

ラット中期発がんモデルを用いたグルコン酸銅の発がん促進作用並びにカテキンとの複合影響による発がん修飾作用に関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2012-03-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 阿部, 正義 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00006466

電子科学研究科:

GD

0

0008513632

R

145

静岡大学附属図書館

静岡大学博士論文

ラット中期発がんモデルを用いたグルコン酸銅
の発がん促進作用並びにカテキンとの複合影
響による発がん修飾作用に関する研究



阿部正義

平成20年5月

目次

I. 要旨	1
II. 省略用語の説明	3
III. 緒言	5
IV. 第1部: DEN投与の幼若ラットの肝臓におけるDNA損傷とGST-P発現との関連性	20
IV-1. 背景及び目的	20
IV-2. 材料及び方法	20
IV-3. 結果	23
IV-4. 考察	24
V. 第2部: ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討	31
V-1. 背景及び目的	31
V-2. 材料及び方法	32
V-3. 結果	35
V-4. 考察	36
VI. 第3部: ラット中期多臓器発がん性試験を用いたグルコン酸銅及びカテキンの単独 または複合投与による発がんリスクの検索	48
VI-1. 背景及び目的	48
VI-2. 材料及び方法	49
VI-3. 結果	52
VI-4. 考察	54
VII. 第4部: ラット中期肝発がん性試験を用いたグルコン酸銅の肝発がん促進作用 の機序解明	67
VII-1. 背景及び目的	67
VII-2. 材料及び方法	68
VII-3. 結果	71
VII-4. 考察	72
VIII. 総論	87

IX. 結語	98
X. 謝辞	99
X I. 参考文献	100

I. 要旨

銅は、ヒトや動物にとって必須の元素であり、様々な酵素の構成成分として酸素の運搬や酸化還元反応等に関与している。一方、生体必須金属あるいはそれ以外の金属であっても、生体の恒常性維持の限界を超える量の暴露を受けた場合や、なんらかの原因で代謝機能が低下している場合、あるいはその金属の種類によって、毒性作用が生じる。一過性の暴露であれば、中毒症状を呈するが、長期間暴露された場合、ある種の金属では発がん性を有することが、職業がんや実験動物の研究により明らかにされている。ヒトに対する銅の発がん性は証明されていないが、動物への過剰な銅化合物の投与や銅代謝異常ラットで見られる肝臓への異常な銅蓄積は、酸化ストレスの発生を介し、肝炎あるいは肝発がんを誘発することが報告されている。

近年、グルコン酸銅が栄養機能食品としてサプリメント等への添加が認可されたため、利用拡大が予想されるが、一方でその過剰摂取による健康被害が危惧される。しかし、グルコン酸銅の発がんリスクの有無については、動物を用いた長期発がん性試験の報告はなく、未だ不明のままである。また *in vitro* においてポリフェノール類、特にカテキンと銅との相互作用により、酸化的 DNA 損傷を誘発することが報告され、さらにカテキンについては、*in vivo* において亜硝酸との複合投与により、胃の発がんリスクを増加させることが報告されている。しかしながら、動物を用いた *in vivo* での銅とカテキンとの複合影響について、実際に発がんリスクが増大するか否かについては、未だ明らかではない。

これらの背景から我々は、本研究において *in vivo* の動物実験により、グルコン酸銅の発がんリスクの検討とその背景機構、並びにグルコン酸銅とカテキンとの複合投与による発がん修飾作用について検索することを目的に、ラット中期発がんモデルである中期多臓器発がん性試験並びに中期肝発がん性試験を実施した。

これらの研究を実施するにあたり、初めに、中期発がん性試験に用いる発がん剤の肝臓における DNA 損傷と前がん病変との関連性について研究を行い、両者に密接な関連があることを明らかにした。さらに肝臓の葉によって、DNA 損傷及び前がん病変発生の反応性が異なることが明らかとなり、以降の中期発がん性試験では、葉間差を考慮し肝臓の観察部位を決定した。

次に、中期多臓器発がん性試験法を実施するにあたり、グルコン酸銅の投与用量及び毒性メカニズム探索の方法を検討すべく、小規模な動物数を用い、中期多臓器発がん性試験の期間を

半分にした予備的な試験を行った。その結果、グルコン酸銅は複数の発がん物質を投与した条件下ながら、比較的低い用量より、単独でも肝臓の銅代謝に影響を及ぼすことが判明した。また、グルコン酸銅の暴露が肝臓の代謝能力を超えることが明らかとなる用量は、6000ppm であるものと判断し、以降の試験のグルコン酸銅の最高用量は 6000ppm とした。

次いで、グルコン酸銅とカテキンのそれぞれ単独あるいは複合投与による影響について、ラット中期多臓器発がん性試験法を用いて全身臓器について検索を行った。その結果、肝前がん病変の発生個数は、グルコン酸銅単独群の 300ppm 以上にて有意に増加したが、グルコン酸銅及びカテキン併用群では増加しなかった。一方、前胃過形成の発生頻度はグルコン酸銅単独群の 6000ppm にて有意に増加したが、カテキンの併用投与ではグルコン酸銅によるこの現象を有意に抑制した。グルコン酸銅の単独またはカテキンとの併用投与下での他臓器への影響や、カテキン単独による被検索臓器への影響は認められなかった。

さらに、発がんリスクが増加した肝臓にターゲットを絞り、グルコン酸銅の及ぼす生体影響の背景機構を詳細に検索することを目的に、ラット中期肝発がん性試験並びに 2 週間反復投与試験を実施した。その結果、ラット中期肝発がん性試験において、グルコン酸銅は、6000ppm の投与により肝前がん病変発生と、肝細胞の酸化的 DNA 損傷、細胞増殖活性及びアポトーシス誘導を有意に増強した。この時の遺伝子発現変化としては、金属代謝、炎症、アポトーシスに関連する遺伝子とがん遺伝子の発現が増強した。これらの遺伝子の一部は、2 週間反復投与試験でも発現増強が認められた。

以上の結果から、グルコン酸銅は、肝臓と前胃を標的とする増殖性病変誘発促進作用を発揮し、高用量で発がんリスクを有するが、ヒト暴露レベルにおいてそうしたリスクが顕現する可能性は低いものと判明した。またその機序には、酸化ストレス、細胞増殖、炎症反応及びアポトーシスの誘導が関与することが示唆された。一方、カテキンは、単独ではなんら影響を示さず、グルコン酸銅との複合投与により、グルコン酸銅の発がんリスクを軽減する可能性が示唆された。

II. 省略用語の説明

- 8-oxoG: 8-oxoguanine 8-オキソグアニン
- ABC: avidin-biotin complex
- AP-1: activator protein 1
- BBN: *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine
- DEN: *N*-nitrosodiethylamine
- DHPN: 2, 2'-dihydroxy-di-*n*-propylnitrosamine
- DMH: 1, 2-dimethylhydrazine
- GADD45 α : growth and DNA damage 45 α
- GSH: glutathione グルタチオン
- GSSG: glutathione disulfide 酸化型グルタチオン
- GST-P: glutathione S-transferase placental form 胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ
- H₂O₂: hydrogen peroxide 過酸化水素
- HE: hematoxylin-eosin ヘマトキシリン-エオジン
- ICH: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
- IL1 α : interleukin 1 α インターロイキン 1 α
- LEC: Long-Evans cinamon ロング-エバンス-シナモン
- MNU: *N*-methylnitrosourea
- MRE: metal responsive element
- MT: metallothionein メタロチオネイン
- MYH: MutY homolog アデニル DNA グリコシラーゼ
- NF- κ B: nuclear factor κ B
- NOS2: nitric oxide synthase 2 一酸化窒素シンターゼ 2
- O₂⁻: superoxide ion スーパーオキシドイオン
- ¹O₂: singlet oxygen 一重項酸素
- OGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase オキソグアニン DNA グリコシラーゼ

•OH: hydroxy radical ヒドロキシラジカル

PCNA: proliferative cell nuclear antigen 増殖性細胞核抗原

SOD: superoxide dismutase スーパーオキシドジスムターゼ

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances チオバルビツール酸反応陽性物質

TNF α : tumor necrosis factor α 腫瘍壊死因子 α

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-uridinetriphosphate-biotin nick end-labeling

Ⅲ. 緒言

生体微量元素の生理作用、毒性作用及び発がん性

ヒトや動物の体には、多量に存在し、その主な構成成分となっている元素(酸素、炭素、水素、窒素等)のほかに、微量しか存在しないが、生命維持の必須なものとして、鉄、亜鉛、銅、セレン、コバルト、マンガン、クロム、ヨウ素、モリブデン、ニッケル、バナジウム等の微量元素が知られている(桜井ら, 1994)。それらの機能について表Ⅲ-1に記載する。これらの必須微量元素は摂食により体内に取り込まれ、健常状態では生体内に常に一定範囲の濃度で存在し、過剰分は体外に排出され、それらの金属の恒常性が保たれている。また、体内で利用されやすい状態で血液中に存在するものと、肝臓や骨などの組織に安定な状態で貯蔵されるものがあり、両者の間で平衡関係が成り立っている。そして、何らかの理由により、ある臓器において微量元素が不足した場合、貯蔵部位から取り出され、血流によって必要な部位に供給される(田中, 1995)。

一方、生体必須金属あるいはそれ以外の金属であっても、その恒常性維持の限界を超える量の暴露を受けた場合や、なんらかの原因で代謝機能が低下している場合、あるいは金属の種類により毒性作用が現れる(Valko et al., 2005)(表Ⅲ-1)。一過性の暴露であれば、中毒症状を呈するが、長期間暴露され続けた場合、ある種の金属では発がん性を有することが、職業がんや実験動物を用いた研究により明らかになっている。微量元素が関与する発がん性について、鉄、コバルト、クロム、ニッケル、鉛、カドミウム、ベリリウム、ヒ素等の研究は数多くなされ、その発がん性が評価されている(表Ⅲ-1)。一方、亜鉛、銅、マンガン、バナジウム、チタン等は、明確にヒトに対する発がん性の有無が評価されておらず、今後更なる研究が必要である(Kawanishi et al., 1989)(表Ⅲ-1)。

金属による発がん機構は、複雑であり十分に解明されてはいないが、金属による酸化ストレスとDNA修復機構の阻害等が作用機序として考えられている(Desoize, 2003; Leonard et al., 2004)。鉄錯体、コバルト、クロム、ニッケル等から成る発がん性金属化合物は、過酸化水素(H_2O_2)やスーパーオキシドイオン(O_2^-)からヒドロキシラジカル($\cdot OH$)、一重項酸素(1O_2)、金属-酸素錯体等の種々のタイプの活性酸素種を生成し、DNAに損傷を与えると考えられている(Kawanishi et al., 1986)(図Ⅲ-1)。もっとも典型的な酸化的DNA損傷は塩基変化であり、代表的なものとして

8-オキソグアニン(8-oxoG)が知られている(Nakae et al., 1997)。8-oxoG は、DNA の構成分子であるグアニン(G)の 8 位の炭素を・OH 等の活性酸素が傷害したもので、一部が本来の相補塩基であるシトシン(C)ではなくアデニン(A)と結合し、さらに複製の過程でアデニンはチミン(T)と対合し、G:C→T:A トランスバージョンを特異的に誘発することで、発がんに関与していると考えられている(Halliwell and Aruoma, 1991; Kasai, 1997) (図III-2)。また酸化ストレスは DNA 以外にも、脂質やタンパク質等を傷害し、過酸化脂質に代表されるそれらの傷害も発がんに関与している(Nakae, 1999)。さらに一酸化窒素をはじめとする活性窒素種は、炎症性サイトカン、アポトーシスあるいは細胞増殖等を制御する種々のシグナル因子等とともに複雑なネットワークを形成し、発がんに関与していることが明らかとされつつある(Newton et al., 1997; Szabo, 1997; Maeda and Akaike, 1998) (図III-1)。

一方、亜鉛、マンガン、鉛、カドミウム、ベリリウム、ヒ素等のそれ自身が活性酸素種の生成に直接関わることはない金属では、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ等の活性酸素消去酵素を阻害、あるいは DNA ポリメラーゼ等の DNA 修復や複製機構を阻害することにより、発がん過程で重要な役割を果たしていると推察されている(Waalkes et al., 1989; Hartwig and Schlegel, 1990; Luke et al., 1975)。

銅の生理作用、ヒトにおける摂取量、毒性作用及び発がん性

遷移金属である銅は、ヒトや動物にとって必須の元素である。銅は酸化型第二銅イオン[Cu(II)]あるいは還元型第一イオン[Cu(I)]として生体に存在しており、SOD、セルロプラスミン、チトクロームオキシダーゼ、チロシナーゼ、アスコルビン酸酸化酵素等の構成成分として、酸素の運搬や酸化還元反応等の働きに関与するほか、エラスチン、コラーゲン等の結合組織代謝や、電子伝達系に関係している(Aruoma et al., 1991; Prohaska et al., 2003; Wasser et al., 2003)。また銅は核にも含まれており、DNA のクロマチン高次構造形成に関与している(Dijkwel and Wenink, 1986)。鉄が不足すると、骨格異常、毛髪の色素脱落や構造異常及び心筋変性などの症状が現れるが、銅はその欠乏により貧血が起こることが報告されているなど、鉄と共に造血機能に関与するほか、銅含有酵素のいくつかは鉄の利用に深く関係している(高橋ら 2002)。このように銅は、ヒトの生命活動にとって重要な役割を果たしている。

日本人の銅摂取量と所要量に関する調査結果を表Ⅲ-2 に示す。これは平成 13 年国民栄養調査結果(健康・栄養情報研究会, 2003)の銅に関わる部分を抜粋したもので、年齢別更に男女別に銅の摂取量を示すと共に、第 6 次改定日本人の栄養所要量(財団法人厚生統計協会, 2003)より抜粋した銅の所要量を示したものである。これによれば、銅は小児を除く幅広い年齢層で不足している傾向にあり、食品への添加物などによって摂取を強化する必要があると考えられている。

銅の毒性作用については、銅は酸化ストレスを誘導し、細胞や組織に障害を与えることが明らかになっている(Oikawa et al., 2001, 2003; Murata et al., 1999; Naito et al., 1994; Yamamoto et al., 1993)。さらに肝臓に銅が異常に蓄積するロング-エバンス-シナモン(LEC)ラットでは、銅による酸化ストレスの関与により、肝炎及び肝がんを発症する(Yamamoto et al., 1993)。また、ヒトでの先天性代謝異常症のウィルソン病では、銅が肝臓や脳等に過剰に蓄積し、肝硬変や中枢神経障害を発症する(Ala et al., 2007)。一方、ヒトに対する銅の発がん性は証明されていない。しかしながらヒトにおいて、血清銅と乳がん発生との関係が調べられた結果、かなりの低濃度とかなりの高濃度で乳がんの発生が多いことが明らかになった(Overvad et al., 1993)。これは、通常レベルの銅が発がん性を示すことはないが、低濃度では SOD の活性が低下することにより、また高濃度では LEC ラットと同様の機構で発がんの可能性が高まると推察されている。従って、銅は必須微量元素であっても、ある条件下では発がんに寄与している可能性が考えられる。

グルコン酸銅の使用及び毒性

現在、栄養機能食品(いわゆるサプリメント)や健康食品が数多く販売されている。これらの健康補助食品は、高齢化やライフスタイルの変化等により、通常の食生活を行うことが難しく1日に必要な栄養成分を取れない場合に、その補給のために摂取する。

グルコン酸銅は、銅塩類の一つとして、人工栄養児の銅強化の目的で 1983 年に食品添加物に指定された。その構造式を図Ⅲ-3 に示す。グルコン酸銅は、日本では近年まで母乳代替食品以外の食品への使用が認められていなかった(Nakamoto et al., 1983)。しかしながら、米国では、栄養強化を目的としてサプリメント類、あめ類、飲料等に用いられており(HHS, 1997)、EU においても、食品添加物ではなく食品成分扱いとされ(EC, 2001)、幅広く用いられている。日本におい

でも、2004年に栄養機能食品として通常の食品の形態をしていない液剤、カプセル、顆粒、錠剤及び粉末に使用できるよう使用基準の改正が行われた。グルコン酸銅の許容上限摂取量は、銅として9 mg/ヒト/日と設定され(<http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy-gluconatecu-hyouka.pdf>)、今後の使用拡大が予想される。

グルコン酸銅の安全性については、Ames試験にて陰性(Hujita et al., 1998)、各種動物の反復投与毒性試験では、高用量投与の場合に肝障害等が認められている(Harrisson et al., 1954; Aburto et al., 2001)。一方ヒトでは、グルコン酸銅の投与試験が行われており、ヒトの許容上限摂取量付近である10mg/ヒト/日の12週間反復投与において、なんら影響がないことが報告されている(Pratt et al., 1985)。しかしそれ以上の用量での影響については、試験が行われておらず不明である。また、グルコン酸銅の発がんリスクの有無については、動物を用いた長期発がん性試験の報告はなく、未だ明らかではない。

栄養機能食品等の評価の現状及び食品中化学物質の複合影響に関する安全性研究の動向

栄養機能食品や健康食品は、手軽に必要な栄養素を摂取できる反面、食事から栄養素をとる場合とは異なり、容易に許容上限摂取量よりも数倍から数十倍もの量を一度に摂取することが可能となり、過剰摂取による健康被害が危惧される。また、安全性が十分に確認されないまま市場に投入される商品も数多い。そのため昨今、栄養機能食品や健康食品あるいは食品添加物に対する再評価の動きが進んでいる。最近の情報では、健康食品であるアガリクスを含む3製品について、厚生労働省がラットを用いた発がん性試験を行い、1つの製品において、製品の摂取目安量の約5倍から10倍程度の用量で発がんを促進する作用が認められ、さらに変異原性も陽性であったことから、商品の自主回収が要請された(<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/qa/060213-1.html>)。また、食品添加物であるアカネ色素もラット発がん性試験において腎臓腫瘍の増加が認められ、変異原性も陽性であったことから使用禁止となった(<http://www.mhlw.go.jp/topics/2004/06/tp0618-1.html>)。

栄養機能食品や健康食品の再評価の動きがある一方、食品中化学物質の複合影響に関する安全性について、基礎的研究が厚生労働省の研究班で行われている。ヒトは常に食事等から数

多くの化学物質を摂取し、これらの化学物質に対し常に複合的に暴露され続けている。しかしながら、これらの化学物質の安全性は、それぞれ個別に評価されているが、複合的に摂取した場合の安全性についての情報は極めて乏しい。そこで、実態に即した安全性評価の必要性から、化学物質の複合影響に関する基礎的研究が行われている。これらの背景から我々の研究グループは、食品健康影響評価と複合影響の観点で研究を進めるに至った。

実際、抗酸化物質など多くの化学物質は、銅や鉄などの金属の存在下で DNA 損傷をおこし、ヒト健康に影響を及ぼす可能性があることが報告されている。とくにポリフェノール類(カテキン類、オルトフェニルフェノール、カフェー酸、カテコール等)の場合、*in vitro* において、それぞれと銅との相互作用により 8-oxoG を生成し、DNA 損傷をもたらすことが報告されている(Oikawa et al., 2001, 2003; Murata et al., 1999; Naito et al., 1994)。特にカテキン類は(図Ⅲ-4)、これまでに抗酸化作用や発がん抑制作用をはじめとする種々の作用を示すことが報告され(Scaltriti et al., 2006; Morley et al., 2005; Weyant et al., 2001)、それらの好影響に基づいて、様々な用途として食品等への使用が拡大している。そのためカテキン類の複合影響による安全性について研究することは、非常に重要であると考え。カテキンと銅との相互作用により酸化的 DNA 損傷が誘発される機構を図Ⅲ-5 に示す。さらに、老化防止や健康増進を期待されるピクノジノールの成分であり、カテキンの 2 量体である procyanidin B2 は、*in vitro* において適量では細胞内の酸化ストレスを抑制するが、高濃度では銅の存在下で酸化ストレスを促進し、酸化的 DNA 損傷を誘発することが報告されている(Sakano et al., 2005)。また金属以外にも、ラット胃発がんモデルにおいて、カテキンあるいはカテコールと亜硝酸ナトリウム(NaNO_2)を同時投与すると、胃の中で酸化ストレスが発生し、前胃発がんを促進することが報告されている(Ishii et al., 2006; Kuroiwa et al., 2007)。

ラット中期発がんモデル

発がん性試験は、対象とする化学物質に腫瘍を発生させる作用あるいは腫瘍の発育を促進させる作用があるかを検討するために行われている。長期発がん性試験では、ラットあるいはマウスを 50 匹以上/群を使用し、ラットでは 24 ヶ月以上、マウスでは 18 ヶ月以上投与し、全ての臓器の腫瘍発生を検索する方法であるが、膨大なコストと人手を必要とする。

ラット中期発がんモデルは、発がんがイニシエーションとプロモーションの 2 つの過程からなると

する発がん二段階説に基づき、長期発がん性試験の代替法として提唱された。このモデルは比較的短期間に、全身の主要臓器あるいは単一臓器に対する化学物質の発がん性の有無を評価することができる。また、長期発がん性試験の結果ともよく相関することが報告されている (Ito et al., 1988; Fukushima et al., 1991; Takahashi et al., 1992; Fukushima et al., 2005)。発がんのイニシエーションとは、発がん物質が活性化されて細胞の遺伝子に作用し、変異細胞を形成する起始的变化を起こす過程で、プロモーションとは、変異した細胞が増殖・進展し、前がん病変あるいはがんを形成する過程をいう (Ito et al., 1988)。

ラット中期肝発がん性試験は、代表的な単一臓器発がんモデルのひとつであり、イニシエーターとして *N*-nitrosodiethylamine (DEN) を用い、さらに肝部分切除処置を施し、肝前がん病変である胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST-P) 陽性細胞巢の数及び大きさを指標に、肝を標的とする発がん物質を比較的短期に検出する試験法である (Shirai, 1997; Ito et al., 2000)。GST-P とは、薬物代謝酵素のうちの抱合酵素の一つで、正常なラットの肝臓では発現していないが、ラットの肝前がん病変において発現するため、GST-P 陽性細胞巢は、ラットの肝発がんのマーカーとして広く用いられている (Shirai, 1997)。300 以上の化学物質について評価が行われ、90%以上の確率で肝発がん物質を検出でき、長期発がん性試験ともよく相関することが報告されている (Fukushima et al., 2005)。この試験のメリットは、単一臓器にターゲットを絞り、肝発がんリスクの評価を前がん病変の数量的データを用いて解析するため、ばらつきの少ない精度の高い結果を比較的短期間に得ることができることである。一方、肝臓以外に標的臓器がある化学物質の場合は、十分な評価を行うことができない。

ラット中期多臓器発がん性試験は、化学物質の全身諸臓器への発がん性を一括して検索するために開発された試験法である (Ito et al., 1988; Fukushima et al., 1991; Takahashi et al., 1992)。複数の発がん物質を用いて種々の臓器にイニシエーション処置をした後、化学物質をプロモーション期に投与して、試験開始後 28-30 週で動物を屠殺し、全身諸臓器の発がん性を、前がん病変あるいは腫瘍の発生を指標として検索する。この方法のメリットは、同時に多くの臓器に対する発がん効果を判定できるため、標的臓器のスクリーニングに用いることができると、ある臓器で発がんしたものが他の臓器ではどうかという関連性の確認が行なえることが挙げられる。一方、複数の発がん物質を投与していることと、投与期間が比較的長いことから、結果のばらつきがやや大きく、評価精度の点から単一臓器を対象としたモデルよりも劣る。

研究の目的

近年、グルコン酸銅が栄養機能食品の成分として利用拡大が予想され、その過剰摂取による健康被害が危惧される。一方、動物への過剰な銅化合物の投与や LEC ラットで見られる異常な銅蓄積は、酸化ストレスの発生を介し毒性あるいは肝発がんを誘発することが報告されている。しかしながら、グルコン酸銅の発がんリスクの有無については、動物を用いた長期発がん性試験の報告はなく、未だ不明のままである。

また、*in vitro* においてポリフェノール類、特にカテキンと銅との相互作用により DNA 損傷を誘発することが報告され、さらにカテキンについては、*in vivo* において亜硝酸との複合投与により、胃の発がんリスクを増加させることが報告されている。しかしながら、動物を用いた *in vivo* でのカテキンと銅との複合影響について、実際に発がんリスクが増大するか否かについては、未だ明確な結論はない。

これらの背景から我々は本研究において、*in vivo* の動物実験により(1)グルコン酸銅の発がんリスクの検討とその背景機構を明らかにすること、(2)グルコン酸銅とカテキンとの複合投与による発がん修飾作用について検索することを目的とした。発がんリスクの検討には、ラット中期多臓器発がん性試験並びに中期肝発がん性試験を用いることとした。

我々は、中期多臓器発がん性試験を先に実施することで、グルコン酸銅の発がんリスクについて全身の臓器に対して検索し、次いで、特に発がんリスクが増加した肝臓にターゲットを絞り、中期肝発がん性試験を行い、その再現性の確認と詳細な背景機構の検索を行った。

第 1 部では、これらの研究を開始するにあたり、まず初めに中期発がん性試験に用いる DEN によるイニシエーション作用について理解を深めるため、DEN 投与の幼若ラットの肝臓における DNA 損傷と GST-P 発現との関連性について検討した。さらにこれらの検討は、肝臓の 3 つの別々の葉について実施し、各葉での反応性の違いについても合わせて調べることとした。

第 2 部では、グルコン酸銅の発がんリスク検索のため中期多臓器発がん性試験法を実施するにあたり、グルコン酸銅の投与用量及び毒性メカニズム探索の方法を検討すべく、小規模な動物数を用い、中期多臓器発がん性試験法の期間を約半分にした予備的な試験を行い、銅の影響が予想される肝臓に焦点をあて、グルコン酸銅の毒性及び発がん性について検索した。

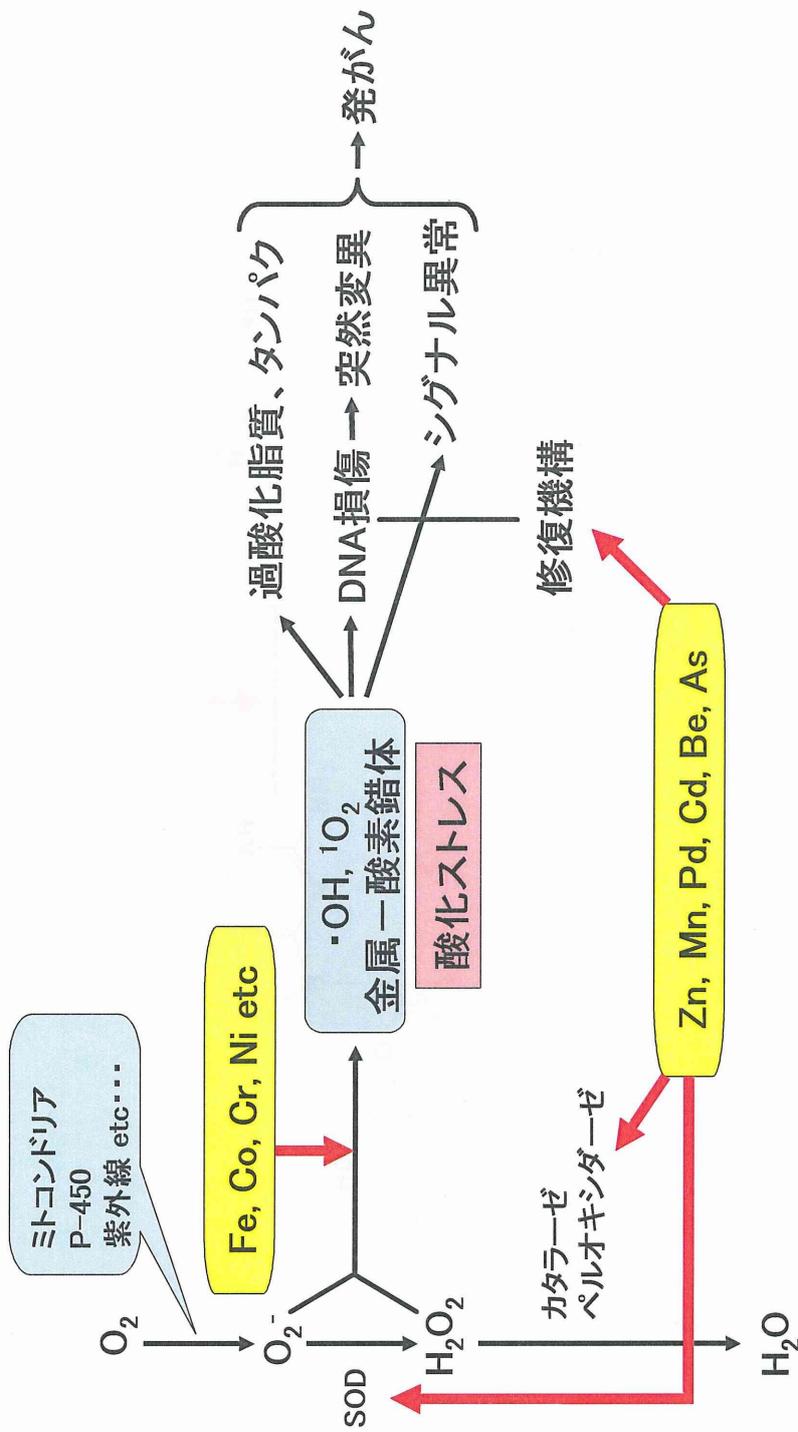
第 3 部では、グルコン酸銅とカテキンのそれぞれ単独、あるいは複合投与による影響について、中期多臓器発がん性試験法を用いて全身臓器について検索を行った。

第 4 部では、第 3 部で発がんリスクが増加した肝臓にターゲットを絞り、より精度の高い再現性を得ること、さらにグルコン酸銅の及ぼす生体影響の背景機構を詳細に検索することを目的に、中期肝発がん性試験並びに 2 週間反復投与試験を実施し、組織化学的検索及び遺伝子発現解析を行った。

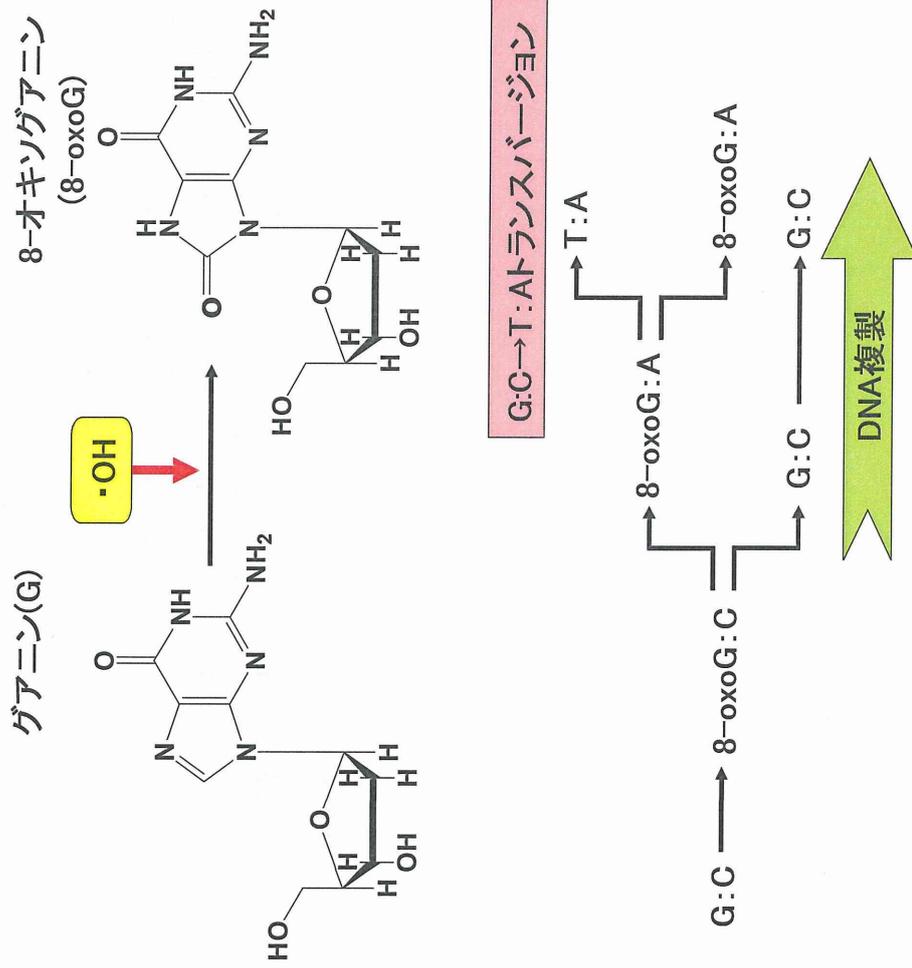
表Ⅲ-1 微量元素の生理作用、毒性及び発がん性

金属 (元素記号)	生理作用	中毒症状	発がん性の評価 ^{a)}	標的臓器	推定発がん機構
鉄 (Fe)	酸素運搬、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ	肝臓毒性など	2B		活性酸素の生成
亜鉛 (Zn)	細胞分裂、核酸代謝、SODの構成成分	肺疾患など			活性酸素消去系の阻害
銅 (Cu)	酸化還元、SODなどの構成成分	接触性皮膚炎			活性酸素の生成
セレン (Se)	酸化活性化、グルタチオンペルオキシダーゼ活性				
コバルト (Co)	造血、ビタミンB12の構成成分	甲状腺異常など	2B	肺、リンパ	活性酸素の生成
マンガン (Mn)	脂質代謝、SODの構成成分	中枢神経障害など			活性酸素消去系の阻害
クロム (Cr)	糖代謝、クロム含有耐糖因子	鼻中隔穿孔など	1	肺、鼻腔	活性酸素の生成
ヨウ素 (I)	甲状腺機能、T3、T4の構成成分				
モリブデン (Mo)	尿酸代謝、キサンチンオキシダーゼの構成成分				
ニッケル (Ni)	RNA安定化、ウレアーゼの構成成分	喘息など	1	鼻腔、肺	活性酸素の生成
バナジウム (V)	脂質、糖代謝、Na/K/ATPaseの調節因子	肺障害			活性酸素の生成
鉛 (Pb)	有害	腎障害	2B	胃、腎臓、呼吸器、膀胱	DNA修復過程の阻害
カドミウム (Cd)	有毒	動脈血栓など	2A	前立腺	抗酸化機構の阻害
ベリリウム (Be)	有害	肉芽腫など	2A	肺	DNA複製過程の阻害
ヒ素 (As)	有害	皮膚障害など	1	皮膚、肺、肝臓	DNA修復過程の阻害
チタン (Ti)	無害				活性酸素の生成

a) IARC による発がん性の評価。1:ヒトに対して発がん性を示す可能性が高い。2A:ヒトに対して発がん性を示す可能性がある。2B:ヒトに対して発がん性を示す可能性がある。



図Ⅲ-1 金属の関与が推定される発がん機構。鉄錯体(Fe)、コバルト(Co)、クロム(Cr)、ニッケル(Ni)等の発がん性金属化合物は、過酸化水素(H_2O_2)やスーパーオキシドイオン($O_2^{\cdot -}$)からヒドロキシジカル($\cdot OH$)、一重項酸素(1O_2)、金属-酸素錯体等の種々のタイプの活性酸素種を生成しDNAに損傷を与える。また酸化ストレスはDNA以外にも、脂質やタンパク質等を酸化的に傷害し肝発がんに関与している。一方、亜鉛(Zn)、マンガン(Mn)、鉛(Pd)、カドミウム(Cd)、ベリリウム(Be)、ヒ素(As)等のそれ自身が活性酸素種の生成に直接携わることはない金属では、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ等の活性酸素消去酵素を阻害、あるいはDNAポリメラーゼ等のDNA修復機構等を阻害することにより発がん過程で重要な役割を果たしている。



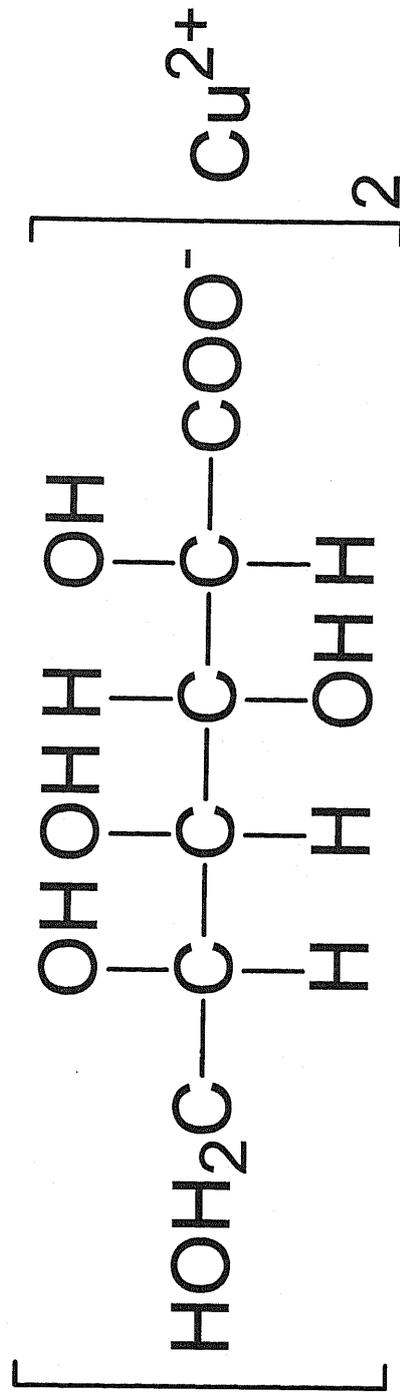
図III-2 8-oxoG による G:C → T:A トランスバージョン。代表的な酸化性 DNA 損傷である 8-oxoG は、DNA の構成分子であるギャニン(G)の 8 位の炭素をヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)等の活性酸素が傷害したもので、DNA 複製の際に、8-oxoG はアデニン(A)と誤対合し、シトシン(C)と相補対を形成する。複製の過程で A はチミン(T)と対合し、G:C → T:A トランスバージョンが起こる。

表Ⅲ-2 日本人の銅摂取量と所要量に関する調査

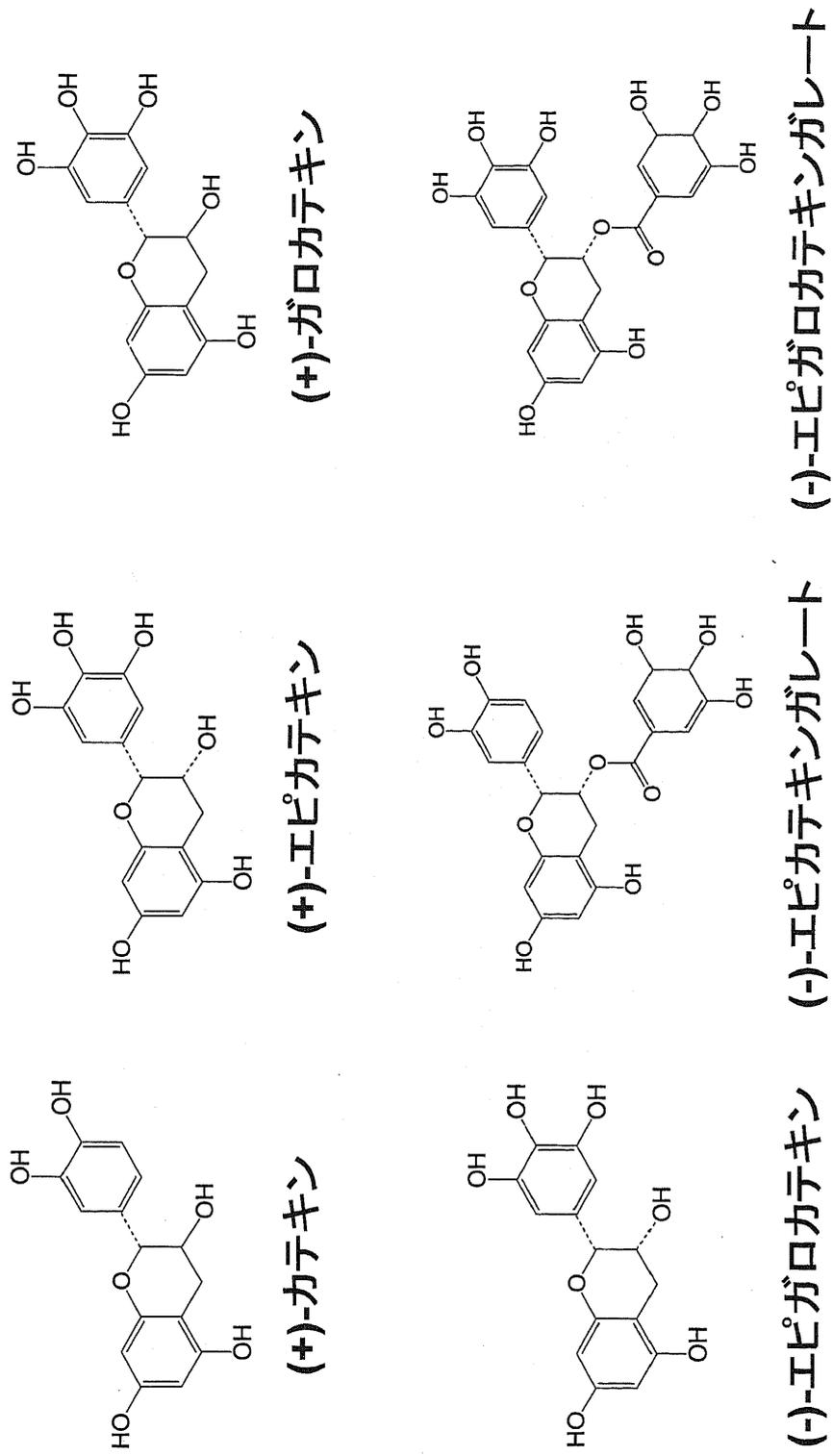
年齢(歳)		銅の摂取量*及び所要量** (mg/人/日)											
		総数	1-6	7-14	15-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-		
男女計	摂取量	1.25	0.75	1.20	1.31	1.15	1.19	1.26	1.40	1.44	1.25		
	所要量	1.35	0.77	1.28	1.47	1.26	1.32	1.36	1.48	1.57	1.33		
男性	摂取量	-	0.8-1.3	1.3-1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8		
	所要量	1.17	0.73	1.12	1.13	1.06	1.08	1.16	1.34	1.34	1.2		
女性	摂取量	-	0.8-1.2	1.2-1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.4		
	所要量	-											

*銅の摂取量は平成13年国民栄養調査結果より抜粋

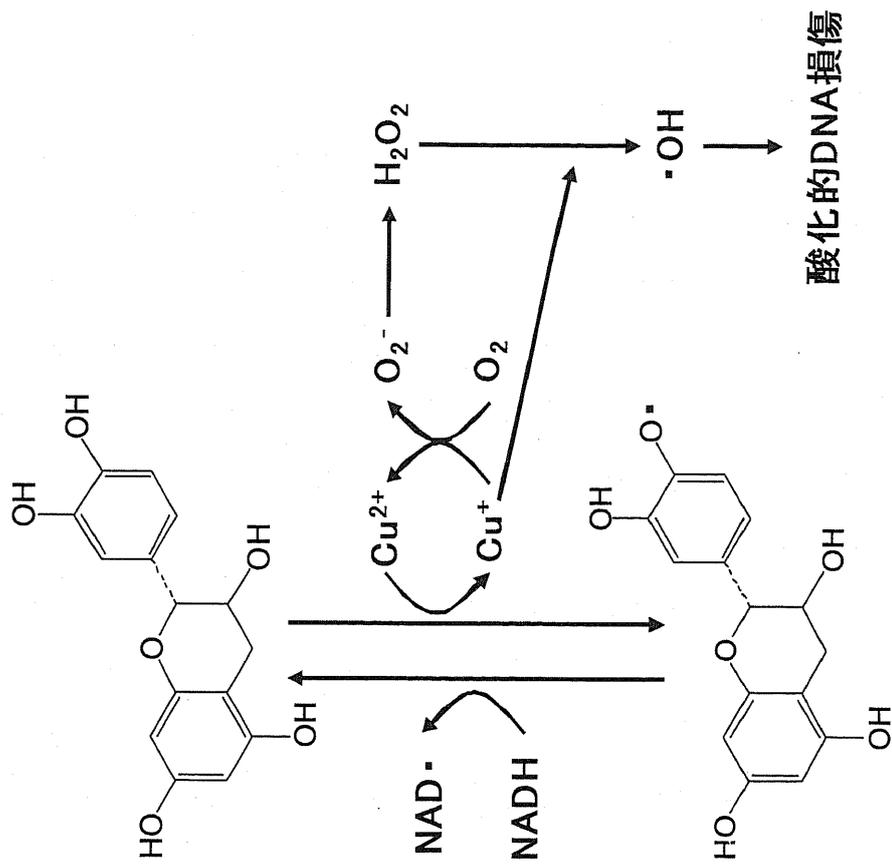
**銅の所要量は第6次改定日本人の栄養所要量より抜粋



図Ⅲ-3 グルコン酸銅の構造式



図III-4 カテキン類の構造式



図III-5 カテキンと銅との相互作用による酸化性 DNA 損傷誘発機構。2 価の銅はカテキンにより還元され 1 価の銅となる。銅と H_2O_2 が反応すると $\cdot\text{OH}$ が生成され、DNA に対し酸化的損傷を与える。また O_2 により銅が酸化される過程で、 O_2^- が生成され H_2O_2 の供給源となる。

IV. 第1部: DEN 投与の幼若ラットの肝臓における DNA 損傷と GST-P 発現との関連性

IV-1. 背景及び目的

化学物質による発がんは、DNA 付加体の形成をはじめとする様々な DNA 損傷に始まり、変異の固定、変異細胞増殖の過程を経て腫瘍形成に至る。近年、*in vivo* での DNA 初期損傷を検出する手法として、 comet assay が定着しつつある (Singh et al., 1988; Fairbairn et al., 1995; Sasaki et al., 1997)。 comet assay (comet assay; 単細胞ゲル電気泳動法) とは、単離した細胞または核をアガロースに閉じ込めて融解した後、アルカリ処理で二本鎖 DNA を単鎖にし、電気泳動による泳動パターンの変化より、DNA 鎖切断を検出する方法である。正常な細胞の DNA は、非常に大きな分子であるため、電場をかけてもほとんど移動せず球形の核 DNA として観察される。一方、DNA 付加体形成等に対する修復過程で DNA の脆弱性や DNA 切断等が起っている場合には、DNA 断片の大きさに応じて移動し、球形の核 DNA を頭に尾を引いた comet (彗星) のような泳動パターンとなる (図 IV-1)。DNA 損傷の程度は、 comet の長さにより数量的に判定することが可能である。この方法は培養細胞のみならず、化学物質を処理した動物より細胞を単離することで、*in vivo* での評価にも応用できる。理論的には全ての細胞を対象に試験が可能であり、実際、肝臓、腎臓、胃、肺、膀胱、子宮等の組織を用いて実施されており (Sasaki et al., 1997; Sasaki et al., 2000)、我々の研究グループにおいても、子宮での comet assay について報告している (Ogawa et al., 2007)。

一方、肝前がん病変マーカーである GST-P 陽性細胞集と DNA 付加体との間に相関があることが報告されている (Dragan et al., 1994)。しかしながら、DNA 初期損傷と GST-P 発現との相関性は、明らかにされていない。

そこで我々は、幼若ラットに 10 あるいは 40ppm の DEN 飲水投与を行い、肝臓での comet assay による DNA 初期損傷と GST-P 発現との相関性について検討した。これらの試験は、肝臓の外側左葉、内側右葉及び外側右葉の 3 葉について実施し、各葉での反応性の違いについても合わせて調べることを目的とした。

IV-2. 材料及び方法

化学物質

DEN は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より購入し、試験期間中は、毎日脱イオン水を用いて 10 あるいは 40ppm に希釈し投与検体とした。投与用量は Richardson ら (1986) の報告を基に設定した。

動物

4 週齢の BriHan:WIST@Jcl (GALAS) 雄性ラットを CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) より 54 匹入手した。動物は 1 週間の検疫馴化期間後 5 週齢にて試験に供し、適切な無作為抽出法を用いて割り付けた。動物はバリアシステム内の温度及び湿度を制御した動物室内で飼育した。室内の環境は温度 22°C (下限 19°C、上限 25°C)、湿度 55% (下限 45%、上限 70%)、換気回数 18 回/時、12 時間照明とした。動物は各 1 匹ずつ、ステンレス網底側板アルミ打抜きブラケットケージ内に収容した。餌 (CE-2: CLEA Japan) 及び水は自由に摂取させた。

試験設計

5 週齢の動物を 3 群 (各群 18 匹) に無作為に分け、0、10 あるいは 40ppm の DEN 飲水投与を 14 日間実施した (図 IV-2)。体重及び飲水量を 3、7 及び 14 日に測定し、検体摂取量を算出した。各群 3、7 及び 14 日に、6 匹の動物をエーテル麻酔下で放血屠殺し、肉眼的病理学検査の後、肝臓を摘出して重量測定を行った。肝臓の外側左葉、内側右葉及び外側右葉を切り出し (図 IV-3)、それらを半分にし、それぞれ一方を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、通常の方法でパラフィン包埋し 4 μ m 切片を作成した。もう一方はコメットアッセイに供した。

病理組織学的及び免疫組織化学的検索

作成した切片に対しヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を常法にて実施し、病理組織学的検索

を行った。肝での GST-P 免疫組織化学染色 (Kishida et al., 2000) は avidin-biotin complex (ABC) 法 (Vector Laboratories Inc., California, USA) にて実施した。脱パラフィン後、0.3% H₂O₂ により 15 分間室温で処理し、一次抗体 (抗ラット GST-P ウサギポリクローナル抗体: Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., Aichi, Japan, ×100 倍希釈) を添加し、1 時間室温にて静置した。洗浄後、ビオチン結合抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories Inc.) を 30 分室温、次いでペルオキシダーゼ結合アビジン (Vector Laboratories Inc.) を 30 分室温にて処理し、0.04% ジアミノベンチジン溶液にて茶褐色に発色させた。GST-P 陽性細胞率の算出には、アイパップイメージアナライザー (Sumika Technoservice Co., Osaka, Japan) を用いた。

コメントアッセイ

各葉の肝臓片に 24mM EDTA 緩衝液を加え、600 rpm で緩やかにホモジナイズした。700×g で 10 分間遠心後、上清を除き沈殿した核分画を同溶液で再懸濁し核懸濁液とした。核懸濁液を 1% アガロース処理済のスライドグラス上に置き、直ちにその上にスライドグラスをかぶせて、アガロースを固化させた。その後スライドグラスを引き剥がしゲルのみとし、これを第 1 層ゲルとした。次に、溶解した 2% 低温度ゲル化アガロースを、核懸濁液と 1:1 で混和し、直ちに固化した第 1 層ゲルに重層し固化させ、第 2 層ゲルとした。第 3 層ゲルとして第 1 層ゲルと同じく 1% アガロースを重層させた。作製したアガロースゲルに核溶解液 (1% TritonX-100-10mM トリス緩衝液) を加え、1 時間 4°C で静置し核を溶解させた。核溶解が終了したアガロースゲルを電気泳動槽に並べ電気泳動液 [1mM EDTA 緩衝液 (pH13)] に浸し、10 分間 4°C で静置して DNA をアルカリ変性させた後、1 V/cm (250-300 mA) で 15 分間電気泳動を行った。その後、ゲルを 25 μg/ml 臭化エチジウム液にて染色し、蛍光顕微鏡を用いて画像解析装置 (KEIO Electronic Industry Co., Ltd, Osaka, Japan) に画像を取り込み観察した。1 枚の標本につき 50 個の核について、無作為に DNA 移動距離 (コメット像の尾の長さ) を計測した。

統計学的解析

各データはバートレット検定または F 検定を実施し、有意であった場合は、Steel 検定または

Aspin-Welch t 検定を実施した。有意でなかった場合には、Dunnett 検定または Student's t 検定を実施した。P値が0.05以下の場合を有意な変化とした。また同じDEN用量あるいは同じ投与期間における各葉での違いについては、Tukey's multiple comparison 検定を実施した。

倫理面への配慮

本研究においては、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規、規則、ガイドライン等及び試験実施施設の規定に準拠し、適切な倫理面への配慮を行った。

IV-3. 結果

全動物は試験期間中死亡あるいは症状の異常は認められなかった。組織病理学的に肝細胞の重度の壊死は認められなかったが、DEN 40ppm の14日間投与群において、肝細胞の核濃縮やアポトーシスの増加が認められた。

図IV-4に各葉におけるGST-P陽性細胞率を示す。GST-P陽性細胞率は、用量及び投与期間依存的に増加し、40ppm群では、7日間投与の外側左葉及び内側右葉、並びに14日間投与の全葉でGST-P陽性細胞率が増加した(図IV-4, 5)。一方、10ppm群では40ppmよりも程度が低く、14日間投与であっても有意な増加は認められなかった。40ppm群の外側左葉と内側右葉を比較した場合、外側左葉のGST-P陽性細胞率は、3及び7日間投与では若干高いが、14日間ではほぼ同程度であった。一方、外側右葉のGST-P陽性細胞率は、試験期間を通して他の葉と比較し低値であった。

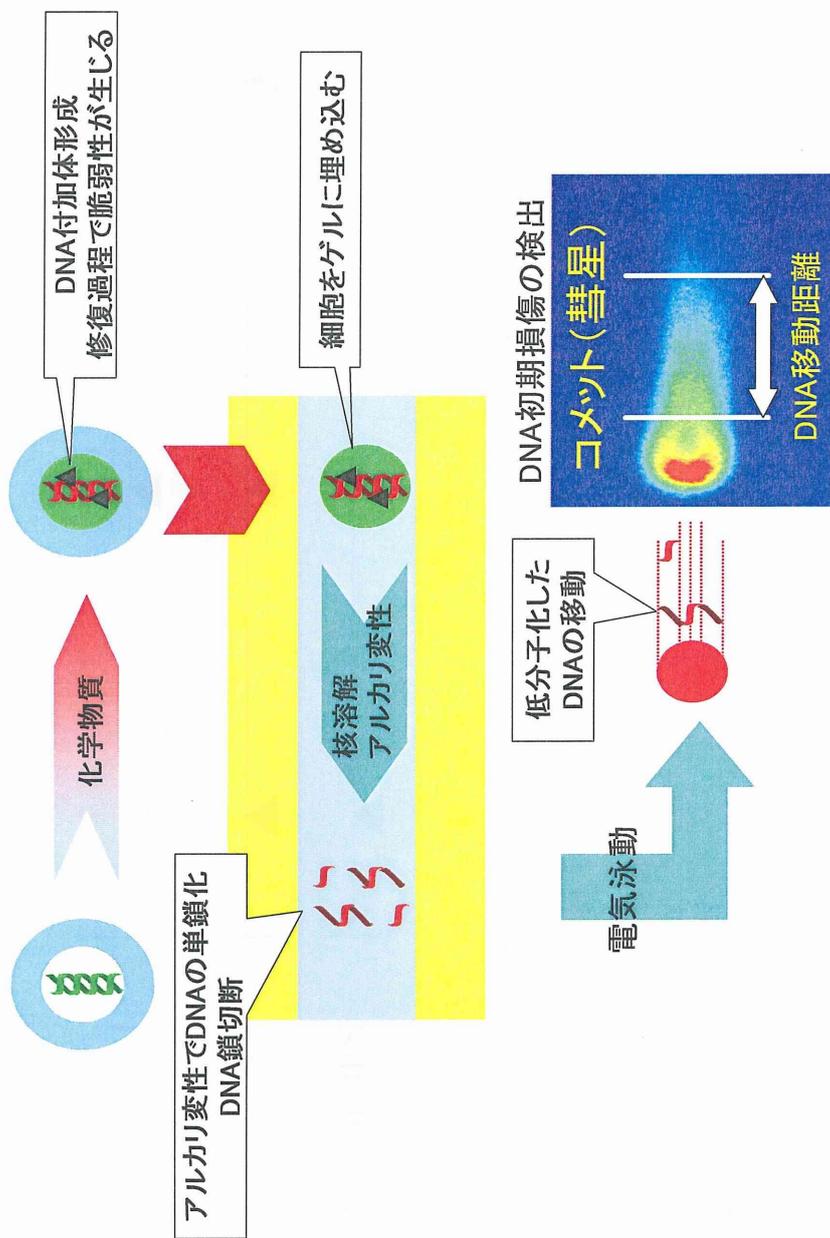
図IV-6はコメットアッセイにより、各葉の細胞核DNAの移動距離を調べたものである。DNA移動距離は用量及び投与期間依存的に増加した。3日間投与では、40ppm群の外側左葉のみでDNA移動距離が有意に増加したが、7あるいは14日間投与では、40ppm群の全葉で有意に増加した。一方、10ppmでは14日間投与の外側左葉のみで有意な増加が認められた。各葉間では、外側左葉が最も高く、40ppm群の14日間投与群では、外側左葉のDNA移動距離は外側右葉よりも有意に増加した。

IV-4. 考察

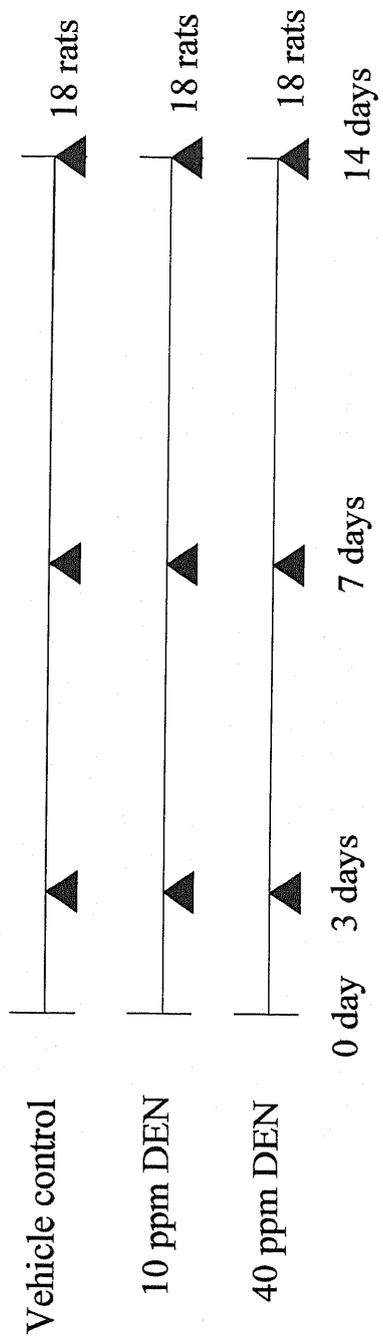
今回の結果から、DNA 移動距離として認められる DNA 初期損傷と GST-P 発現は、各葉において用量及び投与期間によく相関することが示され、その各葉の反応性は、外側左葉 \geq 内側右葉 $>$ 外側右葉の傾向を有することが明らかとなった。また他の報告では、ラットを用いた DEN 投与試験において、DNA 付加体が外側左葉で高い傾向が認められ (Richardson et al., 1986)、我々の comet assay の結果と一致した。このことは、comet assay により検出される DNA 初期損傷のメカニズムを説明する。ラット肝臓において DEN は、様々な種類の DNA 付加体を形成するが (Dragan et al., 1994; Dyroff et al., 1986)、損傷を受けた DNA 部位は修復酵素により近隣のリン酸結合を切り出す形で修復される。その過程で DNA 断片が形成され、comet として検出されると考えられる (Singh et al., 1988)。

DEN 投与に対する肝臓での各葉の反応性は、外側左葉と内側右葉では 100% の腫瘍を形成するのに対し、外側右葉では 5% に留まっているとの報告があり (Dyroff et al., 1986)、各葉での DNA 初期損傷及び GST-P 陽性細胞率は、腫瘍の発生頻度とも、よく一致することが示唆された。一方、10ppm の GST-P 陽性細胞率の程度は、DNA 移動距離と比較し明らかに低かった。また、10ppm 群の 14 日間投与の外側左葉では、DNA 移動距離が有意に増加したのに対し、GST-P 陽性細胞率は、どの葉でも有意な増加を示さなかった。従って、comet assay は GST-P 発現よりも感度が高い可能性が推察された。DNA 損傷を受けたほとんどの細胞は、アポトーシス等により除去されたり、完全に DNA が修復されることで、GST-P を発現するに至らないと推察される (Enomoto and Farber, 1982; Tatematsu et al., 1983)。従来のラット肝臓を用いた *in vivo* comet assay では、内側右葉を含む肝の中間葉を供試するのが一般的であるが、低濃度、反復投与においては、葉によって反応の異なることが明らかとなったことから、今後葉間差を考慮する必要があると考えられる。

以上の結果より、DEN の 14 日間飲水投与による幼若ラットの肝臓において、各葉における DNA 初期損傷と GST-P 陽性細胞を調べ、両者には密接な関連があることが明らかとなり、*in vivo* comet assay は、肝発がんのイニシエーション過程を明確に反映していることが示唆された。さらに葉によって、これらの反応性が異なることが明らかとなり、以降の中期発がん性試験の肝臓検索部位は、葉間差を考慮し外側左葉、内側右葉及び外側右葉の 3 葉とした。



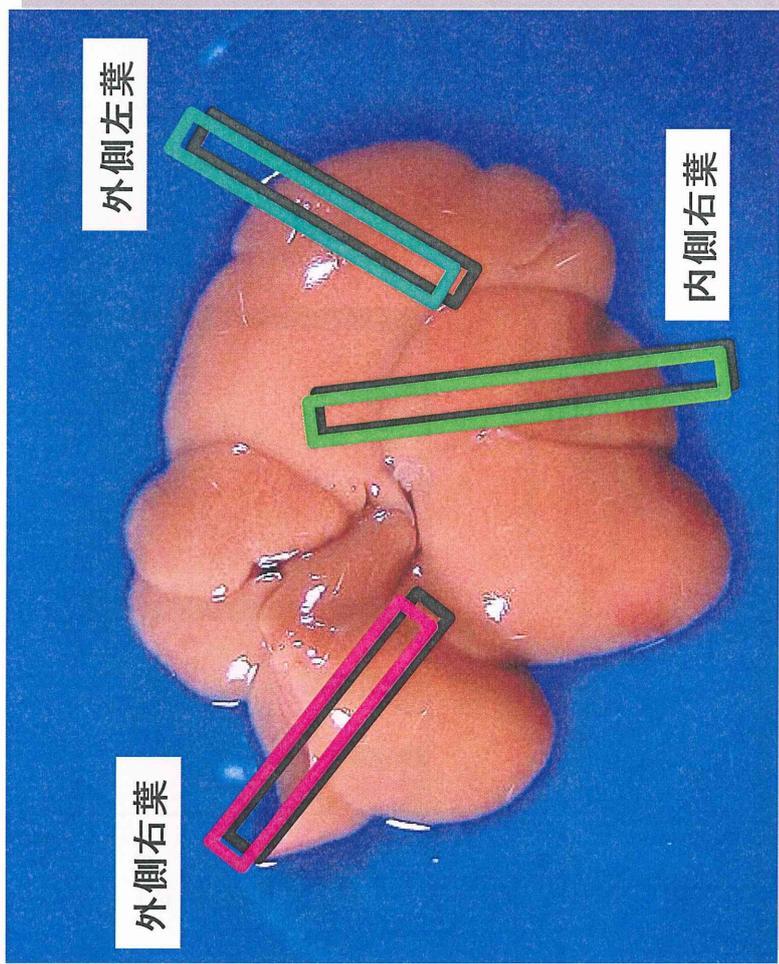
図IV-1 コメットアッセイの原理。コメットアッセイとは、単離した細胞をアガロースに閉じ込めて融解した後、アルカリ処理で二本鎖 DNA を単鎖にし、電気泳動による泳動パターンの変化より DNA 鎖切断を検出する方法。DNA 付加体形成等に対する修復過程で DNA の脆弱性や DNA 切断等が起っている場合は、DNA 断片の大きさに応じて移動し、球形の核 DNA を頭に尾を引いたコメット(彗星)のような泳動パターンとなる。



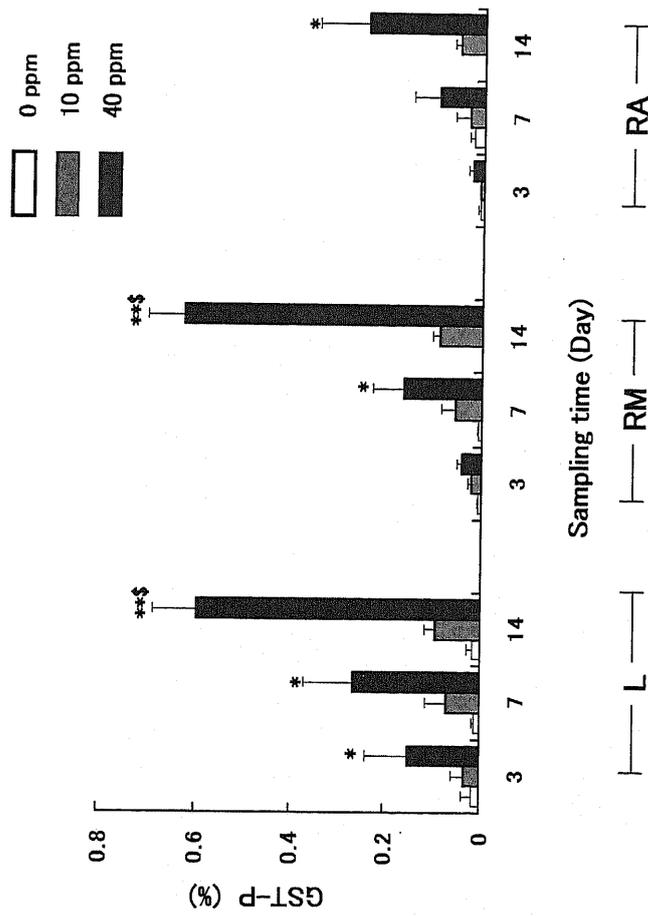
動物：WIST@Jcl(GALAS)雄性ラット 5 週齢

▲：各群 3, 7 及び 14 日に各群 6 匹の動物を経時的に屠殺

図IV-2 DEN 投与の幼若ラットの肝臓における DNA 損傷と GST-P 発現との関連性検討の試験設計



図IV-3 DEN 投与の幼若ラットの肝臓における DNA 損傷と GST-P 発現との関連性検討における肝臓の切り出し部位

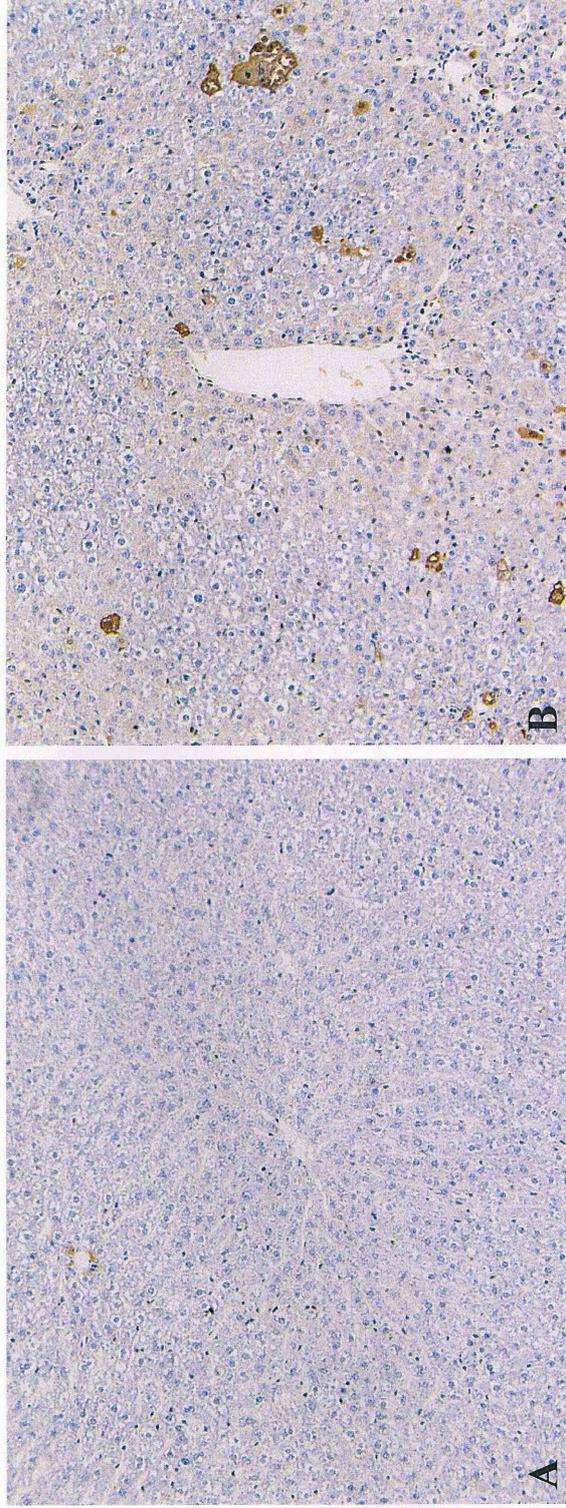


Mean ± SE (%)

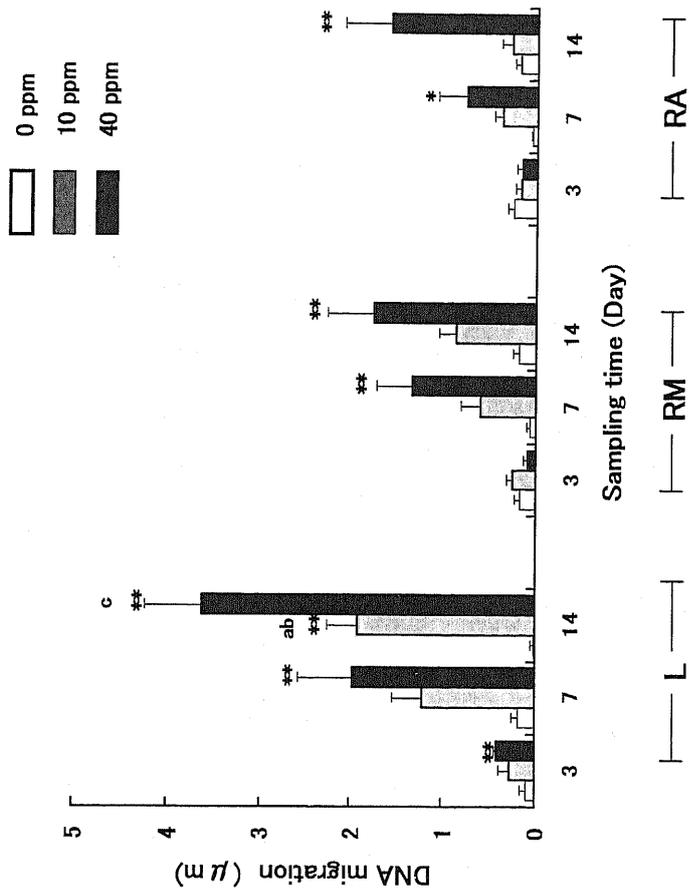
*, ** : Significantly different from the control at $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test)

‡: Significantly different from RM at the $p < 0.05$ (Tukey's test)

図IV-4 DEN投与の幼若ラットの肝臓における各葉のGST-P陽性細胞率。L:外側左葉、RM:内側右葉、RA:外側右葉。



図IV-5 DEN 投与の幼若ラットの肝臓における GST-P 免疫組織化学染色像 (外側左葉)。(A) 対照群 (14 日間投与)、(B) DEN 40ppm 群 (14 日間投与)。DEN 40ppm 群において GST-P 陽性細胞の増加が認められる。



Mean ± SE (μm)

*, **: Significantly different from the control at the $p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test)

a: Significantly different from RA (10 ppm) at the $p < 0.05$ (Tukey's test)

b: Significantly different from RM (10 ppm) at the $p < 0.05$ (Tukey's test)

c: Significantly different from RA (40 ppm) at the $p < 0.05$ (Tukey's test)

図IV-6 DEN投与の幼若ラットの肝臓におけるコメットアッセイでの各葉の細胞核DNA移動距離。L:外側左葉、RM:内側右葉、RA:外側右葉。

V. 第2部:ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討

V-1. 背景及び目的

銅は、ヒトや動物にとって必須の元素であり、様々な酵素の構成成分として酸素の運搬や酸化還元反応等に関与している(Aruoma et al., 1991)。一方、生体必須金属であっても、生体の恒常性維持の限界を超える量の暴露を受けた場合や、なんらかの原因で代謝機能が低下している場合、毒性作用が生じる(Valko et al., 2005)。一過性の暴露であれば、中毒症状を呈するが、長期間暴露された場合、ある種の金属では発がん性を有することが明らかにされている(Desoize, 2003; Leonard et al., 2004)。一方、ヒトに対する銅の発がん性は証明されていないが、動物への過剰な銅化合物の投与やLECラットで見られる肝臓への異常な銅蓄積は、酸化ストレスの発生を介し、肝炎あるいは肝発がんを誘発することが報告されている(Oikawa et al., 2001, 2003; Murata et al., 1999; Naito et al., 1994; Yamamoto et al., 1993)。

グルコン酸銅は、銅塩類の一つとして、人工栄養児の銅強化の目的で、日本では1983年に食品添加物に指定された。一方米国では、栄養強化を目的にサプリメント類、あめ類、飲料等に用いられており(HHS, 1997)、EUにおいても食品添加物ではなく食品成分扱いとされ(EC, 2001)、幅広く用いられている。日本においても、2004年に栄養機能食品として使用できるよう使用基準を改正が行われ、許容上限摂取量を銅として9 mg/ヒト/日と設定され、今後の使用拡大が予想される。グルコン酸銅の安全性については、Ames試験にて陰性であるが(Hujita et al., 1998)、動物を用いた反復投与毒性試験では、高用量投与群において肝障害等が認められている(Harrisson et al., 1954; Aburto et al., 2001)。一方、グルコン酸銅の発がんリスクの有無については、動物を用いた長期発がん性試験の報告はなく、未だ明らかではない。

長期発がん性試験は、多数のラットあるいはマウスを用い、1年半から2年間化学物質を投与し続け、全ての臓器及び組織について病理組織学的検査を実施し、投与群における腫瘍発生が対照群と比較し、増加しているか否かについて検査しなければならない。この試験法は、膨大なコストと人手を必要とすることから、より短期間に効率よく発がん性を評価できる代替法の確立が提唱され、中期発がん性試験法が開発されるに至った。この試験法は比較的短期間で、全身の主要臓器あるいは単一臓器に対する化学物質の発がん性の有無を評価することが可能であり、

長期発がん性試験の結果ともよく相関することが報告されている (Ito et al., 1988; Fukushima et al., 1991; Takahashi et al., 1992)。その中に全身諸臓器への発がん性を一括して検索できる試験法として、ラット中期多臓器発がん性試験がある。

中期多臓器発がん性試験では、DEN、*N*-methylnitrosourea (MNU)、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN)、1,2-dimethylhydrazine (DMH)、2,2'-dihydroxy-di-*n*-propylnitrosamine (DHPN)より成る計4週間のイニシエーション処置(それぞれの頭文字をとりDMBDD処置と呼ぶ)を施行した後、化学物質をプロモーション期に投与して、試験開始後28~30週で動物を屠殺し、全身臓器の病理組織学的検索を行い、化学物質投与による前がん病変あるいは腫瘍性病変数の変動を評価する。さらに、肝臓については、病理組織学的検索と合わせて、肝前がん病変であるGST-P陽性細胞巢の数及び大きさを指標に評価を行う。イニシエーション処置に用いるDENは肝臓、肺及び腎臓、MNUは神経系腫瘍、BBNは膀胱、DMHは消化管や膵臓、DHPNは甲状腺をそれぞれ主な標的臓器としている。

これらの背景から我々は、グルコン酸銅の発がんリスクについて明らかにすることを目的に、ラット中期多臓器発がん性試験を実施することとした。この試験を実施するにあたり、始めにグルコン酸銅の至適投与用量及び毒性メカニズム探索の方法を検討すべく、小規模な動物数を用い、中期多臓器発がん性試験の期間を約半分にした13週間の試験を行った。

検索項目として、血清、肝組織及び尿中の銅濃度測定、主要臓器の病理組織学的検索、さらに影響が予想される肝臓に焦点をあて、肝でのGST-P、8-oxoG、増殖性細胞核抗原(PCNA)及びメタロチオネイン(MT)免疫組織化学的染色並びに肝銅組織化学染色を実施した。MTは、重金属イオンに対して高い親和性を持つシステインを多く含むタンパク質であり、生体内の金属代謝、貯蔵、交換、金属解毒及び酸化剤からの防御に対し、重要な役割を担っている(Davis and Cousins, 2000)。MTは、高濃度の銅に曝露され銅ホメオスタシス機構が充分でなくなった場合、細胞内で発現が誘導され、二次的防衛機構として機能する(Danks, 1989)。銅と結合したMTは胆汁中に排泄される(Vallee and Brady., 1993)。そこでグルコン酸銅投与による肝臓での防御機構を明らかにするため、MT誘導について検索した。

V-2. 材料及び方法

化学物質

DEN、MNU、DMH 及び BBN は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.より購入した。DHPN は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan)、グルコン酸銅は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)より購入した。

動物

5 週齢の BrlHan:WIST@Jcl (GALAS) 雄性ラットを CLEA Japan, Inc.より 16 匹入手した。動物は 1 週間の検疫馴化期間後 6 週齢にて試験に供し、適切な無作為抽出法を用いて割り付けた。ラット中期多臓器発がん性試験法は通常 Fischer344 系ラットを使用するが (Ito et al., 1988; Fukushima et al., 1991; Takahashi et al., 1992)、今回 BrlHan:WIST@Jcl (GALAS) ラットを用いた。この系統は Fischer344 の代替として、国際的に毒性試験に供試されている系統のひとつである (King-Herbert and Thayer, 2006)。動物はバリアシステム内の温度及び湿度を制御した動物室内で飼育した。室内の環境は温度 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、換気回数 12 回/時、12 時間照明とした。動物は 1-3 匹ずつソフトチップを敷いたポリカーボネイト製のプラスチックケージに収容し、ケージ及びチップを週 1 回交換した。餌 (CE-2) 及び水は自由に摂取させた。

試験設計

6 週齢の動物を 6 群 (各群 1-3 匹) に無作為に分け、試験開始時より、ラット中期多臓器発がん性試験法に準拠した DEN (100mg/kg 体重、腹腔内投与 1 回)、MNU (20mg/kg 体重、腹腔内投与 4 回)、DMH (40mg/kg 体重、皮下投与 4 回)、BBN (0.05% 混水投与 2 週間) 及び DHPN (0.1% 混水投与 2 週間) より成る計 4 週間のイニシエーション処置 (DMBDD 処置) を施行すると共に、グルコン酸銅を 0、1000、3000、4800、6000 (各群 3 匹) あるいは 12000ppm (1 匹) の用量にて、粉末 CE-2 飼料に混じて 13 週間自由摂取させた (図 V-1)。グルコン酸銅の用量は、Harrisson ら (1954) 及び Aburto ら (2001) の報告を基に設定した。体重及び摂餌量を毎週測定し、試験開始から 13 週間後の全動物を以降の検索に供した。

動物の解剖

動物はエーテル麻酔下で腹部大静脈より採血し屠殺した後、血液を4℃に静置することで血清を分離した。また必要に応じて尿の採取を行った。肉眼的病理学検査の後、主要臓器及び組織を摘出し、肝臓重量を測定した。各臓器は10%中性緩衝ホルマリン液を用いて固定を行い、肺、食道、胃、腸、膀胱についてはホルマリン液を内腔に注入した。小腸及び大腸は、多くの領域を観察するためスライス標本作製した。肺は全葉、肝臓は3葉(外側左葉、内側右葉及び外側右葉)、食道及び膀胱は4箇所、その他の臓器はそれぞれ1箇所を切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋し、4μm切片を作成した。

病理組織学的、組織化学的及び免疫組織化学的検索並びに銅濃度測定

作成した臓器切片に対しHE染色を常法にて実施し、病理組織学的検索を行った。免疫組織化学的検索については、肝でのGST-P (Kishida et al., 2000)、8-oxoG (Nakae et al., 2000)、PCNA (Tsutsumi et al., 1995)及びMT (Jasani and Elmes, 1991)免疫染色をABC法にて実施した。脱パラフィン後、0.3% H₂O₂により15分間室温で処理し、一次抗体(抗ラットGST-Pウサギポリクローナル抗体: ×100倍希釈; 抗ヒトPCNAマウスモノクローナル抗体: Dako Japan Inc., Tokyo, Japan, ×100倍希釈; 抗ウマMTマウスモノクローナル抗体: Dako Japan Inc., ×50倍希釈)を添加し、1時間室温にて静置した。洗浄後、ビオチン結合抗ウサギIgG抗体あるいはビオチン結合抗マウスIgG(Vector Laboratories Inc.)を30分室温、次いでペルオキシダーゼ結合アビジンを30分室温にて処理し、0.04%ジアミノベンチジン溶液にて茶褐色に発色させた。8-oxoG染色の場合、10%硫酸亜鉛溶液(3分、95℃)、次いで2M塩酸(30分、37℃)にて処理した後、0.3% H₂O₂、次いで一次抗体(抗8-oxoGマウスモノクローナル抗体: Nikken Seil Co., Ltd., Tokyo, Japan, ×100倍希釈)を添加し、24時間4℃にて静置した。GST-P陽性細胞数及び面積並びに8-oxoG及びPCNA陽性細胞率の算出には、アイパップイメージアナライザーを用いた。

肝銅組織化学染色はロダニン法(Pearse, 1985)を用いた。薄切標本を脱パラフィン後に精製水にて湿潤し、5%酢酸ナトリウム水溶液100mlに

p

-ジメチルアミノベンジリデンロダニン(Wako

Pure Chemical Industries, Ltd.)の飽和アルコール溶液 3mlを加え混じた染色液中で、12-24 時間室温にて反応させた。また血清、肝組織及び尿中の銅濃度は、原子吸光分析装置を用いて測定した。

統計学的解析

体重、摂餌量、臓器重量、各銅濃度測定及び免疫組織化学的検索結果については、分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合に、Dunnett 法により対照群と各投与群を検定した。P 値が 0.05 以下の場合を有意な変化とした。

倫理面への配慮

本研究においては、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規、規則、ガイドライン等及び試験実施施設の規定に準拠し、適切な倫理面への配慮を行った。

V-3. 結果

試験期間中、全動物において死亡、症状の異常及び摂餌量の著変は認められなかった。しかし、グルコン酸銅 3000ppm 群以上で黒色糞が認められた。最終の体重に著変は認められなかった(表 V-1)。絶対及び相対肝重量は、6000ppm 群までは明らかな変化は認められなかったが、12000ppm 群では増加傾向が認められた(表 V-1)。肝臓は全群において、肉眼的に異常は認められず、また病理組織学的にも、0 から 4800ppm 群では著変は認められなかった。一方、6000ppm 群において軽度及び中等度の肉芽腫が認められ、さらに 12000ppm では、び漫性の肉芽腫及び肝細胞壊死が高頻度で認められた(図 V-2、表 V-2)。これらの肉芽腫は、主に単核細胞(マクロファージ及びリンパ球等)より構成され、一般的にこの週齢で認められる微小肉芽腫とは異なるものであった。肝臓以外の主要臓器及び組織では、グルコン酸銅投与による影響は認められなかった。

血清及び尿中銅濃度は、グルコン酸銅 4800ppm 群までは明らかな変化は認められなかったが、

6000ppm 群で増加傾向が認められ、さらに 12000ppm 群で明らかに増加した(表 V-3)。肝組織中銅濃度は、3000ppm 群までは低値であったが、6000ppm 群以上で高値を示した(表 V-3)。肝銅組織化学染色では、1000ppm 群までは陰性であったが、3000ppm 群で若干の陽性像が認められ、用量依存的に染色強度及びその範囲が増加した(表 V-3)。銅は肝細胞の細胞質中に赤色顆粒として認められ、高用量では肝組織中に慢性に分布していた(図 V-3A)。

MT 免疫染色の結果、対照群では 1 から 2 個の肝細胞の陽性像が散発的に認められたが、ほとんどの領域は陰性であった。一方、1000ppm 群以上では、肝小葉中心性に軽度の陽性を示し、4800 及び 6000ppm 群では、小葉中心性あるいは慢性に陽性を示し、12000ppm 群ではさらに増加した(図 V-3B、表 V-4)。8-oxoG 免疫染色では、対照群でも 8-oxoG 陽性の肝細胞核が僅かに認められるが、4800ppm 群までは明らかな変化は認められなかった。一方、6000ppm 群以上では、8-oxoG 陽性細胞が明らかに増加した(図 V-3C、D、表 V-4)。肝細胞の PCNA 陽性細胞率は、3000ppm 群から増加傾向を示し、4800ppm 群以上で明らかな増加を示した(図 V-4、表 V-4)。GST-P 陽性細胞巢の数及び総面積は、12000ppm 群で増加傾向を示した(図 V-5、表 V-5)。

V-4. 考察

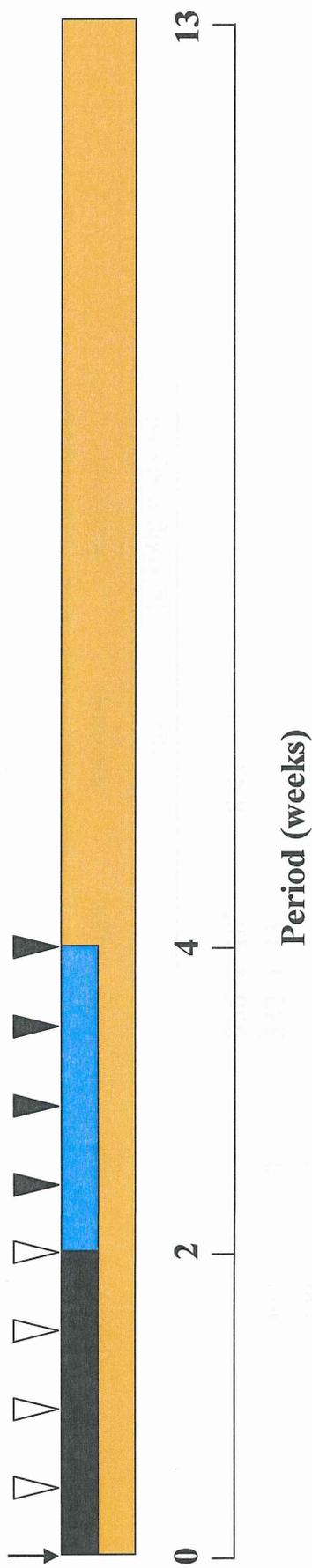
複数の発がん物質が投与された条件下であるが、体重、最終平均体重について群間に明らかな差がなかったことから、今回の試験条件では、死に至らしめる重篤なグルコン酸銅の毒性が現れなかったものと判断した。しかし、1000ppm 群以上で肝 MT 発現増加、3000ppm 群以上で黒色糞と肝での銅蓄積増加、6000ppm 群以上で肉芽腫、8-oxoG 及び細胞増殖活性の増加、12000ppm 群で血清及び尿中銅濃度の増加に加え、肝前がん病変の増加傾向が認められた。

本研究において、グルコン酸銅 1000 ppm より肝での MT 蛋白発現が増加したことから、比較的低いこの用量で既に銅負荷がかかり、MT 誘導による防御機構が働いていることが推察された。3000ppm では肝銅蓄積に伴い黒色糞が観察され、腸管での非吸収あるいは胆汁を介した過剰銅の体外への排泄がより顕著となった。さらに 6000ppm では肉芽腫が増加したことから、この用量では肝での銅排出機構の能力を超える過負荷により細胞障害を誘発し、肉芽腫は壊死細胞の除去反応として出現したものと推察された。12000ppm では血清及び尿中の銅レベルも増加し、肝の

処理能力を超える重篤な銅過負荷状態に立ち至ったものと判断された。一方、ラットにグルコン酸銅を約 11000ppm の用量で 40-44 週間混餌投与した報告があり、35 週までに 83%が死亡し、肝臓において著名な銅蓄積が認められた(Harrisson et al., 1954)。本研究では、13 週間の 12000ppm の投与において死亡は認められなかったが、さらに長期間の投与では肝臓への過剰な銅蓄積により、肝障害が重篤化し、死亡に至るものと推察された。また、12000ppm 群では肝前がん病変が増加したことから、グルコン酸銅の高用量暴露では発がんリスクを増加させる可能性が推察された。

6000ppm 群以上で 8-oxoG が増加したことから、グルコン酸銅の肝毒性発現に酸化ストレスが関与しているものと推察された。一方、肝細胞増殖活性の増加は、肝細胞壊死に対する再生性の変化と考えられた。

以上の結果より、グルコン酸銅は、複数の発がん物質を投与した条件下ながら、比較的低い用量より、単独でも肝臓に影響を及ぼすことが判明した。また、グルコン酸銅の暴露が肝における代謝能力を超え、細胞傷害が明らかとなる用量は、6000ppm であるものと判断された。今回の結果を基に、中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅の最高用量は 6000ppm と設定した。



動物: WIST@Jcl(GALAS)雄性ラット 6 週齢

↓ : DEN(100mg/kg 体重、腹腔内投与 1 回)

▽ : MNU(20mg/kg 体重、腹腔内投与 4 回)

▽ : DMH(40mg/kg 体重、皮下投与 4 回)

■ : BBN(0.05%混水投与 2 週間)

■ : DHPN(0.1%混水投与 2 週間)

■ : グルコン酸銅混餌投与 0、1000、3000、4800、6000、12000ppm

図 V-1 ラット中期多臓器発がん性試験におけるグルコン酸銅投与用量検討の試験設計

表 V-1 ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討における最終体重及び肝重量

Group	Dose (ppm)	No. of rats	Final body weight (g)	Liver weight	
				Absolute (g)	Relative (g/100g body wt)
1	0	3	356 ± 18 ^a	8.49 ± 0.78	2.38 ± 0.17
2	1000	3	342 ± 13	7.90 ± 0.32	2.31 ± 0.01
3	3000	3	386 ± 35	8.43 ± 0.42	2.19 ± 0.09
4	4800	3	358 ± 42	8.76 ± 1.18	2.44 ± 0.05
5	6000	3	336 ± 44	8.71 ± 0.75	2.60 ± 0.12
6	12000	1	367	13.70	3.60

a: Mean ± SD.

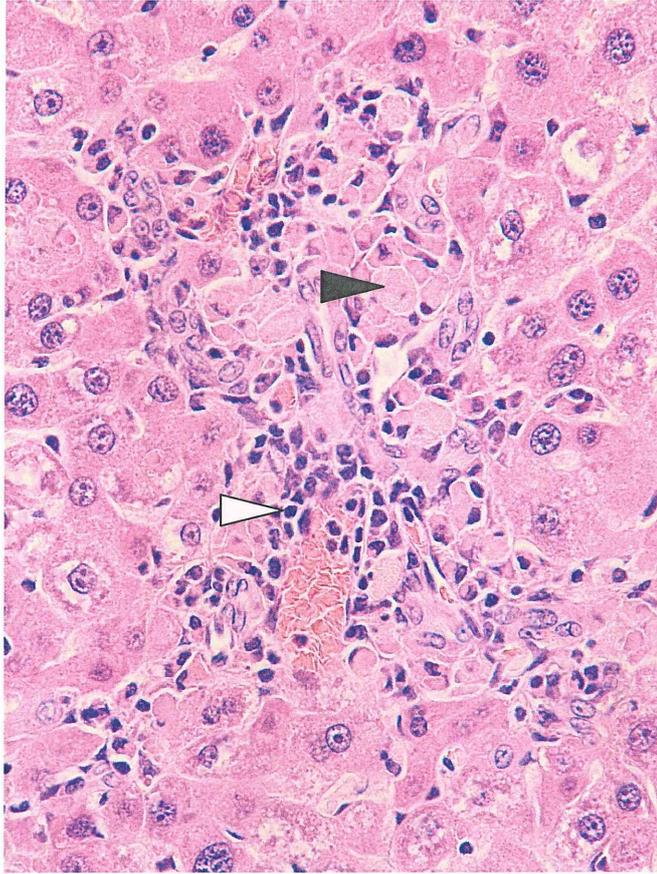


図 V-2 ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討におけるグルコン酸銅12000ppm群の肝HIE染色像。12000ppmではび慢性に肉芽腫が認められる。これらは主に単核細胞(マクロファージ[▼]及びリンパ球[▽]等)より構成され、一般的にこの週齢で認められる微小肉芽腫とは異なるものである(×400)。

表 V-2 ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討における肝肉芽腫の病理組織学的検索結果

Group	Dose (ppm)	No. of rats	Grade of granulomas				
			-	±	+	++	
1	0	3	3	0	0	0	
2	1000	3	3	0	0	0	
3	3000	3	3	0	0	0	
4	4800	3	3	0	0	0	
5	6000	3	0	2	1	0	
6	12000	1	0	0	0	1	

Grade of changes: -; none, ±; slight, +; moderate, ++; marked.

表 V-3 ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討における血清, 尿及び肝組織中銅濃度並びに肝銅組織化学的検査結果

Group	Dose (ppm)	No. of rats	Copper concentration			Liver copper staining grade			
			Serum (µg/dL)	Urine (µg/dL)	Liver (µg/g wet tissue)	-	±	+	++
1	0	3	119.7 ± 5.5 ^a	26.3 ± 11.8	4.3 ^b	3	0	0	0
2	1000	3	108.7 ± 5.5	54.7 ± 16.1	NE	3	0	0	0
3	3000	3	100.0 ± 11.4	44.0 ± 16.6	5.4	0	3	0	0
4	4800	3	104.3 ± 9.7	NE	NE	0	0	3	0
5	6000	3	137.0 ± 15.5	77.7 ± 36.1	252.4	0	0	2	1
6	12000	1	287.0	199.0	453.2	0	0	0	1

a: Mean ± SD.

b: Determined for 1 rat in each group.

NE: Not examined

Grade of changes: -, none, ±, slight, +, moderate, ++, marked.

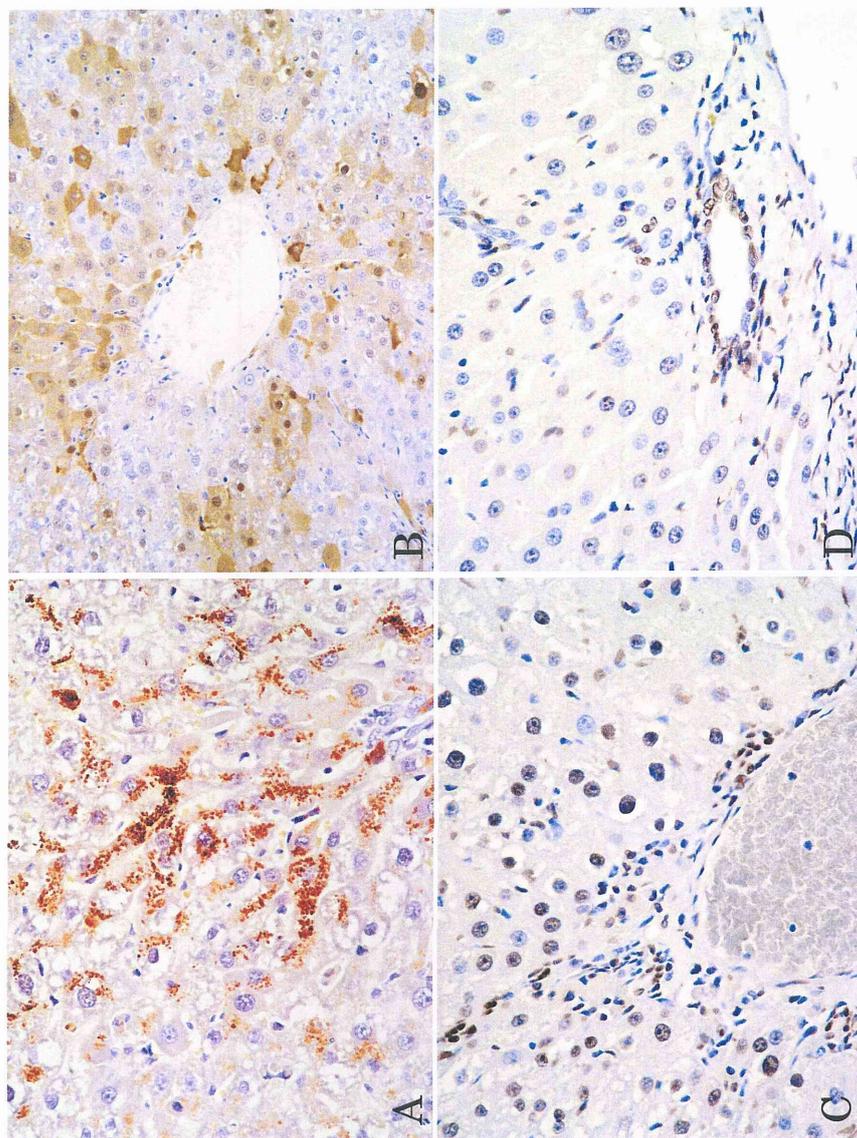


図 V-3 ラット中期多臓器発がん試験のグルコン酸銅投与用量検討におけるグルコン酸銅 12000ppm 群における肝銅組織化学染色像及び MT 並びに 8-oxoG 免疫組織化学染色像。(A)銅染色像(×400)、(B)MT 染色像(×200)、(C)8-oxoG 染色像(×400)、(D)対照群における 8-oxoG 染色像(×400)。

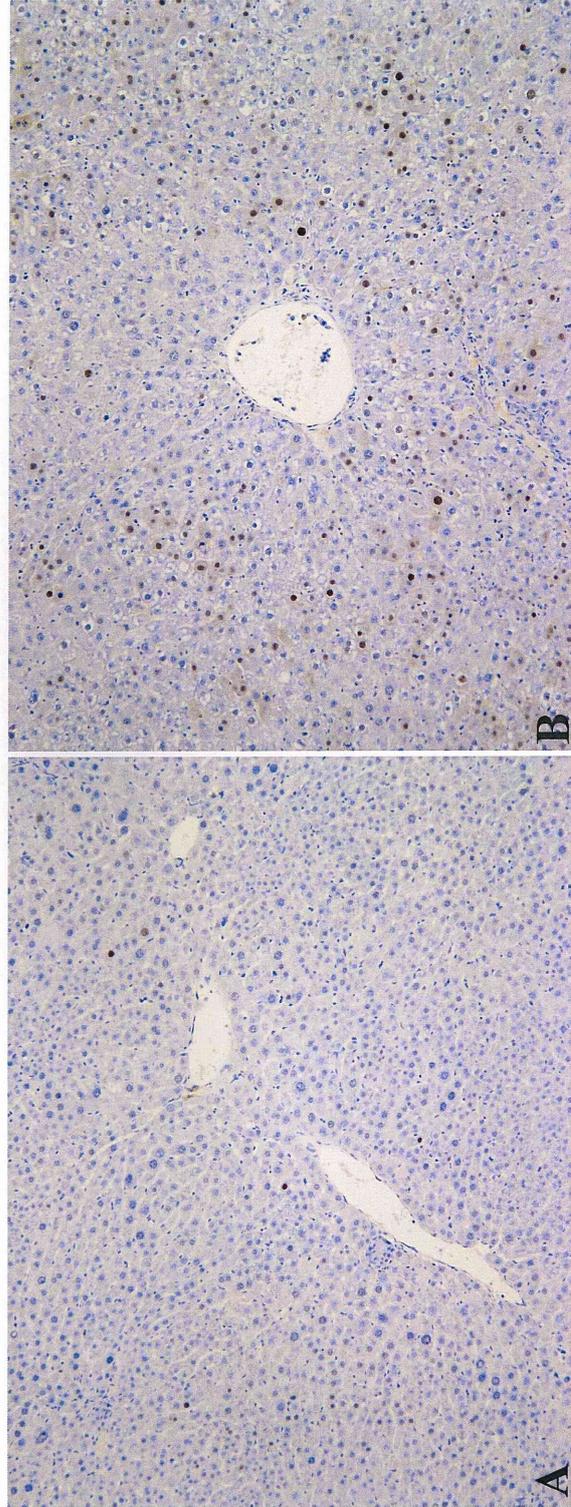
表 V-4 ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討における肝 MT, 8-oxoG 及び PCNA 免疫組織化学的検索結果

Group	Dose (ppm)	No. of rats	MT staining grade				8-oxoG positive index (%)	PCNA positive index (%)
			-	±	+	++		
1	0	3	3	0	0	0	0.09 ± 0.05	
2	1000	3	0	3	0	0	0.09 ± 0.08	
3	3000	3	0	3	0	0	0.25 ± 0.17	
4	4800	3	0	0	3	0	0.66 ± 0.35*	
5	6000	3	0	0	3	0	0.59 ± 0.18*	
6	12000	1	0	0	0	1	58.5	

a: Mean ± SD.

Grade of changes: -; none, ±; slight, +; moderate, ++; marked.

*: Significantly different from group 1 (p<0.05).



図V-4 ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討における肝PCNA免疫組織化学染色像。(A)対照群(×100)、(B)グルコン酸銅 12000ppm 群(×100)。

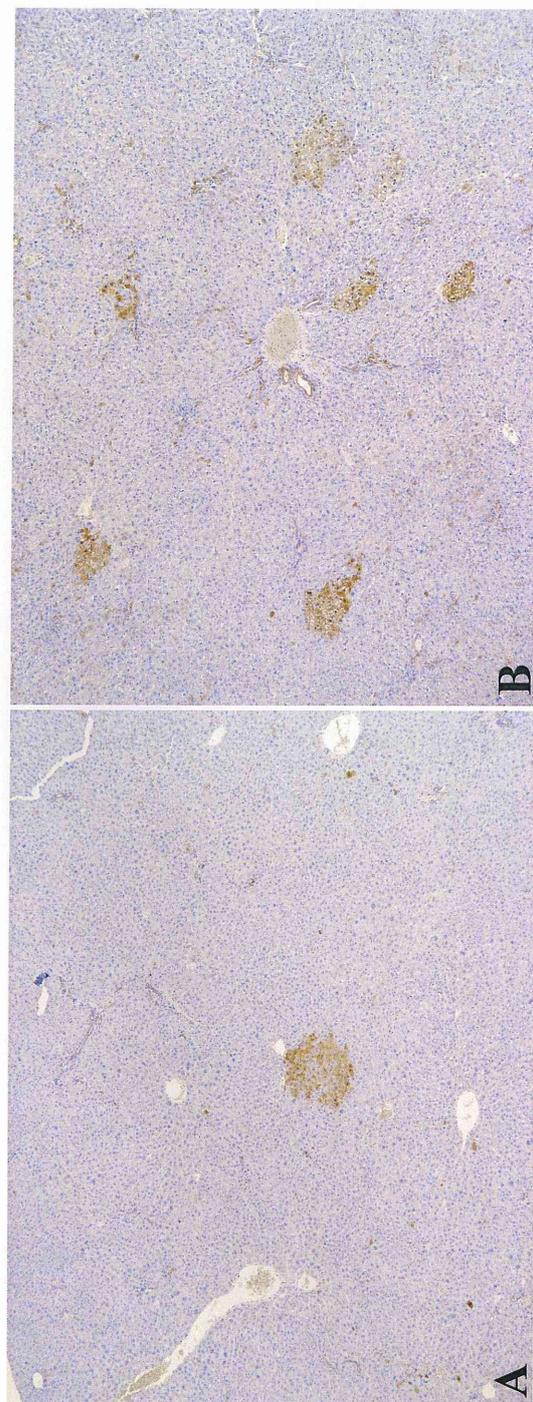


図 V-5 ラット中期多臓器発がん試験のグルコン酸銅投与用量検討における肝 GST-P 免疫組織化学染色像。(A)対照群(×40)、(B)グルコン酸銅 12000ppm 群(×40)。

表V-5 ラット中期多臓器発がん性試験のグルコン酸銅投与用量検討における肝 GST-P 陽性細胞巢の数及び面積

Group	Dose (ppm)	No. of rats	Number (No./cm ²)	Mean area (mm ²)	Occupancy (mm ² /cm ²)
1	0	3	15.3 ± 8.3 ^a	0.015 ± 0.006	0.25 ± 0.17
2	1000	3	9.3 ± 10.5	0.017 ± 0.008	0.13 ± 0.12
3	3000	3	7.0 ± 4.9	0.008 ± 0.002	0.06 ± 0.05
4	4800	3	14.5 ± 4.8	0.019 ± 0.010	0.30 ± 0.22
5	6000	3	14.6 ± 2.4	0.011 ± 0.002	0.16 ± 0.06
6	12000	1	26.9	0.019	0.50

a: Mean ± SD.

VI. 第3部:ラット中期多臓器発がん性試験を用いたグルコン酸銅及びカテキンの単独または複合投与による発がんリスクの検索

VI-1. 背景及び目的

グルコン酸銅は、米国やEUでは、栄養強化材として様々な食品に添加されている(HHS, 1997; EC, 2001)。一方日本では、近年まで母乳代替食品以外の食品への使用が認められていなかったが、2004年に栄養機能食品として使用できるよう使用基準の改正が行われ、今後の使用拡大が予想される。グルコン酸銅は、Ames試験にて陰性(Hujita et al., 1998)、各種動物を用いた反復投与毒性の高用量投与群において、肝障害等が認められている(Harrisson et al., 1954; Aburto et al., 2001)。また、肝臓に銅が異常に蓄積するLECラットでは、銅による酸化ストレスにより肝炎及び肝がんを発症することが報告されている(Yamamoto et al., 1993)。これらのことから、銅化合物は高用量の暴露条件では、発がんリスクを有する可能性が推察されるが、グルコン酸銅の発がんリスクの有無については、動物を用いた長期発がん性試験の報告はなく、未だ明らかではない。

カテキン類は、ツバキ科チャの茎及び葉、マメ科ペグアセンヤクの幹枝、アカネ科ガンビールの幹枝及び葉等に含まれているポリフェノール化合物の総称である。これに含まれるカテキン類として、カテキン、エピカテキン、ガロカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレート等が挙げられる(図III-4)。これ以降、カテキン類を総称しカテキンと呼ぶこととする。カテキンは、これまでに抗酸化作用あるいは発がん抑制作用をはじめとする種々の作用を示すことが報告され(Scaltriti et al., 2006; Morley et al., 2005; Weyant et al., 2001)、それらに好影響に基づいて、水産加工品・食肉加工品・菓子類・油脂・清涼飲料水等に食品添加物(酸化防止剤としても)として使用されている。一方、カテキンに対する安全性評価としては、変異原性試験及び反復投与試験が実施されており、変異原性試験では、Ames試験にて陽性、ハムスター培養細胞を用いた染色体異常試験にて弱陽性、in vivoでのマウス染色体異常試験にて陰性の結果が得られている(Hayashi et al., 2000)。しかしながら最近の報告では、変異原性が無いか弱い(Chang et al., 2003; Isbrucker et al., 2006; Sugisawa et al., 2004)、あるいは抗変異原性とも言われている(Sugisawa et al., 2004; Bunkova et al., 2005; Geetha et al., 2004; Ohsawa et al., 2001;

Sasaki, 2003)。ラットを用いた反復投与試験では、1.25%以上の用量群で投与による影響が認められ、現在ラットを用いた1年間慢性毒性試験と2年間発がん性試験が行われている。

一方、カテキンは、*in vitro*において銅との相互作用により酸化的DNA損傷である8-oxoGを生成することが報告されている(Oikawa et al., 2003)。もし同様の作用が*in vivo*で起こるならば、複合影響による毒性が大きな問題として提起される。なぜならば、これらの酸化ストレスは、腫瘍を含む様々な疾患の進行に関与していると考えられているためである(Hunina and Oliinyk, 2006)。しかしながら、動物を用いた*in vivo*でのカテキンと銅との複合影響について、実際に発がんリスクが増大するか否かについては、未だ明確な結論はない。

これらの背景から我々は、ラット中期発がんモデルを用いてグルコン酸銅とカテキンの単独または複合投与による発がんリスクについて検索することを目的とした。第2部では、中期多臓器発がん性試験法を実施するにあたり予備的な試験を行い、本試験におけるグルコン酸銅の最高用量を6000ppmと決定した。第3部では、グルコン酸銅とカテキンの単独または複合投与による影響について、中期多臓器発がん性試験法を用いて全身臓器の検索を行った。

本試験の検索項目として、血清及び肝組織中の銅濃度測定、主要臓器の発がん性に着目した病理組織学的検索、さらに肝でのGST-P、8-oxoG、PCNA、アポトーシスの観察のためのterminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-uridinetriphosphate-biotin nick end-labeling (TUNEL)免疫組織化学染色並びに肝銅組織化学染色を行った。

VI-2. 材料及び方法

化学物質

DEN、MNU、DMH及びBBNはTokyo Chemical Industry Co., Ltd.より購入した。DHPNはNacalai Tesque、グルコン酸銅はWako Pure Chemical Industries, Ltd.より購入した。カテキン(サンフェノン100S)は、Taiyo Kagaku Co., Ltd. (Mie, Japan)より供与された。本製品は緑茶抽出物であり、全ポリフェノール含量は89.0%、カテキン及びカフェイン含量は、それぞれ74.1%、0.1%であった。この製品は、(+)-カテキン[1.5%]、(+)-エピカテキン[4.4%]、(+)-ガロカテキン[0.9%]、(-)-エピガロカテキン[9.1%]、(-)-エピカテキンガレート[13.5%]、(-)-エピガロカテキンガレート

[43.0%]、(-)ガロカテキンガレート[1.6%]及び(-)-カテキンガレート[0.1%]より構成される (Hara-Kudo et al., 2005; Zhong et al., 2002) (図III-4)。

動物

5週齢のBrlHan:WIST@Jcl(GALAS)雄性ラットをCLEA Japanより174匹入手した。動物は1週間の検疫馴化期間後6週齢にて試験に供し、適切な無作為抽出法を用いて割り付けた。動物はバリアシステム内の温度及び湿度を制御した動物室内で飼育した。室内の環境は温度25±5℃、湿度50±10%、換気回数12回/時、12時間照明とした。動物は3匹ずつソフトチップを敷いたポリカーボネイト製のプラスチックケージに収容し、ケージ及びチップを週1回交換した。餌(CE-2)及び水は自由に摂取させた。

試験設計

6週齢の動物を16群(各群9-12匹)に無作為に分け、1-10群はDEN(100mg/kg体重、腹腔内投与1回)、MNU(20mg/kg体重、腹腔内投与4回)、DMH(40mg/kg体重、皮下投与4回)、BBN(0.05%混水投与2週間)及びDHPN(0.1%混水投与2週間)より成る計4週間のイニシエーション処置(DMBDD処置)を施した後、1-5群では、直ちに0、10、300、3000あるいは6000ppmのグルコン酸銅混餌投与を試験終了時まで実施した(各群12匹)(図VI-1)。試験用量は、第2部の用量検討試験及びHarrissonら(1954)並びにAburtoら(2001)の報告を基に設定した。グルコン酸銅10ppmは、ヒトでの一日あたりの銅許容上限摂取量に相当する。さらに6-10群では、DMBDD処置後直ちに0、10、300、3000あるいは6000ppmのグルコン酸銅を投与するとともに、5000ppmのカテキン飲水投与をDMBDD処置後1週間目から試験終了時まで実施した(各群9-12匹)。カテキンの用量は、90日間反復投与試験(広瀬班厚生労働省報告書、国立医薬品食品衛生研究所、東京、日本)の結果を基に設定した。11-16群(各群9匹)では、DMBDD無処置にて、試験開始4週終りから試験終了時まで、11-13群では、0、3000あるいは6000ppmのグルコン酸銅投与、14-16群では、0、3000あるいは6000ppmのグルコン酸銅投与とともに5000ppmのカテキン投与を実施した。体重及び摂餌量を1-2週間ごとに、飲水量は3-4日ごとに測定した。

試験期間中動物は、死亡または切迫例が認められた場合直ちに剖検し、試験開始から 29 週間後の計画解剖時の全生存動物を有効動物数とし以降の検索に供した。

動物の解剖

動物はエーテル麻酔下で腹部大静脈より採血し屠殺した後、血液を 4°C に静置することで血清を分離した。肉眼的病理学検査の後、主要臓器及び組織を摘出し、肝臓及び腎臓重量を測定した。各臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて固定を行い、肺、食道、胃、腸、膀胱についてはホルマリン液を内腔に注入した。小腸及び大腸は多くの領域を観察するためスイスロール標本作製した。肺は全葉、肝臓は 3 葉(外側左葉、内側右葉及び外側右葉)、食道及び膀胱は 4 箇所、その他の臓器はそれぞれ 1 箇所を切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋し、4 μ m 切片を作成した。

病理組織学的、組織化学的及び免疫組織化学的検索並びに銅濃度測定

作成した臓器切片に対し HE 染色を常法にて実施し、前がん病変あるいは腫瘍性病変について病理組織学的検索を行った。免疫組織化学的検索については、肝での GST-P、8-oxoG、PCNA 及び TUNEL (Gold et al., 1994) 免疫染色を第 2 部と同様に ABC 法にて実施した。TUNEL 染色については、In situ 細胞死検出キット (Roche Diagnostics, Indiana, USA) を用いた。脱パラフィン後、20 μ g/ml プロテアーゼ K 溶液 (37°C、30 分) にて処理し、次いで標識 TUNEL 反応液 (ターミナルトランスフェラーゼ及びフルオレセイン標識ヌクレオチドの混合溶液) (60 分、37°C) にて処理した。一次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗フルオレセインヒツジポリクローナル抗体: Roche Diagnostics, $\times 50$ 倍希釈) を添加し、30 分 37°C にて静置した後、0.04% ジアミノベンチジン溶液にて茶褐色に発色させた。GST-P 陽性細胞数及び面積並びに 8-oxoG、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞率の算出には、アイパップイメージアナライザーを用いた。

第 2 部と同様に、肝銅組織化学染色はロダニン法を、血清及び肝組織の銅濃度測定は、原子吸光分析装置を用いた。

統計学的解析

体重、摂餌量、臓器重量、各銅濃度測定及び免疫組織化学的検索結果については、分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合に、Dunnett 法により対照群と各投与群を検定した。P 値が 0.05 以下の場合を有意な変化とした。中期多臓器発がん性試験の病理組織学的検索結果については、Fischer の直接確率検定法を用いて検定した。

倫理面への配慮

本研究においては、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規、規則、ガイドライン等及び試験実施施設の規定に準拠し、適切な倫理面への配慮を行った。

VI-3. 結果

試験期間中、DMBDD 処置後に発がん剤投与の影響と考えられる死亡または切迫殺が、各群数例ずつ認められた(表VI-1)。そのため 1-10 群の有効動物数は、それぞれ 11、11、11、10、12、11、9、7、10 及び 11 匹となった。DMBDD 無処置群では、全動物が試験期間満了まで生存したため、有効動物数は各群 9 匹となった。しばしば DMBDD 処置により多少の死亡例が認められることがあるが、通常このような死亡例は統計学的有意にはならず、結果の解析にも悪影響は与えることはない。

摂餌量、最終体重、相対肝重量及び相対腎重量に著変は認められなかったが(表VI-1)、飲水量がカテキン群において、DMBDD 処置の有無に関わらず有意に低下した。これはカテキンの悪味による飲水忌避による影響と推察された。グルコン酸銅の摂取量は、投与量に比例し増加し、カテキン併用投与あるいは DMBDD 処置の有無の影響は認められなかった(表VI-2)。グルコン酸銅 10ppm 群の銅摂取量は、基礎飼料中の銅濃度(約 10ppm)と合わせると、約 8mg/ヒト/日に相当し、ヒトの銅摂取目安 5mg/日及び許容上限摂取量 9mg/日の範囲内にある。一方、カテキン 5000ppm 群のカテキン摂取量(表VI-2)は、約 20g/ヒト/日であり、一般的なカテキン含有の健康食品に表示される摂取目安である 500-1000mg/日の約 20-40 倍に相当する。

血清中銅濃度は、DMBDD 処置の有無に関わらず著変は認められなかった(表VI-3)。一方、肝組織中銅濃度は 0-300ppm 群では低値であったが、3000ppm 群で増加傾向を示し、6000ppm 群では有意に増加した(表VI-3)。さらにグルコン酸銅 6000ppm カテキン併用群では、同濃度の単独群と比較し、肝組織中銅濃度が高い傾向を示した(表VI-3)。DMBDD 無処置群では、グルコン酸銅 6000ppm 群及びその併用群で肝組織中銅濃度が増加したが、その程度は DMBDD 処置群と比較し低値であった(表VI-3)。肝銅組織化学染色では、対照群及びグルコン酸銅 10ppm 群では陰性であったが、300ppm 群で陽性染色像が認められ、3000ppm 群以上でさらに染色強度及び範囲の増加が認められた(図VI-2、表VI-3)。銅は肝細胞の細胞質内に赤色顆粒として認められ、3000 及び 6000ppm 群では、肝組織中にび慢性に認められた。肝銅組織化学染色に対するカテキン併用投与の明らかな修飾作用は認められなかった。DMBDD 無処置群では、3000ppm 群で若干の陽性、6000ppm 群でさらに増加したが、その程度は DMBDD 処置群と比較し軽度であった(表VI-3)。

全身諸臓器について、病理組織学的あるいは免疫組織化学的に検索した結果、肝臓及び前胃以外の臓器では、前がん病変あるいは腫瘍性病変に対するグルコン酸銅またはカテキンによる修飾作用は認められなかった(表VI-4)。

肝臓では、GST-P 陽性細胞巢数が、DMBDD 処置群のグルコン酸銅 10ppm 群では、影響が認められなかったが、300ppm 群以上で有意に増加した(表VI-5)。一方、カテキン群では、単独では影響を示さず、併用群においてグルコン酸銅 300ppm 群以上で認められた統計学的に有意な陽性細胞巢数の増加を無効にした(表VI-5)。DMBDD 無処置群では、僅かな数の陽性細胞巢が観察されたが著変は認められなかった(表VI-5)。また、GST-P 陽性細胞巢1個あたりの面積及び総面積は、全投与群において著変は認められなかった(表VI-5)。8-oxoG 陽性肝細胞は DMBDD 処置の全群で認められたが、グルコン酸銅 300ppm 群からその陽性率が増加し始め、6000ppm 群で有意に増加した(表VI-5)。8-oxoG 陽性肝細胞は、前がん病変あるいは周囲組織の区別なくび慢性に認められた。カテキン群では、単独では影響を示さず、グルコン酸銅 300ppm 以上による 8-oxoG 陽性率の増加を抑制する傾向が認められた(表VI-5)。DMBDD 無処置群では、対照群で 8-oxoG 陽性肝細胞が認められず、グルコン酸銅 6000ppm 群で若干の陽性率の増加傾向を示したが、その程度は弱く有意な変化ではなかった(表VI-5)。PCNA 陽性肝細胞は、DMBDD 処置群において無処置群と比較し明らかに増加していたが、各群間での著変は認めら

れなかった(データは示していない)。一方、TUNEL 陽性率は全群通して著変は認められなかった(データは示していない)。

前胃では、DMBDD 処置群において前胃境界縁の過形成病変が、グルコン酸銅 6000ppm 群で頻度及び程度ともに増加した(図VI-3、表VI-6)。一方、カテキン群では単独では影響を示さず、グルコン酸銅 6000ppm との併用群において過形成の有意な抑制が認められた。

VI-4. 考察

ラット中期多臓器発がん性試験において、グルコン酸銅は肝臓及び前胃に対し高用量で発がんリスクを有することが示された。一方、カテキンは単独では発がんリスクを示さず、複合投与によりグルコン酸銅の発がんリスクを軽減する可能性があることが明らかとなった。

GST-P 陽性細胞巢数が、DMBDD 処置群のグルコン酸銅 300ppm 群以上で有意に増加した。肝臓銅濃度はグルコン酸銅 3000ppm 群において $23.8 \mu\text{g/g}$ 湿重で増加傾向を示し、6000ppm 群では、 $117.1 \mu\text{g/g}$ 湿重と有意に増加した。LEC ラットでは、肝臓中に銅が定常的に $200\text{--}300 \mu\text{g/g}$ 湿重程度蓄積し、重篤な肝障害や肝細胞腫瘍を誘発する(Yamamoto et al., 1993; Hattori et al., 1995; Sawaki et al., 1998)。一方、penicillamine や trientine のような銅キレート剤投与により、LEC ラットの肝発がんは抑制される(Jong-Hon et al., 1993; Sone et al., 1996)。それ故、肝臓内の銅蓄積は、グルコン酸銅の発がんリスク増加に関連していると考えられる。高用量の銅を摂取した場合、過剰な部分は取り込まれず、また吸収された銅は主に肝臓で代謝され、余剰は胆汁そして糞として排出される(Pena et al., 1999)。今回の試験で、DMBDD 処置のグルコン酸銅 3000 あるいは 6000ppm 群において、組織化学的に明らかな銅の蓄積と黒色糞が認められた。これらのことから、DMBDD 処置条件下において、グルコン酸銅 3000ppm 以上の投与では、銅処理能力を超えているものと推察した。さらに組織化学的検索により、肝臓中銅濃度や黒色糞が認められないグルコン酸銅 300ppm でも、すでに肝臓への銅蓄積が始まっていることが明らかになった。グルコン酸銅の継続的な投与により、高用量投与でみられるような著明な銅蓄積がないとしても、肝細胞への継続的な銅取り込みと排出は、肝発がん促進に重要な役割を担っている可能性が推察された。

DMBDD 処置群において、肝臓での銅蓄積は、8-oxoG 陽性率と同様に、グルコン酸銅用量依

存的に増加した。銅は酸化ストレスを誘導し、細胞や組織に障害を与えることが *in vitro* あるいは *in vivo* の実験から明らかになっている (Oikawa et al., 2001, 2003; Murata et al., 1999; Naito et al., 1994; Yamamoto et al., 1993)。さらに酸化ストレスは、LEC ラットにおける肝毒性及び肝発がん性に重要な役割を果たしていることが報告されている (Yamamoto et al., 1993)。これらのことから、グルコン酸銅の肝発がん促進作用は、銅の過剰供給による肝臓での酸化ストレス誘導が関与していると推察された。

しかしながら、GST-P 陽性細胞数、8-oxoG 陽性率や銅蓄積とは異なり、グルコン酸銅の用量依存的な増加を示さず、300ppm でプラトーに達していた。8-oxoG は主要な酸化的 DNA 付加体であるが、ほかにも 20 種類以上の酸化的 DNA 付加体が存在する (Cooke et al., 2003)。さらに酸化ストレスは、DNA のみではなく、さまざまな生体物質に対し作用することから (Klaunig et al., 1998)、8-oxoG の動向だけでは、全ての細胞性酸化ストレス障害の程度を示唆することはできない。一方、銅の生体内での増加は、酸化ストレスを誘導するが、最終的な組織内での酸化還元の均衡は、様々な因子により規定される。以上のことから、銅による酸化ストレスは、グルコン酸銅の発がん作用に重要な役割を有しているが、未知の要素 (銅依存的あるいは非依存的、他の酸化ストレスあるいは生体防御、細胞死等) が関与している可能性も推察された。さらに今回の試験では、グルコン酸銅による細胞増殖活性あるいはアポトーシスの変化は認められず、肝発がん性への酸化ストレスや他の因子の関与について、十分に明らかにすることはできなかった。グルコン酸銅の肝発がん促進作用について更なるメカニズム解明が必要である。

DMBDD 無処置群において、グルコン酸銅は顕著な銅蓄積や 8-oxoG 生成あるいは肝臓や前胃での前がん病変を誘導しなかった。DMBDD 処置群の肝臓は、肝毒性を有する発がん剤により暴露されることで、肝代謝機能低下が起こり、グルコン酸銅の代謝が容易に障害されると推察された。一方、DMBDD 無処置群では、肝臓の代謝機能は正常であるため、グルコン酸銅の暴露に対して耐性を示すと考えられた。

DMBDD 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群において、前胃過形成の頻度及び程度が有意に増加した。前胃境界線における扁平上皮の角化亢進を伴う過形成は、硫酸銅の 2 あるいは 13 週間投与のラット及びマウスでの発生が報告されている (Hebert, 1993)。銅化合物は、一般的に前胃に対し毒性作用を有すると考えられ、銅の過剰摂取による酸化ストレスの関与が推察された。

一方、肝 GST-P 陽性細胞数及び前胃過形成病変以外に、他の臓器においてグルコン酸銅に

よる前がん病変あるいは腫瘍性病変に対する修飾作用は認められなかった。肝臓は銅の主な貯蔵部位であること(Pena et al., 1999)、前胃は食物を一時的に貯蔵する器官であることから、銅による暴露を長時間受けていることが推察された。一方、それ以外の臓器では、過剰な銅蓄積は生じにくく(Pena et al., 1999)、従って銅による作用が顕現しなかったものと推察された。

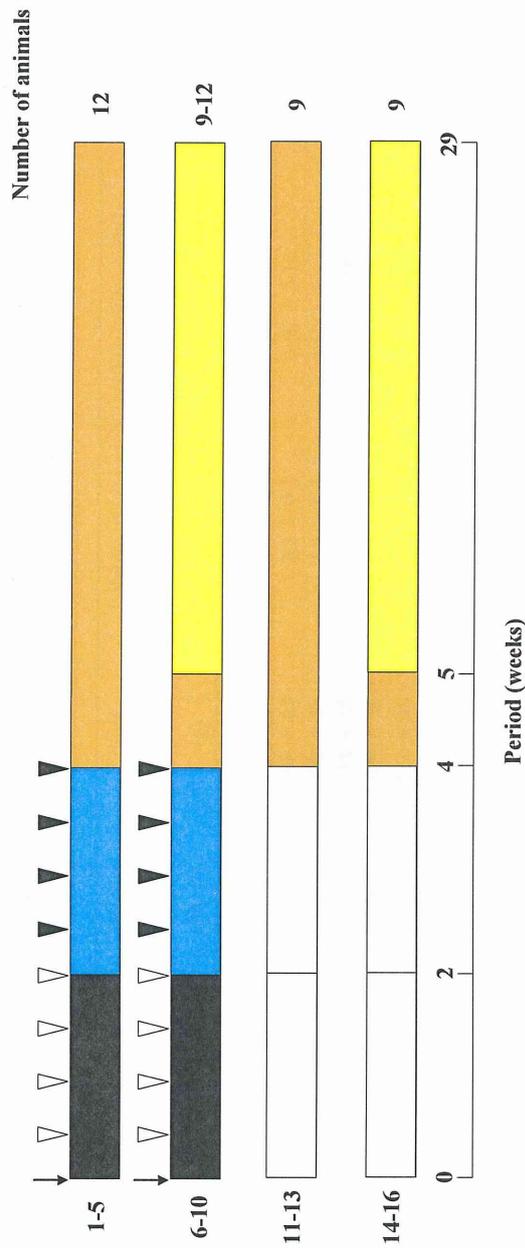
カテキンは、発がんの抑制あるいは予防効果を有することが報告されている(Scaltriti et al., 2006; Morley et al., 2005; Weyant et al., 2001)。一方、DMH によりイニシエーション処置したラットにおいて、カテキン(0.1%混餌投与)は大腸がんを促進させることや(Hirose et al., 2001)、Fischer344 系ラットによる中期肝発がん性試験において、カテキン(0.1、1.0%混餌投与)は、GST-P 陽性細胞巣を増加させることが報告されている(Hirose et al., 1993)。しかしながら、前者の実験では用量相関性が明らかではなく、後者ではその作用が弱いものであり、いずれも発がん促進作用を明確に示したものではない。カテキンの毒性あるいは発がん性抑制効果は、抗酸化作用及び抗炎症作用に基づくことが一般的に考えられている(Abe et al., 2005)。カテキンは、 $\cdot\text{OH}$ や O_2^- を捕捉し(He et al., 2007; Anjaneyulu et al., 2003)、マウスにおいて、tamoxifen 投与により誘導した肝臓での酸化ストレスを抑制することや(Parvez et al., 2006)、ラットにおいて、2-nitropropan あるいは DEN により誘導した肝毒性及び肝発がんに対し抑制作用を示すとともに、肝臓の 8-oxoG レベルを低下させることが報告されている(Hasegawa et al., 1995; Tamura et al., 1997)。一方、カテキンは *in vitro* において、銅イオン存在下で 8-oxoG を生成することが報告されており(Oikawa et al., 2003)、*in vitro* の作用が *in vivo* でも起こった場合、グルコン酸銅とカテキン複合投与は、8-oxoG 生成を促進し発がんリスクを増大させる可能性が懸念された。しかし、5000ppm のカテキン投与は、グルコン酸銅による肝臓での前がん病変、8-oxoG 生成あるいは前胃前がん病変に対し抑制的に作用した。以上ことから、*in vivo* でのグルコン酸銅とカテキンの複合投与は、*in vitro* で見られるような作用は生じないことが明らかとなった。さらに、今回認められた発がんリスクに対する抑制作用は、カテキンのもつ抗酸化作用が関与しているものと推察された。

第 2 部の用量検討試験及び今回の中期多臓器発がん性試験では、ともに肝への明らかな銅蓄積は、グルコン酸銅 3000ppm 投与から認められたが、中期多臓器発がん性試験では、肝での肉芽腫の明らかな増加は認められなかった。おそらく、より長期の試験期間のため、壊死細胞がすでに除去されたことで、肉芽腫が見られなくなった可能性が推察された。一方、炎症反応の終末

像である繊維化が、対照群を含め各群で散見されたが、投与群で明らかな増加は認められなかった(データは示していない)。DMBDD 処置によっても肝毒性による肝臓の繊維化が生じてしまうため、グルコン酸銅と炎症との関連性については、十分に明らかにすることができなかった。

グルコン酸銅の肝臓及び前胃に対する前がん病変の促進は、それぞれ 300 及び 6000ppm であった。一方、ヒトの摂取量とほぼ同等の 10ppm では、いずれの悪影響も認められなかった。グルコン酸銅は非変異原性として知られ(Hujita et al., 1998)、DMBDD 無処置群では、全臓器において前がん病変の発生は認められず、肝臓での銅蓄積や 8-oxoG 陽性率の増加の程度も小さかった。それ故、ヒト暴露レベルにおいて発がんリスクが顕現する可能性は低いものと推察された。

以上のことから、グルコン酸銅は高用量の場合、肝臓及び全胃において発がんリスクを増加させるが、カテキンの複合投与は、それらに対し抑制的に作用することが本研究により明らかとなった。



動物:WIST@Jcl(GALAS)雄性ラット6 週齢

↓ :DEN(100mg/kg 体重、腹腔内投与 1 回) ▽ :MNU(20mg/kg 体重、腹腔内投与 4 回)

▼ :DMH(40mg/kg 体重、皮下投与 4 回) ■ :BBN(0.05%混水投与 2 週間)

■ :DHPN(0.1%混水投与 2 週間)

■ :グルコン酸銅混餌投与 1-5 群;0、10、300、3000、6000ppm、11-13 群;0、3000、6000ppm

■ :グルコン酸銅及びビカテキン併用投与 6-10 群;グルコン酸銅 0、10、300、3000、6000ppm 及びビカテキン 5000ppm

14-16 群;グルコン酸銅 0、3000、6000ppm 及びビカテキン 5000ppm

□ :無処理の餌 (CE-2)にて飼育

図 VI-1 ラット中期多臓器発がん性試験の試験設計

表VI-1 ラット中期多臓器発がん性試験における最終体重、摂餌量及び飲水量

Group	DMBDD	Copper gluconate (ppm)	Green tea catechins (ppm)	Effective number of animals	Final body weight (g)	Relative organ weight (g/100 g body weight)			Food consumption (g/rat/day)	Water intake (g/rat/day)
						Liver	Kidneys			
1	+	0	0	11	409 ± 43 ^a	2.3 ± 0.1	0.65 ± 0.10	18.2 ± 0.6	31.5 ± 3.2	
2	+	10	0	11	406 ± 61	2.3 ± 0.3	0.66 ± 0.18	17.7 ± 1.0	30.4 ± 2.6	
3	+	300	0	11	392 ± 38	2.4 ± 0.3	0.67 ± 0.17	17.3 ± 1.7	31.1 ± 2.1	
4	+	3000	0	10	416 ± 36	2.4 ± 0.2	0.63 ± 0.06	17.7 ± 1.7	31.6 ± 3.2	
5	+	6000	0	12	399 ± 36	2.4 ± 0.1	0.66 ± 0.06	18.1 ± 1.6	30.9 ± 4.2	
6	+	0	5000	11	412 ± 50	2.5 ± 0.4	0.70 ± 0.07	18.0 ± 1.5	25.5 ± 1.1*	
7	+	10	5000	9	415 ± 38	2.3 ± 0.2	0.69 ± 0.08	18.2 ± 0.3	25.0 ± 1.1*	
8	+	300	5000	7	396 ± 30	2.6 ± 0.3	0.71 ± 0.06	17.9 ± 1.0	23.3 ± 0.6**	
9	+	3000	5000	10	404 ± 34	2.3 ± 0.2	0.70 ± 0.09	17.9 ± 0.6	23.8 ± 1.5**	
10	+	6000	5000	11	380 ± 43	2.4 ± 0.2	0.70 ± 0.08	17.6 ± 1.4	23.3 ± 1.6**	
11	-	0	0	9	470 ± 25	2.4 ± 0.2	0.56 ± 0.07	20.4 ± 1.1	36.4 ± 1.1	
12	-	3000	0	9	452 ± 28	2.3 ± 0.1	0.57 ± 0.04	18.9 ± 0.4	33.3 ± 2.6	
13	-	6000	0	9	463 ± 50	2.3 ± 0.3	0.57 ± 0.07	19.6 ± 0.6	35.4 ± 5.4	
14	-	0	5000	9	442 ± 43	2.5 ± 0.3	0.63 ± 0.04	19.0 ± 1.5	26.4 ± 2.7**	
15	-	3000	5000	9	439 ± 41	2.4 ± 0.1	0.64 ± 0.05	19.1 ± 0.2	25.8 ± 0.7**	
16	-	6000	5000	9	441 ± 43	2.6 ± 0.5	0.63 ± 0.09	18.7 ± 1.3	25.6 ± 1.6**	

^aMean ± SD.

Significantly different from group 1 (p < *0.05, **0.01).

表VI-2 ラット中期多臓器発がん性試験におけるグルコン酸銅及び銅並びに緑茶カテキンの摂取量

Group	DMBDD	Copper gluconate (ppm)	Green tea catechins (ppm)	Effective number of animals	Copper achieved dosage		Green tea catechins achieved dosage (mg/kg body weight/day)
					Copper gluconate basis (mg/kg body weight/day)	Copper basis (average) (mg/kg body weight/day)	
1	+	0	0	11			
2	+	10	0	11	0.5 ± 0.0 ^a	0.07	
3	+	300	0	11	14.6 ± 1.4	2.05	
4	+	3000	0	10	152.6 ± 14.9	21.37	
5	+	6000	0	12	314.8 ± 27.4	44.08	
6	+	0	5000	11			355.7 ± 15.9
7	+	10	5000	9	0.5 ± 0.0	0.07	353.4 ± 14.9
8	+	300	5000	7	15.4 ± 0.8	2.16	335.3 ± 8.6
9	+	3000	5000	10	155.3 ± 5.6	21.74	343.2 ± 22.0
10	+	6000	5000	11	321.9 ± 25.4	45.07	355.3 ± 24.2
11	-	0	0	9			
12	-	3000	0	9	140.4 ± 2.9	19.66	
13	-	6000	0	9	285.3 ± 9.2	39.95	
14	-	0	5000	9			333.2 ± 34.3
15	-	3000	5000	9	146.6 ± 1.4	20.53	330.8 ± 8.8
16	-	6000	5000	9	285.8 ± 19.2	40.02	325.5 ± 20.4

^a Mean ± SD.

表VI-3 ラット中期多臓器発がん性試験における血清及び肝組織中銅濃度並びに肝銅組織化学的検索結果

Group	DMBDD	Copper gluconate (ppm)	Green tea catechins (ppm)	Effective number of animals	Copper concentration ^b		Copper accumulation in the liver ^c				
					Serum (µg/dL)	Liver (µg/g wet tissue)	None	Slight	Moderate	Marked	Severe
1	+	0	0	11	157.7 ± 35.1 ^a	5.5 ± 0.6	11	0	0	0	0
2	+	10	0	11	140.3 ± 21.4	5.4 ± 0.7	11	0	0	0	0
3	+	300	0	11	124.4 ± 10.0	6.7 ± 2.6	4	7	0	0	0
4	+	3000	0	10	153.2 ± 53.9	23.8 ± 22.5	0	3	7	0	0
5	+	6000	0	12	134.2 ± 6.6	117.1 ± 71.8**	0	0	5	5	2
6	+	0	5000	11	180.7 ± 70.9	4.5 ± 1.0	11	0	0	0	0
7	+	10	5000	9	NE	NE	9	0	0	0	0
8	+	300	5000	7	NE	NE	3	4	0	0	0
9	+	3000	5000	10	NE	NE	0	2	7	1	0
10	+	6000	5000	11	154.0 ± 10.4	170.3 ± 83.2**	0	0	4	6	1
11	-	0	0	9	117.3 ± 21.7	4.2 ± 0.3	9	0	0	0	0
12	-	3000	0	9	106.8 ± 22.4	5.4 ± 1.5	8	1	0	0	0
13	-	6000	0	9	116.8 ± 9.9	19.0 ± 19.3	0	7	2	0	0
14	-	0	5000	9	116.3 ± 9.1	4.0 ± 0.6	9	0	0	0	0
15	-	3000	5000	9	NE	NE	6	3	0	0	0
16	-	6000	5000	9	133.2 ± 23.5	39.2 ± 26.3	1	6	2	0	0

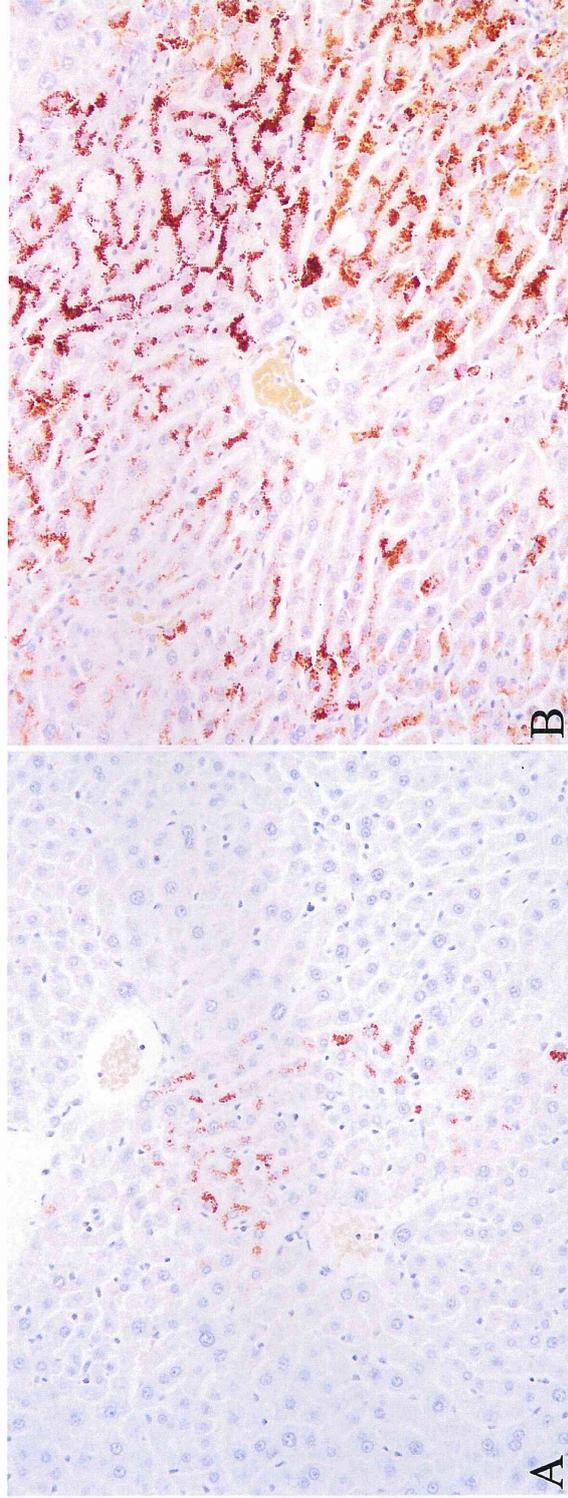
^a Mean ± SD.

^b Determined for 3-5 rats in each group.

^c Data are not evaluated by statistical analysis.

NE, not examined.

** Significantly different from group 1 (p < 0.01).



図VI-2 ラット中期多臓器発がん性試験における肝銅組織化学染色像。(A)DMBDD 処置のグルコン酸銅 300ppm 群、(B)DMBDD 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群。300ppm 群で銅陽性となり、6000ppm 群では肝組織中にび慢性に認められる(×200)。

表VI-4 ラット中期多臓器発がん性試験における腫瘍性病変あるいは前がん病変の病理組織学的検索結果

Group	No. of rats with (%)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DMBD treatment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Copper gluconate (ppm)	0	10	300	3000	6000	0	10	300	3000	6000	0	3000	6000	0	3000	6000
Catechins (ppm)	0	0	0	0	0	5000	5000	5000	5000	5000	0	0	0	5000	5000	5000
No. of rats examined	11	11	11	10	12	11	9	8	10	11	9	9	9	9	9	9
Liver																
Adenoma	0	1 (9)	1 (9)	0	0	0	0	0	1 (10)	0	0	0	0	0	0	0
Bile duct proliferation	1 (9)	2 (18)	0	0	0	3 (27)	0	0	2 (20)	0	0	0	0	0	0	0
Cholangioma	0	1 (9)	1 (9)	0	0	1 (9)	0	0	1 (10)	0	0	0	0	0	0	0
Cholangiocarcinoma	0	0	0	0	0	1 (9)	0	0	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0
Hepatoholangiocellular adenoma	0	0	0	0	0	0	1 (11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liposarcoma	0	0	0	1 (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney																
Hyperplasia	8 (73)	9 (82)	8 (73)	7 (70)	8 (67)	3 (27)	5 (56)	6 (75)	4 (40)	4 (36)	0	0	0	0	0	0
Transitional cell hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (27)	1 (11)	0	0	0	0	0
Adenoma	6 (55)	2 (18)	1 (9)	2 (20)	2 (17)	4 (36)	4 (44)	3 (38)	1 (10)	3 (27)	0	0	0	0	0	0
Adenocarcinoma	1 (9)	0	2 (18)	0	0	1 (9)	2 (22)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (11)
Nephroblastoma	3 (27)	6 (45)	1 (9)	2 (20)	7 (58)	6 (54)	7 (78)	7 (88)	7 (70)	2 (18)	0	0	0	0	0	0
Brain																
Astrocytoma	0	0	0	0	0	0	1 (11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thyroid																
Hyperplasia	0	2 (18)	3 (27)	1 (10)	0	0	2 (22)	1 (13)	4 (40)	1 (9)	0	0	0	0	0	0
Follicular cell adenoma	0	0	0	0	1 (8)	0	1 (11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung																
Hyperplasia	9 (82)	10 (91)	11 (100)	10 (100)	10 (83)	11 (100)	9 (100)	8 (100)	10 (100)	9 (82)	0	0	0	0	0	0
Adenoma	4 (36)	3 (27)	0	0	4 (33)	2 (18)	6 (67)	1 (13)	2 (20)	0	0	0	0	0	0	0
Adenocarcinoma	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Squamous cell carcinoma	0	0	1 (9)	0	0	1 (9)	0	0	1 (10)	0	0	0	0	0	0	0
Tongue																
Hyperplasia	0	0	0	0	1 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Esophagus																
Hyperplasia	3 (27)	4 (36)	1 (9)	1 (10)	6 (50)	2 (18)	5 (56)	2 (25)	4 (40)	4 (36)	0	0	0	0	0	0
Squamous cell papilloma	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Forestomach																
Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liposarcoma	0	0	0	1 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Small intestine																
Hyperplasia	0	0	0	0	1 (8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adenoma	0	0	1 (9)	0	2 (17)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adenocarcinoma	1 (9)	1 (9)	1 (9)	0	1 (8)	0	0	0	1 (10)	1 (9)	0	0	0	0	0	0
Large intestine																
Hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (10)	0	0	0	0	0	0	0
Adenoma	4 (36)	2 (18)	2 (18)	3 (30)	1 (8)	3 (27)	4 (44)	2 (25)	3 (30)	3 (27)	0	0	0	0	0	0
Adenocarcinoma	2 (18)	2 (18)	1 (9)	0	3 (25)	2 (18)	1 (11)	2 (25)	2 (20)	1 (9)	0	0	0	0	0	0
Adrenal																
Hyperplasia	3 (27)	4 (36)	1 (9)	4 (40)	1 (8)	1 (9)	1 (11)	3 (38)	3 (30)	5 (45)	0	0	0	0	0	0
Thymus																
Malignant lymphoma	0	0	0	0	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Thymoma	1 (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymph node																
Malignant lymphoma	0	0	0	0	0	0	0	1 (13)	0	0	0	0	0	0	0	0
Liposarcoma	0	0	0	1 (10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Prostate																
Hemangioma	0	0	0	0	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyperplasia	0	1 (9)	1 (9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Seminal vesicle																
Hyperplasia	0	0	0	1 (10)	1 (8)	0	0	1 (13)	0	0	0	0	0	0	0	0
Urinary bladder																
Hyperplasia	0	1 (9)	1 (9)	1 (10)	1 (8)	0	0	0	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0
Papillary or nodular hyperplasia	0	0	0	0	1 (8)	0	0	0	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0
Abdominal cavity																
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1 (11)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lipoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (11)	0	0	0	0

※肝臓の免疫組織化学的検索及び前胃の前がん病変の病理組織学的検索結果については、以降の表に記載する。

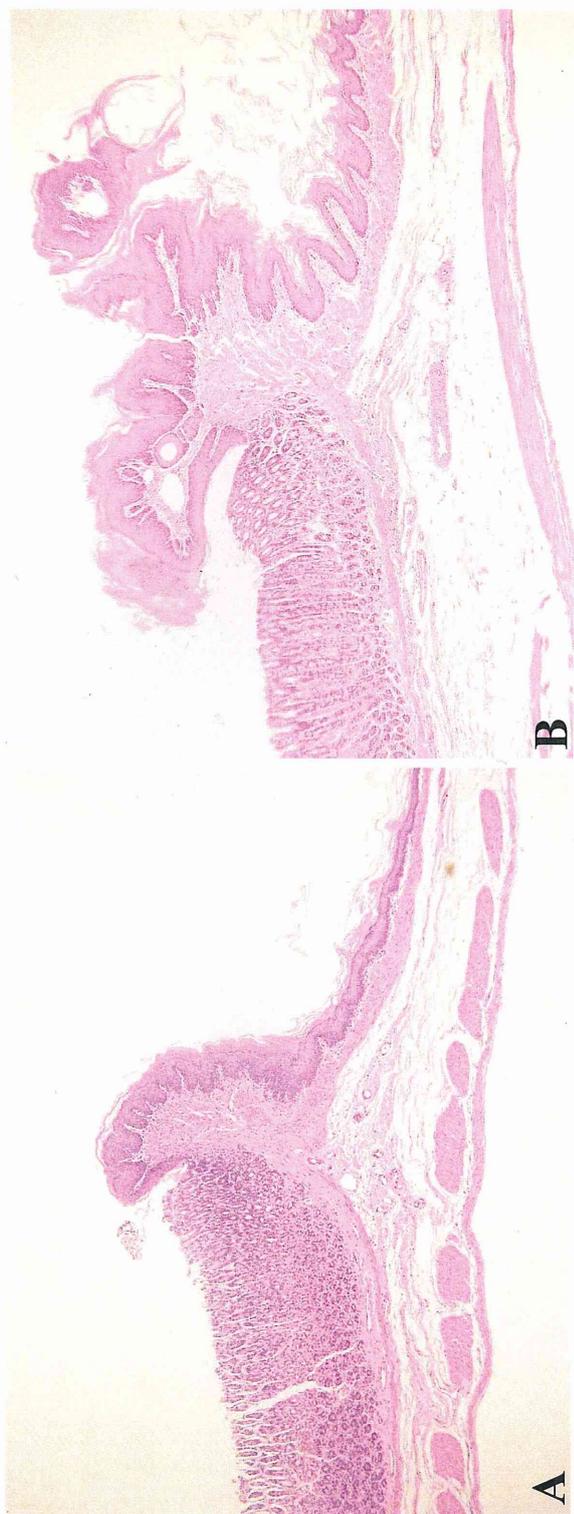
表VI-5 ラット中期多臓器発がん性試験における肝 GST-P 陽性細胞巢の数及び面積並びに 8-oxoG 陽性細胞率

Group	DMBDD	Copper gluconate (ppm)	Green tea catechins (ppm)	Effective number of animals	GST-P-positive lesions		8-oxoG-positive index ^b	
					Number (/cm ²)	Mean area (mm ²)	Occupancy (mm ² /cm ²)	(%)
1	+	0	0	11	6.9 ± 4.1 ^a	0.057 ± 0.037	0.404 ± 0.314	0.3 ± 0.5
2	+	10	0	11	10.9 ± 3.6	0.129 ± 0.215	1.093 ± 1.342	0.1 ± 0.1
3	+	300	0	11	24.1 ± 15.8*	0.089 ± 0.149	1.308 ± 1.297	4.3 ± 9.6
4	+	3000	0	10	19.0 ± 9.9*	0.033 ± 0.009	0.631 ± 0.361	11.5 ± 15.7
5	+	6000	0	12	23.2 ± 16.9**	0.049 ± 0.024	1.078 ± 1.110	72.0 ± 36.8*
6	+	0	5000	11	12.0 ± 6.8	0.052 ± 0.019	0.591 ± 0.365	0.6 ± 0.5
7	+	10	5000	9	8.5 ± 4.9	0.077 ± 0.088	0.957 ± 1.672	0.4 ± 0.3
8	+	300	5000	7	11.0 ± 6.5	0.042 ± 0.022	0.435 ± 0.242	0.5 ± 0.6
9	+	3000	5000	10	10.3 ± 2.6	0.047 ± 0.021	0.479 ± 0.235	6.9 ± 6.0
10	+	6000	5000	11	17.7 ± 16.8	0.073 ± 0.037	1.008 ± 0.706	46.8 ± 19.7*
11	-	0	0	9	0.3 ± 0.4	0.004 ± 0.005	0.002 ± 0.003	0.0 ± 0.0
12	-	3000	0	9	0.3 ± 0.3	0.007 ± 0.007	0.003 ± 0.003	0.0 ± 0.0
13	-	6000	0	9	0.5 ± 0.3	0.014 ± 0.005	0.007 ± 0.004	2.5 ± 5.0
14	-	0	5000	9	0.3 ± 0.4	0.010 ± 0.015	0.005 ± 0.009	0.0 ± 0.0
15	-	3000	5000	9	0.2 ± 0.2	0.007 ± 0.007	0.003 ± 0.004	0.0 ± 0.0
16	-	6000	5000	9	0.8 ± 1.2	0.006 ± 0.006	0.009 ± 0.013	0.0 ± 0.0

^a Mean ± SD.

^b Determined for 4-5 rats in each group.

* Significantly different from group 1 (p < *0.05, **0.01).



図VI-3 ラット中期多臓器発がん性試験における前胃の HE 染色像。(A)DMBDD 処置の対照群、(B)DMBDD 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群 (×200)。6000ppm 群において、前胃境界縁の過形成病変が増加している。

表VI-6 ラット中期多臓器発がん性試験における前胃過形成の病理組織学的検索結果

Group	DMBDD	Copper gluconate (ppm)	Green tea catechins (ppm)	Effective number of animals	Hyperplasia (Incidence; number of baring animals with percentage in the parenthesis)		
					Total	Slight	Moderate
1	+	0	0	11	0	0	0
2	+	10	0	11	0	0	0
3	+	300	0	11	0	0	0
4	+	3000	0	10	1 (10)	1 (10)	0
5	+	6000	0	12	9 (75)**	4 (33)	2 (17)
6	+	0	5000	11	1 (9)	0	0
7	+	10	5000	9	0	0	0
8	+	300	5000	7	0	0	0
9	+	3000	5000	10	0	0	0
10	+	6000	5000	11	3 (27)#	0	0
11	-	0	0	9	0	0	0
12	-	3000	0	9	0	0	0
13	-	6000	0	9	2 (22)	0	0
14	-	0	5000	9	0	0	0
15	-	3000	5000	9	0	0	0
16	-	6000	5000	9	2 (22)	0	0

** Significantly different from group 1 (p < 0.01).

Significantly different from group 5 (p < 0.05).

Ⅶ. 第 4 部:ラット中期肝発がん性試験を用いたグルコン酸銅の肝発がん促進作用の機序解明

Ⅶ-1. 背景及び目的

近年、グルコン酸銅が栄養機能食品としてサプリメント等への添加が認可されたため、利用拡大が予想されるが、一方でその過剰摂取による健康被害が危惧される。しかし、グルコン酸銅の発がんリスクの有無については、動物を用いた長期発がん性試験の報告はなく、未だ不明のままである。一方、*in vitro* においてポリフェノール類、特にカテキンと銅との相互作用により、酸化的 DNA 損傷を誘発することが報告されている(Oikawa et al., 2001, 2003; Murata et al., 1999; Naito et al., 1994)。

これらの背景から我々は、*in vivo* の動物実験により、グルコン酸銅の発がんリスクの検討とその背景機構について検索すること、並びにグルコン酸銅とカテキンとの複合投与による発がんリスクを検索することを目的に、第 3 部においてラット中期多臓器発がん性試験を行った。その結果、グルコン酸銅は、肝臓及び前胃に対し高用量で発がんリスクを有することが明らかとなった。一方、カテキンは単独では発がんリスクを示さず、複合投与によりグルコン酸銅の発がんリスクを軽減することが明らかとなった。

そこで第 4 部では、発がんリスクが増加した肝臓にターゲットを絞り、より精度の高い再現性を得ること、さらに、グルコン酸銅の及ぼす生体影響の背景機構を詳細に検索することを目的に、ラット中期肝発がん性試験並びに 2 週間反復投与試験を実施した。

ラット中期肝発がん性試験とは、イニシエーターとして DEN を用い、さらに肝部分切除処置を施し、肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の数及び大きさを指標に、肝を標的とする発がん物質を検出する短期発がん性試験である(Shirai, 1997; Ito et al., 2000)。300 以上の化学物質について評価を行い、90%以上の確率で肝発がん物質を検出でき、長期発がん性試験ともよく相関することが報告されている(Fukushima et al., 2005)。

中期肝発がん性試験並びに 2 週間反復投与試験の検索項目として、肝臓の病理組織学的検索、肝 GST-P、8-oxoG、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞の観察並びに肝銅組織化学染色を実施した。また、中期肝発がん性試験では、肝での GST-P 及び MT 発現並びに銅の局在の関連性を明らかにするため、GST-P・銅二重染色、GST-P・MT 二重染色及び GST-P・MT・銅三重染色を実

施した。

さらに両試験において、グルコン酸銅の遺伝子発現への影響を明らかにするため、それらの肝臓サンプルを用いてリアルタイム定量 PCR 法を行い、金属代謝関連遺伝子、炎症関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子等の発現を解析した。この方法は、PCR による増幅反応をリアルタイムにモニタリングし、サンプル中に存在する RNA の量を定量的に測定する方法であり、あらかじめ決められたサイクル数でのバンドの有無(濃淡)により、PCR 産物量を測定する従来の RT-PCR 法に比べて、感度、定量性、測定レンジ及び再現性に優れている。

VII-2. 材料及び方法

化学物質

DEN は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.より、グルコン酸銅は Wako Pure Chemical Industries, Ltd.より購入した。

動物

5 週齢の Fischer344 系雄性ラットを Charles River Laboratories, Inc. (Kanagawa, Japan)より 86 匹購入した。動物は 1 週間の検疫馴化期間後 6 週齢にて試験に供し、適切な無作為抽出法を用いて割り付けた。動物はバリアシステム内の温度及び湿度を制御した動物室内で飼育した。室内の環境は温度 22°C (下限 19°C、上限 25°C)、湿度 55% (下限 45%、上限 70%)、換気回数 18 回/時、12 時間照明とした。動物は各 1 匹ずつ、ステンレス網底側板アルミ打抜きブラケットケージ内に収容した。餌(CE-2)及び水は自由に摂取させた。

試験設計

(1) 中期肝発がん性試験

6 週齢の動物を 6 群に無作為に分け、1-4 群は、DEN (200mg/kg 体重、腹腔内投与 1 回)を投与した(各群 12 匹)。5 及び 6 群は、DEN の溶媒である生理食塩液を同様に投与した(各群 9 匹)。1-4 群は、その 2 週間後より 0、10、300 あるいは 6000ppm のグルコン酸銅混餌投与を 6 週間実施した(図 VII-1)。5 及び 6 群は、0 あるいは 6000ppm のグルコン酸銅を投与した。全ての動物は試験開始の 3 週間後に、エーテル麻酔下で肝臓の左外側葉及び中間葉を切除する 2/3 部分肝切除術を実施した。体重及び摂餌量は 1 週間ごとに測定した。試験期間中動物は、死亡または切迫例が認められた場合、直ちに剖検し、試験開始から 8 週間後の計画解剖時の全生存動物を有効動物数とし以降の検索に供した。

(2) 2 週間反復投与試験

6 週齢の動物を 4 群(各群 5 匹)に無作為に分け、0、10、300 あるいは 6000ppm のグルコン酸銅混餌投与を 2 週間実施した(図 VII-2)。

動物の解剖

動物はエーテル麻酔下で腹部大静脈より採血し屠殺した。肉眼的病理学検査の後、肝臓を摘出して重量測定を行った。肝臓は 3 葉(外側左葉、内側右葉及び外側右葉)を切り出し、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて固定後、通常の方法によりパラフィン包埋し、4 μ m 切片を作成した。残余の肝臓組織(外側左葉)の一部は、液体窒素を用いて急速冷凍後-80 $^{\circ}$ C に保存し、以降の遺伝子発現解析に用いた。

病理組織学的、組織化学的及び免疫組織化学的検索

作成した臓器切片に対し、HE 染色を常法にて実施し、病理組織学的検索を行った。免疫組織化学的検索については、肝での GST-P、8-oxoG、PCNA 及び TUNEL 免疫染色を第 2 及び 3 部と同様に ABC 法にて実施した。さらに肝での GST-P、MT 及び銅の局在の関係性を明らかにするため、GST-P・銅二重染色、GST-P・MT 二重染色及び GST-P・MT・銅三重染色を実施した。

銅染色はロダニン法、GST-P 及び MT の発色には、アルカリフォスファターゼキット(赤、青) (Vector Laboratories Inc.)を用いた。GST-P 陽性細胞数及び面積並びに 8-oxoG、PCNA 及び TUNEL 陽性率算出にはアイパップイメージアナライザーを用いた。

リアルタイム定量 PCR 法

肝凍結保存標本は、Isogen (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて、ポリロンホモジナイザー (Kinematica, Inc. New York, USA)により組織を破碎後に total RNA を抽出し、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Ltd., California, USA)により cDNA を作製した。得られた cDNA は、7200 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, California, USA)により、TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)及び TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて増幅し、mRNA 発現を解析した。反応条件は、50°Cで 2 分間、次いで 95°Cで 10 分間加温後、95°Cで 15 秒並びに 60°Cで 1 分間のサイクルを 40 回繰り返した。mRNA 発現解析は、*Mt1a* (Rn00821759_g1)、growth and DNA damage 45 α (*Gadd45 \alpha*, Rn00577049_m1)、*p21* (Rn00589996_m1)、*p53* (Rn00755717_m1)、腫瘍壊死因子 α (*Tnf \alpha*, Rn99999017_m1)、インターロイキン 1 α (*Il1 \alpha*, Rn00566700_m1)、一酸化窒素シンターゼ 2 (*Nos2*, Rn00561646_m1)、*c-fos* (Rn02396759_m1)及び 18S ribosomal RNA (eukaryotic 18S rRNA, Hs99999901_s1) (上記全て Applied Biosystems)について実施した。mRNA 発現率の測定は、18S rRNA 発現量で補正後、対照群の mRNA 発現量の平均値を 1 とした場合の投与群の mRNA 発現率を算出した。

統計学的解析

各データはバートレット検定または F 検定を実施し、有意であった場合は Steel 検定または Aspin-Welch *t* 検定を実施した。有意でなかった場合には Dunnett 検定または Student's *t* 検定を実施した。*P* 値が 0.05 以下の場合を有意な変化とした。

倫理面への配慮

本研究においては、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規、規則、ガイドライン等及び試験実施施設の規定に準拠し、適切な倫理面への配慮を行った。

VII-3. 結果

中期肝発がん性試験において、各群 1-4 匹の動物が肝切除術の後死亡した。そのため各群の有効動物数は、それぞれ 8、11、10、9、8 及び 6 匹となった(表VII-1)。最終体重、実肝重量及び摂餌量は、DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群で有意に減少したが(表VII-1、表VII-2)、相対肝重量では著変は認められなかった。グルコン酸銅 10 ppm 群の銅摂取量は、基礎飼料中の銅濃度(約 10 ppm)と合わせると、約 14 mg/ヒト/日に相当し、ヒトの許容上限摂取量 9 mg/日の近似値となる。一方、2 週間反復投与試験では、最終体重、肝重量あるいは摂餌量に著変は認められなかった。

中期肝発がん性試験において、肝臓は全群で肉眼的に正常であった。組織学的に 3000ppm 群までは、グルコン酸銅投与に起因した変化は認められなかったが、6000ppm 群では、肝臓にアポトーシス小体の増加が観察された。2 週間反復投与試験では、肉眼的にも組織学的にも著変は認められなかった。

中期肝発がん性試験の DEN 処置の肝 GST-P 陽性細胞巢数は、グルコン酸銅 6000ppm 群で有意に増加した(表VII-3)。一方、その面積には著変は認められなかった(表VII-3)。GST-P 陽性単細胞は、DEN 処置の全群で認められたが、グルコン酸銅 6000ppm 群で有意に増加した(図VII-3、表VII-3)。興味深いことに、DEN 無処置の対照群では、まったく GST-P 陽性単細胞が認められないのに対し、6000ppm 群では有意に増加した(表VII-3)。また、肝臓の 8-oxoG、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞率は、DEN 処置の有無に関わらずグルコン酸銅 6000ppm 群において有意に増加した(図VII-4、表VII-4)。

GST-P・銅二重染色では、DEN 処置あるいは無処置のグルコン酸銅 6000ppm 群で銅陽性細胞が認められ、DEN 処置群では多くの場合 GST-P 陽性細胞巢に銅陽性所見は認められなかった(図VII-5)。GST-P・MT 二重染色では、DEN 処置及び無処置のグルコン酸銅 6000ppm 群で MT 陽性細胞が認められた。DEN 処置群では、GST-P と MT は多くの場合、それぞれ単独で発現していたが、一部の GST-P 陽性細胞巢では、MT との共発現が認められた(図VII-6)。GST-P・

MT・銅三重染色では、DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群で多くの場合、銅陽性細胞は、GST-P 及び MT の発現のいずれにも一致せず、一部の GST-P 陽性細胞巢では、MT との共発現が認められた(図VII-7)。

中期肝発がん性試験及び 2 週間反復投与試験において、肝臓の金属代謝、炎症及びアポトーシス関連遺伝子等の発現を解析した結果を図VII-8 に示す。金属代謝関連遺伝子である *Mt1a* は、両試験においてDEN 処置の有無に関わらず、グルコン酸銅 6000ppm 群で有意に増加した。アポトーシス関連遺伝子である *p21* は、2 週間反復投与試験では、300 及び 6000ppm 群で有意に増加し、中期肝発がん性試験では、DEN 処置の有無に関わらずグルコン酸銅 6000ppm 群で増加した。また、アポトーシス関連遺伝子である *Gadd45 α* は、両試験においてDEN 処置の有無に関わらず、6000ppm 群で増加した。もうひとつのアポトーシス関連遺伝子である *p53* は、2 週間反復投与試験では変化が認められなかったが、中期肝発がん性試験では、DEN 処置の有無に関わらずグルコン酸銅 6000ppm 群で増加し、さらに 300ppm 群でも有意な増加を示した。炎症関連遺伝子である *Tnf α* 、*Il1 α* 及び *Nos2*、並びにがん原遺伝子である *c-fos* は、2 週間反復投与試験では変化が認められなかったが、中期肝発がん性試験では、DEN 処置の有無に関わらずグルコン酸銅 6000ppm 群で有意に増加した。

VII-4. 考察

中期肝発がん性試験において、GST-P 陽性細胞巢数は、DEN 処置のグルコン酸銅 6000 ppm 群で有意に増加した。一方、グルコン酸銅 10 及び 300 ppm 群では、GST-P 陽性細胞巢数に変化は認められなかった。さらに、中期肝発がん性試験及び 2 週間反復投与試験の両試験において、グルコン酸銅 10ppm 群では、遺伝子発現の変動も認められなかった。これらのことから、グルコン酸銅は、ヒトが摂取すると考えられる用量では何ら影響を示さないが、それよりも明らかに高い用量を与えた場合、肝増殖性病変誘発促進作用を有し、発がんリスクを増加させる可能性が示唆された。一方、第 3 部の中期多臓器発がん性試験では、グルコン酸銅 300 ppm 群でも GST-P 陽性細胞巢数が有意に増加した。この用量では比較的長期間の投与により、はじめて肝前がん病変が増加するものと推察された。さらに 8-oxoG 陽性率が、グルコン酸銅 6000 ppm 群で有意に増加したことから、グルコン酸銅の高用量での発がん促進機序には、銅の過剰供給による肝臓で

の酸化ストレス誘導が関与しているものと推察された。

中期肝発がん性試験において、DEN 処置の有無に関わらず GST-P 陽性単細胞がグルコン酸銅 6000ppm 群で認められたが、2 週間反復投与試験ではそれらは認められなかった(データは示していない)。前がん病変での肝細胞での GST-P の発現は、イニシエートされた肝細胞が毒性物質や発がん物質に対し解毒活性を強化することで、周辺細胞よりも増殖しやすい環境を得るためと考えられている(Suzuki et al., 1994)。これらの細胞は、発がんプロポーシオン期においてクローン増殖を行い GST-P 陽性細胞巣を形成する(Farber, 1996)。一方、DEN や鉛投与のラット肝臓において、GST-P が僅か 24 時間後に誘導されることが報告されている(Suzuki et al., 1994; Suzuki et al., 1996)。また、GST-P 陽性領域(単細胞及び多細胞を含む)の 90-95%は、正常な肝細胞に復帰すると言われている(Enomoto and Farber, 1982; Tatematsu et al., 1983)。事実、我々の研究においても、13 週間あるいは 29 週間の中期多臓器発がん性試験での高用量のグルコン酸銅投与群でも、GST-P 陽性単肝細胞は認められなかった。従って、今回認められた GST-P 陽性単肝細胞は、前がん病変において恒久的に発現するものとは異なり、グルコン酸銅暴露に対する解毒あるいは防御系として、一時的に誘導されたものと推察された。

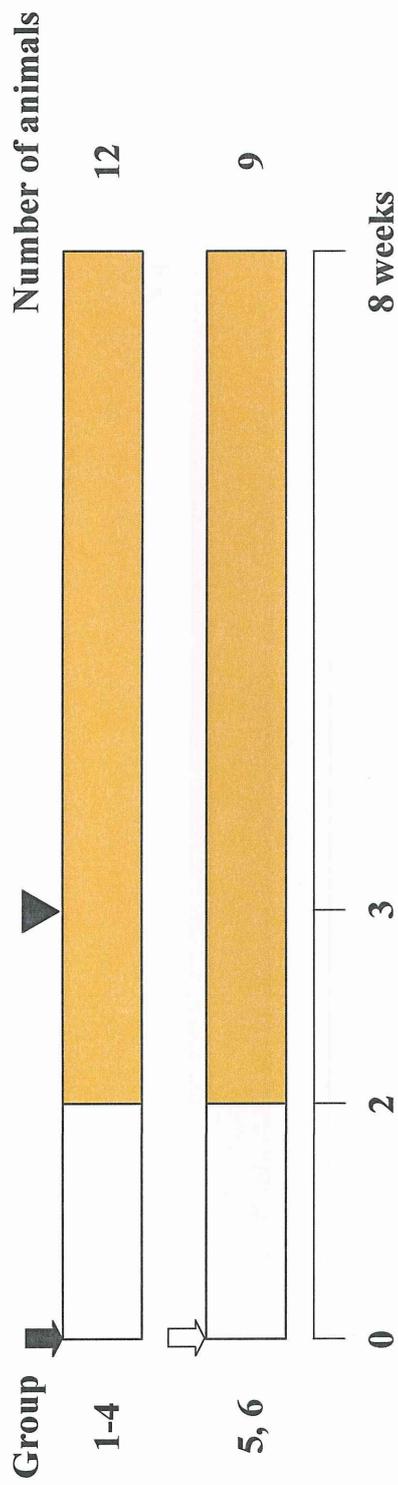
今回、組織学的あるいは組織化学的に銅の蓄積(データは示していない)や肝細胞毒性が認められない 2 週間のグルコン酸銅 6000ppm 投与でも、*Mt1a* の誘導が確認された。MT はグルコン酸銅による毒性に対する防御機構として機能し、比較的早い期間に誘導されることが示唆された。一方、発がん過程においても、MT の発現は重要であり、LEC ラットの肝 GST-P 陽性細胞巣では、周囲組織に比べ MT の発現が増強していることが知られている(Sawaki et al., 1994)。中期肝発がん性試験での GST-P・MT・銅の二重あるいは三重染色の結果から、DEN 投与のグルコン酸銅 6000ppm 群において MT 発現及び銅蓄積が認められた。さらに GST-P 陽性細胞巣には、銅蓄積がほとんど認められず、その一部で MT の共発現が認められた。以上のことから、MT は銅負荷への反応として比較的早期から発現し、銅毒性に対する防御機構として機能する一方で、GST-P 陽性細胞巣では、MT 発現やそのほかの機序により銅蓄積を阻止することで、前がん細胞が銅毒性を回避し、周囲組織よりも優位な細胞環境を得ているものと推察された。

中期肝発がん性試験において高用量のグルコン酸銅は、TUNEL 陽性細胞及びアポトーシス関連遺伝子である *Gadd45 α* 、*p21* 及び *p53* の発現を誘導し、肝細胞アポトーシスシグナルを活性化させることが示された。LEC ラットにおいて、銅蓄積量とアポトーシス細胞出現率は相関する

ことが報告されている(Fong et al., 2004)。また、ラット及びマウスへの過剰銅投与やイヌでの先天性の銅蓄積等でも、肝臓でのアポトーシスの増加が知られている(Fuentealba and Haywood, 1988; Haywood et al., 1996; Deng et al., 1998)。p53はDNA複製のための細胞周期を止め、アポトーシスを誘導することが知られている(Lotem et al., 1996; Janus et al., 1999)。また、GADD45はp21と直接的に相互作用し、細胞周期を制御しているが、これらはp53によって制御されている(Kearsey et al., 1995)。さらにLECラットの肝臓では、過剰な銅蓄積がp53及びp21を誘導し、細胞増殖活性を抑制することが報告されている(Obata et al., 1996)。今回の結果から、*Gadd45* 及び *p21* は、銅蓄積が認められない2週間投与でも誘導が認められているが、この時期のp53の発現には変化がなかった。可能性として、放射線照射のWI-L2-NS細胞での*Gadd45*の発現で見られるようなp53とは独立した機構が存在する可能性も考えられた(Carrier et al., 1996)。

炎症関連遺伝子である *Tnf* α 、*Il1* α 及び *Nos2* は、中期肝発がん性試験においてDEN処置の有無に関わらず、グルコン酸銅6000ppm群で増加したが、2週間投与では変化は認められなかった。TNF α 、IL1 α 及びNOS2は、様々な肝臓疾患や実験的な肝障害モデルにおいて、細胞毒性の重要なメディエーターとして知られている(Ramadori and Christ, 1999; Hon et al., 2002; Soas et al., 2001)。また、肝臓疾患や実験的な肝障害モデルでは、アポトーシス小体を取り込んだクッパー細胞が観察される(Canbay et al., 2003)。さらにLECラットの肝臓において、*Tnf* α 発現の増加が報告されている(Fong et al., 2004)。TNF α はTNF α レセプターを介したアポトーシス誘導し、結果としてカスパーカスケードを活性化させる(Cohen, 1997)。中期肝発がん性試験での高用量のグルコン酸銅投与群のみで認められたアポトーシス小体の増加は、これらの炎症関連遺伝子の増加とよく相関していた。がん原遺伝子である *c-fos* の増加は、LECラットの肝臓でも報告されている(Suzuki et al., 1990)。銅は核での *c-fos* 誘導を制御することで、血清応答因子を活性化させることが報告されており、これらのメカニズムがLECラットでの肝発がん重要な役割を担っている(Maeda et al., 1997)。グルコン酸銅による肝発がん促進にも *c-fos* が何らかの役割を果たしていることが推察された。

以上の結果から、グルコン酸銅は、高用量で肝発がんリスクを有し、その機序には酸化ストレス、炎症及びアポトーシスが関与しているものと推察された。



動物：Fischer344 雄性ラット6週齢

↓：DEN投与(200 mg/kg体重、腹腔内投与1回)

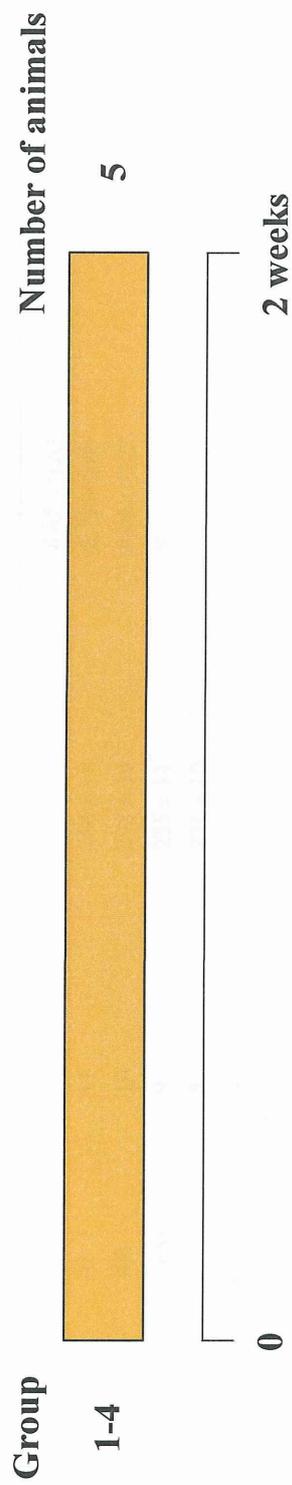
↓：生理食塩液投与

▼：2/3部分肝切除術

■：グルコン酸銅混餌投与 1-4群；0、10、300、6000ppm、5、6群；0、6000ppm

□：無処理の餌(CE-2)にて飼育

図VII-1 ラット中期肝発がん性試験の試験設計



動物：Fischer344 雄性ラット 6 週齢

■：グルコン酸銅混餌投与 1-4 群；0、10、300、6000ppm

図VII-2 2 週間反復投与試験の試験設計

表VII-1 中期肝発がん性試験における最終体重及び肝重量

Group	DEN	Copper gluconate (ppm)	Effective number of animals	Final body weight (g)	Liver weight	
					Absolute (g)	Relative (g/100 g body weight)
1	+	0	8	275 ± 10 ^a	8.85 ± 0.53	3.21 ± 0.11
2	+	10	11	266 ± 18	8.79 ± 0.69	3.31 ± 0.31
3	+	300	10	273 ± 16	8.66 ± 0.52	3.17 ± 0.14
4	+	6000	9	255 ± 11 [*]	8.14 ± 0.41 [*]	3.19 ± 0.12
5	-	0	8	278 ± 10	8.64 ± 0.45	3.11 ± 0.14
6	-	6000	6	269 ± 6 [#]	8.15 ± 0.47 [#]	3.03 ± 0.17

^a Mean ± SD.

^{*} Significantly different from group 1 value ($P < 0.05$).

[#] Significantly different from group 5 value ($P < 0.05$).

表VII-2 中期肝発がん性試験における摂餌量、グルコン酸銅及び銅摂取量

Group	DEN	Copper gluconate (ppm)	Effective number of animals	Food consumption (g/rat/day)	Copper gluconate achieved dosage (mg/kg/day)	Copper basis achieved dosage (mg/kg/day)
1	+	0	8	14.0 ± 0.6 ^a		
2	+	10	11	13.7 ± 0.9	0.86 ± 0.02	0.12 ± 0.00
3	+	300	10	14.1 ± 0.7	25.90 ± 1.06	3.63 ± 0.15
4	+	6000	9	13.1 ± 0.6*	497.25 ± 20.38	69.62 ± 2.85
5	-	0	8	13.6 ± 0.5		
6	-	6000	6	13.1 ± 0.5	442.81 ± 11.95	62.00 ± 1.67

^a Mean ± SD.

* Significantly different from group 1 value ($P < 0.05$).

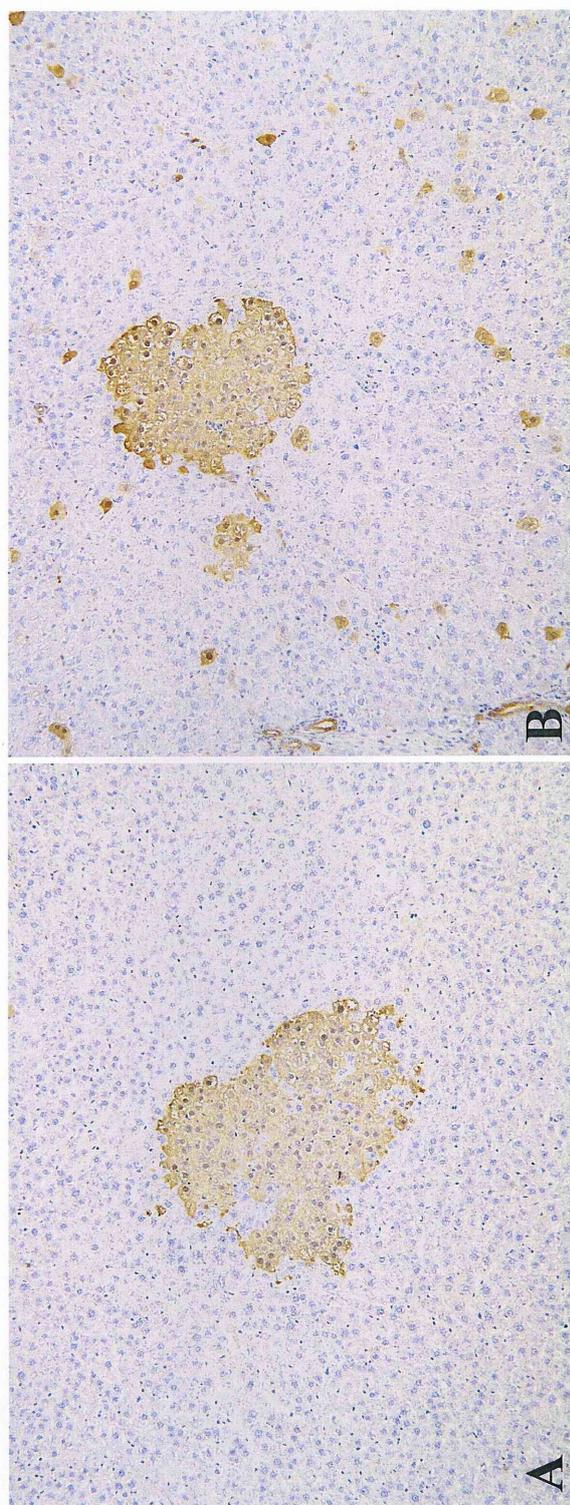
表VII-3 中期肝発がん性試験における肝 GST-P 陽性細胞巢の数及び総面積並びに GST-P 陽性単細胞数

Group	DEN	Copper gluconate (ppm)	Effective number of animals	Number of GST-P-positive lesions (No./cm ²)	Occupancy of GST-P-positive lesions (mm ² /cm ²)	Number of GST-P-positive single hepatocytes (No./cm ²)
1	+	0	8	15.3 ± 3.8 ^a	0.879 ± 0.406	15.0 ± 4.3
2	+	10	11	15.9 ± 6.3	1.081 ± 0.917	14.3 ± 3.9
3	+	300	10	14.1 ± 5.1	0.918 ± 0.547	15.4 ± 5.3
4	+	6000	9	20.6 ± 4.5*	1.018 ± 0.319	155.7 ± 54.0**
5	-	0	8	0	0	0
6	-	6000	6	0	0	52.5 ± 21.9 ^{##}

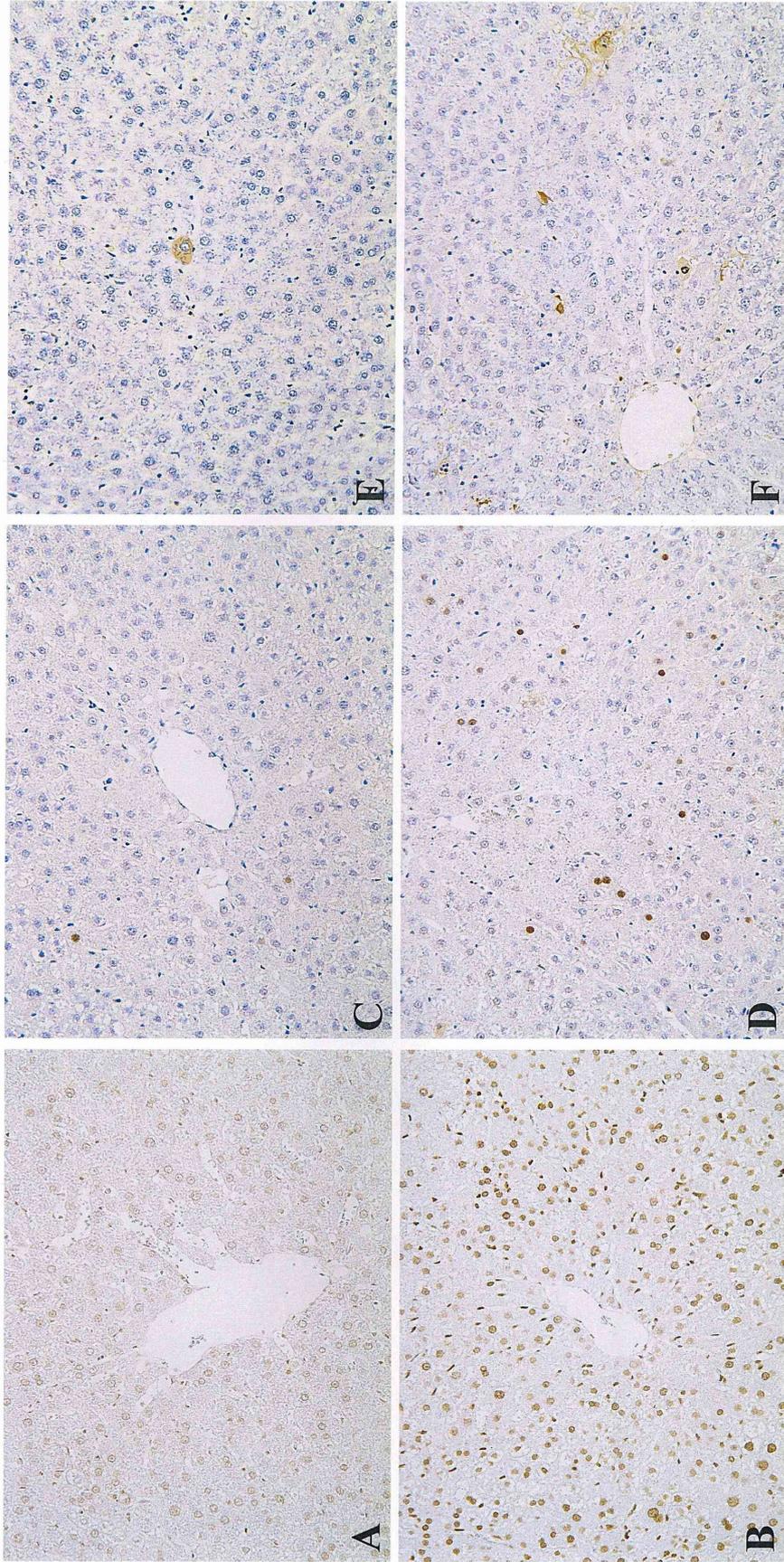
^a Mean ± SD.

* , ** Significantly different from group 1 value ($P < 0.05$, 0.01).

^{##} Significantly different from group 5 value ($P < 0.01$).



図VII-3 中期肝発がん試験における肝 GST-P 免疫組織化学染色像。(A)DEN 処置の対照群、(B)DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群。
GST-P 陽性単細胞数がグルコン酸銅 6000ppm 群で有意に増加している(×100)。



図VII-4 中期肝発がん試験における肝 8-oxoG、PCNA 及び TUNEL 免疫組織化学染色像。(A、C、E) DEN 処置の対照群、(B、D、F) DEN 処置の 6000ppm 群、(A、B)8-oxoG、(C、D)PCNA、(E、F)TUNEL。肝 8-oxoG、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞はグルコン酸銅 6000ppm 群において有意に増加している(×200)。

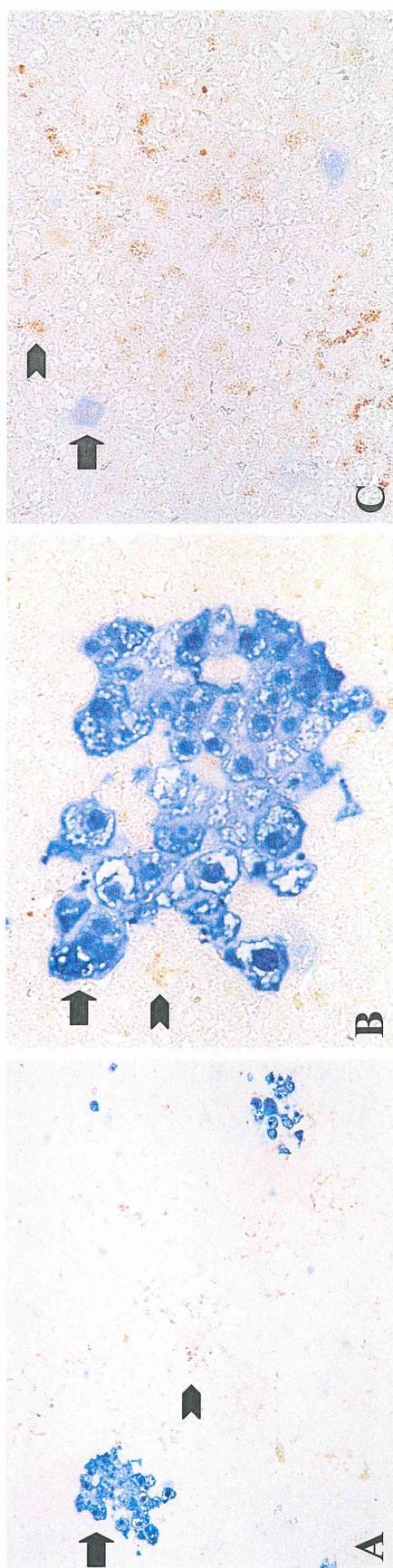
表VII-4 中期肝発がん性試験における肝 8-oxoG、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞率

Group	DEN	Copper gluconate (ppm)	Effective number of animals	8-oxoG-positive index (%)	PCNA-positive index (%)	TUNEL-positive index (%)
1	+	0	5	0	2.2 ± 1.0 ^a	0.13 ± 0.08
2	+	10	5	0	2.6 ± 1.1	0.11 ± 0.08
3	+	300	5	0	2.5 ± 0.5	0.14 ± 0.04
4	+	6000	5	55.0 ± 9.9 ^{**}	10.8 ± 4.2 [*]	1.31 ± 0.52 [*]
5	-	0	5	0	1.3 ± 0.2	0.12 ± 0.10
6	-	6000	5	63.9 ± 12.5 ^{##}	22.2 ± 11.3 ^{##}	0.89 ± 0.43 ^{##}

a Mean ± SD.

*, ** Significantly different from group 1 value (P < 0.05, 0.01).

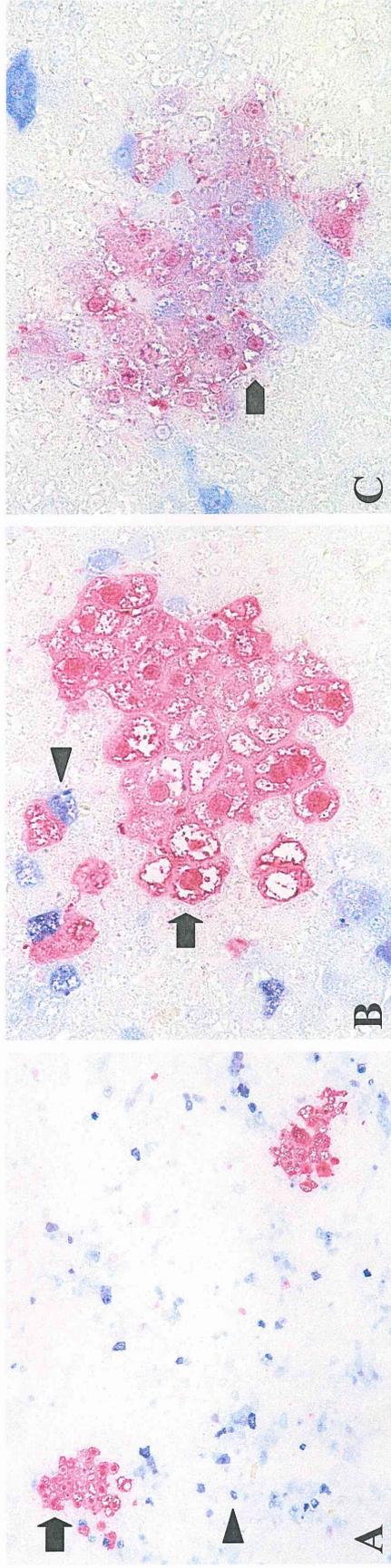
Significantly different from group 5 value (P < 0.01).



➡ : GST-P 陽性細胞(青色)

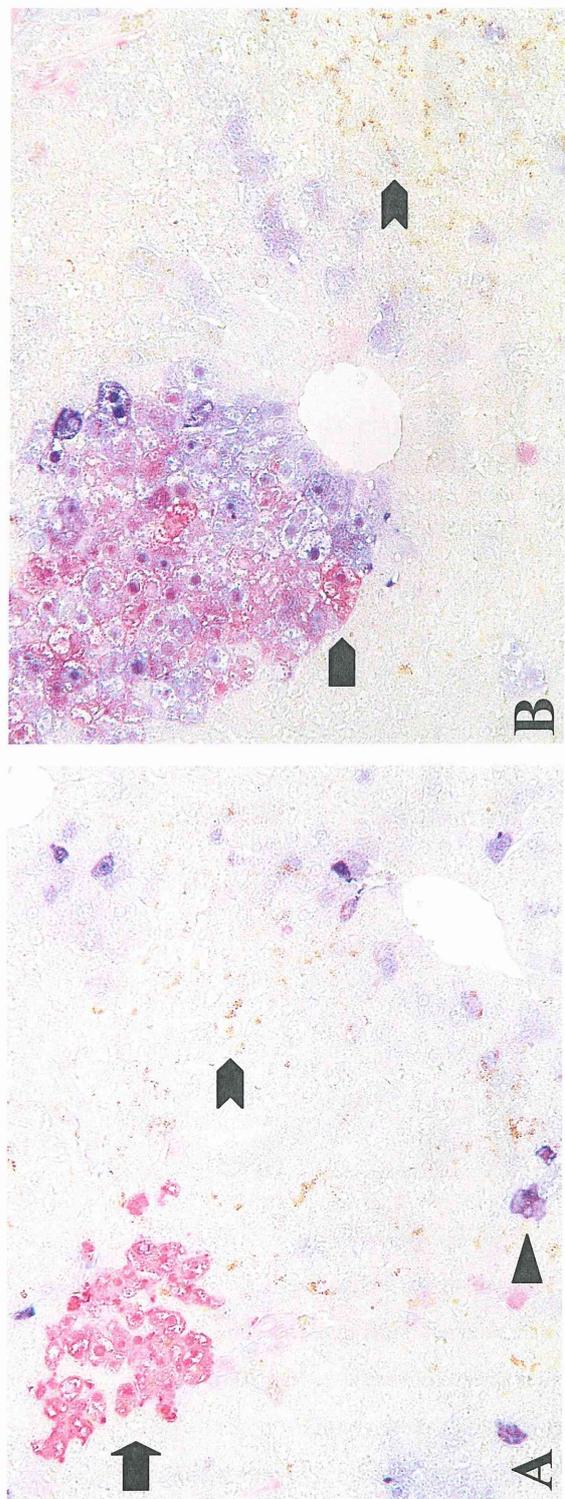
➤ : 銅陽性細胞(茶褐色)

図VII-5 中期肝発がん試験におけるDEN処置のグルコノ酸銅6000ppm群の肝GST-P・銅二重染色像(A、B、C)。グルコノ酸銅6000ppm群で銅陽性細胞が認められ、多くの場合GST-P陽性細胞巢に銅陽性所見は認められない(A×100;B、C×400)。



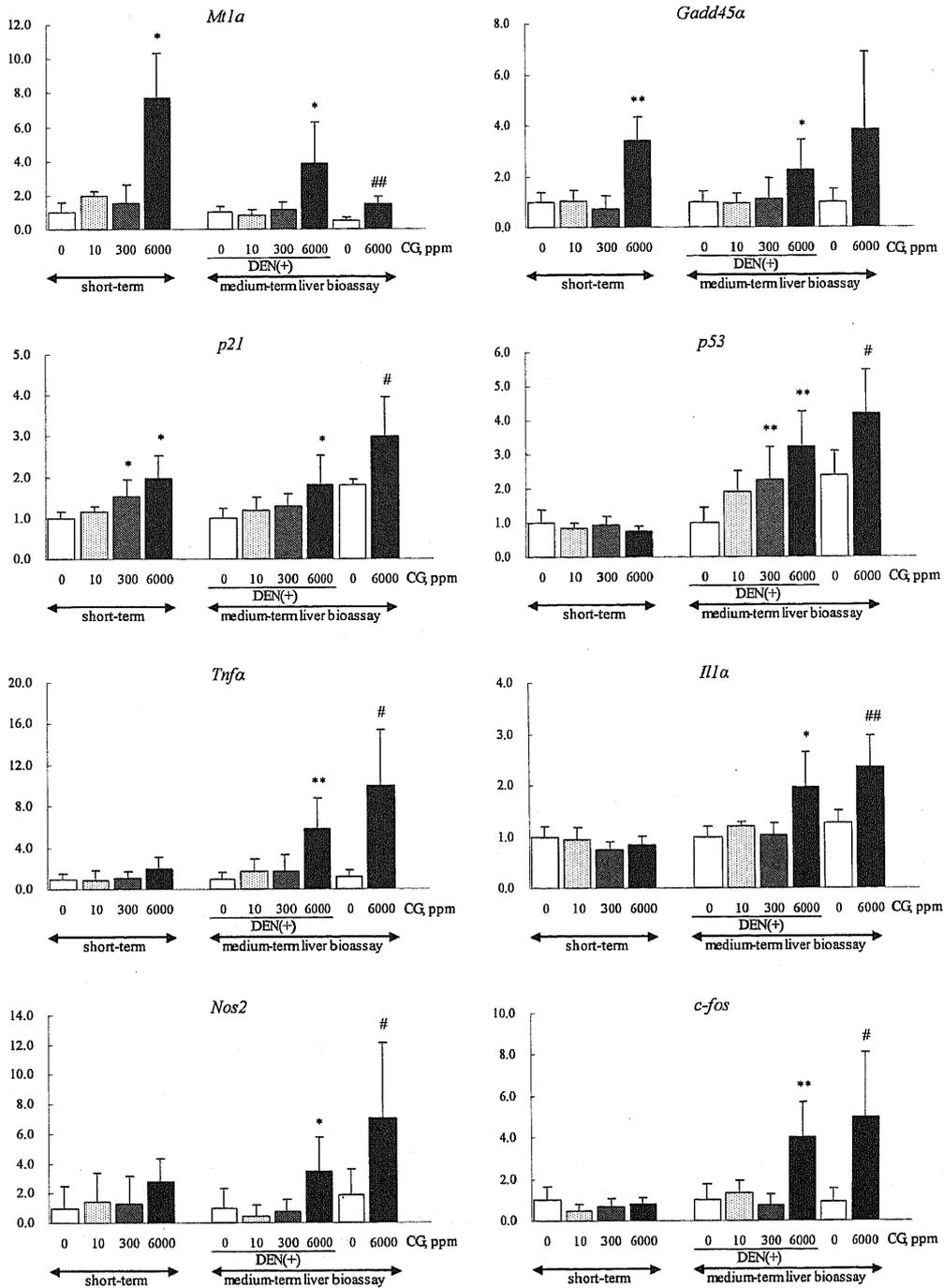
- ▲ : GST-P 陽性細胞(赤色)
- ▲ : MT 陽性細胞(青色)
- ▲ : GST-P・MT 共陽性細胞

図VII-6 中期肝癌がん性試験におけるDEN処置のグルコン酸銅6000ppm群の肝GST-P・MT二重染色像(A、B、C)。グルコン酸銅6000ppm群でMT陽性細胞が認められ、GST-PとMTは多くの場合、それぞれ単独で発現しているが、一部のGST-P陽性細胞巢ではMT共発現が認められる(A×100;B、C×400)。



- ➡ : GST-P 陽性細胞(赤色)
- ▲ : MT 陽性細胞(青色)
- : 銅陽性細胞(茶褐色)
- ◆ : GST-P・MT 共陽性細胞

図VII-7 中期肝発がん試験における DEN 処置のグルコン酸銅 6000ppm 群の肝 GST-P・MT・銅三重染色像(A、B)。グルコン酸銅 6000ppm 群で多くの場合、銅陽性細胞は GST-P 及び MT の発現のいずれにも一致せず、一部の GST-P 陽性細胞巢では、MT との共発現が認められる(×400)。



Data: Mean + SD. CG: copper gluconate.

*,** Significantly different from the value of untreated group in the short-term experiment or the only DEN-treated group in the medium-term liver bioassay ($P < 0.05, 0.01$).

#, ## Significantly different from the value of untreated group without the DEN treatment in the medium-term liver bioassay ($P < 0.05, 0.01$).

図VII-8 中期肝発がん性試験及び2週間反復投与試験での肝遺伝子発現解析

VIII. 総論

本研究により、グルコン酸銅は、中期多臓器発がん性試験並びに中期肝発がん性試験において、肝臓及び前胃を標的とする増殖性病変誘発促進作用を発揮し、高用量で発がんリスクを有することが明らかとなった。その背景機構を理解するためには、銅の動態、酸化ストレス、それによってもたらされる障害作用と細胞応答について考察する必要がある。

銅の体内動態及び銅に対する防御機構

銅は、ヒトの場合、小腸刷子縁の表面に局在する特異性のある銅転送因子、あるいは非特異的な 2 価金属イオン転送因子により、小腸上皮細胞内にまず取り込まれる。新たに吸収された銅の組織への取り込みは、異なる 2 つの相から成る。第 1 相では、腸細胞の基底側部の膜を経て門脈循環に入る銅の一定方向の転送であり、そこで銅はゆるやかにアルブミンや銅輸送タンパク質と結合し、肝臓に輸送される。第 2 相では、銅は肝臓からセルロプラスミンに結合して、血漿の中に再分泌される (Pena et al., 1999)。セルロプラスミンは、血漿における銅の主要な貯蔵タンパク質である (Hellman and Gitlin, 2002)。細胞に取り込まれた銅は、様々な酵素の構成成分となり、細胞内、細胞外に分泌される (Aruoma et al., 1991; Pena et al., 1999)。また、胆汁由来の銅と非吸収性経口銅が糞へ、あるいは腎臓を経て尿へ排出されることで、常に生体内の銅レベルは正常に保たれている (Linder and Hazegh-Azam, 1996) (図 VIII-1)。またウィルソン病や LEC ラットの研究から、銅の血中あるいは胆汁中への輸送には、ATP7B 遺伝子と呼ばれる銅輸送 P 型 ATPase が関与することが明らかになっている (Pena et al., 1999; Camakaris et al., 1999)。細胞質内の銅は、ATP7B タンパク質によってゴルジ装置内に取り込まれ、そこで銅とセルロプラスミンが結合しトランスゴルジに移行し、血中に分泌される。また銅の細胞内濃度が上昇すると、ATP7B はリソソームに再配布され銅をリソソーム内に輸送し、この小胞が肝細胞の胆管膜と融合することで、過剰な銅を胆汁中に排泄する (図 VIII-2)。ウィルソン病や LEC ラットでは ATP7B 遺伝子が欠損しているため、血中への銅分泌と胆汁中への銅排出が十分に行われず、肝臓内に銅が過剰蓄積し、重篤な肝障害が生じると考えられている。

本研究を通じて、グルコン酸銅の高用量投与は、ラットに対し死に至らしめる重篤な毒性は示

さなかつた。しかし、グルコン酸銅 3000 あるいは 6000ppm 群において、生化学的あるいは組織化学的に明らかな肝臓への銅蓄積と黒色糞が認められた。これらのことから、グルコン酸銅 3000ppm 以上の投与では、銅処理能力を超えているものと推察される。さらに中期多臓器発がん性試験では、組織化学的検索により肝臓中銅濃度や黒色糞が認められないグルコン酸銅 300ppm でも、すでに肝臓への銅蓄積が始まっていることが明らかになった。複合的な発がん剤投与により、肝臓の代謝機能が低下していると考えられる動物においては、比較的長期間の継続的な銅投与は、その排出機構の限界をさらに引き下げてしまう可能性が推察される。

MT は高濃度の銅に曝露され、上述の銅のホメオスタシス機構が充分でなくなった場合、細胞内で発現が誘導され、二次的防衛機構として機能している (Danks, 1989)。銅が細胞内に CTR1 と呼ばれる銅転送たんぱく質によって取り込まれると、未知の転写因子と結合し MT のプロモーター領域の metal responsive element (MRE) に結合し、MT 転写を活性化させる (Dameron and Harrison, 1998)。銅と結合した MT は、そのほとんどがリソソームに移行した後に胆汁中に排泄される (Vallee and Brady, 1993) (図 VIII-2)。さらに MT は、 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 等の活性酸素種の消去能 (Miles et al., 2000; Viarengo et al., 2000)、さらに一酸化窒素やペルオキシナイトライト等の活性酸素種の消去能を有することが報告されている (Cai et al., 2000)。本研究において、MT の発現誘導は 2 週間投与と比較的早期、あるいは少なくとも 1000ppm の比較的低用量から誘導されることが確認された。このことから、MT は銅負荷及び酸化ストレスへの反応として比較的早期から発現し、銅毒性に対する防御機構として機能していると考えられる。

一方、GST-P 陽性細胞巢では、銅蓄積がほとんど認められず、その一部に MT の共発現が認められた。GST-P 陽性細胞巢では、MT 発現やそのほかの機序により、銅蓄積を阻止することで、周囲組織よりも優位な細胞環境を得ているものと推察される。さらに MT がプロオキシダントとしても機能することが報告されている。LEC ラットの肝臓では、過剰な銅蓄積とともに MT が過剰発現しており、銅結合型 MT (Cu-MT) として存在する。これが H_2O_2 と反応すると $\cdot OH$ が生成されることが見出された (Suzuki et al., 1995)。さらに MT は正常細胞では、ほとんどが細胞質に局在するが、癌細胞では S 期の核に局在し、増殖活性に対し何らかの作用があることが推察されている (Cherian, 1994)。これらのことから、MT は生体防御的に働くだけでなく、発がん促進過程でも重要な役割を果たしていると考えられる (図 VIII-3)。

銅による酸化ストレス発生機構

銅は酸化ストレスを誘導し、細胞や組織に障害を与えることが *in vitro* あるいは *in vivo* の実験から明らかになっている(Oikawa et al., 2001, 2003; Murata et al., 1999; Naito et al., 1994; Yamamoto et al., 1993)。さらに酸化ストレスは、LEC ラットにおける肝毒性及び肝発がん性に重要な役割を果たしていることが報告されている(Yamamoto et al., 1993)。銅による酸化ストレスの発生機構は以下のように考えられる(図VIII-3)。

生体内では、環境因子や代謝により細胞内に活性酸素が発生する。たとえばミトコンドリアでは、 O_2 から O_2^- が生成される。 O_2^- は比較的その反応性が低いため、直接生体成分の修飾には関与しないと考えられている(Grivennikova and Vinogradov, 2006)。一方、 O_2^- の消去系として SOD が存在し、 O_2^- を H_2O_2 と O_2 に変換する(Tsan, 1997)。 H_2O_2 はほとんどカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼで分解されるが、わずかに分解されずに残った H_2O_2 は遷移金属である銅や鉄が存在すると $\cdot OH$ が生成される(Kawanishi et al., 2002)。 $\cdot OH$ の生成は、鉄の場合、2 価の鉄によるフェントン反応[$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + \cdot OH$]による。一方、銅の場合、1 価の銅ではフェントン様反応により $\cdot OH$ を生成するが[$Cu(I) + H_2O_2 \rightarrow Cu(II) + \cdot OH$]、2 価の銅でも H_2O_2 が共存すると金属に結合した状態の $\cdot OH$ (クリプト $\cdot OH$) が生成されることが報告されている(Yamamoto and Kawanishi, 1989)。また、 $Cu(II)$ はグルタチオン(GSH)により還元され $Cu(I)$ になり、上記のようにフェントン様反応へと供給される。さらに $Cu(I)$ は O_2 により再び酸化され、 $Cu(II)$ に戻る(Kawanishi et al., 2002)。 $\cdot OH$ あるいはクリプト $\cdot OH$ は活性酸素の中でもっとも反応性が高く、DNA、タンパク質、脂質等あらゆる生体成分と反応する。LEC ラットの肝臓では $\cdot OH$ が生成していることが報告されており(Yamamoto et al., 2001)、本研究においても、同様に肝臓中で $\cdot OH$ が継続的に生成されていると考えられる。これらのことから、グルコン酸銅の肝発がん促進作用は、銅の過剰供給による肝臓での酸化ストレス誘導が関与していると考えられる。

銅による酸化的 DNA 損傷機構

本研究において、グルコン酸の高用量投与により、酸化的 DNA 損傷である 8-oxoG の生成が認められた。その生成機構は以下のように考えられる(図VIII-3)。 $\cdot OH$ の半減期は非常に短いた

め、遠くまで拡散することができず、近傍の生体成分と反応する。しかし H_2O_2 は核に到達することができ、また核内での H_2O_2 の生成も報告されている (Puntarulo and Cederbaum, 1992)。DNA 近傍において H_2O_2 と銅が存在する場合、 $\cdot OH$ が生成され DNA に対し酸化的損傷を与えると考えられる。代表的な酸化的 DNA 損傷である 8-oxoG はグアニンが酸化的に損傷されたものである (Halliwell and Aruoma., 1991; Kasai., 1997)。グアニンは 4 つの塩基の中で酸化還元電位が最も低いことから酸化修飾を受けやすいことが報告されている (Ito and Kawanishi, 1997)。実際、LEC ラットでは、週齢の増加とともに肝臓への銅蓄積と 8-oxoG レベルの増加が報告されている (Otsuka et al., 2006)。

それでは銅は、酸化的 DNA 損傷を引き起こすことで遺伝子突然変異を誘発し、発がん作用を發揮しているのであろうか。LEC ラットにおいて肝臓、腎臓及び脳を用いコメットアッセイを行ったところ、これらの臓器で週齢の増加に伴い DNA 初期損傷の増加が認められ、酸化ストレスによる DNA 損傷が生じていることが示唆された (Hayashi et al., 2001, 2005, 2006)。一方、8-oxoG に対し特異的な修復酵素が存在し、哺乳類では 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ (OGG1) とアデニル DNA グリコシラーゼ (MYH) が知られている (Arai et al., 1997; Slupska et al., 1996)。OGG1 は 8-oxoG・シトシン対から 8-oxoG を、MYH は 8-oxoG・アデニン対からアデニンを除去する。これらの修復酵素により、多くの酸化的 DNA 損傷は修復されると考えられる。また 8-oxoG 以外にも、種々のタイプの酸化的 DNA 損傷が生成されることが報告されているが (Cooke et al., 2003)、これらの DNA 損傷に対しても特異的な修復酵素が存在する (Bjelland and Seeberg, 2003; Wallace, 2002)。そのため、これらの DNA 損傷は、すべてが遺伝子突然変異に結び付くわけではない。

8-oxoG の生成に関し興味深い報告がある。DEN は遺伝子突然変異を検出する Ames 試験で強い陽性を示し、イニシエーション作用を有する発がん物質である。その発がん機構は、DNA 付加体、DNA メチル化及びそれ自身のフリーラジカル体への転換が生じ、これらが複合的に細胞に作用し、DNA 損傷を誘発することで、イニシエーション作用を發揮すると考えられている (Dragan et al., 1994; Dyroff et al., 1986)。DEN をラットに単回投与すると、投与後 6 時間より用量依存的に肝臓で 8-oxoG の生成が認められ、少なくとも 72 時間まで高値を示すことが報告された (Nakae et al., 1997)。さらに、DEN 投与後早期の持続的な 8-oxoG の生成は、前がん病変形成とよく関連していた (Nakae et al., 1997)。一方、酸化ストレスによる肝毒性を示すが、肝発がん性はないと考えられているアセトアミノフェンを用い同様に単回投与を行うと、投与後初期から用

量依存的に 8-oxoG は増加するものの、72 時間以内に消失することが明らかになった (Nakae et al., 1990)。従って、酸化ストレスにより誘発される酸化的 DNA 損傷だけでは、イニシエーション作用は十分ではなく、化学物質の有する様々な DNA 損傷作用の種類や強さ、さらにはそれらの修復機構の阻害等により、発がんに至るイニシエーション作用が完全なものになると推察される。

我々は本研究において、DEN 投与の肝臓での DNA 初期損傷と GST-P 発現との間には密接な関連性があることを明らかにした。ある程度の大きさの前がん病変は、遺伝子変異を起こし増殖に向かったひとつの細胞からクローン増殖により形成される。それらの細胞では、GST-P を発現するが、その意義はイニシエートされた細胞が化学物質 (毒性物質や発がん物質等) に対する解毒活性を強化し、周辺細胞よりも増殖しやすい環境を得るためと考えられている (Farber, 1984; Roomi et al., 1985)。一方、DEN や鉛投与のラット肝において GST-P が、僅か 24 時間後に誘導されることが報告されている (Suzuki et al., 1994; Suzuki et al., 1996)。本研究において、中期肝発がん性試験の DEN 処置の有無に関わらず、GST-P 陽性単細胞がグルコン酸銅 6000ppm 群で認められたが、2 週間反復投与、13 週間あるいは 29 週間の中期多臓器発がん性試験では、高用量のグルコン酸銅投与でも、GST-P 陽性単肝細胞は認められなかった。以上のことから、今回認められた GST-P 陽性単肝細胞は、前がん病変において恒久的に発現するものとは異なり、グルコン酸銅暴露に対する解毒あるいは防御系として一時的に誘導されたものと推察される。肝細胞における GST-P 発現は、必ずしも全てが遺伝子変異により形質転換を起こした細胞を意味するものではないと推察される。

実際、グルコン酸銅は Ames 陰性であることから、遺伝子突然変異を誘発する可能性は低く、さらに本研究において、発がん剤処置を行っていない動物群では、グルコン酸銅による発がんに対する影響は認められていない。以上のことから、グルコン酸銅の DNA に対する作用は、DEN のような発がん物質とは異なり、十分なイニシエーション作用になりえないものと推察される。

一方、酸化ストレスは DNA 以外にも脂質やタンパクに対しても傷害し、過酸化脂質に代表されるそれらの障害も発がんに関与している (Klaunig et al., 1998) (図 VIII-3)。LEC ラットの肝臓では、過酸化脂質が生成されることが報告されている (Ohhira et al., 1995)。また本研究において、中期多臓器発がんでは 300ppm より発がん促進作用が見られたが、8-oxoG の量とは相関していなかった。コリン欠乏アミノ酸食餌を用いた内因性ラット肝発がんモデルにおいて、抗酸化剤を投与した場合、8-oxoG と代表的な過酸化脂質であるチオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARS) の量

に相関性がないことが報告されている(Nakae et al., 1999)。これらのことから、グルコン酸銅投与により誘導された酸化ストレスは、DNA 損傷以外にも脂質やタンパクに対して作用し、プロテインキナーゼ活性、膜構造やその機能、あるいは遺伝子発現等に影響を与え、結果的に細胞増殖活性を誘発し、発がんを促進している可能性が推察される(Klaunig et al., 1998)。

銅の酸化ストレスに対する細胞応答機構

本研究において、グルコン酸銅投与により肝臓で炎症反応、細胞増殖活性及びアポトーシスが誘導されることを明らかになった。酸化ストレスは種々のシグナル因子の活性化や動態に影響し、さらに種々のシグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして働くことが知られている。たとえば酸化ストレスは、nuclear factor κ B (NF- κ B)や activator protein 1(AP-1)等の転写因子の活性化に関与する(Newton et al., 1997)。実際にラット銅投与においてNF- κ Bが誘導され、さらにNOS2やTNF α は、NF- κ Bにより転写活性化されることが報告されている(Persichini et al., 2006)。AP-1は、c-fosとc-Junの転写因子複合体であり、細胞増殖活性を促進する(Glover and Harrison, 1995)。今回、中期発がん性試験において、NOS2、TNF α 及びc-fos発現、あるいは細胞増殖活性の増加が認められていることから、種々のシグナル因子が活性化し、細胞増殖を促進している可能性が推察される。また、アポトーシスに関連するシグナル系も、酸化ストレスをセカンドメッセンジャーとする(Kumar et al., 2001)。さらに、近年注目されている活性窒素による反応系は、酸化ストレス反応系と密接に関連することが知られている(Szabo and Ohshima., 1997)。活性窒素反応系と酸化ストレス反応系は、慢性炎症において種々のサイトカインの変動とともに重要な役割を果たす(Maeda and Akaike., 1998)。従って、酸化ストレスはこれらの種々の要因との複雑なネットワークの下に、肝発がん促進に関与しているものと推察される。これらのことから、グルコン酸銅の高用量での肝発がん促進作用には、酸化ストレスを介した炎症及びアポトーシスあるいは細胞増殖のシグナル応答が重要な役割を担っていると考えられる(図VIII-3)。

グルコン酸銅の発がんリスク評価

我々は、グルコン酸銅の発がんリスク評価についてどのように考えればよいのだろうか。本研究

は厳密な意味で行政のリスクアセスメントのための研究ではないが、何らかの貢献をすることを目的としている。我々が中期多臓器発がん性試験あるいは中期肝発がん性試験を用いた一つの理由として、これらの方法は発がんリスク評価法として International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) でも認められていることが挙げられる。レギュラトリーサイエンスの分野では、変異原性を有さない発がん物質は非遺伝毒性発がん物質として分類され、その発がん性には閾値が設定できると考えられている。グルコン酸銅は変異原性が陰性であることから (Hujita et al., 1998)、その発がん性に閾値があると考えられる。本研究において、ヒトの許容摂取量に近い 10ppm ではなんら影響は認められず、さらに発がん剤処置を行っていない動物群では、グルコン酸銅による発がんに対する影響は認められなかった。実際、ヒトでのグルコン酸銅の投与試験では、許容上限摂取量付近である 10mg/ヒト/日の 12 週間反復投与において、なんら影響がないことが報告されている (Pratt et al., 1985)。以上のことから、グルコン酸銅の発がんリスクには閾値が存在し、ヒトの許容摂取量においては、なんら問題ないものと考えられる。

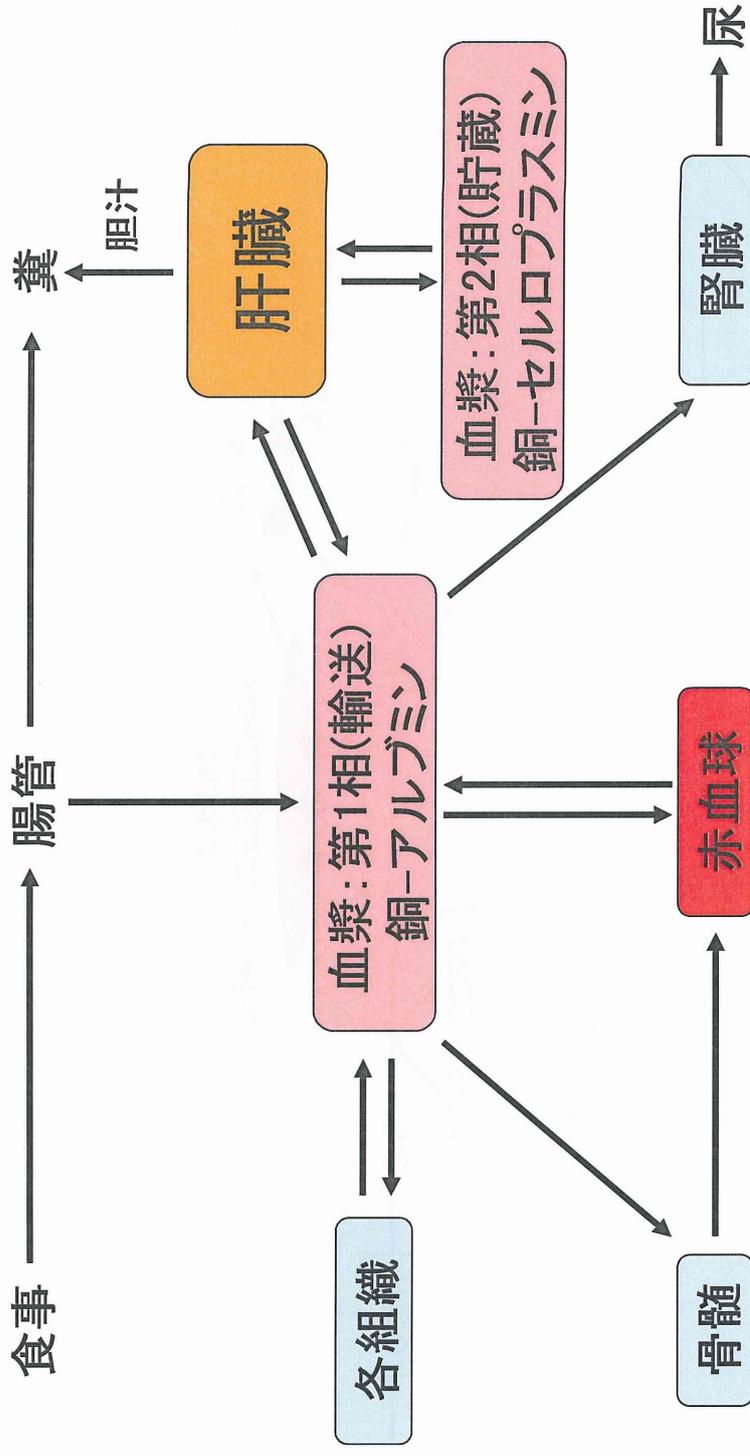
一方、それ以上の濃度でのヒトでの試験は行われていないため、どの程度の安全マージンがあるかは十分に明らかになっていない。本研究では、比較的長期間の試験である中期多臓器発がん性試験では、300ppm から肝臓での前がん病変が増加した。また疫学調査では、高濃度の血清銅と乳がんの発生には相関あり (Overvad et al., 1993)、インドにおいては、銅が溶出したミルクを長期間にわたり摂取した小児が肝硬変を発症した事例が報告されている (Food and Nutrition Board, 2001)。その場合の銅濃度は、実験的に行われる高濃度暴露とは異なり、正常値の数十倍程度に留まると推察されるが、それでも発がんあるいは肝障害への関与が疑われる。銅をサプリメントとして、基準値よりも数十倍高い量を一度に、あるいは長期間に亘って摂取することは、代謝機構が発達していない小児や疾病等により代謝機構が低下しているヒトにとっては、過剰な銅蓄積につながり、障害あるいは発がんリスクを増加させる可能性が考えられるため、不用意な銅の過剰摂取は避けるべきであろう。

グルコン酸銅とカテキンとの複合影響

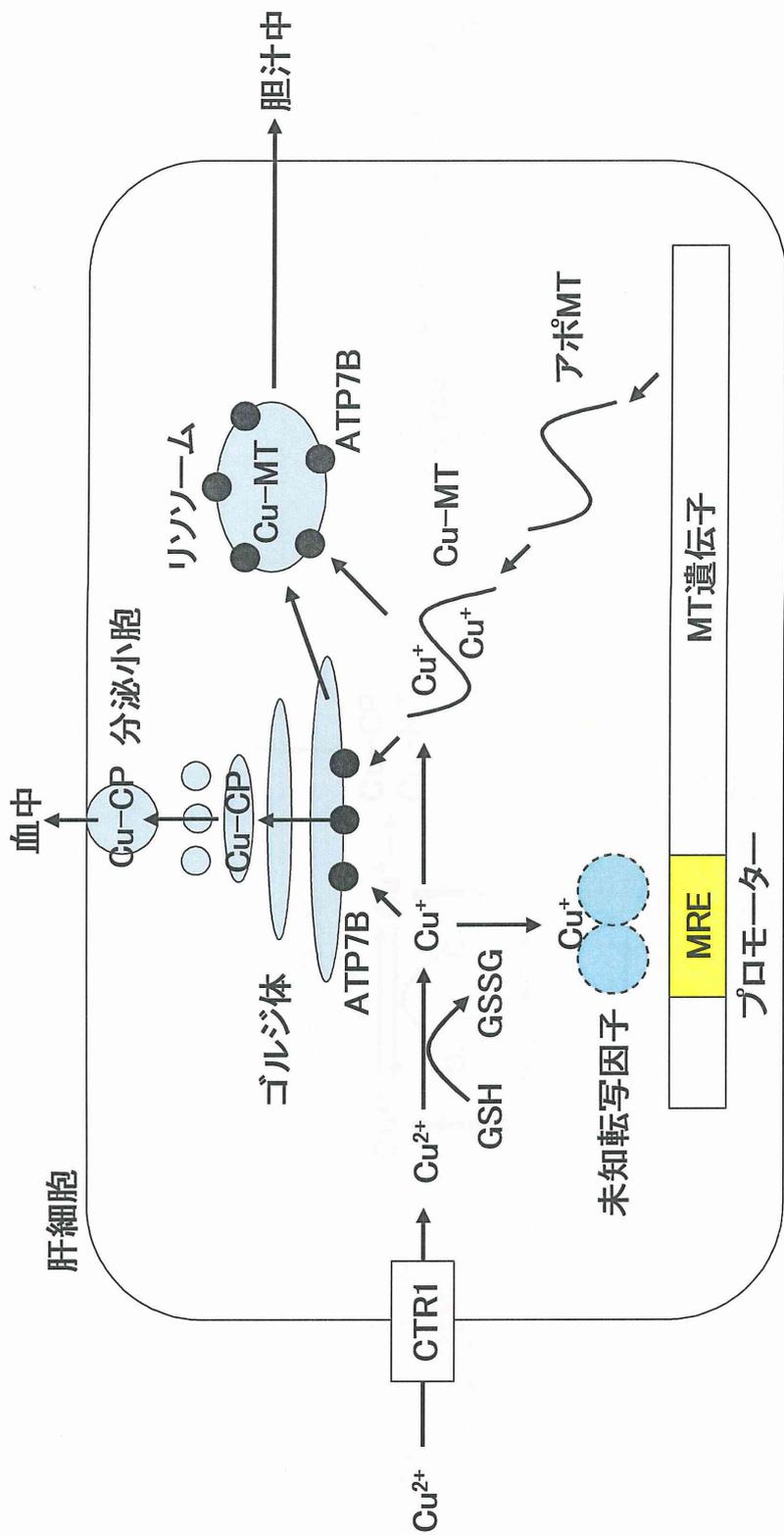
カテキンは、*in vitro* において銅イオン存在下で 8-oxoG を生成することが報告されており

(Oikawa et al., 2003)、in vitro の作用が in vivo でも起こった場合、グルコン酸銅とカテキンとの複合投与は 8-oxoG 生成を促進し、発がんリスクを増大させる可能性が懸念された。本研究において、5000ppm のカテキン投与は、グルコン酸銅による肝臓での前がん病変及び 8-oxoG 生成、あるいは前胃前がん病変に対し抑制的に作用した。以上のことから、in vivo でのグルコン酸銅とカテキンの複合投与では、in vitro で認められた作用は生じず、発がんリスクの増大はないことが示唆される。また他のグループにより現在、in vivo におけるグルコン酸銅と他のポリフェノール類であるカテコールとの複合投与による影響が検討されているが、カテコールによる修飾作用は今のところ得られていない(岡村ら 2008)。これらのことから、in vitro でのグルコン酸銅とポリフェノール類の複合影響による毒性は、in vivo では生じにくいものと推察される。またカテキンは、 $\cdot\text{OH}$ や O_2 を捕捉することで、ラットやマウスの肝臓において、酸化ストレスや肝発がんに対し抑制的に作用するとともに(He et al., 2007; Anjaneyulu et al., 2003)、8-oxoG レベルを低下させることが報告されている(Parvez et al., 2006; Hasegawa et al., 1995; Tamura et al., 1997)。本研究において認められたカテキンの発がんリスクに対する抑制作用は、これらの抗酸化作用が関与しているものと推察される。

しかしながら、ラット胃発がんモデルにおいて、亜硝酸ナトリウム(NaNO_2)とカテキンあるいはカテコールを複合投与すると、胃の中で酸化ストレスが発生し、前胃発がんを促進することが報告されている(Ishii et al., 2006; Kuroiwa et al., 2007)。これらのことを踏まえ、今後も化学物質の複合影響による安全性の評価をしていくことは、実態に即した化学物質のリスク評価をする上で重要であると考えられる。



図VIII-1 銅の代謝経路。食事由来の銅は小腸刷子縁の小腸上皮細胞内に取り込まれる。銅の組織への取り込みは、2つの相から成り、第1相では、腸細胞の基底側部の膜を経て門脈循環に入る銅の一定方向の転送であり、そこで銅はゆるやかにアルブミンや銅輸送タンパク質と結合し肝臓に輸送される。第2相では、銅はセルロプラスミンと結合して、肝臓から血漿の中に再分泌される。セルロプラスミンは血漿における銅の主貯蔵タンパク質である。細胞に取り込まれた銅は、様々な酵素の構成成分となり、細胞内、細胞外に分泌される。また、胆汁由来の銅と非吸収性経口銅が糞へ、あるいは腎臓を経て尿へ排出されることで、常に生体内の銅レベルは正常に保たれている。



図VIII-2 銅の細胞内輸送経路。銅が細胞内にCTR1と呼ばれる銅転送たんぱく質によって取り込まれると、GSHにより還元され、ATP7B(●)によってゴルジ装置内に移行する。そこで銅とセロプロブラスミンが結合し血中に分泌される。またATP7Bはリソソームに再配布され、銅をリソソーム内に輸送し、過剰な銅を胆汁中に排泄する。一方、銅は未知の転写因子と結合しMTのプロモーター領域の metal responsive element (MRE) に結合し、MT転写を活性化させる。銅と結合したMTは、リソソームに移行した後に胆汁中に排泄される。

IX. 結語

グルコン酸銅は、肝臓と前胃を標的とする増殖性病変誘発促進作用を発揮し、高用量で発がんリスクを有するが、ヒト暴露レベルにおいてそうしたリスクが顕現する可能性は低いものと判明した。またその機序には、酸化ストレス、細胞増殖、炎症反応及びアポトーシスの誘導が関与することが示唆された。一方、カテキンは、単独ではなんら影響を示さず、グルコン酸銅との複合投与により、グルコン酸銅の発がんリスクを軽減する可能性が示唆された。

X. 謝辞

本論文の執筆にあたり、御懇意な御指導並びに御審査頂きました静岡大学理学部生物科学科の塩尻信義教授に心より厚く感謝の意を表します。

また、本論文を御審査頂きました静岡大学理学部生物科学科の山内清志教授、山田眞平教授、丑丸敬史教授並びに静岡大学農学部応用生物化学科の森田達也教授に心より厚く感謝の意を表します。

本研究は東京都健康安全研究センター中江大参事研究員のご指導、ご鞭撻の基に行われたことを記し、心より厚く感謝の意を表します。

また、本研究の遂行に多大な御協力と御助言を頂きました前川昭彦博士、吉田緑博士、広瀬雅雄博士、鰐淵英樹博士、古川賢博士並びに臼田浩二氏に深く感謝致します。

さらに、常に熱意と優れた実験技術を以って、本研究の遂行を支えてくださった浅子宏美氏、前島かおり氏に感謝致します。

本研究はすべて財団法人佐々木研究所及び日産化学工業株式会社生物科学研究所にて行われました。本研究の遂行にあたり、御助言、御協力くださった各研究所の皆様に厚く御礼申し上げます。

なお、本研究は中江大参事研究員に授与された厚生労働省による厚生労働科学研究費補助金を基に実施されました。

X I. 参考文献

- Abe K, Ijiri M, Suzuki T, Taguchi K, Koyama Y, Isemura M (2005) Green tea with a high catechin content suppresses inflammatory cytokine expression in the galactosamine-injured rat liver. *Biomed Res* 26: 187-192
- Aburto EM, Cribb AE, Fuentealba IC, Ikede BO, Kibenge FS, Markham F (2001) Morphological and biochemical assessment of the liver response to excess dietary copper in Fischer 344 rats. *Can J Vet Res* 65: 97-103
- Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML (2007) Wilson's disease. *Lancet* 369: 397-408
- Anjaneyulu M, Tirkey N, Chopra K (2003) Attenuation of cyclosporine-induced renal dysfunction by catech in: possible antioxidant mechanism. *Ren Fail* 25: 691-707
- Arai K, Morishita K, Shinmura K, Kohno T, Kim SR, Nohmi T, Taniwaki M, Ohwada S, Yokota J (1997) Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 14: 2857-2861
- Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B (1991) Oxygen free radicals and human diseases. *J R Soc Health* 111: 172-177
- Bjelland S, Seeberg E (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531: 37-80
- Bunkova R, Marova I, Nemeč M (2005) Antimutagenic properties of green tea. *Plant Foods Hum Nutr* 60: 25-29
- Cai L, Klein JB, Kang YJ (2000) Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage. *J Biol Chem* 275: 38957-38960
- Camakaris J, Voskoboinik I, Mercer JF (1999) Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 225-232
- Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ (2003) Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 38: 1188-1198

- Carrier F, Bae I, Smith ML, Ayers DM, Fornance Jr AJ (1996) Characterization of the GADD45 response to ionizing radiation in WI-L2-NS cells, a p53 mutant cell line. *Mutat Res* 352: 79-86
- Chang PY, Mirsalis J, Riccio ES, Bakke JP, Lee PS, Shimon J, Phillips S, Fairchild D, Hara Y, Crowell JA (2003) Genotoxicity and toxicity of the potential cancer-preventive agent polyphenon E. *Environ Mol Mutagen* 41: 43-54
- Cherian MG (1994) The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells. *Environ Health Perspect* 102: 131-135
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M (2003) *Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J* 17: 1195-214
- Dameron CT, Harrison MD (1998) Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr* 67: 1091S-1097S
- Danks DM, Scriver TR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (1989) Disorders of copper transport in the metabolic basis of inherited disease (eds). McGraw Hill USA 1412-1431
- Davis SR, Cousins RJ (2000) Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr* 130: 1085-1088
- Deng DX, Ono S, Koropatnick J, Cherian MG (1998) Metallothionein and apoptosis in the toxic milk mutant mouse. *Lab Invest* 78: 175-183
- Desoize B (2003) Metals and metal compounds in carcinogenesis. *In Vivo* 17: 529-539
- Dijkwel PA, Wenink PW (1986) Structural integrity of the nuclear matrix: differential effects of thiol agents and metal chelators. *J Cell Sci* 84: 53-67
- Dragan YP, Hully J, Nakamura MJ, Mass J, Swenberg HC (1994) Biochemical events during initiation of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 15: 1451-1458
- Dyroff MC, Richardson FC, Popp JA, Bedell MA, Swenberg JA (1986) Correlation of O4-Ethyldeoxythymidine accumulation, hepatic initiation and hepatocellular carcinoma induction in rats continuously administered diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 7: 241-246

- EC (2001) Commission Directive 2001/15/EC of 15 February 2001 on substances that may be added for specific nutritional purposes in foods intended for particular nutritional uses, Official Journal of the European Communities. 22. 2. 2001, L52/19-25
- Enomoto K, Farber E (1982) Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis. *Cancer Res* 42: 2330-2335
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay; a comprehensive review, *Mutation Res* 339: 37-59
- Farber E (1984) The biochemistry of preneoplastic liver: a common metabolic pattern in hepatocyte nodules. *Can J Biochem Cell Biol* 62: 486-494
- Farber E (1996) The step-by-step development of epithelial cancer: from phenotype to genotype. *Adv Cancer Res* 70: 21-48
- Fong RN, Gonzalez BP, Fuentealba IC, Cherian, MG (2004) Role of tumor necrosis factor- α in the development of spontaneous hepatic toxicity in Long-Evans Cinnamon rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 200: 121-130
- Food and Nutrition Board (2001) A report of the panel on micronutrients, subcommittees on upper reference levels of nutrients and of interpretation and use of dietary reference intakes, and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intake. Chapter 12, Institute of Medicine, Washington D.C.
- Fuentealba I, Haywood S (1988) Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat: I. Ultrastructural changes in the liver. *Liver* 8: 372-380
- Fukushima S, Hagiwara A, Hirose M, Yamaguchi S, Tiwawech D, Ito N (1991) Modifying effects of various chemicals on preneoplastic and neoplastic lesion development in a wide-spectrum organ carcinogenesis model using F344 rats. *Jpn J Cancer Res* 82: 642-649
- Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchai R, Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K (2005) Hormesis and dose-response mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 26: 1835-1845
- Geetha T, Garg A, Chopra K, Pal KI (2004) Delineation of antimutagenic activity of catechin,

- epicatechin and green tea extract. *Mutat Res* 556: 65-74
- Glover JN, Harrison SC. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373: 257-261
- Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyaka KV, Lassmann H (1994) Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 71:219-225
- Grivennikova VG, Vinogradov AD (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* 1757: 553-561
- Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281: 9-19
- Hara-Kudo Y, Yamasaki A, Sasaki M, Okubo T, Minai Y, Haga M, Kondo K, Sugita-Konishi Y (2005) Antibacterial action on pathogenic bacterial spore by green tea catechins. *J Sci Food Agric* 85: 2654-2361
- Harrison JW, Levin SE, Travin B (1954) The safety and fate of potassium sodium copper chlorophyllin and other copper compounds. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)* 43: 722-737
- Hartwig A, Schlegel R, Beyersmann D (1990) Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 241: 75-82
- Hasegawa R, Chujo T, Sai-Kato K, Umemura T, Tanimura A, Kurokawa Y (1995) Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food Chem Toxicol* 33: 961-970
- Hattori A, Sawaki M, Enomoto K, Tsuzuki N, Isomura H, Kojima T, Kamibayashi Y, Sugawara N, Sugiyama T, Mori M (1995) The high hepatocarcinogen susceptibility of LEC rats is genetically independent of abnormal copper accumulation in the liver. *Carcinogenesis* 16: 491-494
- Hayashi M, Fuse S, Endoh D, Horiguchi N, Nakayama K, Kon Y, Okui T (2006) Accumulation of Copper Induces DNA Strand Breaks in Brain Cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) Rats, An Animal Model for Human Wilson Disease. *Exp Anim* 55: 419-426

- Hayashi M, Kuge T, Endoh D, Nakayama K, Arikawa J, Takazawa A, Okui T (2001) No significant differences were observed in the amounts of DNA strand breaks produced by copper between male and female liver cells of long-evans cinnamon (LEC) strain rats. *J Vet Med Sci* 63: 1109-1113
- Hayashi M, Matsui M, Ishii K, Kawasaki M (2000) A datasheet for the evaluation of the mutagenicity of food additives conducted by the Ministry of Health and Welfare and other institutions in Japan. *Environ Mutagen Res* 22: 27-44
- Hayashi M, Miyane K, Senou M, Endoh D, Higuchi H, Nagahata H, Nakayama K, Kon Y, Okui T (2005) Inhibitory Effects of Trientine, a Copper-Chelating Agent, on Induction of DNA Strand Breaks in Kidney Cells of Long-Evans Cinnamon (LEC) Rats. *Exp Anim* 54: 403-412
- Haywood S, Fuentealba IC, Foster J, Ross G (1996) Pathobiology of copper-induced injury in Bedlington terriers: ultrastructural and microanalytical studies. *Anal Cell Pathol* 10: 229-241
- He XJ, Yi ZW, Mo SH, Dang XQ, Lu XY, Tian Y, Bai HT (2007) Effect of catechin microcapsulation on the repair of DNA damage in glomerular mesangial cells induced by H₂O₂. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 32: 82-87
- Hebert C (1993) NTP technical report on the toxicity studies of cupric sulfate (CAS No. 7758-99-8) administered in drinking water and feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic Rep Ser* 29: 1-D3
- Hellman NE, Gitlin JD (2002) Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr* 22: 439-458
- HHS (Department of Health and Human Services) (1997) Food and drug administration, 21CFR Ch.1 (4-1-97 Edition) 182
- Hirose M, Hoshiya T, Akagi K, Takahashi S, Hara Y, Ito N (1993) Effects of green tea catechins in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 14: 1549-1553
- Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Nakamura A, Akagi K, Shirai T (2001) Greentea catechins were reported to enhance tumor development in the colon without effects in the lung or

- thyroid after pretreatment with 1,2-dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats. *Cancer Lett* 168: 23-29
- Hon NM, Lee KH, Knoo HE (2002) Nitric oxide in liver diseases: friend, foe or just passerby. *Ann N Y Acad Sci* 962: 275-295
- Hujita H, Nakano M, Sasaki M (1998) Mutagenicity of food additives in the Ames Salmonella/microsome assay. *Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health Annual Reports* 39: 343-350
- Hunina LM, Oliinyk SA (2006) Oxidative stress and its role in carcinogenesis. *Fiziol Zh* 52: 78-89
- Isbrucker RA, Bausch J, Edwards JA, Wolz E (2006) Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity. *Food Chem Toxicol* 44: 626-635
- Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Nishikawa A, Ito R, Saito K, Nakazawa H, Hirose M (2006) Possible involvement of NO-mediated oxidative stress in induction of rat forestomach damage and cell proliferation by combined treatment with catechol and sodium nitrite. *Arch Biochem Biophys* 447: 127-135
- Ito K, Kawanishi S (1997) Photoinduced hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by pterins: sequence specificity and mechanism. *Biochemistry* 36: 1774-1781
- Ito N, Imaida K, Asamoto M, Shirai T (2000) Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. *Mutat Res* 462: 209-217
- Ito N, Imaida K, Tsuda H, Shibata M, Aoki T, de Camargo JLV, Fukushima S (1988) Wide-spectrum initiation models: possible application to medium-term multiple organ bioassays for carcinogenesis modifiers. *Jpn J Cancer Res* 79: 413-417
- Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W (1999) The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* 5: 12-27
- Jasani B, Elmes ME (1991) Immunohistochemical detection of metallothionein. *Methods Enzymol* 205: 95-107
- Jong-Hon K, Togashi Y, Kasai H, Hosokawa M, Takeichi N (1993) Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis by administration of D-penicillamine. *Hepatology* 18: 614-620

- Kasai H (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 387: 147-163
- Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S (2002) The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 32: 822-832
- Kawanishi S, Inoue S, Sano S (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 261: 5952-5958
- Kawanishi S, Inoue S, Yamamoto K (1989) Hydroxyl radical and singlet oxygen production and DNA damage induced by carcinogenic metal compounds and hydrogen peroxide. *Biol Trace Elem Res* 21: 367-372
- Kearsey JM, Coates PJ, Prescott AR, Warbrick E, Hall PA (1995) Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene* 11: 1675-1683
- King-Herbert A, Thayer K (2006) NTP workshop: Animal models for the NTP rodent cancer bioassay: Stocks and strains. Should we switch? *Toxicol Pathol* 34: 802-805
- Kishida H, Nakae D, Kobayashi Y, Kusuoka O, Kitayama W, Denda A, Fukui H, Konishi Y (2000) Enhancement of hepatocarcinogenesis initiated with diethylnitrosamine or N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine by a choline-deficient, l-amino acid-defined diet administered prior to the carcinogen exposure in rats. *Exp Toxicol Pathol* 52: 405-412
- Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr (1998) The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 106: 289-295
- Kumar S, Bharti A, Mishra NC, Raina D, Kharbanda S, Saxena S, Kufe D (2001) Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in the necrotic cell death response to oxidative stress. *J Biol Chem* 276: 17281-17285
- Kuroiwa Y, Ishii Y, Umemura T, Kanki K, Mitsumori K, Nishikawa A, Nakazawa H, Hirose M (2007) Combined treatment with green tea catechins and sodium nitrite selectively promotes rat forestomach carcinogenesis after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Sci* 98: 949-957
- Leonard SS, Harris GK, Shi X (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction.

Free Radic Biol Med 37: 1921-1942

- Linder MC, Hazegh-Azam M (1996) Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 63: 797S-811S
- Lotem J, Peled-Kamer M, Groner Y, Sachs L (1996) Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9166-9171
- Luke MZ, Hamilton L, Hollocher TC (1975) Beryllium-induced misincorporation by a DNA polymerase: a possible factor in beryllium toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 62: 497-501
- Maeda H, Akaike T (1998) Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 63: 854-65
- Maeda Y, Taira T, Haraguchi K, Hirose K, Kazusaka A, Fujita S (1997) Activation of serum response factor in the liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rat. *Cancer Lett* 119: 137-141
- Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V (2000) Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 35-70
- Morley N, Clifford T, Salter L, Campbell S, Gould D, Curnow A (2005) The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21: 15-22
- Murata M, Moriya K, Inoue S, Kawanishi S (1999) Oxidative damage to cellular and isolated DNA by metabolites of a fungicide ortho-phenylphenol. *Carcinogenesis* 20: 851-857
- Naito S, Ono Y, Somiya I, Inoue S, Ito K, Yamamoto K, Kawanishi S (1994) Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites. *Mutat Res* 310: 79-88
- Nakae D (1999) Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathol Int* 49: 1028-1042
- Nakae D, Akai H, Kishida H, Kusuoka O, Tsutsumi M, Konishi Y (2000) Age and organ dependent spontaneous generation of nuclear 8-hydroxydeoxyguanosine in male Fischer 344 rats.

Lab Invest 80: 249-261

- Nakae D, Kobayashi Y, Akai H, Andoh N, Satoh H, Ohashi K, Tsutsumi M, Konishi Y (1997) Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. *Cancer Res* 57: 1281-1287
- Nakae D, Yoshiji H, Yamamoto K, Maruyama H, Kinugasa T, Takashima Y, Denda A, Konishi Y (1990) Influence of timing of administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase on its prevention of acetaminophen-induced liver cell necrosis in rats. *Acta Pathol Jpn* 40: 568-573
- Nakamoto N, Hirayama Y, Matuda T, Yamamoto Y (1983) Zinc and copper salts. *Food Sanitation Research* 33: 833-851
- Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ (1997) Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 28-32
- Obata H, Sawada N, Isomura H, Mori M (1996) Abnormal accumulation of copper in LEC rat liver induces expression of p53 and nuclear matrix-bound p21(waf 1/cip 1). *Carcinogenesis* 17: 2157-2161
- Ogawa I, Furukawa S, Abe M, Tanaka Y, Usuda K (2007) Short communication: study on the in vivo comet assay using rat uteri. *Genes and Environment* 29: 159-162
- Ohhira M, Ono M, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M, Fujimoto Y, Nagao M, Mori M (1995) Changes in free radical-metabolizing enzymes and lipid peroxides in the liver of Long-Evans with cinnamon-like coat color rats. *J Gastroenterol* 30: 619-623
- Ohsawa K, Nakagawa SY, Kimura M, Shimada C, Tsuda S, Kabasawa K, Kawaguchi S, Krul C, Luiten-Schuite A, Tenfelde A, van Ommen B, Verhagen H, Havenaar R (2001) Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Mutat Res* 474: 71-85
- Oikawa S, Furukawa A, Asada H, Hirakawa K, Kawanishi S (2003) Catechins induce oxidative damage to cellular and isolated DNA through the generation of reactive oxygen species. *Free Radic Res* 37: 881-890

- Oikawa S, Hirosawa I, Hirakawa K, Kawanishi S (2001) Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. *Carcinogenesis* 22: 1239–1245
- Otsuka T, Izumi K, Tokunaga I, Gotohda T, Ipposhi K, Takiguchi Y, Kaneda S, Satake N, Ohnishi T, Tashiro S, Shimada M (2006) Prevention of lethal hepatic injury in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats by D-galactosamine hydrochloride. *J Med Invest* 53: 81–86
- Overvad K, Wang DY, Olsen J, Allen DS, Thorling EB, Bulbrook RD, Hayward JL (1993) Copper in human mammary carcinogenesis: a case-cohort study. *Am J Epidemiol* 137: 409–414
- Parvez S, Tabassum H, Rehman H, Banerjee BD, Athar M, Raisuddin S (2006) Catechin prevents tamoxifen-induced oxidative stress and biochemical perturbations in mice. *Toxicology* 225: 109–118
- Pearse AGE (1985) *Histochemistry, Theoretical and Applied Vol. 2 Analytical Technology* 4th ed. Churchill Livingstone, London
- Pena MM, Lee J, Thiele DJ (1999) A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 129: 1251–1260
- Persichini T, Percario Z, Mazzon E, Colasanti M, Cuzzocrea S, Musci G (2006) Copper activates the NF- κ B pathway in vivo. *Antioxid Redox Signal*. 8: 1897–1904
- Pratt WB, Omdahl JL, Sorenson JR (1985) Lack of effects of copper gluconate supplementation. *Am J Clin Nutr* 42: 681–682
- Prohaska JR, Geissler J, Brokate B, Broderius M (2003) Copper, zinc-superoxide dismutase protein but not mRNA is lower in copper-deficient mice and mice lacking the copper chaperone for superoxide dismutase. *Exp Biol Med* 228: 959–966
- Puntarulo S, Cederbaum AI (1992) Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene treatment on NADPH- and NADH-dependent production of reactive oxygen intermediates by rat liver nuclei. *Biochim Biophys Acta* 1116: 17–23
- Ramadori G, Christ B (1999) Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin Liver Dis* 19: 141–155
- Richardson FC, Boucheron JA, Dyroff MC, Popp JA, Swenberg J (1986) Biochemical and morphologic studies of heterogeneous lobe responses in hepatocarcinogenesis.

- Roomi MW, Ho RK, Sarma DS, Farber E (1985) A common biochemical pattern in preneoplastic hepatocyte nodules generated in four different models in the rat. *Cancer Res* 45: 564-571
- Sakano K, Mizutani M, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S (2005) Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med* 39: 1041-1049
- Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, Nishidate E, Saga A, Ishida K, Tsuda S (2000) The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity. *Database Crit Rev Toxicol* 30: 629-799
- Sasaki YF (2003) Detection of in vivo genotoxicity of endogenously formed N-nitroso compounds and suppression by ascorbic acid, teas and fruit juices. *Mutat Res* 539: 65-76
- Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F, Nishidate E (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutation Res* 388: 33-44
- Sawaki M, Enomoto K, Hattori A, Tsuzuki N, Sugawara N, Mori M (1994) Role of copper accumulation and metallothionein induction in spontaneous liver cancer development in LEC rats. *Carcinogenesis* 15: 1833-1837
- Sawaki M, Hattori A, Tsuzuki N, Sugawara N, Enomoto K, Sawada N, Mori M (1998) Chronic liver injury promotes hepatocarcinogenesis of the LEC rat. *Carcinogenesis* 19: 331-335
- Scaltriti M, Belloni L, Caporali A, Davalli P, Remondini D, Rizzi F, Astancolle S, Corti A, Bettuzzi S (2006) Molecular classification of green tea catechin-sensitive and green tea catechin-resistant prostate cancer in the TRAMP mice model by quantitative real-time PCR gene profiling. *Carcinogenesis* 27: 1047-1053
- Shirai T (1997) A medium-term rat liver bioassay as a rapid in vivo test for carcinogenic potential: a historical review of model development and summary of results from 291 tests. *Toxicol Pathol* 25: 453-460
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low

- levels of DNA damage in individual cells. *Cell Res* 175: 184–191
- Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, Chiang JH, Wei YF, Miller JH (1996) Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 178: 3885–3892
- Soas G, Koerber K, Bang R, Gueerhring H, Tiegs G (2001) Inducible nitric oxide synthase is central for immune-mediated liver injury in mice. *J Clin Invest* 107: 439–447
- Sone H, Maeda M, Wakabayashi K, Takeichi N, Mori M, Sugimura T, Nagao M (1996) Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long-Evans Cinnamon rats by the copper-chelating agent trientine dihydrochloride. *Hepatology* 23: 764–770
- Sugisawa A, Kimura M, Fenech M, Umegaki K (2004) Anti-genotoxic effects of tea catechins against reactive oxygen species in human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 559: 97–103
- Suzuki H, Fujita H, Mullauer L, Kuzumaki N, Konaka S, Togashi Y, Takeichi N, Kawamukai Y, Uchino J (1990) Increased expression of c-jun gene during spontaneous hepatocarcinogenesis in LEC rats. *Cancer Lett* 53: 205–212
- Suzuki KT (1995) Disordered copper metabolism in LEC rats, an animal model of Wilson disease: roles of metallothionein. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 89: 221–240
- Suzuki T, Imagawa M, Yamada R, Yokoyama K, Kondo S, Itakura K, Muramatsu M (1994) Acute changes in liver gene expression in the N-nitrosodiethylamine-treated rat. *Carcinogenesis* 15: 1759–1761
- Suzuki T, Morimura S, Diccianni MB, Yamada R, Hochi S, Hirabayashi M, Yuki A, Nomura K, Kitagawa T, Imagawa M, Muramatsu M (1996) Activation of glutathione transferase P gene by lead requires glutathione transferase P enhancer I. *J Biol Chem* 271: 1626–1632
- Szabo C, Ohshima H (1997) DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1: 373–385
- Takahashi S, Hasegawa R, Masui T, Mizoguchi M, Fukushima S, Ito N (1992) Establishment of a multi-organ carcinogenesis bioassay using rats treated with a combination of five different carcinogens. *J Toxicol Pathol* 5: 151–156
- Tamura K, Nakae D, Horiguchi K, Akai H, Kobayashi Y, Satoh H, Tsujiuchi T, Denda A, Konishi

- Y (1997) Inhibition of green tea extract of diethylnitrosamine-initiated but not choline-deficient,L-amino acid-defined diet-associated development of putative preneoplastic,glutathione S-transferase placental form-positive lesions in rat liver. *Jpn J Cancer Res* 88: 356-362
- Tatematsu M, Nagamine Y, Farber E (1983) Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver. *Cancer Res* 43: 5049-5058
- Tsan MF (1997) Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 107-113
- Tsutsumi Y, Serizawa A, Kawai K (1995) Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen: Application to intra-operative frozen diagnosis. *Pathol Int* 45:108-115
- Valko M, Morris H, Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12: 1161-1208
- Vallee BL, Brady FO (1993) Introduction of Metallothionein, Induction of Metallothionein, Metallothionein. 3-25, 559-591
- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I (2000) Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46: 407-417
- Waalkes MP, Perantoni A, Rehm S (1989) Tissue susceptibility factors in cadmium carcinogenesis. Correlation between cadmium-induction of prostatic tumors in rats and an apparent deficiency of metallothionein. *Biol Trace Elem Res* 21: 483-490
- Wallace SS (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 33: 1-14
- Wasser IM, de Vries S, Moenne-Loccoz P, Schroder I, Karlin KD (2003) Nitric oxide in biological denitrification: Fe/Cu metalloenzyme and metal complex NO(x) redox chemistry. *Chem Rev* 102: 1201-1234
- Weyant MJ, Carothers AM, Dannenberg AJ, Bertagnolli MM (2001) (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase activation in the min/+

- mouse. *Cancer Res* 61:118-125
- Yamamoto F, Kasai H, Togashi Y, Takeishi N, Hori T, Nishimura S (1993) Elevated level of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA of liver, kidneys, and brain of Long-Evans Cinnamon Rats. *Jpn J Cancer Res* 84: 508-511
- Yamamoto H, Watanabe T, Mizuno H, Endo K, Hosokawa T, Kazusaka A, Gooneratne R, Fujita S (2001) In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. *Free Radic Biol Med* 30: 547-554
- Yamamoto K, Kawanishi S (1989) Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper (II) ion and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 264: 15435-15440
- Zhong Z, Froh M, Connor HD, Li X, Conzelmann LO, Mason RP, Lemasters JJ, Thurman RG (2002) Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by green tea extract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G957-G964
- 岡村 俊也, 石井 雄二, 井上 知紀, 田崎 雅子, 梅村 隆志, 広瀬 雅雄, 西川 秋佳 (2008) グルコン酸銅摂取によるラット肝酸化的ストレスの誘発とカテコール併用投与による修飾効果の検討. 第 24 回日本毒性病理学会学術集会
- 健康・栄養情報研究会(2003) 平成 13 年厚生労働省国民栄養調査結果「国民栄養の現状」. 第一出版, pp.55-56
- 財団法人厚生統計協会(2003) 日本人の栄養所要量(第 6 次改定:使用期間 平成 12 年 4 月～17 年 3 月), 「国民衛生の動向」. 厚生統計学会, pp.499-502
- 桜井 弘, 田中 久(1994) 生物無機化学. 廣川書店, pp.3-11
- 高橋正侑:銅「最新栄養学第 8 版:専門領域の情報」. 建帛社, pp.386-396
- 田中 久(1995) 生体微量金属の機能とその薬剤としての期待. 微量金属の生体作用 化学総説 27: 3-12