or PhB-treated rats. HE staining.



Table 1-2. 8-OHdG levels in the livers of *gpt* delta rats treated with PBO or PhB.

Treatment	Control	PBO	PhB
4 weeks	0.08 ± 0.02	0.17 ± 0.06 *	0.11 ± 0.04
13weeks	0.14 ±0.03	0.37 ± 0.10 **	0.21 ± 0.08

\*  $p < 0.05$  vs. Control.

\*\*  $p < 0.05$  vs. Control.

8-OHdG, 8-hydroxydeoxyguanosine; PBO, piperonyl butoxide; PhB, phenobarbital.

Table 1-3. *gpt* mutant frequencies in the livers of *gpt* delta rats treated with PBO or PhB for 4 weeks.

Treatment	Animal no.	Cm <sup>R</sup> colonies (× 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant frequency (× 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	20.4	0 <sup>a</sup>	-	0.28 ± 0.14
	2	15.1	3	0.20	
	3	12.8	3	0.23	
	4	8.3	4	0.48	
	5	20.7	4	0.19	
PBO	6	12.0	3	0.25	0.21 ± 0.17
	7	11.4	1	0.09	
	8	16.7	1	0.06	
	9	13.0	2	0.15	
	10	8.3	4	0.48	
PhB	11	13.5	2	0.15	0.27 ± 0.13
	12	13.7	2	0.15	
	13	14.4	5	0.35	
	14	13.5	6	0.44	
	15	8.4	2	0.24	

<sup>a</sup> No mutant colonies were detected on the plate, those data being excluded for the calculation of mutant frequency. PBO, piperonyl butoxide; PhB, phenobarbital.

Table 1-4. Mutation spectra of *gpt* mutant colonies in the livers of rats treated with PBO or PhB for 4 weeks.

Mutation	Control		PBO		PhB	
	Number (%)	Mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Number (%)	Mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )	Number (%)	Mutation frequency ( $\times 10^{-5}$ )
<b>Base substitution</b>						
Transversions						
GC-TA	1 <sup>a</sup> (7.1)	0.03 $\pm$ 0.06	3 (27.3)	0.14 $\pm$ 0.13	1 (5.9)	0.05 $\pm$ 0.12
GC-CG	0	0	2 (18.2)	0.08 $\pm$ 0.11	2 (11.8)	0.10 $\pm$ 0.23
AT-TA	3 (21.4)	0.13 $\pm$ 0.09	1 (9.1)	0.04 $\pm$ 0.10	6 (35.3)	0.29 $\pm$ 0.19
AT-CG	0	0	1 (9.1)	0.04 $\pm$ 0.10	0	0
Transitions						
GC-AT	5 (35.7)	0.24 $\pm$ 0.15	3 (27.3)	0.14 $\pm$ 0.13	5 (29.4)	0.23 $\pm$ 0.19
AT-GC	2 (14.3)	0.09 $\pm$ 0.19	0	0	0	0
<b>Deletion</b>						
Single bp	3 (21.4)	0.14 $\pm$ 0.10	0	0	3 (17.6)	0.14 $\pm$ 0.13
Over 2 bp	0	0	1 (9.1)	0.04 $\pm$ 0.09	0	0
<b>Insertion</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Complex</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	14	0.28 $\pm$ 0.14	11	0.21 $\pm$ 0.17	17	0.27 $\pm$ 0.13

<sup>a</sup> The number of colonies with independent mutations.  
PBO, piperonyl butoxide; PhB, phenobarbital.

Table 1-5. *gpt* mutant frequencies in the livers of *gpt* delta rats treated with PBO or PhB for 13 weeks.

Treatment	Animal no.	Cm <sup>R</sup> colonies (× 10 <sup>5</sup> )	6-TG <sup>R</sup> and Cm <sup>R</sup> colonies	Mutant frequency (× 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	101	15.8	2	0.13	0.12 ± 0.06
	102	19.4	1	0.05	
	103	17.6	2	0.11	
	104	12.2	1	0.08	
	105	19.2	4	0.21	
PBO	106	16.7	3	0.18	0.24 ± 0.09
	107	15.1	5	0.33	
	108	21.8	5	0.23	
	109	15.8	2	0.13	
	110	14.2	5	0.35	
PhB	111	14.6	2	0.14	0.22 ± 0.22
	112	20.2	0 <sup>a</sup>	-	
	113	9.1	5	0.55	
	114	16.7	1	0.06	
	115	14.4	2	0.14	

<sup>a</sup>No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded for the calculation of mutant frequency. PBO, piperonyl butoxide; PhB, phenobarbital.

Table 1-6. Spi<sup>r</sup> mutant frequencies in the livers of *gpt* delta rats treated with PBO or PhB for 4 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 <sup>5</sup> )	Plaques within XL-1 Blue MRA (P2)	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	1	13.55	4	0.30	0.20 ± 0.09
	2	23.76	2	0.08	
	3	21.02	5	0.24	
	4	23.09	4	0.17	
	5	0 <sup>a</sup>	2	-	
PBO	6	27.05	8	0.30	0.20 ± 0.10
	7	18.63	5	0.27	
	8	17.37	4	0.23	
	9	22.32	4	0.18	
	10	21.42	1	0.05	
PhB	11	25.79	7	0.27	0.30 ± 0.05
	12	20.43	5	0.24	
	13	13.32	5	0.38	
	14	10.17	3	0.29	
	15	17.24	5	0.29	

<sup>a</sup> Data was excluded for the calculation of mutant frequency because of the poor packaging efficiency of the transgene. PBO, piperonyl butoxide; PhB, phenobarbital.

Table 1-7. Spi<sup>r</sup> mutant frequencies in the livers of *gpt* delta rats treated with PBO or PhB for 13 weeks.

Treatment	Animal No.	Plaques within XL-1 Blue MRA (x 10 <sup>5</sup> )	Plaques within XL-1 Blue MRA (P2)	Mutant frequency (x 10 <sup>-5</sup> )	Mean ± SD
Control	101	28.26	14	0.50	0.63 ± 0.45
	102	31.86	13	0.41	
	103	25.07	36	1.44	
	104	29.43	10	0.34	
	105	28.85	14	0.49	
PBO	106	21.20	27	1.27	0.72 ± 0.38
	107	24.35	8	0.33	
	108	23.81	10	0.42	
	109	22.10	15	0.68	
	110	27.99	25	0.89	
PhB	111	34.88	19	0.54	0.56 ± 0.23
	112	29.43	26	0.88	
	113	28.35	11	0.39	
	114	23.04	0 <sup>a</sup>	-	
	115	24.08	10	0.42	

<sup>a</sup>No mutant colonies were detected on the plate, with those data being excluded for the calculation of mutant frequency. PBO, piperonyl butoxide; PhB, phenobarbital.

Table 1-8. PCNA and GST-P levels in the livers of *gpt* delta rats treated with PBO or PhB.

Treatment	Control	PBO	PhB
4 weeks			
PCNA	0.17 ± 0.09	0.44 ± 0.13 *	0.20 ± 0.03
13 weeks			
PCNA	0.17 ± 0.08	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.03
GST-P (number/cm <sup>2</sup> )	0.20 ± 0.28	0.33 ± 0.40	0.41 ± 0.54
GST-P (mm/cm <sup>2</sup> )	0.10 ± 0.14	0.14 ± 0.13	0.32 ± 0.34

\*  $p < 0.05$  vs. Control.

\*\*  $p < 0.05$  vs. Control.

PCNA, proliferating cell nuclear antigen; GST-P, glutathione S-transferase placental form; PBO, piperonyl butoxide; PhB, phenobarbital.

## 1.4 考察

PBO ならびに PhB は、げっ歯類の肝臓に数種の CYP サブファミリーの誘導に伴う肝細胞肥大を生じさせることが報告されており[121]、*gpt delta* ラットへ投与した本研究においても同様の結果が得られた。

PBO の投与により、ラット肝臓中の 8-OHdG レベルが有意に上昇することを本研究で初めて明らかにすることができた。一方、PhB の投与により、ラット肝臓中の 8-OHdG レベルの上昇傾向が認められたが、統計学的に有意な変化ではなかった。これまでの報告で、PhB の投与により 8-OHdG レベルが上昇することが認められていたが[48、49]、より長期間投与した本研究では、その上昇は認められなかった。CYP と NADPH-P450 リダクターゼの還元システムにより、スーパーオキシドアニオンが発生することが報告されている[1、69]。各種 CYP の NADPH-P450 に対する親和性の違いが、活性酸素の産生量に影響することが報告されている [33]。本研究において PBO と PhB を投与したところ、*Cyp 2B1* の mRNA 発現量レベルが経時的に上昇したが、*Cyp 1A1* と *1A2* の mRNA 発現レベルの上昇は、PBO 投与群でのみ認められた。このことから、PBO と PhB の投与による 8-OHdG レベルの違いは、誘導された CYP の種類とそれにより発生する活性酸素量の違いを反映した結果であると考えられた。

本研究において、PBO と PhB を 13 週間投与したが、*gpt* 遺伝子ならびに *red/gam* (Spi) 遺伝子の変異体頻度に、対照群と比較して有意差は認められなかった。6TG 耐性コロニーの *gpt* 遺伝子上の変異スペクトラムを解析したところ、8-OHdG が生じる GC から TA への塩基置換変異を含め、遺伝子変異の上昇は認められなかった。



ラット肝臓における種々の CYP の中で、CYP1A1、1A2、2B1 が、最も効率的に活性酸素を発生する [81]。そのため、PBO の投与により誘導された CYP1A1 と 1A2 は活性酸素を発生し、ラット肝臓に酸化 DNA 損傷を与えると考えられる。8-OHdG は、酸化 DNA の中でも最も安定した DNA 付加体といわれ、DNA ポリメラーゼによる複製の過程で、GC から TA への塩基置換変異を生じる[30、40、118]。マウスの肝臓に発がん性を示す蛆駆除剤ジサイクルアニルは、遺伝毒性試験で陰性を示すが、本物質の発がん用量を *gpt delta* マウスに 13 週間投与すると、肝臓中の 8-OHdG レベルの上昇ならびに *gpt* 遺伝上に GC から TA への塩基置換変異を生じることが報告されている[117]。最近の知見として、8-OHdG を含む酸化 DNA 損傷は、塩基除去修復の過程で、修復酵素 OGG1 によって DNA の二重鎖切断を生じることから[130]、DNA の二重鎖切断を伴う修復機構は、大型の欠失変異を生じさせる潜在的风险を有している[29、58]。実際に酸化剤であり、ラットの腎臓に発がん性を示す臭素酸カリウムは、腎臓に 8-OHdG を生じ、点突然変異[131]ならびに欠失変異を生じることが報告されている[22、55、101、116]。Umemura ら[116]は、臭素酸カリウムをラットに投与した研究で、8-OHdG レベルが一定期間高く維持されることが恒久的な遺伝子変異が生じるために必要であることを示している。しかし本研究では、PBO の投与により、CYP の mRNA 発現レベルならびに 8-OHdG レベルの上昇、肝細胞の増殖活性が認められたにも関わらず、遺伝子突然変異が認められなかった。これらのことから、強力な酸化剤で、DNA 損傷を引き起こす発がん物質の臭素酸カリウムとは異なり、PBO のように CYP の還元反応とい

った生体反応を介して間接的に生じる酸化ストレスの損傷レベルでは、遺伝子変異を生じる可能性は低いと推察された。

PBO と PhB の遺伝毒性作用による細胞表現型の変化を調べるため、PBO あるいは PhB を 13 週間投与した *gpt delta* ラットの肝臓について、ラット前がん病変のマーカである GST-P 陽性肝細胞の定量的解析を行ったが、対照群との間に差は認められなかった。これまで、*N*-ニトロソピロリジンや、2-アミノ-メチルリミダゾ 4、5-*f* キノリンのような遺伝毒性物質の投与によって、GST-P 陽性細胞の数と面積が顕著に増えることが報告されている。一方、非遺伝毒性発がん物質であるジエチルヘキシルフタレートや非発がん物質であるアセトアミノフェンでは、GST-P 陽性肝細胞巣は生じない[46]。遺伝毒性発がん物質であるジエチルニトロソアミンにより生じた GST-P 陽性細胞巣の形成を PBO が促進するという過去の報告[71]を考慮すると、PBO は遺伝毒性によるのではなく、細胞の増殖活性を亢進させることで腫瘍を誘発すると考えられた。GST-P 陽性肝細胞巣は、前がん状態に至った肝細胞がクローナルに増殖した病変である。今回、PBO 投与で GST-P 陽性肝細胞巣に変化が認められなかったのは前がん病変の発生には 13 週間の投与期間では不十分であったためと考えられた。

以上、CYP 誘導により生じる酸化ストレスは、酸化的 DNA 損傷を生じさせるものの、恒久的な遺伝子変異の固定までには至らず、腫瘍形成過程において遺伝毒性作用を示す可能性は低いことが示唆された。

## 1.5 小括

薬物代謝酵素であるチトクローム P450 のうち、CYP 1A と 2B は、薬物を代謝する過程で効率的に活性酸素を発生することから、これらの酵素誘導能をもつ非遺伝毒性発がん物質は、生体内で酸化ストレスを発生させ、酸化的 DNA 損傷を与えて腫瘍を誘発することが示唆されている。本章では、遺伝子変異を検出できるレポーター遺伝子導入動物 *gpt delta* ラットを用い、CYP 誘導能を有する PBO あるいは PhB の肝臓における酸化的 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性について検討した。

解析の結果、PBO 投与群で *CYP 1A1*、*1A2*、*2B1* の、PhB 投与群で *CYP 2B1* の mRNA レベルの上昇が確認された。一方、8-OHdG レベルの有意な上昇は、PBO 投与群のみに認められた。*In vivo* 変異原性は、PBO、PhB 投与群のいずれにおいても認められなかった。PCNA 陽性肝細胞率は、PBO の 4 週間投与群で有意に増加したが、GST-P 陽性細胞巢の定量解析では、何れの投与群においても対照群と比較して有意差は認められなかった。

PBO 投与群では、*CYP 1A1*、*1A2* の mRNA レベルを顕著に上昇させるとともに、8-OHdG レベルの増加をもたらしたことから、CYP1A ファミリーが発生する酸化的ストレスは、酸化的 DNA 損傷を引き起こすことが示唆された。しかしながら、PBO ならびに PhB 投与群で、*in vivo* 変異原性ならびに肝前がん病変の増加は認められなかったことから、CYP 代謝で生じる酸化ストレスが、腫瘍形成過程において遺伝毒性作用を示す可能性は低いと考えられた。

## 第2章

キノン体生成能あるいはチトクロム P450 誘導能を有する  
非遺伝毒性発がん物質の *p53* 欠損 *gpt delta* マウスを用いた  
酸化 DNA 損傷と *in vivo* 変異原性に関する検討

## 2.1 はじめに

*p53* 遺伝子は、異常をきたした細胞の増殖を抑制し、またアポトーシスを誘導するがん抑制遺伝子である[3、56]。また、*p53* 蛋白質は、グルタチオンペルオキシターゼ[104]、ヘムオキシゲナーゼ-1[65]、マンガンスーパーオキシドジムスターゼ [32] といった抗酸化遺伝子群の転写を活性化する。*p53* を欠損させたマウスに抗酸化作用を有する N-アセチルシステインを投与すると、自然発生腫瘍の形成を抑制することが報告されている[92]。このことから、*p53* 遺伝子欠損マウスは、生体内で酸化ストレスを生じる化学物質の遺伝毒性作用を調べる上で有用なツールであると考えられる[65]。

近年開発された *gpt delta* マウスを用いた *in vivo* mutation assay は、げっ歯類を用いた発がん性試験と同様の方法で化学物質を暴露させることが可能であり、化学物質の生体内における吸収、分布、代謝、排泄を考慮した遺伝毒性発現の検出に適した方法である[79]。*gpt delta* マウスには、第1章で用いた *gpt delta* ラットと同様に大腸菌 *gpt* 遺伝子及びλファージ *red/gam* 遺伝子が導入されていることから、*gpt* または *Spi*<sup>-</sup> mutation assay により、点突然変異又は欠失変異をそれぞれ検出することができる [27、64]。

本章では、酸化ストレス発生系の異なる3つの非遺伝毒性肝発がん物質を、*p53* 欠損 *gpt delta* マウスに投与し、第1章と同様に酸化ストレスの発生に関与する遺伝子の mRNA 発現レベル、肝臓において酸化的DNA損傷ならびに *in vivo* 変異原性を有する可能性について検討した。

実験1では、木材の防腐剤、除草剤、殺虫剤として広く使われていた非遺伝毒性肝発がん物質である PCP[11、77、96]について検討した。PCPは、生体内

における代謝過程でキノン体を生じ、酸化還元サイクルの反応過程で活性酸素を発生することで、肝臓に発がん性を示すと考えられている物質である [112、115]。

実験 2 では、第 1 章で *gpt delta* ラットを用いて検証した PhB と PBO を、*p53* 欠損 *gpt delta* マウスに投与し、CYP 誘導により生じる活性酸素 [43、70、85、123] の遺伝毒性的作用について解析した。

## 2.2 材料と方法

本動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の承諾を得て実施した。

### 1) 化学物質

PCP、PBO、PhB は、和光純薬工業株式会社より購入した。

### 2) 実験動物

$\lambda$ EG10シャトルベクターDNAが組み込まれているC57BL/6 *gpt delta* マウスとTsukudaら[111]によって作出されたC57BL/6 *p53* ホモ欠損型マウス ( $p53^{-/-}$ マウス)を交配させて、*p53* ヘテロ欠損型 ( $p53^{+/-}$ ) のC57BL/6 *gpt delta* マウスを作出した。 $p53^{+/-}$ C57BL/6 *gpt delta* マウス同士を交配させて得られたF1動物について、尾端の組織よりDNAを抽出し、polymerase chain reaction (PCR) 法にて*p53*の遺伝子型を確認して、*p53* 野生型 ( $p53^{+/+}$ ) ならびに  $p53^{-/-}$  である *gpt delta* マウスを実験に使用した。

動物は、木製チップを入れたポリカーボネート製のケージ内に5匹ずつ収容し、バリアーシステムの動物飼育室内で、温度  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 5\%$ 、換気回数12回、12時間の明暗周期の環境条件下で飼育した。基礎飼料としてCRF-1 (日本チャールスリバー株式会社) を与えた。餌と飲料水は自由摂取させた。

### 3) 投与方法および投与後の処置

#### 実験 1 PCP の投与実験

7 週齢雄の  $p53^{+/+}$  ならびに  $p53^{-/-}$  マウス各 15 匹をそれぞれ 3 群 (1 群 5 匹) に分け、PCP を 600 ppm ならびに 1200 ppm でそれぞれ 13 週間混餌投与した。PCP の投与濃度は、マウスにおける発がん濃度 [67] に準拠した。対照群は基礎飼料のみ与えた。投与期間終了後、動物はメトキシフルランの深麻酔下で安楽殺した。死亡確認後、肝臓を摘出し、重量を測定した。肝臓の一部は、10% 中性緩衝ホルマリン液に固定し、パラフィン切片を作製し、HE 染色を行った。また、肝臓の一部は RNA later (アプライドバイオシステムズ社) に浸漬し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存して、*Cyp 1A1*、*Cyp 1A2*、*Cyp2B10*、NAD (P) : キノンオキシドレダクターゼ 1 をコードする遺伝子である *NQO1* の mRNA 発現レベルの測定に供した。残りの肝臓は、*in vivo* mutation assay と 8-OHdG レベルの測定まで、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 実験 2 PBO および PhB の投与実験

7 週齢雄の  $p53^{+/+}$  ならびに  $p53^{-/-}$  マウス各 15 匹をそれぞれ 3 群 (1 群 5 匹) に分け、PhB を 500 ppm、PBO を 6,000 ppm でそれぞれ 13 週間混餌投与した。各物質の投与濃度は、マウスにおける発がん濃度 [102] に準拠した。対照群には、基礎飼料のみを与えた。剖検後の肝臓は実験 1 と同様の方法で保存した。



#### 4) リアルタイム PCR による *Cyp 1A1*、*1A2*、*2B10*、*NQO-1* の mRNA 発現の定量解析

RNA later に浸漬し凍結保存した肝臓から RNeasy Mini kit (キアゲン社) を用いてトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA を用いて、High capacity cDNA Reverse Transcription kit (アプライドバイオシステム社) を使用して cDNA を作製した。

PCR 反応は、TaqMan fast Universal PCR Master mix ならびに TaqMan Gene Expression assay (アプライドバイオシステム社) を用い、Applied Biosystems 7900HT FAST real-time RT-PCR システムにて行った。プライマーは、マウスの CYP1A1 (#Mm00487218\_m1)、CYP1A2 (#Mm00487224\_m1)、CYP2B10 (#Mm01972453\_s1)、NQO1 (#Mm01253561\_m1)、TaqMan Rodent GAPDH Control reagents (アプライドバイオシステム社) を用いた。目的とする遺伝子の mRNA 発現量は、GAPDH の mRNA 発現量との比で表した[73]。

#### 5) 8-OHdG の測定

第 1 章と同様の方法で測定した。

#### 6) *In vivo mutation assay*

第 1 章と同様の方法で測定した。

#### 7) 統計処理

剖検時体重、肝臓の重量、相対肝重量、mRNA 発現レベル、8-OHdG レベル、

レポーター遺伝子 *gpt* と *Spi* 遺伝子の変異体頻度について統計処理を行った。分散の一意性は、Bartlett 法もしくは F 検定により確認した。分散が一意であった場合、Dunnett 法（パラメトリック）もしくは Student t-検定を行った。分散が一意でない場合は、Dunnett 法（ノンパラメトリック）もしくは Welch's の t-検定を行った。 $p$  値が 0.05 未満であった場合、有意と判断した。

## 2.3 成績

### 実験 1 PCP 投与実験

#### 1) 体重と肝臓重量

$p53^{+/+}$ マウスでは、PCP の投与濃度に依存して有意な体重減少が認められた。一方、肝臓の重量は PCP の投与濃度に依存して増加傾向を示し、PCP の 1,200 ppm 投与群では、肝臓の相対重量は有意に増加した。

$p53^{-/-}$ マウスでは、PCP の投与群における有意な体重の変化は認められなかった。一方、PCP の 600 ppm 投与群では、肝臓の相対重量の増加傾向が認められた (Table 2-1)。

なお、 $p53^{-/-}$ マウスでは、対照群の 1 匹、PCP の 600 ppm 投与群の 2 匹、1,200 ppm 投与群の 3 匹が試験期間中に悪性リンパ腫により死亡した。 $p53^{-/-}$ マウスの PCP 1,200 ppm 投与群のデータは統計学的解析が不可能と判断し、除外した。

#### 2) 病理組織学的検査

PCP 投与群では、肝臓に小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、一部には核の大型化、倍数核を伴う細胞が認められた。これらの変化に、 $p53^{+/+}$ マウスと  $p53^{-/-}$ マウスの間で差は認められなかった (Figure 2-1)。

#### 3) *Cyp 1A1*、*1A2*、*2B10*、*NQO1* の mRNA 発現レベル

*CYP1A1* と *1A2* の mRNA 発現レベルは、 $p53^{+/+}$  ならびに  $p53^{-/-}$ マウスのいずれの PCP 投与群においても、対照群と比較して有意な差は認められなかった。一方、 $p53^{+/+}$ マウスでは、*CYP2B10* の mRNA 発現レベルが対照群と比較して有

意に低下した。*NQO1* の mRNA 発現レベルは、 $p53^{+/+}$ ならびに  $p53^{-/-}$ マウスで、同遺伝子型の対照群と比較してそれぞれ有意に上昇した (Figure 2-2)。

#### 4) 8-OHdG レベル

$p53^{+/+}$ マウスでは、PCP の投与濃度に依存して、8-OHdG レベルが同遺伝子型の対照群と比較して有意に上昇した。

また、 $p53^{-/-}$ マウスの PCP の 600 ppm 投与群でも、8-OHdG レベルの有意な上昇が認められた (Figure 2-3)。

#### 5) *In vivo* mutation assay

*gpt* と *red/gam* (Spi-) 遺伝子の変異体頻度は、 $p53^{+/+}$ ならびに  $p53^{-/-}$ マウスともに有意差は認められなかった (Table 2-2)。

### 実験 2 PhB と PBO の投与実験

#### 1) 体重と肝臓重量

PhB 投与群では、 $p53^{+/+}$ マウスで肝臓重量の増加が認められた。 $p53^{-/-}$ マウスでは、体重、肝臓重量ともに有意な変化は認められなかった。

PBO 投与群では、 $p53^{+/+}$ ならびに  $p53^{-/-}$ マウスにおいて顕著な体重減少、 $p53^{+/+}$ マウスで肝臓の相対重量の有意な増加が認められた (Table 2-3)。

#### 2) 病理組織学的検査

PhB 投与群では、肝細胞にすり硝子様変性が認められたが、この変化の程度

に  $p53^{+/+}$  マウスと  $p53^{-/-}$  マウス間で差は認められなかった。

PBO 投与群では、肝細胞肥大が認められたが、その程度に  $p53^{+/+}$  マウスと  $p53^{-/-}$  マウス間で差は認められなかった (Figure 2-4)。

### 3) リアルタイム PCR による *Cyp 1A1*、*1A2*、*2B10*、*NQO1* の mRNA 発現の定量解析

PhB 投与群では、 $p53^{+/+}$  ならびに  $p53^{-/-}$  の両マウスにおいて、*CYP 1A1*、*1A2* の mRNA 発現レベルに有意差は認められなかった。一方、*CYP2B10* の mRNA レベルは、 $p53^{+/+}$  マウスならびに  $p53^{-/-}$  マウスで各対照群と比較して有意に上昇した。*NQO1* の mRNA 発現レベルは、 $p53^{+/+}$  マウスで変化はなかったが、 $p53^{-/-}$  マウスで軽微に上昇する傾向が認められた。

PBO 投与群では、 $p53^{+/+}$  マウスでは *CYP 1A1*、*1A2*、*2B10* および *NQO1* の mRNA 発現レベルが、 $p53^{-/-}$  マウスでは *CYP 1A2*、*2B10*、*NQO1* の mRNA 発現レベルがそれぞれ対照群と比較して有意に上昇した (Figure 2-5)。

### 4) 8-OHdG レベル

PhB 投与群では、 $p53^{+/+}$  ならびに  $p53^{-/-}$  マウスのいずれにおいても、8-OHdG レベルの有意な上昇は認められなかった。

PBO 投与群では、 $p53^{+/+}$  マウスでのみ 8-OHdG レベルの有意な上昇が認められた (Figure 2-6)。

5) *In vivo mutation assay*

PhB ならびに PBO の各投与群において、 $p53^{+/+}$  ならびに  $p53^{-/-}$  マウスのいずれにおいても、*gpt* と *red/gam* (*Spi*) 遺伝子の変異体頻度に各対照群と比較して有意差は認められなかった (Table2-5)。

Table 2-1. Body, liver, relative liver weights in  $p53^{+/+}$  and  $p53^{-/-}$  *gpt* delta mice given PCP for 13 weeks.

Genotype	Control	600 ppm	1,200 ppm
<i>p53<sup>+/+</sup></i>			
Body weight (g)	33.5 ± 2.43	28.7 ± 1.86 **	27.7 ± 1.60 **
Liver weight (g)	1.64 ± 0.37	1.74 ± 0.16	1.78 ± 0.15
Relative liver weight (g%)	4.87 ± 0.91	6.07 ± 0.54	6.43 ± 0.24 *
<i>p53<sup>-/-</sup></i>			
Body weight (g)	34.8 ± 4.25	30.0 ± 1.06	ND
Liver weight (g)	1.69 ± 0.46	1.62 ± 0.37	ND
Relative liver weight (g%)	4.99 ± 1.93	5.39 ± 1.13	ND

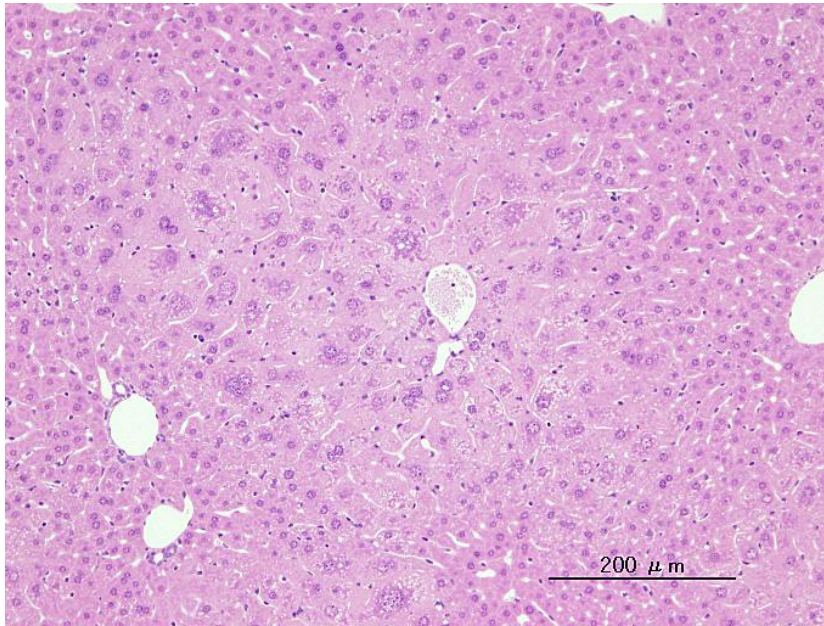
\*  $p < 0.05$  vs. Control.

\*\*  $p < 0.01$  vs. Control.

ND, not determined.

PCP, pentachlorophenol.

*p53*<sup>+/+</sup>



*p53*<sup>-/-</sup>

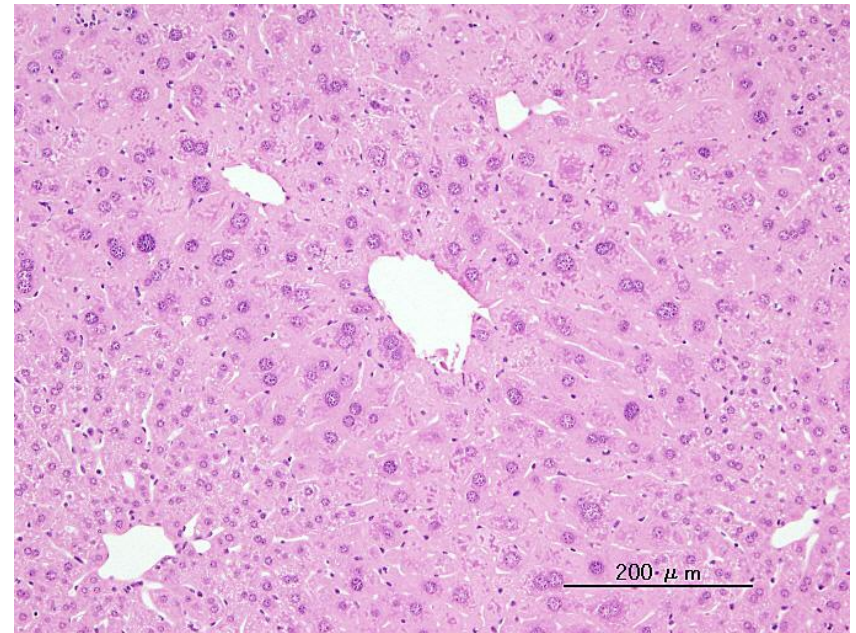


Figure 2-1.

Histopathological features in the livers of *p53*<sup>+/+</sup> or *p53*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice given pentachlorophenol (PCP) at a concentration of 600 ppm in the diet for 13 weeks. Centrilobular hepatocyte hypertrophy with enlarged nuclei was evident. There was no inter-genotype difference in the severity. HE staining.



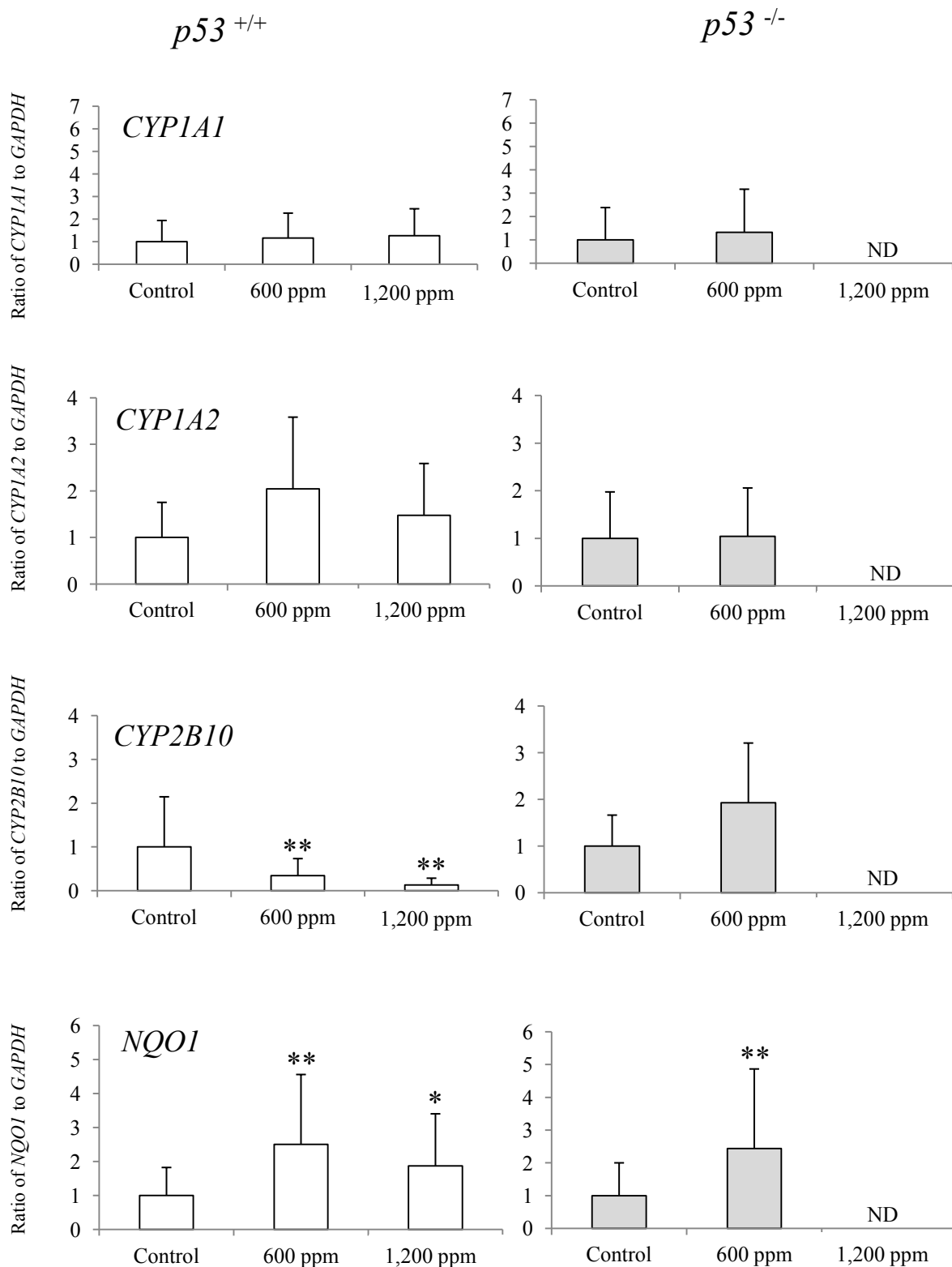


Figure 2-2.

Changes in *CYP1A1*, *1A2*, *2B10* and *NQO1* mRNA levels in the livers of *p53*<sup>+/+</sup> or *p53*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice given pentachlorophenol (PCP) at concentrations of 600 and 1,200 ppm in the diet for 13 weeks. ND, not determined. Values are mean  $\pm$  SD for 3-5 mice.

\*, \*\* Significantly different from the respective control group at  $p < 0.05$ , 0.01.

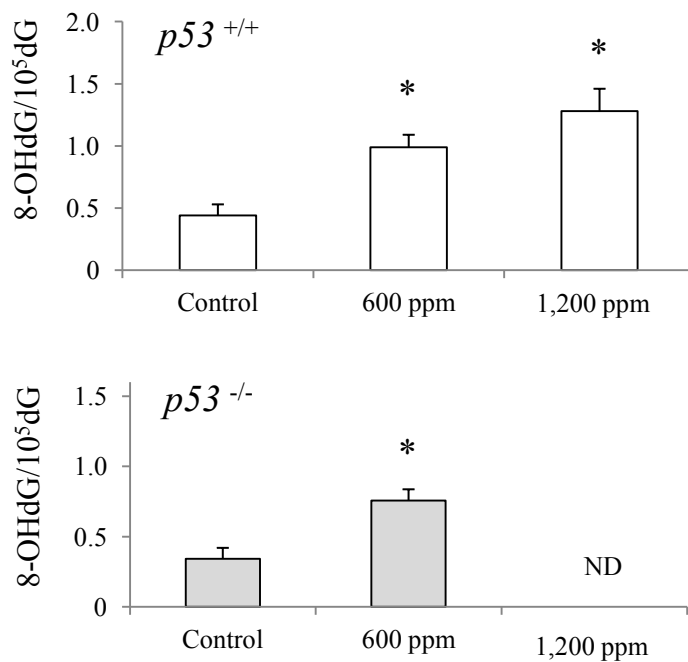


Figure 2-3.

Changes in 8-OHdG levels in the liver DNA of  $p53^{+/+}$  or  $p53^{-/-}$  *gpt* delta mice given pentachlorophenol (PCP) at concentrations of 600 and 1,200 ppm in the diet for 13 weeks. ND, not determined. Values are mean  $\pm$  SD for 3-5 mice.

\* Significantly different from the respective control group at  $p < 0.01$ .

Table 2-2. Mutant frequencies of *gpt* and *Spi*<sup>-</sup> in *p53*<sup>+/+</sup> and *p53*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice given PCP for 13 weeks.

Treatment	<i>p53</i> <sup>+/+</sup>		<i>p53</i> <sup>-/-</sup>	
	<i>gpt</i>	<i>red/gam</i> ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> )	<i>gpt</i>	<i>red/gam</i> ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> )
Control	0.34 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.20	1.17 ± 0.16	0.27 ± 0.04
PCP (600 ppm)	0.56 ± 0.63	0.32 ± 0.15	0.50 ± 0.22	0.17 ± 0.30
PCP (1,200 ppm)	0.41 ± 0.32	0.33 ± 0.06	ND	ND

a, x10<sup>-5</sup>

ND, not determined.

PCP, pentachlorophenol.

Table 2-3. Body, liver, relative liver weights in  $p53^{+/+}$  and  $p53^{-/-}$  *gpt* delta mice given PhB or PBO for 13 weeks.

Genotype	Control	PhB	PBO
<i>p53<sup>+/+</sup></i>			
Body weight (g)	31.2 ± 2.45	32.4 ± 2.41	19.2 ± 1.29 **
Liver weight (g)	1.40 ± 0.16	1.89 ± 0.27 *	1.57 ± 0.26
Relative liver weight (g%)	4.49 ± 0.16	5.82 ± 0.50	8.19 ± 1.55 **
<i>p53<sup>-/-</sup></i>			
Body weight (g)	32.4 ± 4.00	31.7 ± 2.93	22.0 ± 1.41 **
Liver weight (g)	1.29 ± 0.33	1.56 ± 0.47	1.77 ± 0.41
Relative liver weight (g%)	3.96 ± 0.80	4.88 ± 1.12	8.03 ± 1.46 **

\*  $p < 0.05$  vs. Control.

\*\*  $p < 0.05$  vs. Control.

PhB, phenobarbital; PBO, piperonyl butoxide.

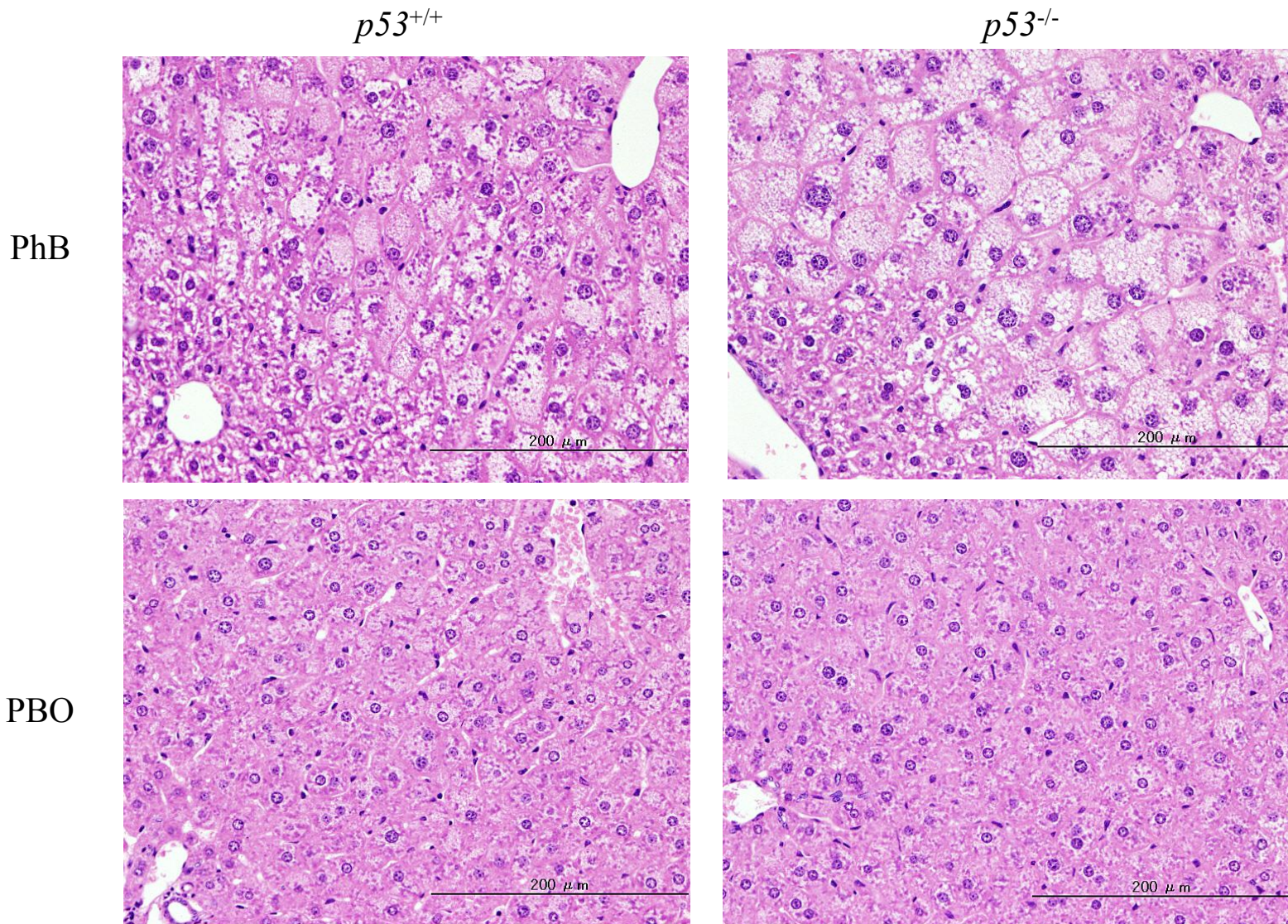


Figure 2-4. Histopathological features in the livers of  $p53^{+/+}$  or  $p53^{-/-}$  *gpt* delta mice given phenobarbital (PhB) or piperonyl butoxide (PBO) at a respective concentration of 500 or 6,000 ppm in the diet for 13 weeks. Lesions with a ground glass-like appearance and hepatocyte hypertrophy were evident in PhB-treated mice. There were no inter-genotype differences in the respective severities. HE staining.

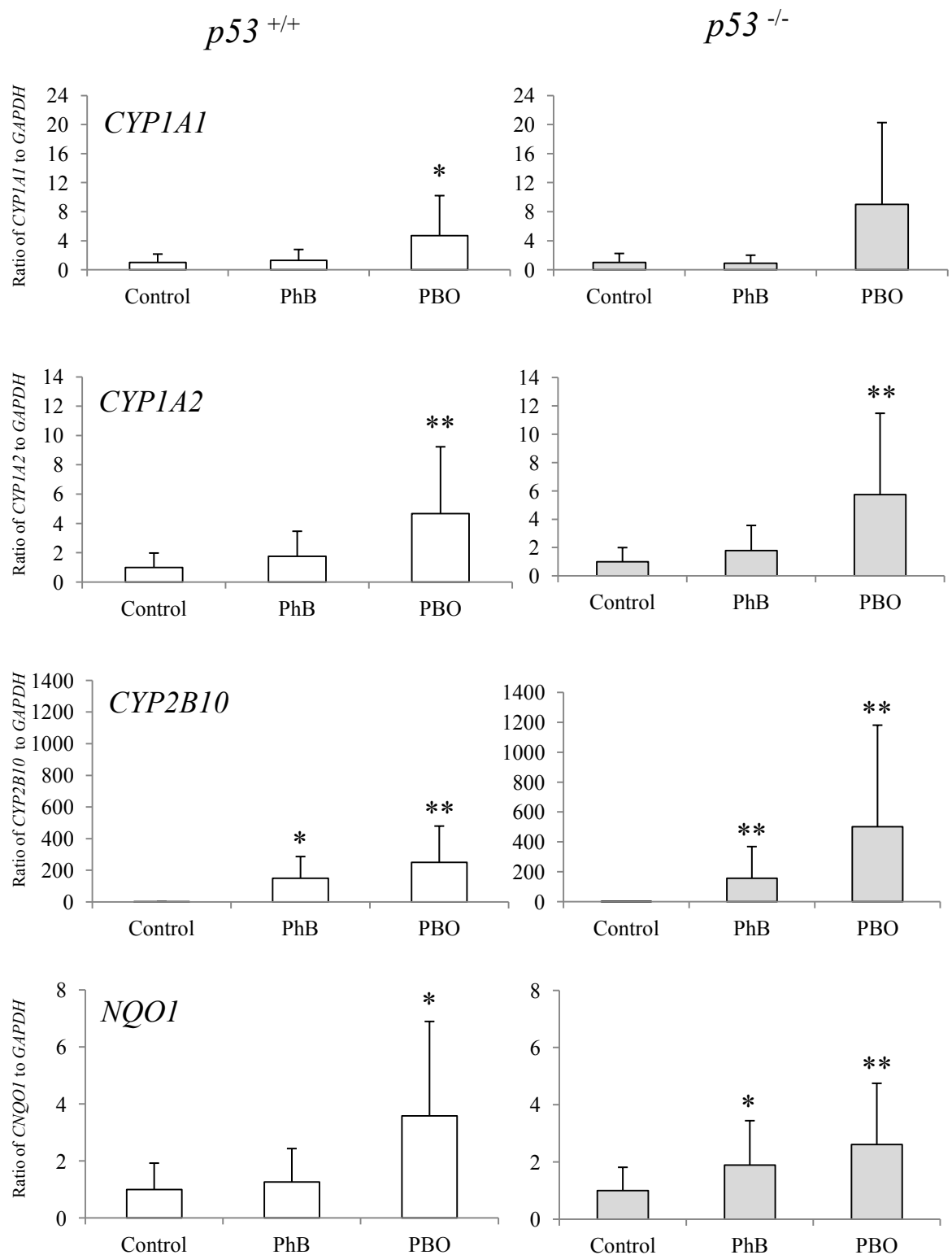


Figure 2-5.

Changes in *CYP1A1*, *1A2*, *2B10* and *NQO1* mRNA levels in the livers of *p53*<sup>+/+</sup> or *p53*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice given phenobarbital (PhB) or piperonyl butoxide (PBO) at respective concentrations of 500 or 6,000 ppm in the diet for 13 weeks. Values are mean  $\pm$  SD for 5 mice.

\*, \*\* Significantly different from the respective control group at  $p < 0.05$ , 0.01.

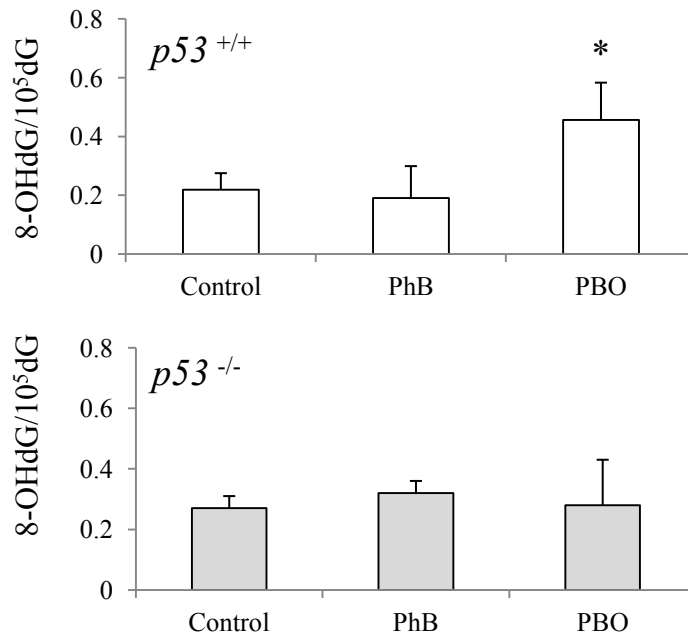


Figure 2-6.

Changes in 8-OHdG levels in the liver DNA of  $p53^{+/+}$  or  $p53^{-/-}$  *gpt* delta mice given phenobarbital (PhB) or piperonyl butoxide (PBO) at respective concentrations of 500 or 6,000 ppm in the diet for 13 weeks. Values are mean  $\pm$  SD for 5 mice.

\* Significantly different from the respective control group at  $p < 0.01$ .

Table 2-5. Mutant frequencies of *gpt* and *Spi*<sup>-</sup> in *p53*<sup>+/+</sup> and *p53*<sup>-/-</sup> *gpt* delta mice given PhB or PBO for 13 weeks.

Treatment	<i>p53</i> <sup>+/+</sup>		<i>p53</i> <sup>-/-</sup>	
	<i>gpt</i>	<i>red/gam</i> ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> )	<i>gpt</i>	<i>red/gam</i> ( <i>Spi</i> <sup>-</sup> )
Control	0.38 ± 0.20	0.39 ± 0.15	0.48 ± 0.27	0.48 ± 0.16
PhB (500 ppm)	0.27 ± 0.18	0.53 ± 0.16	0.22 ± 0.03	0.64 ± 0.22
PBO (6,000 ppm)	0.53 ± 0.52	0.57 ± 0.17	0.51 ± 0.20	0.54 ± 0.18

a, x10<sup>-5</sup>

ND, not determined.

PhB, phenobarbital; PBO, piperonyl butoxide.



## 2.4 考察

B6C3F1 マウスに 600 ppm の PCP を混餌投与すると、遺伝毒性がないにも関わらず肝腫瘍が生じることが報告されている[67]。今回、既報の発がん濃度の PCP を *p53* 欠損 *gpt delta* に投与することによって、8-OHdG の有意な上昇が認められたことから、PCP の発がんに関与する酸化ストレスが示唆された[113、115]。PCP は、生体内で自動的に酸化あるいは酵素反応的な酸化によりテトラクロロヒドロキノン (TCHQ)、テトラクロロベンゾキノン (TCBQ) となり、両キノン体の間に酸化還元サイクルを生じるが、特にテトラクロロセミキノン (TCSQ) と TCBQ の間で生じる反応では、活性酸素が効率的に発生することが報告されている[74、110]。このことから、今回 PCP の投与により肝臓に生じた酸化的 DNA 損傷は、PCP がキノン体となり発生した活性酸素により生じた可能性が考えられた [91]。

今回、PCP を投与した C57 BL/6 系マウスにおいて、8-OHdG の産生と *NQO1* の mRNA 発現レベルの上昇が同時に確認された。また、PCP を投与した ICR 系マウスで、*NQO1* タンパクレベルが上昇することが報告されている[115]。*NQO1* は TCBQ の 2 電子を奪う反応を触媒する酵素であり、TCSQ の中間体を介さず活性酸素種の産生を抑える [91]。このことから、生体内で酸化還元サイクルが介在する反応が生じているとともに、PCP の活性酸素の発生条件下で *NQO1* が抗酸化的に作用していることが推察された。

PCP の代謝初期の過程において、TCHQ への変換は主に *CYP1A1* に依存していると考えられている[82]。また、マウスへ PCP を混餌投与した研究では、肝臓中の *CYP 1A1* の酵素活性が上昇したことが報告されている[115]。本研究の

結果、PCP の投与により CYP1A1 の mRNA 発現レベルは増加傾向を示したが、対照群と比較して有意な変化ではなく、他の CYP 誘導剤の投与により誘導される mRNA 発現レベルと比較しても、軽微な変化であったと考えられる[15、98]。現在、PCP 投与による CYP2B10 の mRNA レベルの減少に関して、その生物学的な意義は不明であるが、PCP 投与により生じる CYP 誘導が活性酸素の産生に関与したとは考えにくく、PCP はキノン体による酸化還元サイクルを介して活性酸素を産生し、発がん標的臓器である肝臓に酸化的 DNA 損傷を生じたと考えられた。しかし、本研究における *in vivo* mutation assay の結果、*gpt* ならびに *red/gam* 遺伝子の変異体頻度には変化が認められなかったことから、PCP の代謝で生じる活性酸素の産生は、酸化的 DNA 損傷をもたらすが、この変化は遺伝子変異を誘発するには至らないと考えられた。

第 2 章では、PhB を投与したマウスでは、ラットの CYP2B1 に相当するマウス CYP2B10 の mRNA 発現レベルが、対照群と比較して 100 倍以上上昇した。CYP2B10 は、構造的活性化アンドロスタン受容体 (CAR) の標的遺伝子である [28]。CAR 欠損マウスに PhB を投与しても肝臓に腫瘍を生じない [86] ことから、PhB の腫瘍発生に CAR を介して誘導された CYP2 B10 が関与している可能性が考えられている。また、CYP 2B10 が効率的に活性酸素を発生させる CYP であること [81] から、PhB の発がんに関与する酸化ストレスが重要な役割を果たしていると思われる。しかしながら本章の実験で、PhB を投与したマウス肝臓中の 8-OHdG レベルに有意な上昇は認められず、第 1 章のラットの成績と一致していた [105]。これらの成績から、PhB による肝臓の発がんには、CYP2B10 の誘導による酸化ストレスが関与するのではなく、CAR を介した発がん機序が関与し

ていると考えられた。

*In vivo* mutation assay においても、PhB を投与したマウスの *gpt* ならびに *red/gam* 遺伝子の変異体頻度に影響は見られなかったことから、PhB は従来通り、細胞増殖活性を亢進させることで発がん性を示す非遺伝毒性発がん物質 [13] に分類されると考えられた。

本章の実験において、*gpt delta* マウスへの PBO の投与により、*CYP 1A1*、*1A2*、*2B10* の mRNA 発現レベルの上昇が認められたが、*CYP 1A1*、*1A2* の mRNA 発現レベルは対照群に対して約 4 倍程度の上昇であり、ラットで認められた 100 倍の上昇 [105] と比較すると軽微な変化であった。おそらくマウスへの PBO 投与で誘導される *CYP 1A1*、*1A2* に起因する活性酸素の発生量のレベルでは、酸化的 DNA 損傷や遺伝子変異が生じるには不十分であると考えられた。一方、*NQO1* mRNA 発現レベルは、PBO の投与により上昇した。PBO の代謝は主にメチレンジオキシド環で生じ、本部位が開環することでカテコールを生じる [9]。今回、PBO の *gpt delta* マウスへの投与で認められた *NQO1* mRNA 発現レベルの上昇は、カテコールに起因するキノン体の産生を反映していることから、活性酸素の産生に、*CYP2B10* の誘導に加えてキノン体による酸化還元サイクルが重要であることが考えられた。この結果は、*CYP 1A1*、*1A2* の誘導が顕著に生じたラットの結果と大きく異なった [71]。いずれにしても、本研究からマウスならびにラットへ PBO を投与して生じる活性酸素は、酸化的 DNA 損傷を生じるが、この変化は遺伝子変異を誘発するには至らないことが明らかとなった。

本章の実験では、*p53* の欠損による変化として、PhB 投与群で *NQO1* の mRNA 発現レベルの上昇が、また、PBO 投与群では 8-OHdG レベルの上昇が認められ

たのみで、他の解析項目に有意な変化は認められなかった。*p53* は、8-OHdG の修復酵素である OGG1 を直接的に制御し[93]、また転写活性因子として生体に抗酸化的に作用することが知られている[10、87、119]。従って、PhB 群で 8-OHdG レベルが上昇しなかったのは、*p53* の欠損による変化であったとは考えにくい。*p53*<sup>-/-</sup> *gpt delta* マウスは、DNA の 2 重鎖切断に関連する欠失変異を引き起こす遺伝毒性物質に対して高感受性を示すこと[133]、8-OHdG は OGG1 により塩基除去修復の際に欠失変異を引き起こす[132]ことを考えれば、*p53*<sup>-/-</sup> *gpt delta* マウスは酸化ストレスを産生する化学物質に対して高感受性を示すと考えられる。しかしながら、今回、PCP あるいは PBO の投与によりマウス肝臓に酸化的 DNA 損傷が生じることは確認できたものの、*p53*<sup>+/+</sup> マウスだけではなく *p53*<sup>-/-</sup> マウスにおいても、*gpt* と *red/gam* 遺伝子の変異体頻度は上昇しなかった。強力な酸化剤である臭素酸は、腫瘍発生の標的臓器である腎臓の DNA に 8-OHdG を生じ、顕著な *red/gam* の変異体頻度が顕著に上昇することが報告されている[118]。このことから、PCP、PBO の投与によるキノン体の発生や PhB や PBO の投与による CYP 誘導により生じる程度の活性酸素量では、肝臓に酸化的 DNA 損傷を引き起こすものの、遺伝子変異を誘発するには至らないと考えられた。

以上から、PCP はキノン体の酸化還元サイクル、PhB は CYP 誘導のみを、PBO はその両方の酸化ストレス発生系を介して活性酸素を発生させると考えられたが、酸化的 DNA 損傷を生じるのは PCP、PBO のみであることが示された。しかしながら、いずれの化学物質も *in vivo* 変異原性を示すには至らないことが明らかとなった。これら 3 種類の肝臓における発がん機序に、酸化ストレ

スが関与する遺伝毒性的な作用はなく、従来どおり非遺伝毒性発がん物質としての作用を有するのみであることが確認された。

## 2.5 小括

*p53* は DNA 修復やアポトーシスに関わるがん抑制遺伝子として知られており、近年では、その発現蛋白質が抗酸化酵素群の転写因子として働くことも報告されている。従って *p53* が欠損したマウスは、酸化ストレス発生系を有する発がん物質に対して高感受性を示すことが予想される。そこで本章では、*p53*<sup>+/+</sup> ならびに *p53*<sup>-/-</sup> *gpt delta* マウスを用い、代謝後にキノン体となって酸化ストレスを発生する PCP ならびに CYP 誘導能を有する PBO と PhB が、標的臓器である肝臓において酸化的 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性を有するかについて検討した。

PCP を投与した *p53*<sup>+/+</sup> マウスでは、*NQO1* の mRNA 発現レベルの有意な上昇、ならびに 8-OHdG レベルの有意な増加が認められたが、*gpt* ならびに *red/gam* の変異体頻度の上昇は認められなかった。一方、*p53*<sup>-/-</sup> マウスでは、これらの結果に *p53*<sup>+/+</sup> マウスとの違いは認められなかった。

PhB ならびに PBO を投与した *p53*<sup>+/+</sup> マウスでは、*CYP 2B10* の mRNA 発現レベルが上昇し、PBO 投与群では、*CYP1A1*、*IA2* に加え *NQO1* の mRNA 発現レベルの上昇も観察された。8-OHdG レベルは、PBO 投与群のみで有意に増加した。一方、*p53*<sup>-/-</sup> マウスでは、PhB、PBO の両投与群で *p53*<sup>+/+</sup> マウスと同種の mRNA の発現レベルが上昇したが、8-OHdG レベルに *p53* の欠損による上昇は認められなかった。*gpt* ならびに *red/gam* の遺伝子変異体頻度は、*p53*<sup>+/+</sup> マウス、*p53*<sup>-/-</sup> マウスのいずれにおいても変化は認められなかった。

以上の結果から、PCP および PBO は *p53*<sup>+/+</sup> マウスの肝臓に酸化的 DNA 損傷を誘発することが明らかとなった。また、PBO は、*NQO1* の mRNA 発現レベル

の有意な上昇を起こしたことから、肝臓における PBO の酸化ストレス発生に、CYP 誘導に加えてキノン体の生成が関与している可能性を示すことができた。しかしながら、いずれの投与群においても、導入遺伝子の変異体頻度が上昇しなかったことから、キノン体の酸化還元サイクルや CYP 誘導により生じる酸化ストレスは、酸化的 DNA 損傷を生じさせるものの、遺伝子変異を誘発しない、すなわち腫瘍形成過程において遺伝毒性作用を示す可能性は低いことが考えられた。

## 第 3 章

*nrf2* 遺伝子欠損マウスを用いたペンタクロロフェノールなら  
びにピペロニルブトキシドの腫瘍形成過程における酸化スト  
レスの作用点に関する解析



### 3.1 はじめに

第 1 章では *gpt delta* ラット、第 2 章では *p53* 欠損 *gpt delta* マウスに酸化ストレス発生系が異なる非遺伝毒性肝発がん物質を 4 ないしは 13 週間投与し、肝臓における酸化的 DNA 損傷ならびに遺伝子変異の誘発について解析した。その結果、PCP はキノン体の酸化還元サイクル、PhB は CYP 誘導、PBO はその両方の酸化ストレス発生系を介して活性酸素を発生させることが考えられたが、酸化的 DNA 損傷が生じたことを示す 8-OHdG レベルの上昇を生じたのは PCP、PBO のみで、*in vivo* mutation assay では、いずれの物質も導入遺伝子の変異を誘発しなかった [105、106]。

腫瘍は、細胞内に生じた遺伝子変異が蓄積し、正常細胞から腫瘍細胞へと変化することで生じると考えられている [53、83]。このような概念に基づき、細胞の形態学的な解析から、異型性を有するいわゆる前がん病変が分類されているが、腫瘍形成過程における病変の進展段階と酸化ストレスの関係について解析した報告はない。

Nrf2 (nuclear factor E2 p45-related factor 2) は、酸化ストレスにより活性化され、プロモーター領域に抗酸化応答配列 (anti oxidant response element, ARE) を有する多くの抗酸化酵素群の転写を調節する生体内酸化防御機構に関わる重要な因子として知られており、環境ストレス応答遺伝子群の発現を上昇させる [2、41、100]。最近の研究では、600 もの遺伝子が Nrf2 の結合モチーフとして存在するとも言われ、Nrf2 が細胞内において主要な役割を果たしていることが考えられている

[61]。特に、Nrf2は、NQO-1をはじめとする、 $\gamma$ -グルタミン酸システインリガーゼ、NAD (P) キノンオキシドリダクターゼ1、ヘモオキシゲナーゼ1、チオレドキシシンオキシゲナーゼなどの抗酸化酵素を制御していることが報告されており[97]、酸化ストレスに対する生体防御として重要な役割を果たしていると考えられている。

*nrf2*欠損マウスは、生体内で酸化ストレスを生じるアセトアミノフェンや4-ビニルシクロヘキサジエポキシドといった多くの毒性物質に対して高感受性を示す[19、31]。また、同マウスに発がん誘導剤を投与すると、前胃や肝臓が高い発がん感受性を示すことが報告されている[50、89、90]が、これらの発がん研究で用いられた化学物質は、元来遺伝毒性を有す化合物であり、非遺伝毒性発がん物質を*nrf2*欠損マウスに投与して酸化ストレスと腫瘍形成との関連を解析した報告はない。

PCPは、非遺伝毒性発がん物質でありながら、マウス肝臓に発がん性を示し[36、37、67]、ジエチルニトロソアミンの投与により生じる肝内胆管嚢胞を胆管がんへと進展させる作用がある [114]。PCPの代謝により生じるキノンの生成物[110、112、122]が生体内で酸化ストレスを発生し、これが発がんの原因となると考えられている。事実、*nrf2*欠損マウスへPCPを投与すると、肝臓中の8-OHdGとALP活性が高いレベルを示す [115]。

第2章で行ったPBOの投与実験では、PCPと同様にPBOの混餌投与でもマウス肝臓中のNQO1のmRNA発現レベルが上昇したことから、メチ

レンジオキシ環の開環により生じるキノン体が酸化ストレスを発生させ、肝臓における発がんに関与していることが示唆された [9、42、70]。

そこで本章では、酸化ストレスに対する生体防御機構の重要な因子である Nrf2 の遺伝子欠損したマウスに、非遺伝毒性発がん物質である PCP と PBO を投与し、腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点について検証した。実験 1 では、*nrf2* 欠損マウスに PCP を長期投与し、肝臓における腫瘍形成を指標とした解析を行った。実験 2 では、PBO 投与初期のマウス肝臓における *nrf2* の影響を調べるため、PBO の短期投与を行い、血清中の肝障害マーカーと肝臓中の 8-OHdG を測定し、長期投与における腫瘍形成の成績と比較検討した。

### 3.2 材料と方法

本動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の承諾を得て実施した。

#### 1) 化学物質

PCPとPBOは和光純薬工業株式会社より購入した。

#### 2) 実験動物

*nrf2*欠損マウスは、ICR/129SVJ を背景系統として伊藤ら[35]により確立された動物をICR マウスと交配し作出した（日本SLC株式会社）。F1動物の尾端の組織からDNAを抽出し、PCR法にて*nrf2*の遺伝子型を確認し、*nrf2*野生型マウス (*nrf2*<sup>+/+</sup>)ならびに*nrf2*ホモ欠損マウス(*nrf2*<sup>-/-</sup>)を得た。動物は、木製床敷を入れたポリカーボネート製のケージに収容し、バリアシステムの飼育室内で、温度23 ± 2°C、湿度55 ± 5 %、換気回数12 回/時間、明暗周期12時間で飼育した。基礎飼料としてCRF-1（日本チャールスリバー株式会社）を与えた。餌と水道水は自由摂取させた。

#### 3) 投与方法および投与後の処置

##### 実験1 PCPの長期投与実験

50匹の7週齢雄の *nrf2*<sup>+/+</sup>ならびに *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスを、3群（1群 15~20匹）に分け、PCPを600 ppm、1,200 ppmでそれぞれ60週間混餌投与

した。投与濃度は、マウスにおける発がん濃度[67]に準拠した。対照群には、基礎飼料のみを与えた。臨床症状、一般状態の観察は毎日実施した。体重と摂餌量は投与5週目まで毎週測定し、その後5週間おきに測定した。投与期間終了後、動物はメトキシフルランによる深麻酔下で安楽殺した。死亡確認後、肝臓の一部を回収し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定した肝臓は、パラフィン切片を作製し、HE染色を施して光学顕微鏡下で観察した。残った肝臓は、肝DNA中の8-OHdGを測定するため、液体窒素で凍結し、測定まで-80℃で保存した。

## 実験2 PBOの短期ならびに長期投与実験

PBOの短期投与実験として、15匹の7週齢雄の *nrf2*<sup>+/+</sup>ならびに *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスを3群(1群5匹)に分け、PBOを3,000および6,000 ppmでそれぞれ8週間混餌投与した。投与濃度は、マウスにおける発がん濃度[102]に準拠した。対照群には、基礎飼料のみを与えた。剖検時、メトキシフルランの深麻酔下で採血後、安楽殺した。血液から分離した血清を用いて肝障害マーカーであるALT、AST、ALPを測定した。摘出した肝臓の一部を10%中性緩衝ホルマリン液に固定し、パラフィン切片を作製し、HE染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

PBOの長期投与実験として、80匹の7週齢雄の *nrf2*<sup>+/+</sup>ならびに *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスを3群(1群25~30匹)に分け、PBOの短期投与実験と同じ濃度で52週間混餌投与した。剖検後、肝臓を摘出し、パラフィン切

片を作製し、HE染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

#### 4) 血清生化学的検査

ALT、AST、ALPレベルの測定は、SRL社（東京、日本）に依頼した。

#### 5) 8-OHdGの測定

第1章と同様の方法で測定した。

#### 6) 統計学的処理

体重、肝臓重量、血清生化学検査値、8-OHdGレベルについて、分散の均一性をBartlett's testで調べた。分散が均一な場合、一要因分散分析(ANOVA)を適用した。分散が一樣ではなかった場合、Kruskal-Wallis検定を実施した。統計学的有意差が認められた場合、Dunnett's 多重検定により対照群と試験群を比較した。生存率と腫瘍形成発生頻度、病理学的所見の検定は、フィッシャーの直接確立検定を行った。 $p$ 値が0.05未満の場合、有意差ありと判断した。

### 3.3 成績

#### 実験 1 PCP の長期投与実験

##### 1) 生存率

PCPを60週間投与した  $nrf2^{+/+}$  と  $nrf2^{-/-}$  マウスの生存率を、Figure 3-1 (a) に示す。いずれの遺伝子型においても、PCP1,200 ppm群で投与初期から死亡あるいは瀕死の個体が認められるようになり、生存率は投与20週目には30%となった。死亡原因は不明であったが、肉眼的に肝臓に結節が多発していた。投与25週目における  $nrf2^{-/-}$  マウスのPCP 6,000 ppm投与群の生存率は53%であったが、 $nrf2^{+/+}$  マウスでは、これと同等の生存率約50%となったのは投与50週目であった。

PCPを0、600、1,200 ppmで投与した群の投与終了時の生存率は、それぞれ  $nrf2^{+/+}$  マウスで80、27、0%、 $nrf2^{-/-}$  マウスでは53、13、0%であった。

##### 2) 体重

体重変化をFigure3-1 (b) に示した。 $nrf2^{+/+}$  と  $nrf2^{-/-}$  マウスのPCP投与群で、体重の増加抑制が認められた。この変化は、 $nrf2^{+/+}$  と  $nrf2^{-/-}$  マウスのPCP1,200 ppm投与群では投与11週目以降、 $nrf2^{-/-}$  マウスのPCP600 ppm投与群では投与16週目以降、 $nrf2^{+/+}$  マウスのPCP600 ppm投与群では投与36週目以降に、それぞれ統計学的に有意な変化として現れた。

### 3) 摂餌量

PCPの0、600、1,200 ppm投与群における平均摂餌量は、それぞれ *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスで5.85、6.81、8.66 mg/kg/匹、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは7.53、6.97、10.3 mg/kg/匹であった。

### 4) 病理組織学的検査

PCPを60週間投与した *nrf2*<sup>+/+</sup> と *nrf2*<sup>-/-</sup> マウスでは、多発性の胆管病変が認められた (Figure 3-2 (a))。この病変は、異型性を有する胆管周囲に、線維化、炎症を伴い、導管には細胞破砕物が認められたことから、胆管線維症 (cholangiofibrosis) [4、24]と診断した。また、異型性を有する上皮細胞が間質に認められ、多層化した胆管上皮を特徴とする胆管がん (cholangiocarcinoma) [25、112]も認められた (Figure 3-2 (b)、3-2 (c))。各病変の発生頻度をTable3-1に示す。

胆管線維症は、*nrf2*<sup>+/+</sup>と*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスのPCP1,200 ppm投与群で高頻度に認められ、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスのPCP600 ppm投与群における発生頻度は *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスにおける同濃度投与群と比較して有意に高かった。

胆管がんは、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスのPCP600 ppm投与群を除くすべてのPCP投与群で認められたが、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスのPCP1,200 ppm投与群における発生頻度は、統計学的に有意に高かった。

肝細胞腺腫の発生頻度は、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスのPCP1,200 ppm投与群で有意に高かった (Figure 3-2 (a)、Table 3-1)。



## 実験 2 PBO の短期および長期投与実験

### 実験 2-1 PBO の短期投与実験

#### 1) 体重、肝臓の相対重量

体重に PBO 投与による有意な変化は認められなかった。*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスならびに *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの PBO3,000、6,000 ppm 投与群で、肝臓の相対重量が有意に増加した (Table 3-2)。

#### 2) 血清生化学的検査

*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの PBO 6,000 ppm 投与群で、軽微ではあるが AST 値の有意な上昇が認められた (Table 3-2)。

#### 3) 8-OHdG レベル

8-OHdG レベルが、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスの PBO6,000 ppm 投与群で対照群と比較して有意に上昇し、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは、PBO3,000 ppm、6,000 ppm 投与群において、対照群と比較して有意に上昇した (Figure 3-3)。

### 実験 2-2 PBO の長期投与実験の結果

#### 1) 生存率

PBO の 3,000 ppm ならびに 6,000 ppm 投与群における *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの生存率は、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスの値と比較して低かった。投与期間終了時の生存率は、それぞれ *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスで 96%、96%、90%、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスで 80%、88%、87%であった (Figure 3-4 (a) ) 。

## 2) 体重

*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスでは、PBO 3,000、6,000 ppm 投与群で試験期間を通じて体重の増加抑制が認められた。

*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは、PBO の 3,000 ppm 投与群で投与 10 週目から 25 週目、投与 40 週目の体重が対照群と比較して有意に低値を示した。6,000 ppm 投与群では、投与 10 週目から試験期間終了まで体重が有意に低い値を示した (Figure 3-4 (b))。

## 3) 摂餌量

PBOの0、3,000、6,000 ppm投与群における平均摂餌量は、それぞれ *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスで5.99、6.16、6.24 mg/kg/匹で、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは7.15、6.22、7.36 mg/kg/匹であった。

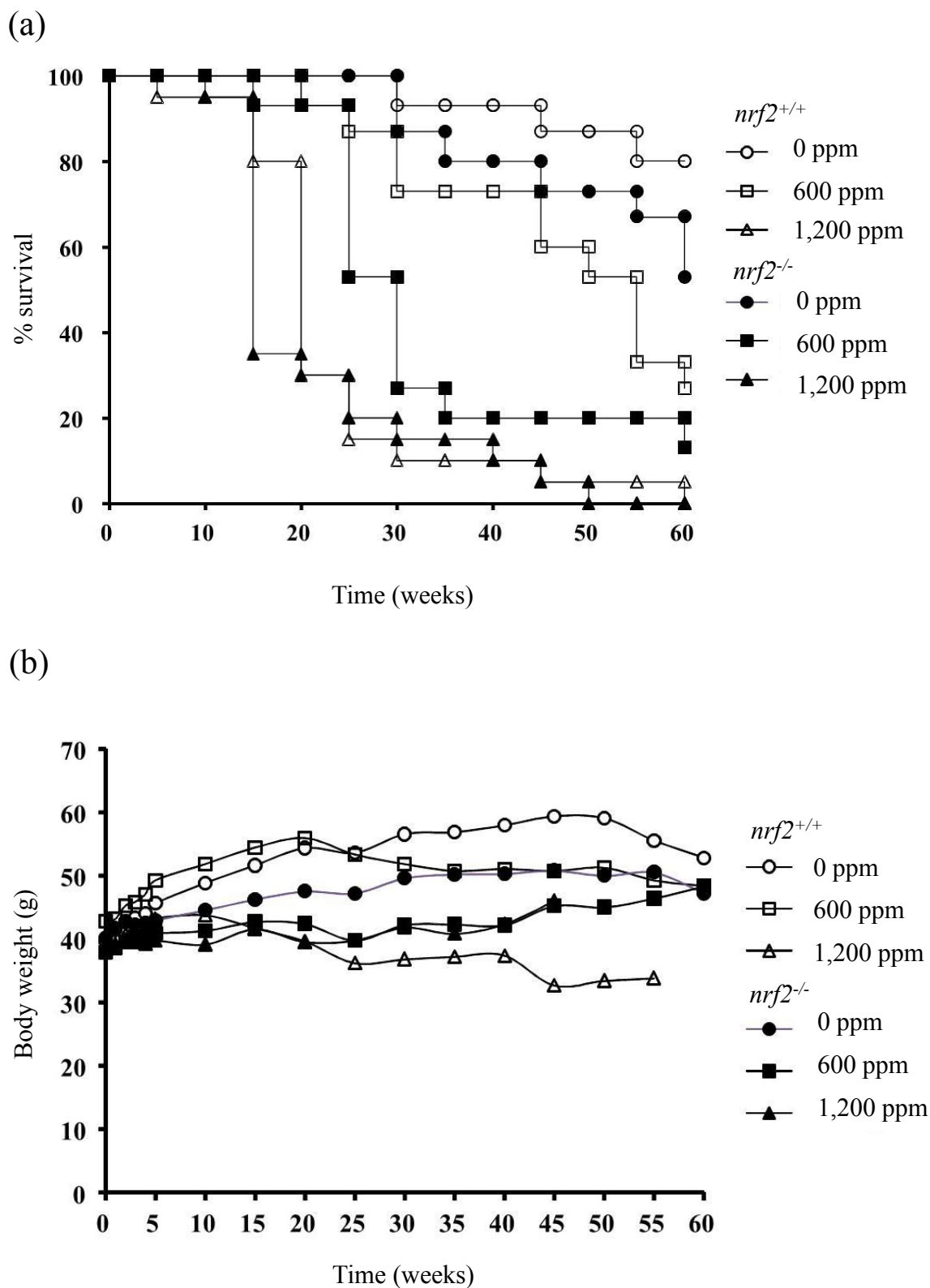
## 4) 病理組織学的検査

PBO の 3,000、6,000 ppm 投与群で、肝臓表面から突出するように結節が多数認められた。大型の結節は有茎性に形成され、さらにその結節は圧排性を示す結節性病変より構成されていた (Figure 3-5 (a))。ほとんどの結節が、好塩基性 (Figure 3-5 (b))、好酸性 (Figure 3-5 (c))、空胞をもつ肝細胞 (Figure 3-5 (d)) から構成され、肝細胞索の乱れや、未熟な中心静脈やグリソン鞘を有するものが認められたが小葉構造は保たれていた。また、ほとんどの結節が巣状壊死を伴って認められた (Figure 3-5 (e))。これらの特徴から、本病変を再生性肝細胞過形成

(regenerative hepatocellular hyperplasia) [106]と診断した。再生性肝細胞過形成内に、周囲の結節との境界が明瞭で、異型性を有する肝細胞のモノクローナルな増殖が観察された。この変化は、肝細胞腺腫 (Figure 3-6 (a、b)) あるいは肝細胞がん (Figure 3-6 (c、d)) と診断した。肝細胞がんは、正常肝細胞の領域にも散見された。これらの肝病変の発生頻度を Table 3-3 に示す。

再生性肝細胞過形成はすべての PBO 投与群で認められ、その発生頻度は  $nrf2^{+/+}$ ならびに  $nrf2^{-/-}$ マウスの PBO6,000 ppm 投与群で各遺伝子型の対照群と比較して有意に高かった。

肝細胞腺腫を生じた個体の発生頻度ならびに 1 個体当たりの肝細胞腺腫の発生数を解析した。その結果、 $nrf2^{+/+}$ ならびに  $nrf2^{-/-}$ マウスのいずれにおいても PBO6,000 ppm 投与群で同遺伝子型の対照群と比較して有意に高い発生頻度で認められ、1 個体当たりの発生数も有意に多かった。また、 $nrf2^{-/-}$ マウスの PBO6,000 ppm 投与群における肝細胞腺腫の発生頻度は、 $nrf2^{+/+}$ マウスの同濃度投与群と比較して有意に高かった。さらに、再生性肝細胞過形成内に肝細胞腺腫を生じた個体の発生頻度ならびに 1 個体あたりの肝細胞腺腫の数は、PBO を 6,000 ppm 投与した  $nrf2^{-/-}$ マウスで  $nrf2^{+/+}$ マウスの同濃度群と比較して約 5 倍高かった。



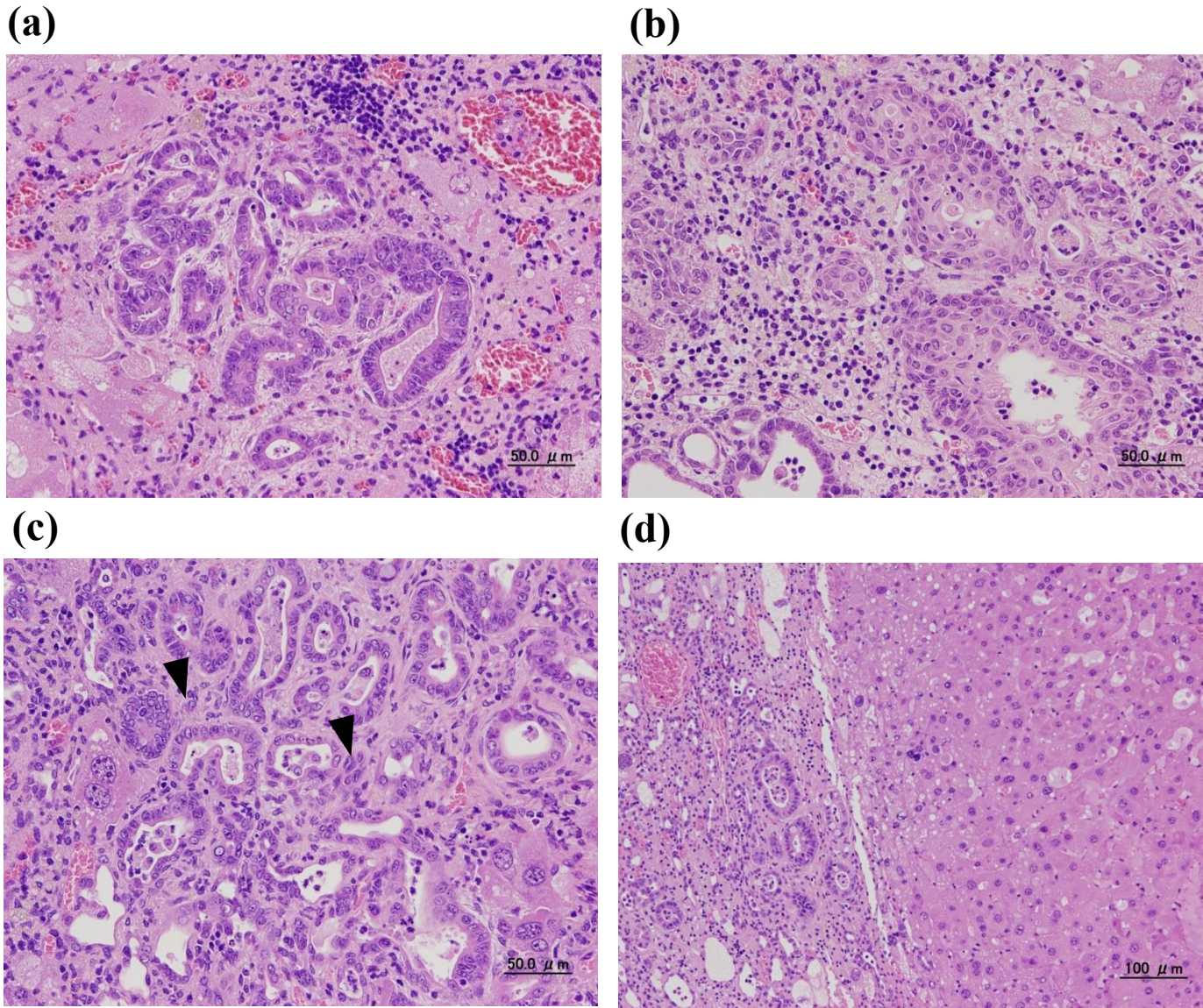


Figure 3-2.

(a) Cholangiofibrosis in *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given pentachlorophenol (PCP) at a concentration of 1,200 ppm. Note atypical ducts containing cellular debris in extensive fibrosis and inflammation. (b), (c) Cholangiocarcinoma in *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given PCP at a concentration of 1,200 ppm. Note (b) multilayered and (c) scattered (arrow head) atypical epithelial cells with mitotic cells. (d) Hepatocellular carcinoma adjacent to cholangiofibrosis in *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given PCP at a concentration of 1,200 ppm. HE staining.

Table 3-1. Incidences of cholangiofibrosis and liver tumors in *nrf2*<sup>+/+</sup> and *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given PCP.

Genotype Dose	No. of mice	No. of mice (%) with proliferative lesions			
		Cholangio- fibrosis	Cholangio- carcinoma	Hepatocellular adenoma	Hepatocellular carcinoma
<i>nrf2</i> <sup>+/+</sup>					
0 ppm	15	0	0	2(13)	1 (7)
600 ppm	15	1 (7)	0	1 (7)	0
1,200 ppm	20	16 (80) **	3 (15)	2 (10)	0
<i>nrf2</i> <sup>-/-</sup>					
0 ppm	15	0	0	0	1 (7)
600 ppm	15	8 (53) *,#	2 (13)	2 (13)	0
1,200 ppm	20	18 (90) **	6 (30) *	4 (20) *	0

\*  $p < 0.05$  vs. the relevant control.

\*\*  $p < 0.01$  vs. the relevant control.

#  $p < 0.05$  vs. PCP (600 ppm) in *nrf2*<sup>+/+</sup>.

PCP, pentachlorophenol.

Table 3-2. Body and relative liver weights, and serum biochemistry in *nrf2*<sup>+/+</sup> and *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given PBO.

Genotype Dose	Body weight (g)	Relative liver weight (g%)	Serum biochemistry		
			ALT	AST	ALP
<i>nrf2</i> <sup>+/+</sup>					
0 ppm	46.1 ± 9.6	4.59 ± 0.97	31.2 ± 10.1	97.4 ± 24.5	159 ± 17
3,000 ppm	42.4 ± 8.5	6.32 ± 0.53**	33.2 ± 11.1	79.4 ± 7.09	163 ± 32
6,000 ppm	38.8 ± 5.1	8.04 ± 0.28**	42.4 ± 7.92	99.4 ± 23.8	165 ± 30
<i>nrf2</i> <sup>-/-</sup>					
0 ppm	46.0 ± 7.7	4.50 ± 0.32	30.6 ± 8.20	74.6 ± 11.2	194 ± 48
3,000 ppm	42.2 ± 6.1	6.02 ± 0.44**	42.2 ± 8.58	82.8 ± 14.0	231 ± 61
6,000 ppm	38.9 ± 3.8	8.34 ± 0.81**	36.8 ± 9.01	91.1 ± 16.9*	193 ± 31

\*  $p < 0.05$  vs. the relevant control.

\*\*  $p < 0.01$  vs. the relevant control.

PBO, piperonyl butoxide.

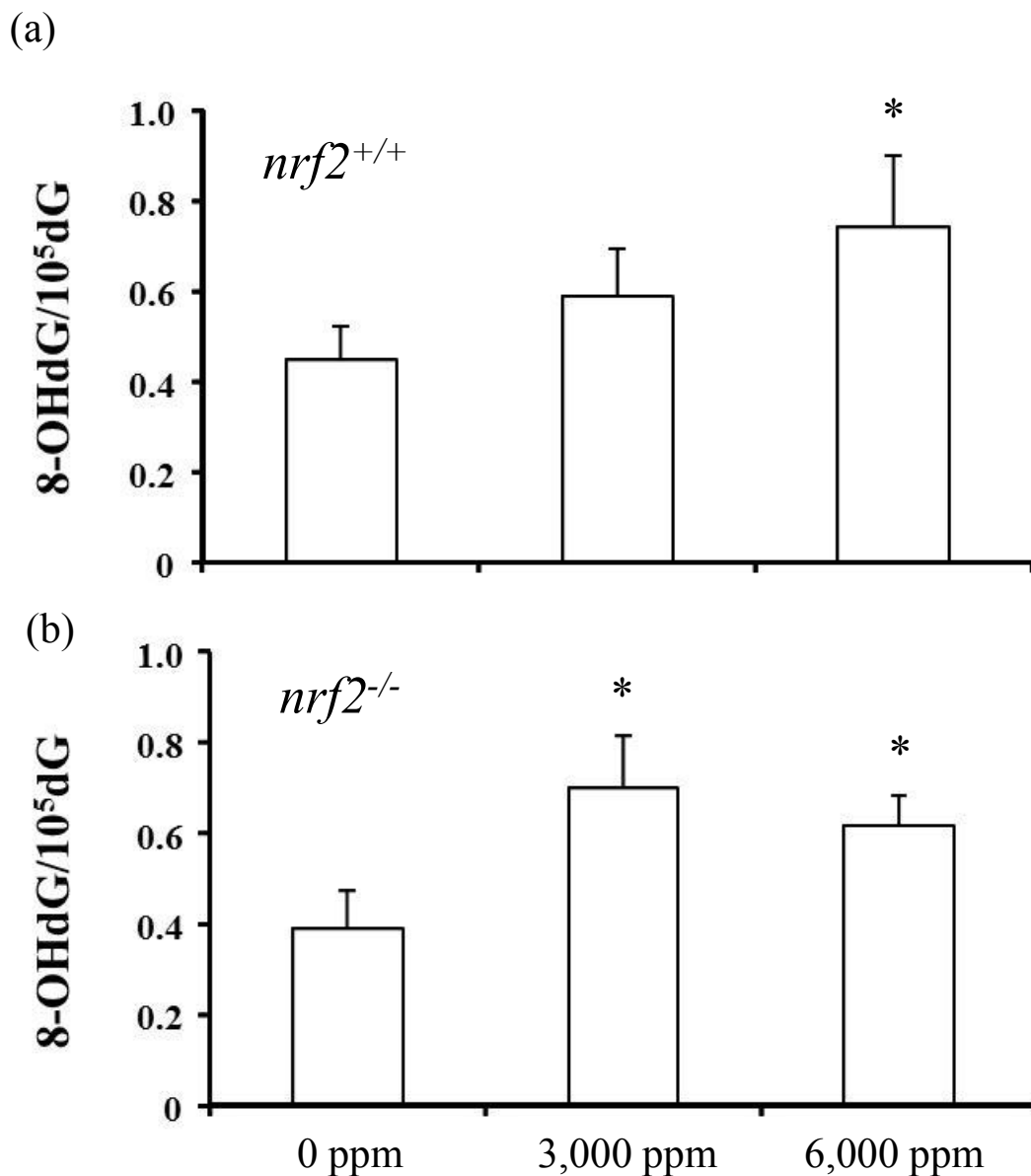


Figure 3-3.  
Changes in 8-OHdG levels in the liver DNA of (a) *nrf2*<sup>+/+</sup> and (b) *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given piperonyl butoxide (PBO). The values are the means  $\pm$  SDs of data for 5 animals. \* significantly different from the relevant control group at  $p < 0.01$ .



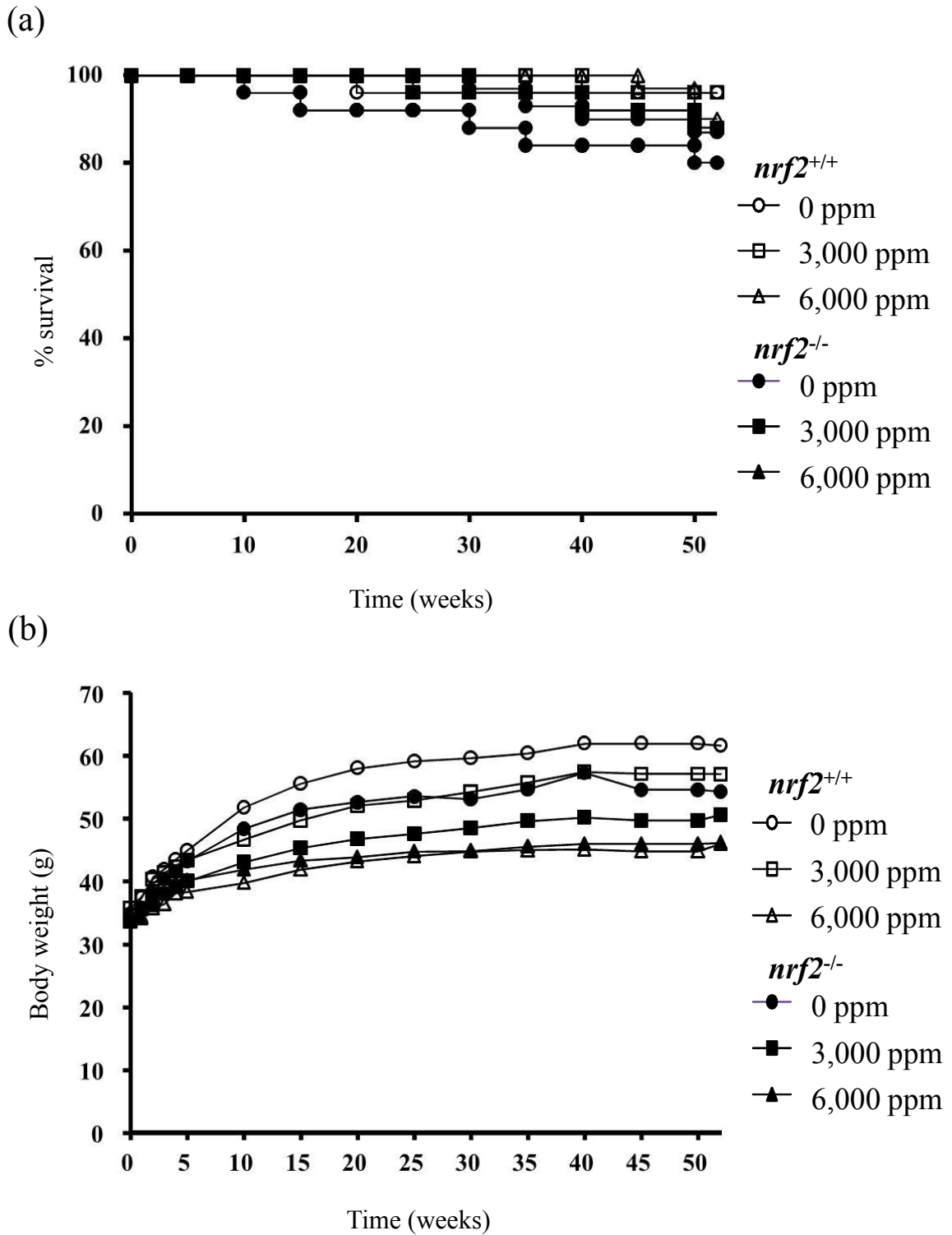


Figure 3-4.  
 (a) Survival curves for *nrf2*<sup>+/+</sup> and *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given piperonyl butoxide (PBO).  
 (b) Growth curves for *nrf2*<sup>+/+</sup> and *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given PBO.

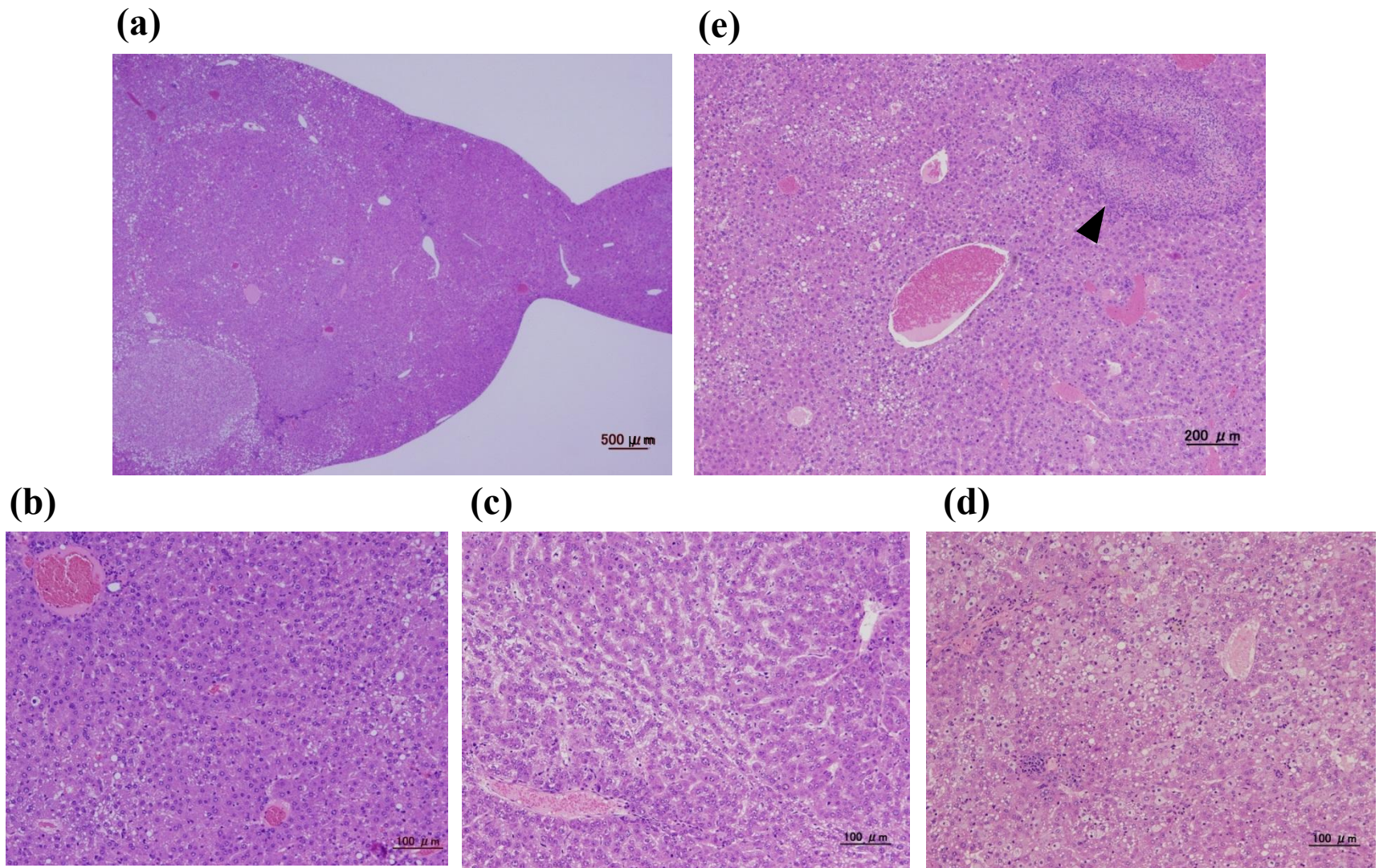


Figure 3-5.

(a) Regenerative hepatocellular hyperplasia (RHH) in *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given piperonyl butoxide (PBO) at a concentration of 6,000 ppm. Note the pedunculated shape and involvement of some nodules. (b), (c), (d), (e) Almost all of the nodules were composed of (b) basophilic, (c) eosinophilic, or (d) vacuolated hepatocytes, but the lobular architecture remained intact despite some central veins and portal triads being immature. (e) Nodules were accompanied by focal necrosis (arrow head). HE staining.

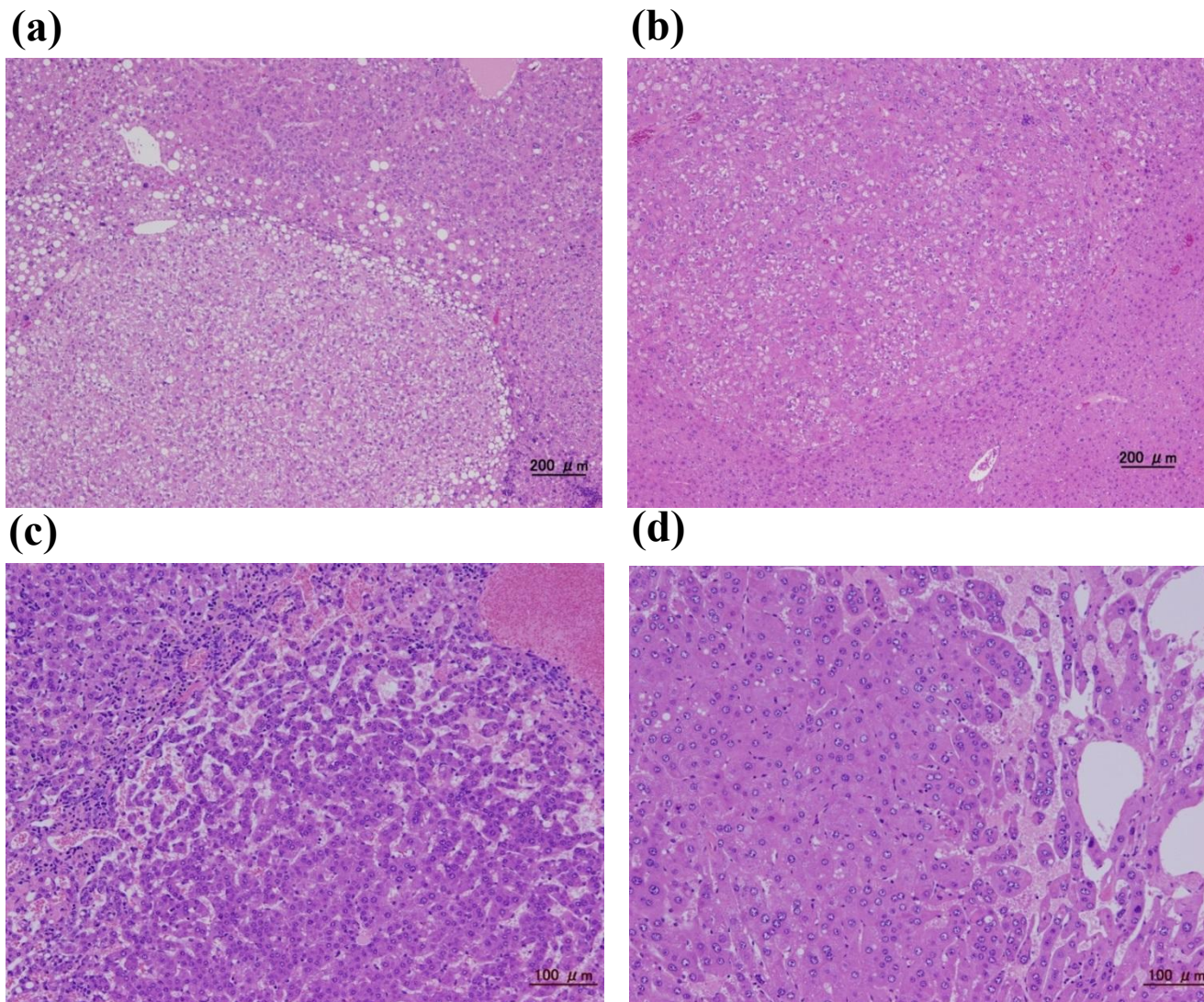


Figure 3-6.

(a), (b) Hepatocellular adenomas from *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given piperonyl butoxide (PBO) at a concentration of 6,000 ppm. Note the growth of monoclonal atypical hepatocytes without intact central veins and portal triads. (c),(d) Hepatocellular carcinomas from *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given PBO at a concentration of 6,000 ppm inside (c) regenerative hepatocyte hyperplasia (RHH) and outside (d) RHH. HE staining.

Table 3-3 Incidences of regenerative hepatocellular hyperplasias and hepatocellular tumors in *nrf2*<sup>+/+</sup> and *nrf2*<sup>-/-</sup> mice given PBO.

Findings	<i>nrf2</i> <sup>+/+</sup>			<i>nrf2</i> <sup>-/-</sup>		
	0 ppm N=25	3,000 ppm N=25	6,000 ppm N=29	0 ppm N=25	3,000 ppm N=25	6,000 ppm N=30
<b>In all area</b>						
HCA						
Incidence (%)	0	3 (12)	6 (21) *	0	3 (12)	15 (50) **, #
Multiplicity (no. of tumors/mouse)	0	0.12±0.33	0.34±0.72 *	0	0.12±0.33	0.90±1.37 **
HCC						
Incidence (%)	0	1 (4)	1 (3)	0	1 (4)	2 (7)
Multiplicity (no. of tumors/mouse)	0	0.04±0.20	0.03±0.19	0	0.04±0.20	0.10±0.40
No. of mice with RHH (%)	2 (8)	14 (56) **	18 (62) **	11 (44)	14 (56)	22 (73) *
<b>In RHH</b>						
HCA						
Incidence (%) <sup>a</sup>	0	2 (14)	2 (11)	0	1 (7)	9 (41) #
Multiplicity (no. of tumors/mouse with RHH)	0	0.14±0.36	0.11±0.32	0	0.07±0.27	0.55±0.80 #
HCC						
Incidence (%) <sup>a</sup>	0	1 (7)	1 (6)	0	1 (7)	1 (5)
Multiplicity (no. of tumors/mouse with RHH)	0	0.07±0.27	0.06±0.24	0	0.07±0.27	0.05±0.21

RHH, regenerative hepatocellular hyperplasia; HCA, hepatocellular adenoma; HCC, hepatocellular carcinoma. PBO, piperonyl butoxide.

a, no. of mice with tumors per no. of mice with RHH.

\* *p* < 0.05 vs. the relevant control.

\*\* *p* < 0.01 vs. the relevant control.

# *p* < 0.05 vs. *nrf2*<sup>+/+</sup>.

### 3.4 考察

PCP を投与した *nrf2*<sup>-/-</sup> マウスでは、胆管線維症が高頻度に認められ、特に *nrf2*<sup>-/-</sup> マウスに PCP を 600 ppm 投与した群では、*nrf2*<sup>+/+</sup> マウスの同濃度投与群と比較して、有意に高い頻度で観察された。胆管線維症は肝内胆管の障害に続いて生じると考えられている[8、25]。PCP を 600 ppm、1,200 ppm で *nrf2*<sup>-/-</sup> マウスに短期投与した実験では、ALP が高値を示すことが報告されている[112]。このことから、PCP による胆管障害の発生に酸化ストレスが関与していることが考えられた。また、今回の実験では、PCP を投与された *nrf2*<sup>-/-</sup> マウスにおいて胆管がんの発生頻度が有意に上昇した。胆管線維症の病変内に、発がんの原因となる遺伝子変異は未だ同定されていないが[61]、本病変は胆管がんの前がん病変と考えられており[63]、本研究においても胆管がんはいずれも胆管線維症を伴っていたこと、本研究の第 2 章の結果から PCP は標的臓器である肝臓に対して遺伝毒性を示さなかったことから、PCP による胆管線維症から胆管がんへの進展にも酸化ストレスが関与していることが考えられた。

今回、*nrf2*<sup>-/-</sup> マウスの PCP 1,200 ppm 投与群において、同遺伝子型の対照群と比較して肝細胞腺腫が有意に高い頻度で認められた。しかしながら、同濃度の PCP を投与された *nrf2*<sup>+/+</sup> マウスとの間に、有意差は認められなかったことから、本病変の形成における酸化ストレスの関与は現時点で不明である。

PBO を 8 週間投与した実験では、8-OHdG レベルが *nrf2*<sup>+/+</sup> マウスと

*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの 6,000 ppm 投与群で上昇し、さらに *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの 3,000 ppm 投与群においてもこの値は有意に上昇したことから、PBO の投与により生じる酸化ストレスの発生に Nrf2 が関与していることが示された。しかし、血清生化学検査の結果、肝障害のパラメーターに *nrf2* の遺伝子型による違いは認められなかった。また、PBO を長期投与した実験では、細胞傷害に対する変化として生じる再生性肝細胞過形成 [108] の発生頻度に、*nrf2*<sup>+/+</sup>ならびに *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスで差は認められなかった。このことから、PBO の投与により生じる肝毒性の発現に、酸化ストレスは関与しないと考えられた。しかしながら、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスは、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスよりも PBO の腫瘍形成において高い感受性を示した。特に、再生性肝細胞過形成内に肝細胞腺腫が生じた個体の発生頻度と 1 個体あたりの肝細胞腺腫の数が、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの PBO 6,000 ppm 投与群で、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスの同濃度投与群と比較して有意に高かった。これらの結果から、PBO 投与により生じる酸化ストレスは、発がん過程の初期段階である肝障害の発生には関与せず、後期の肝発がんへの進展に関与している可能性が考えられた。

近年、がん遺伝子が Nrf2 を介した経路を活性化することが報告されているが [14]、腫瘍内における Nrf2 の位置づけや役割はいまだ論議されているのが現状である [6、57、84、99]。今回の実験において、再生性肝細胞過形成内における Nrf2 の発現レベルは不明であるが、Nrf2 の欠損マウスにおいて再生性肝細胞過形成内の肝細胞腺腫の形成が増強されることが示された。

以上、*nrf2* 欠損マウスに非遺伝毒性発がん物質である PCP と PBO を投与し、腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点について検証した結果、酸化ストレスは肝臓の腫瘍形成過程に一様に作用するのではなく、非遺伝毒性発がん物質の種類により酸化ストレスの作用点が異なることを明らかにした。

ヒトでは *Nrf2* に遺伝子多型があることが報告されており[23、61]、酸化ストレスに対する感受性に個人差があることが考えられる。従って、本研究結果は様々な化学物質に暴露されている現代社会において、特に非遺伝毒性発がん物質による発がんを低減するための対策を立て、また、それらのリスク評価を行う上で大いに貢献しうるものと考えられた。

### 3.5 小括

Nrf2 は、酸化ストレスにより活性化される抗酸化酵素群の転写因子であり、生体内で生じる酸化を防御する重要な因子と考えられている。本章では、*nrf2* 欠損マウスに、肝臓の 8-OHdG レベルを上昇させることが明らかとなった PCP および PBO を投与し、腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点について検討した。

PCP の長期投与により胆管線維症が *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスおよび *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスに高頻度に認められ、600 ppm 投与群の *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスの同濃度群と比較して有意な頻度で観察された。一方、胆管がんの発生頻度は、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの 1,200 ppm 投与群で同遺伝子型マウスの対照群と比較して有意に高かった。

本研究において、PCP の短期投与で 8-OHdG レベルが上昇することが報告されていること、PCP の低濃度を投与した *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスで胆管線維症が観察されたことから、PCP の胆管障害の発生機序に酸化ストレスが関与していることが考えられた。さらに、PCP の 1,200 ppm 投与群で、胆管がんを生じた個体の発生頻度は、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスで *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスに比べ有意に高かったことから、前がん病変である胆管線維症から胆管がんへの進展にも酸化ストレスが関与しているものと考えられた。

PBO を 8 週間投与したマウスでは、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスおよび *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスのいずれにおいても血清中の肝障害マーカーに顕著な変化は認められなかった。8-OHdG レベルは、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスおよび *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの 6,000



ppm 群で有意に増加し、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは 3,000 ppm の投与でも有意な増加を示した。PBO の 52 週間投与後の肝臓に、慢性的な肝障害に続いて形成されといわれる再生性肝細胞過形成が *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスおよび *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスに認められたが、その発生頻度に差は見られなかった。このことから、PBO の肝障害に至るまでの初期過程に酸化ストレスは関与していないと考えられた。一方、PBO の長期投与では、PBO を 6,000 ppm で投与した *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスにおいて肝細胞腺腫が高頻度に認められ、特に再生性肝細胞過形成内に肝細胞腺腫を生じた個体の発生頻度ならびに 1 個体あたりの肝細胞腺腫の数は、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスの同濃度投与群と比べて約 5 倍と高く、統計学的に有意な変化であった。このことから、PBO の投与により発生する酸化ストレスは、前がん病変から腫瘍形成に至る過程に作用していると考えられた。

以上、*nrf2* が欠損したマウスに非遺伝毒性発がん物質である PCP と PBO を投与し、腫瘍発生過程における酸化ストレスの作用点について検証した結果、酸化ストレスは腫瘍形成過程に一様に作用するのではなく、物質により酸化ストレスの作用点が異なることを明らかにした。

## 総括

現在、日本における死因の第1位はがんで、我々の周囲に存在する膨大な数の化学物質の約80%が発がんとの関連性が疑われている。従って、種々の化学物質の発がんリスクを適切に評価し、管理することが、我々が健全な生活を営む上で重要であるといえる。

現在、げっ歯類で発がん性が確認された化学物質のうち、遺伝毒性試験で陰性を示した物質は、非遺伝毒性発がん物質に分類されている。非遺伝毒性発がん物質は、解毒・代謝過程等で生じる酸化還元反応、活性酸素消去系酵素の枯渇等により生体に酸化ストレスを発生させ、細胞に増殖刺激を与えることが知られている。また、酸化ストレスは、DNAにも傷害を与え、遺伝子突然変異を生じることから、非遺伝毒性発がん物質の酸化ストレスによる遺伝子傷害が、発がんに関与している可能性も示唆されている。

本研究では、非遺伝毒性発がん物質の生体に与える酸化ストレスが、発がんを惹起するメカニズムを解明することを目的に、酸化ストレス発生系が異なる3種の非遺伝毒性発がん物質であるPBO、PhB、PCPを遺伝子改変動物にそれぞれ投与し、標的臓器である肝臓における酸化的DNA損傷、遺伝子変異 (*in vivo* 変異原性) の発生ならびに発がん過程における酸化ストレスの作用点について解析した。

## 第1章 チトクロム P450 誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の *gpt delta*

### ラットを用いた酸化的 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性に関する検討

薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) のうち、CYP 1A と 2B は、薬物を代謝する過程で効率的に活性酸素を発生することから、これらの酵素誘導能をもつ非遺伝毒性発がん物質は、酸化ストレスを発生させ、DNA に損傷を与えて発がんを誘発することが示唆されている。第 1 章では、レポーター遺伝子を導入した *gpt delta* ラットを用い、CYP 誘導能を有する PBO あるいは PhB が肝臓に酸化的 DNA 損傷をもたらすか、また *in vivo* において変異原性を有するかについて検討した。

6 週齢雄の F344 系 *gpt delta* ラット (1 群 5 匹) に、発がん用量である 20,000 ppm の PBO あるいは 500 ppm の PhB をそれぞれ 4 週間ないし 13 週間混餌投与した。投与期間終了後、ラットの肝臓中の、*CYP 1A1*、*1A2*、*2B1* の mRNA 発現レベルを RT-PCR 法により測定するとともに、酸化的 DNA 損傷マーカーである 8-OHdG を HPLC-ECD 法により測定した。また、点突然変異を検出する *gpt* ならびに欠失変異を検出する *red/gam* 遺伝子の変異体頻度、免疫染色により細胞増殖活性マーカーである PCNA の陽性肝細胞率を、さらに肝前がん病変のマーカーである GST-P の陽性細胞巢の定量解析を行った。

解析の結果、PBO 投与群で *CYP 1A1*、*1A2*、*2B1* の、PhB 投与群で *CYP 2B1* の mRNA 発現レベルの上昇が確認された。一方、8-OHdG レベルの有意な上昇は、PBO 投与群のみに認められた。PBO、PhB 投与群のいずれにおいても *gpt* ならびに *red/gam* の変異体頻度に有意な変化は認められなかった。

PCNA 陽性肝細胞率は、PBO の 4 週間投与群で有意に増加したが、GST-P 陽性細胞巢の定量解析では、何れの投与群においても変化は見られなかった。

PBO 投与群では、*CYP 1A1*、*1A2* の mRNA 発現レベルを顕著に上昇させるとともに、8-OHdG レベルの増加をもたらしたことから、CYP1A ファミリーが発生する酸化ストレスは、酸化 DNA 損傷を引き起こすことが示唆された。しかしながら、PBO ならびに PhB 投与群で、*in vivo* 変異原性ならびに肝前がん病変の増加は認められなかったことから、CYP 代謝で生じる酸化ストレスが、発がん過程において遺伝毒性的に作用する可能性は低いと考えられた。

## 第 2 章 キノン体生成能あるいはチトクロム誘導能を有する非遺伝毒性発がん物質の *p53* 欠損 *gpt delta* マウスを用いた酸化 DNA 損傷と *in vivo* 変異原性に関する検討

*p53* は DNA 修復やアポトーシスに関わるがん抑制遺伝子として知られており、近年では、その発現蛋白質が抗酸化酵素群の転写因子として働くことも報告されている。従って *p53* 欠損マウスは、酸化ストレス発生系を有する発がん物質に対して高感受性を示すことが予想される。そこで第 2 章では、*p53* 欠損 *gpt delta* マウスを用い、代謝後にキノン体となって酸化ストレスを発生する PCP ならびに CYP 誘導能を有する PBO と PhB が、標的臓器である肝臓において酸化 DNA 損傷ならびに *in vivo* 変異原性を有する可能性について検討した。

7週齢雄 C57BL/6 系 *gpt delta* の  $p53^{-/-}$  および  $p53^{+/+}$  のマウス（1群5匹）に、発がん用量である PCP の 600 ppm、PBO の 6,000 ppm、PhB の 500 ppm をそれぞれ 13 週間混餌投与した。投与期間終了後、第 1 章と同様の方法でマウス肝臓中の *CYP1A1*、*1A2*、*2B10* の mRNA 発現レベルならびにキノン還元酵素である *NQO1* をコードする遺伝子の mRNA 発現レベル、8-OHdG レベルを測定するとともに、*gpt* ならびに *red/gam* の変異体頻度を解析した。

PCP を投与した  $p53^{+/+}$  マウスでは、*NQO1* の mRNA 発現レベルの有意な上昇、ならびに 8-OHdG レベルの有意な増加が認められたが、*gpt* ならびに *red/gam* の変異体頻度の上昇は認められなかった。一方、 $p53^{-/-}$  マウスでは、これらの結果に  $p53^{+/+}$  マウスとの差は認められなかった。

PBO ならびに PhB を投与された  $p53^{+/+}$  マウスでは、*CYP 2B10* の mRNA 発現レベルが上昇し、PBO 投与群では、*CYP1A1*、*1A2* に加え *NQO1* の mRNA 発現レベルの上昇も観察された。8-OHdG レベルは、PBO 投与群のみで有意に増加した。一方、 $p53^{-/-}$  マウスでは、いずれの投与群においても  $p53^{+/+}$  マウスと同様に各 mRNA の発現レベルが上昇したが、8-OHdG レベルに有意な変化は認められなかった。*gpt* ならびに *red/gam* の変異体頻度は、 $p53^{+/+}$  マウス、 $p53^{-/-}$  マウスのいずれにおいても変化は認められなかった。

以上から、PCP および PBO は  $p53^{+/+}$  マウスの肝臓に酸化的 DNA 損傷を誘発することが明らかとなった。また、PBO は、*NQO1* の mRNA 発現レベルの有意な上昇を起こしたことから、肝臓における PBO の酸化ストレス発生系には、CYP 誘導とキノン体の形成が関与している可能性を示すことができた。しかしながら、いずれの投与群においても、肝臓における導入遺

伝子の変異体頻度が上昇しなかったことから、キノン体の酸化還元サイクルや CYP 誘導により生じる酸化ストレスは、酸化的 DNA 損傷を生じさせるものの、遺伝子変異を誘発しない、すなわち腫瘍形成過程において遺伝毒性作用を示す可能性は低いことが考えられた。

### 第3章 *nrf2* 遺伝子欠損マウスを用いたペンタクロロフェノールならびにピペロニルブトキシドの腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点に関する解析

Nrf2 は、酸化ストレスにより活性化される抗酸化酵素群の転写因子であり、生体内で生じる酸化を防御する重要な因子と考えられている。第3章では、8-OHdG レベルの上昇をもたらすことが明らかとなった PCP および PBO について *nrf2* 欠損マウスを用いて、腫瘍発生過程における酸化ストレスの作用点について検討した。

7 週齢、雄の ICR 系の *nrf2*<sup>-/-</sup> および *nrf2*<sup>+/+</sup> のマウス（1 群 15~20 匹）に、PCP の 600 ppm あるいは 1,200 ppm を 60 週間混餌投与し、肝臓の病理組織学的解析を行った。さらに同系のマウスに、PBO の 3,000 ppm あるいは 6,000 ppm を混餌投与し、8 週間投与群（1 群 5 匹）については、血清中の肝障害マーカー（ALT、AST、ALP）と 8-OHdG 量の測定を、52 週間投与個体（1 群 25~30 匹）については肝臓の病理組織学的解析を行った。

PCP 投与群では、胆管線維症が *nrf2*<sup>+/+</sup> および *nrf2*<sup>-/-</sup> マウスに高頻度に認められ、*nrf2*<sup>-/-</sup> マウスの 600 ppm 投与群では有意な頻度で観察された。一方、胆管がんの発生頻度は、*nrf2*<sup>-/-</sup> マウスの 1,200 ppm 投与群で有意に増加した。

本研究において、PCP の低濃度を投与した *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスで胆管線維症が観察されたこと、また、PCP の短期投与で 8-OHdG レベルが上昇することが報告されていることから、PCP の胆管障害の発生機序に酸化ストレスが関与していることが考えられた。さらに、高濃度の PCP を投与した *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは、胆管がんを生じた個体の発生頻度が *nrf2*<sup>+/+</sup>マウスに比べ有意に高かったことから、前がん病変である胆管線維症から胆管がんへの進展にも酸化ストレスが関与しているものと考えられた。

PBO を投与したマウスでは、8 週間投与群の血清中の肝障害マーカーに顕著な変化は認められなかった。8-OHdG 量は、*nrf2*<sup>+/+</sup>および *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスの 6,000 ppm 群で有意に増加し、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスでは 3,000 ppm の投与でも有意な増加を示した。PBO 52 週間投与群の肝臓では、再生性肝細胞過形成が *nrf2*<sup>+/+</sup>および *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスに認められたが、その発生頻度に有意な差は見られなかった。一方、肝細胞腺腫は、6,000 ppm を投与した *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスで高頻度に認められ、特に再生性肝細胞過形成内に肝細胞がんを生じた個体の発生頻度は、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスと比べて有意に高かった。

PBO を投与したマウスでは、血清中の肝障害マーカーの変動と慢性的な肝障害に続いて形成される再生性肝細胞過形成の発生頻度に、*nrf2*<sup>+/+</sup>マウスと *nrf2*<sup>-/-</sup>マウスで差異は認められなかったことから、PBO の肝障害に至るまでの初期過程に酸化ストレスは関与していないと考えられた。一方、PBO の長期投与で、再生性肝細胞過形成内に肝細胞腺腫を生じた個体の発生頻度が、*nrf2*<sup>-/-</sup>マウスで有意に高かったことから、PBO の投与により発生する酸化ストレスは、前がん病変から腫瘍形成に至る過程に作用してい

ると考えられた。

本研究では、非遺伝毒性発がん物質の CYP 誘導により生体内で生じた酸化ストレスや、キノン体の酸化還元反応サイクルにより生じた酸化ストレスは、酸化的 DNA 損傷を与えるものの、遺伝子変異を引き起こす可能性は低いことを明らかにした。また、腫瘍形成過程における酸化ストレスの作用点は、非遺伝毒性発がん物質の種類により異なることを証明した。生体における酸化ストレスの発生系に着目し、3 種の非遺伝毒性発がん物質の発がん機序について、酸化的 DNA 損傷と発がんの関連性を遺伝子改変動物を用いて明らかにした本研究成果は、環境中に広く存在する非遺伝毒性発がん物質のリスクを評価し、その管理をする上で重要な資料になりうるものと思われる。



## 謝辞

本研究を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、日本大学生物資源科学部獣医学科 丸山総一教授に深甚なる謝意を表します。

また、本稿の作成に際して、懇篤なご指導、御助言を賜りました同研究科獣医病理学研究室 佐藤常男教授、実験動物学研究室 湯川眞嘉教授、獣医公衆衛生学研究室 壁谷英則准教授に心より感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださり、格別なご配慮と有益な御助言を賜りました国立医薬品食品衛生研究所安全試験研究センター センター長 西川秋佳博士に深謝の意を表します。また、本研究の遂行に終始ご指導いただきました国立医薬品食品衛生研究所病理部第一室室長 梅村隆志博士ならびに同室員の先生方に篤く御礼申し上げます。

最後に、これまで私を温かく見守ってくれた家族に心より感謝します。

## 引用文献

1. Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. Free radicals in toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120:168-178, 1993.
2. Baird L, Dinkova-Kostova. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.* 85:241–272, 2011.
3. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249:912-915, 1990.
4. Bristol DW. NTP 3-month toxicity studies of estragole administered by gavage to F344/N rats and B6C3F<sub>1</sub> mice. *Toxic. Rep. Ser.* 82:1–111, 2011.
5. Brown KL, Basu AK, Stone MP. The cis-(5R, 6S)-thymine glycol lesion occupies the wobble position when mismatched with deoxyguanosine in DNA. *Biochemistry* 48:9722-9733, 2009.
6. Buitrago-Molina LE, Marhenke S, Longerich T, Sharma AD, Boukouris AE, Geffers R, Guiga B, Manns MP, Vogel A. The degree of liver injury determines the role of p21 in liver regeneration and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* in press.
7. Bulter WH. Long-term effects of phenobarbitone-Na on male Fischer rats. *Br. J. Cancer* 37: 418-423, 1978.
8. Bustos M, Sangro B, Alzuguren P, Gil AG, Ruiz J, Beraza N, Qian C, Gracia-Pardo A, Prieto J. Liver damage using suicide genes. A model for oval cell activation. *Am. J. Pathol.* 157:549–559, 2000.
9. Byard J, Needham D. Metabolism and excretion of piperonyl butoxide in the rat. *Xenobiotica* 36:1259-1272, 2006.
10. Cano CE, Gommeaux J, Pietri S, Culcasi M, Garcia S, Seux M, Barelier S, Vasseur S, Spoto RP, Pébusque MJ, Dusetti NJ, Iovanna JL, Carrier A. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Res.* 69:219-226, 2009.

11. Crosby DJ, Beynon KL, Greve PA, Korte F, Stili GG, Vouk JW. Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl. Chem.* 53:1051-1081, 1981.
12. Deferme L, Briede JJ, Claessen SM, Jennen DG, Cavill R, Kleinjans JC. Time series analysis of oxidative stress response patterns in HepG2: a toxicogenomics approach. *Toxicology* 306C:24–34, 2013.
13. Deguchi Y, Yamada T, Hirose Y, Nagahori H, Kushida M, Sumida K, Sukata T, Tomigahara Y, Nishioka S, Uwagawa S, Kawamura S, Okuno Y. Mode of action analysis for the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced rat liver tumors: Evidence for hepatic CYP2B induction and hepatocyte proliferation. *Toxicol. Sci.* 108:69-80, 2009.
14. DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM, Hruban RH, Lacobuzio-Donahue C, Kern SE, Blair IA, Tuveson DA. Oncogenic-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475:106–109, 2011.
15. Dewa Y, Nishimura J, Muguruma M, Jin M, Saegusa Y, Okamura T, Tasaki M, Umemura T, Mitsumori K.  $\beta$ -Naphthoflavone enhances oxidative stress responses and the induction of preneoplastic lesions in a diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized rats. *Toxicology* 244:179-189, 2008.
16. Dewa Y, Nishimura J, Muguruma M, Jin M, Kawai M, Saegusa Y, Okamura T, Umemura T, Mitsumori, K. Involvement of oxidative stress in hepatocellular tumor-promoting activity of oxfendazole in rats. *Arch. Toxicol.* 83:503-511, 2009.
17. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 275:331-342, 1992.
18. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 66(6):1191-308, 1981.
19. Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol. Sci.*

59:169–177, 2001.

20. Fujikawa K, Kamiya H, Kasai H. The mutations induced by oxidatively damaged nucleotides, 5-formyl-dUTP and 5-hydroxy-dCTP, in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 26: 4582–4587, 1998.
21. Gushima M, Hirahashi M, Matsumoto T, Fujita K, Fujisawa R, Mizumoto K, Nakabeppu Y, Iida M, Yao T, Tsuneyoshi M. Altered expression of MUTYH and an increase in 8-hydroxydeoxyguanosine are early events in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *J. Pathol.* 219:77-86, 2009.
22. Harrington-Brock K, Collard DD, Chen T. Bromate induces loss of heterozygosity in the *Thymidine kinase* gene of L5178Y/Tk<sup>+/−</sup>-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* 537: 21-28, 2003.
23. Hartikainen JM, Tengstrom M, Kosma VM, Kinnula VL, Mannermaa A, Soini Y. Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer. *Cancer Res.* 72:5537–5546, 2012.
24. Hata M, Iida H, Yamanegi K, Yamada N, Ohyama H, Hirano H, Nakasho K, Terada N. Phenotypic characteristics and proliferative activity of hyperplastic ductile cells in cholangiofibrosis induced by thioacetamide in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65:351–356, 2013.
25. Hickling KC, Hitchcock JM, Chipman JK, Hammond TG, Evans JG. Induction of progression of cholangiofibrosis in rat liver injured by oral administration of furan. *Toxicol. Pathol.* 38:213–229, 2010a.
26. Hickling KC, Hitchcock JM, Oreffo V, Mally A, Hammond TG, Evans JG, Chipman JK. Evidence of oxidative stress and associated DNA damage, increased proliferative drive, and altered gene expression in rat liver produced by the cholangiocarcinogenic agent furan. *Toxicol. Pathol.* 38:230–243, 2010b.
27. Hibi D, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Watanabe M, Sugita-Konishi Y, Yanai T, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. Site-specific *in vivo* mutagenicity in the kidney of *gpt* delta rats given a carcinogenic dose of ochratoxin A. *Tox. Sci.* 122:406-414, 2011.
28. Hoflack JC, Mueller L, Fowler S, Braendli-Baiocco A, Flint N, Kuhlmann O, Singer T, Roth A.

Monitoring Cyp2b10 mRNA expression at cessation of 2-year carcinogenesis bioassay in mouse liver provides evidence for a carcinogenic mechanism devoid of human relevance: the dalcetrapib experience. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259:355-365, 2012.

29. Honma M. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 45:162-176, 2005.

30. Hori M, Satou K, Harashima H, Kamiya H. Suppression of mutagenesis by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate) by human MTH1, MTH2, and NUDT5. *Free Rad. Biol. Med.* 48:1197-1201, 2010.

31. Hu X, Roberts JR, Apopa PL, Kan YW, Ma Q. Accelerated ovarian failure induced by 4-vinyl cyclohexane diepoxide in nrf2 null mice. *Mol. Cell Biol.* 26:940-954, 2006.

32. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, Ichimiya M, Sengupta L, Okamura S, Hofseth LJ, Moake M, Nagashima M, Forrester KS, Harris CC. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 64:2350-2356, 2004.

33. Imaoka S, Osada M, Minamiyama Y, Yukimura T, Toyokuni S, Takemura S, Hiroi T, Funae Y. Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. *Cancer Lett.* 203:117-125, 2004.

34. Ishii Y, Okamura T, Inoue T, Tasaki M, Umemura T, Nishikawa A. Dietary catechol causes increased oxidative DNA damage in the livers of mice treated with acetaminophen. *Toxicology* 263:93-99, 2009.

35. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyae T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzymes genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:313-322, 1997.

36. Jansson K, Jansson V. Induction of mutation in V79 hamsters cells by tetrachlorohydroquinone, a metabolite of pentachlorophenol. *Mutat. Res.* 260:313-322, 1991.

37. Jansson K, Jansson V. Induction of micronuclei in V79 hamsters cells by tetrachlorohydroquinone, a metabolite of pentachlorophenol. *Mutat. Res.* 279:205–208, 1992.
38. Jin M, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T. Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with *gpt* delta rats. *Toxicology* 290:312–321, 2011.
39. Kamakura N, Yamamoto J, Brooks PJ, Iwai S, Kuraoka I. Effects of 5',8-cyclodeoxyadenosine triphosphates on DNA synthesis. *Chem. Res. Toxicol.* 25:2718–2724, 2012.
40. Kamiya H, Satou K, Hori M, Yamaguchi A, Harashima H. Roles of specialized DNA polymerases in mutagenesis by oxidized guanine. *Nucleic. Acids Symp. Ser. (Oxf.)* 53: 223-224, 2009.
41. Kansanen E, Jyrkkanen HK, Levonen AL. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radic. Biol. Med.* 52:973–982, 2012.
42. Kawai M, Saegusa Y, Jin M, Dewa Y, Nishimura J, Harada T, Shibutani M, Mitsumori K. Mechanistic study of hepatocarcinogenesis of piperonyl butoxide in mice. *Toxicol. Pathol.* 37:761–769, 2009.
43. Kawai M, Saegusa Y, Dewa Y, Nishimura J, Kemmochi S, Harada T, Umemura T, Shibutani M, Mitsumori K. Elevation of cell proliferation via generation of reactive oxygen species by piperonyl butoxide contributes to its liver tumor-promoting effects in mice. *Arch. Toxicol.* 84:155-164, 2010.
44. Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, Umemura T, Imazawa T, Kitamura Y, Nohmi T, Hirose M. *In vivo* mutational analysis of liver DNA in *gpt* delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens *N*-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol. Carcinog.* 42:9-17, 2005.
45. Kasai H, Nishimura S. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In: H. Sies Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants, London: Academic Press, 99-116, 1991.
46. Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis.

*Free Rad. Biol. Med.* 33:450-456, 2002.

47. Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Müller L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res.* 4;584(1-2):1-256. 2005.

48. Kinoshita A, Wanibuchi H, Imaoka S, Ogawa M, Masuda C, Morimura K, Funae Y, Fukushima S. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1), cyclin D1 and ogg1. *Carcinogenesis* 23:341-349, 2002.

49. Kinoshita A, Wanibuchi H, Morimura Y, Wei M, Shen J, Imaoka S, Funae M, Fukushima S. Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression. *Carcinogenesis* 24:1389-1399, 2003.

50. Kitamura Y, Umemura T, Kanki K, Kodama Y, Kitamoto S, Saito K, Itoh K, Yamamoto M, Masegi T, Nishikawa A, Hirose M. Increased susceptibility to hepatocarcinogenicity of *Nrf2*-deficient mice exposed to 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolone. *Cancer Sci.* 98:19-24, 2007.

51. Klaunig JE, Kameddulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:239-267, 2004.

52. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254:86-99, 2011.

53. Koturbash I, Melnyk S, James SJ, Beland FA, Pogribny IP. Role of epigenetic and miR-22 and miR-29b alterations in the downregulation of *Mat1a* and *Mthfr* genes in early preneoplastic livers in rats induced by 2-acetylaminofluorene. *Mol. Carcinog.* 52:318-327, 2013.

54 厚生労働省「平成 24 年人口動態統計月報年計（概数）の概況」

55. Lee JC, Son YO, Pratheeshkumar P, Shi X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* 53:742-757, 2012.

56. Levin AJ. P53, the cell gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331, 1997.

57. Li H, Wood J, Whitten K, Vadival S, Seng S, Makriyannis A, Avraham S, Avraham H. Inhibition of fatty acid amide hydrolase activates NRF2 signaling and induces heme oxygenase 1 transcription in breast cancer cells. *Br. J. Pharmacol.* in press.
58. Liber HL, Yandell DW, Little JB. A comparison of mutation induction at the *tk* and *hprt* loci in human lymphoblastoid cells, quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal *tk* locus. *Mutat. Res.* 216:9-17, 1989.
59. Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayahsi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat. Res.* 619:113-123, 2007.
60. Maher J, Yamamoto M. The rise of antioxidant signaling; the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244:4-15, 2010.
61. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, Shyr C, Wakabayashi N, Kensler TW, Wasserman WW, Biswal S. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChiP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res.* 38:5718–5734, 2010.
62. Marczak ED, Marzec J, Zeldin DC, Kleeberger SR, Brown NJ, Pretorius M, Lee CR. Polymorphisms in the transcriptional factor NRF2 and forearm vasodilator responses in humans. *Pharmacogenet. Genomics* 22:620–628, 2012.
63. Maronpot RR, Giles HD, Dykes DJ, Irwin RD. Furan-induced hepatic cholangiocarcinomas in Fischer 344 rats. *Toxicol. Pathol.* 19:561–570, 1991.
64. Masumura K, Horiguchi M, Nishikawa A, Umemura T, Kanki K, Kanke Y, Nohmi T. Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQx) in *gpt* delta transgenic mice. *Mutat. Res.* 541:91-102, 2003.
65. Masumura K, Sakamoto Y, Ikeda M, Asami Y, Tsukamoto T, Ikehata H, Kuroiwa Y, Umemura T, Nishikawa A, Tatematsu M, Ono T, Nohmi T. Antigenotoxic effects of p53 on spontaneous and



ultraviolet light B-induced deletions in the epidermis of *gpt* delta transgenic mice. *Environ.Mol. Mutagen* 52:244-252, 2011.

66. McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72(12):5135-9, 1975.

67. McConnell EE, Huff JE, Hejtmancik M, Peters AC, Persing R. Toxicology and carcinogenesis studies of two grades of pentachlorophenol in B6C3F<sub>1</sub> mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 17:519-532, 1991.

68. Meiller A, Alvarez S, Drané P, Lallemand C, Blanchard B, Tovey M, May E. P53-dependent stimulation of redox-related genes in the lymphoid organs of  $\gamma$ -irradiated mice – identification of *Haeme-oxygenase 1* as a direct p53 target gene. *Nucl. Acids Res.* 35:6924-6934, 2007.

69. Minamiyama Y, Takemura S, Toyokuni S, Imaoka S, Funae Y, Hirohashi K, Yoshikawa T, Okada S. CYP 3A induction aggravates endotoxemic liver injury via reactive oxygen species in male rats. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 703-712, 2004.

70. Muguruma M, Nishimura J, Jin M, Kashida Y, Moto M, Takahashi M, Yokouchi Y, Mitsumori K. Molecular pathological analysis for determining the possible mechanism of piperonyl butoxide-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Toxicology* 228:178-187, 2006.

71. Muguruma M, Unami A, Kanki M, Kuroiwa Y, Nishimura J, Dewa Y, Umemura T, Oishi Y, Mitsumori, K. Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats. *Toxicology* 236:61-75, 2007.

72. Muguruma M, Kawai M, Dewa Y, Nishimura J, Saegusa Y, Yasuno H, Jin M, Matsumoto S, Takabatake M, Arai K, Mitsumori K. Threshold dose of piperonyl butoxide that induces reactive oxygen species-mediated hepatocarcinogenesis in rats. *Arch. Toxicol.* 83:183-193, 2009.

73. Nagata M., Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y., Ohnishi M., Ohyama T., Shingaki S., Kaji M., Saku T., Takagi R. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int. J. Cancer* 106:683-689, 2003

74. Naito S, Ono Y, Somiya Y, Inoue S, Ito K, Yamamoto K, Kawanishi S. Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites. *Mutat. Res.* 310:79-88, 1994.

75. Nakae D, Mizumoto Y, Kobayashi E, Noguchi O, Konishi Y. Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue. *Cancer Lett.* 87:233-239, 1995.
76. Nichols KD, Kirby GM. Expression of cytochrome P450 2A5 in a glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mouse model of oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 75:1230-1239, 2008.
77. 日本環境化学会 第26回日本環境化学会講演会予稿集資料, 1998.
78. Nilov DI, Komarov DY, Panov MS, Karabaeva KE, Mereshchenko AS, Tarnovsky AN, Wilson RM. Oxidation of adenosine and inosine: the chemistry of 8-oxo-7,8-dihydropurines, purine iminoquinones, and purine quinones as observed by ultrafast spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 135:3423-438, 2013.
79. Nohmi T, Suzuki K, Masumura M. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutat. Res.* 455:191-215, 2000.
80. Okamiya H, Mitsumori K, Onodera H, Ito S, Imazawa T, Yasuhara K, Takahashi M. Mechanistic study on liver tumor promoting effects of piperonyl butoxide in rats. *Arch. Toxicol.* 72:744-750, 1998.
81. Ohmori S, Misaizu T, Nakamura T, Takano N, Kitagawa H, Kitada M. Differential role in lipid peroxidation between rat P450 1A1 and P450 1A2. *Biochem. Pharmacol.* 46:55-60, 1993.
82. Ommen BV, Adang A, Müller F, van Bladeren PJ. The microsomal metabolism of pentachlorophenol and its covalent binding to protein and DNA. *Chem. Biol. Interact.* 60:1-11, 1986.
83. Oshima H, Matsunaga A, Fujimura T, Tsukamoto T, Taketo MM, Oshima M. Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E2 pathway. *Gastroenterology* 131:1086-1095, 2006.
84. Ooi A, Dykema K, Ansari A, Petillo D, Snider J, Kahnoski R, Anema J, Craig D, Carpten J, Teh BT, Furge KA. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 73:2044-2051, 2013.

85. Phillips JC, Price RJ, Cunninghame ME, Osimitz TG, Cockburn A, Gabriel KL, Preiss FJ, Butler WH, Lake BG. Effects of piperonyl butoxide on cell replication and xenobiotic metabolism in the livers of CD-1 mice and F344 rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38:64-74, 1997.
86. Phillips JM, Yamamoto Y, Negishi M, Maronpot RR, Goodman JI. Orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor-mediated alterations in DNA methylating during phenobarbital promotion of liver tumorigenesis. *Toxicol. Sci.* 96:72-82, 2007.
87. Popowich DA, Vavra AK, Walsh CP, Bhikapurwala HA, Rossi NB, Jiang Q, Aalami OO, Kibbe MR. Regulation of reactive oxygen species by p53: implications for nitric oxide-mediated apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298:H2192-H2200, 2010.
88. Puntarulo S, Cederbaum A. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Rad. Biol. Med.* 24:1324-1330, 1998.
89. Ramos-Gomez M, Kwak M-K, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemopreventive efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:3410-3415, 2001.
90. Ramos-Gomez M, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Interactive effects of *nrf2* genotype and oltipraz on benzo[*a*]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. *Carcinogenesis* 24:461-467, 2003.
91. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): Chemoprotection, bioactivation, gene regulation and gene polymorphisms. *Chem. Biol. Interact.* 129:77-97, 2000.
92. Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Med.* 12:1306-1313, 2005.
93. Salem MM, Shalhaf M, Gibbons NC, Chavan B, Thornton JM, Schallreuter KU. Enhanced DNA binding capacity on up-regulated epidermal wild-type p53 in vitiligo by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidation: a possible repair mechanism for DNA damage. *FASEB J.* 23:3790-3807, 2009.

94. Sapone A, Gustavino B, Monfrinotti M, Canistr D, Broccoli M, Pozzetti L, Affatato A, Valgimigli L, Abdel-Rahman SZ, Paolini M. Perturbation of cytochrome P450, generation of oxidative stress and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed *in situ* to potable surface water. *Mutat. Res.* 626:143-154, 2007.
95. Satou K, Kasai H, Masutani C, Hanaoka F, Harashima H, Kamiya H. 2-Hydroxy-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate enhances AT-GC mutations caused by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate by suppressing its degradation upon replication in a HeLa extract. *Biochemistry* 46:6639-6646, 2007.
96. Seiler JP. Pentachlorophenol. *Mutat. Res.* 257:27-47, 1991.
97. Shelton P, Jaiswal AK. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J.* 27:414-423, 2013.
98. Shimamoto K, Dewa Y, Ishii Y, Kemmochi S, Taniai E, Hayashi H, Imaoka M, Morita R, Kuwata K, Suzuki K, Shibutani M, Mitsumori K. Indole-3-carbinol enhances oxidative stress responses resulting in the induction of preneoplastic liver cell lesions in partially hepatectomized rats initiated with diethylnitrosamine. *Toxicology* 283:109-117, 2011.
99. Singh B, Ronghe AM, Chatterjee A, Bhat NK, Bhat HK. MicroRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2013, in press.
100. Slocum SL, Kensler TW. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch. Toxicol.* 85:273-284, 2011.
101. Speit G, Haupter S, Schutz P, Kreis C. Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* 439:213-221, 1999.
102. Takahashi O, Oishi S, Fujutani T, Tanaka T, Yoneyama M. Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in CD-1 mice: Induction of hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 124:95-103, 1997.
103. Takahashi O, Ohishi S, Fujitani T, Tanaka T, Yoneyama M. Chronic toxicity studies of piperonyl

butoxide in F344 rats: induction of hepatocellular carcinoma. *Fundam. Appl. Toxicol.* 22:293-303, 1994.

104. Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, Sun Y. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J. Biol. Chem.* 274:12061-12066, 1999.

105. Tasaki M, Umemura T, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Okamura T, Ishii Y, Maruyama S, Nohmi T, Nishikawa A. Oxidative DNA damage and reporter gene mutation in the livers of *gpt* delta rats given non-genotoxic hepatocarcinogens with cytochrome P450-inducible potency. *Cancer Sci.* 101:2525-2530, 2010.

106. Tasaki M, Kuroiwa Y, Inoue T, Hibi D, Matsushita K, Ishii Y, Maruyama S, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. Oxidative DNA damage and *in vivo* mutagenicity caused by reactive oxygen species generated in the livers of *p53*-proficient or deficient *gpt* delta mice treated with non-genotoxic hepatocarcinogens. *J. App. Toxicol.* in press.

107. Tasaki M, Kuroiwa Y, Inoue T, Hibi D, Matsushita K, Kijima A, Maruyama S, Nishikawa A, Umemura T. Lack of *nr2* progresses proliferative lesions to neoplasms induced by long-term exposure to non-genotoxic hepatocarcinogens involving oxidative stress. *Exp. Toxicol. Pathol.* in press.

108. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, Malarkey DE, Kaufmann W, Kuttler K, Deschi U, Nakae D, Gerson R, Vinlove M, Brix AE, Singh B, Belpoggi F, Ward JM. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol. Pathol.* 38:55-81, 2010.

109. Toyokuni S. Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 8:1373-1377, 2006.

110. Tsai CH, Lin PH, Waidyanatha S, Rappaport SM. Characterization of metabolic activation of pentachlorophenol to quinones and semiquinones in rodent liver. *Chem. Biol. Interact.* 134:55-71, 2001.

111. Tsukada T, Tomooka Y, Takai S, Ueda Y, Nishikawa SI, Yagi T, Tokunaga T, Takeda N, Suda Y, Abe S, Matsuo I, Ikawa Y, Aizawa SI. Enhanced proliferative potential in culture of cells from *p53*-deficient mice. *Oncogene* 8:3313-3322, 1993.

112. Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. Oxidative DNA damage and cell

proliferation in livers of B6C3F<sub>1</sub> mice exposed to pentachlorophenol in their diet. *Fundam. Appl. Toxicol.* 30:285–289, 1996.

113. Umemura T, Kai S, Hasegawa R, Kanki K, Kitamura Y, Nishikawa A, Hirose M. Prevention of dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on diethylnitrosamine-induced hepato- and cholangiocarcinogenesis in mice by green tea infusion. *Carcinogenesis* 24:1105-1109, 2003a.

114. Umemura T, Kodama Y, Kanki K, Iatropoulos MJ, Nishikawa A, Hirose M, Williams GM. Pentachlorophenol (but not phenobarbital) promotes intrahepatic biliary cysts induced by diethylnitrosamine to cholangio cystic neoplasms in B6C3F<sub>1</sub> mice possibly due to oxidative stress. *Toxicol. Pathol.* 31:10-13, 2003b.

115. Umemura T, Kuroiwa Y, Kitamura Y, Ishii Y, Kanki K, Kodama Y, Itoh K, Yamamoto M, Nishikawa A, Hirose M. A crucial role of *Nrf2* in *in vivo* defense against oxidative damage by an environmental pollutant, pentachlorophenol. *Toxicol. Sci.* 90:111-119, 2006a.

116. Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Ishii Y, Okano K, Nohmi T, Nishikawa A, Hirose M. *In vivo* mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate. *Cancer Sci.* 97:829-835, 2006b.

117. Umemura T, Kuroiwa Y, Tasaki M, Okamura T, Ishii Y, Kodama Y, Nohmi T, Mistumori K, Nishikawa A, Hirose M. Detection of oxidative DNA damage, cell proliferation and *in vivo* mutagenicity induced by dicyclanil, a non-genotoxic carcinogen, using *gpt* delta mice. *Mutat. Res.* 633:46-54, 2007.

118. Umemura T, Tasaki M, Kijima A, Okamura T, Inoue T, Ishii Y, Suzuki N, Masui T, Nohmi T, Nishikawa A. Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and *in vivo* mutagenicity in kidneys of *gpt* delta rats treated with potassium bromate. *Toxicology* 257:46-52, 2009.

119. Unnikrishnan A, Raffoul JJ, Patel HV, Prychitko TM, Aynangwe N, Meira LB, Friedberg EC, Cabelof DC, Heydari AR. Oxidative stress alters base excision repair pathway and increases apoptotic response in apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox factor-1 haploinsufficient mice. *Free Radic. Biol. Med.* 46:1488-1499, 2009.

120. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ. Sci. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27:120-139, 2009.
121. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Rad. Biol. Med.* 33:1-14, 2002.
122. Wang Y-J, Lee C-C, Chang W-C, Liou H-B, Ho Y-S. Oxidative stress and liver toxicity in rats and human hepatoma cell line induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone. *Toxicol. Lett.* 122:157-169, 2001.
123. Watanabe T, Manabe S, Ohashi Y, Okamiya H, Onodera H, Mitsumori K. Comparison of the induction profile of hepatic drug-metabolizing enzymes between piperonyl butoxide and phenobarbital in rats. *J. Toxicol. Pathol.* 11:1-10, 1998.
124. Weinberg F, Chande NS. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cell Mol. Life Sci.* 66:3663-3673, 2009.
125. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* 1:1-9, 2000.
126. White RE, Coon MJ. Oxygen activation by cytochrome P450. *Am. Rev. Biochem.* 49:315-356, 1980.
127. Whysner J, Ross PM, Williams GM. Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: Enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol. Ther.* 71:53-91, 1996.
128. Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25:675-682, 2006.
129. Wu ZH, Miyamoto S. Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J. Mol. Med.* 85:1187-1202, 2007.

130. Yang N, Chaudhry MA, Wallace SS. Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells. *DNA Repair (Amst.)* 5, 43-51, 2006.
131. Yamaguchi T, Wei M, Hagihara N, Omori M, Wanibuchi H, Fukushima S. Lack of mutagenic and toxic effects of low dose potassium bromate on kidneys in the Big Blue rat. *Mutat. Res.* 652:1-11, 2008.
132. Yang N, Chaudhry MA, Wallace SS. Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells. *DNA Repair (Amst)* 5:43-51, 2006.
133. Yatagai F, Kurobe T, Nohmi T, Masumura K, Tsukada T, Yamaguchi H, Kasai-Eguchi K, Fukunishi N. Heavy-ion-induced mutations in the gpt delta transgenic mouse: Effect of *p53* gene knockout. *Environ. Mol. Mutagen.* 40:216-225, 2002.