

学位申請論文

マウスにおける Cyp2b 誘導化合物による
肝肥大及び肝発がんへの
constitutive androstane receptor (CAR)の関与
に関する研究

(Involvement of the constitutive androstane receptor (CAR)
in murine liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis
mediated by Cyp2b-inducible chemicals)

2017 年 12 月

坂本 洋平

目次

目次.....	2
序論.....	3
第 1 章.....	8
緒言.....	9
実験材料及び実験方法.....	10
実験結果.....	16
考察.....	22
小括.....	25
第 1 章の図表.....	26
第 2 章.....	40
緒言.....	41
実験材料及び実験方法.....	42
実験結果.....	46
考察.....	50
小括.....	53
第 2 章の図表.....	54
第 3 章.....	63
緒言.....	64
実験材料及び実験方法.....	66
実験結果.....	69
考察.....	72
小括.....	75
第 3 章の図表.....	76
総括ならびに結論.....	84
謝辞.....	90
引用文献.....	91
要旨.....	104
Abstract.....	109

序論

現代人は、様々な天然由来あるいは人為的に合成された化学物質に囲まれて生活しており、環境中から呼吸や皮膚への接触を介して、又は食品・水に含まれる添加物や残留物として口から摂取することで、様々な化学物質に暴露されている。これらの化学物質については、人体に与える影響のポテンシャルや暴露量との関係を調べるため、様々な手法によるリスク評価が行われている。その一つの手法として毒性試験が取り入れられており、主にラットやマウスなどのげっ歯類を実験動物として用い、対象となる化合物を強制的に摂取させることで、その反応や影響が詳細に調べられている。毒性試験で得られるデータは、化合物によるヒトへの有害性の推測について多くの有用な情報をもたらす。一方で、生理機能や代謝反応には動物種ごとに差があり、異なる反応を示すことがあることから、実験動物から得られた情報をもとに有害性の評価を行う際には、その反応や影響の発現メカニズムを考慮したうえでのヒトへの外挿性を検討する必要がある。とくに化学物質投与によって実験動物で発がん性が認められた場合、ヒトへの外挿性の判断は、有害性評価の最も重要なポイントとなる。

ヒトとげっ歯類における化学物質による発がん感受性の種差については、遺伝子工学的な手法を取り入れた研究の進展とともに詳細なメカニズムが明らかになりつつある。その一例として、フェノバルビタール (Phenobarbital、以下 PB) による肝発がんに関する種差が挙げられる。PB は抗てんかん薬として、臨床的に古くから使用されてきた。PB はヒトにおいて肝肥大を起こすものの、疫学的研究結果からヒトでは肝発がんには関与しないと考えられている (22, 28)。一方で、げっ歯類においては肝肥大のみならず、長期投与では肝発がんを起こすことが知られている (62)。PB によ

るマウスの肝発がんは DNA の傷害作用（イニシエーション作用）によるものではなく、持続的に肝細胞増殖活性を上げるなどの発がん促進作用（プロモーション作用）によると考えられている (62)。

1990 年代後半には、PB によるげっ歯類での肝発がんメカニズムについて、重要な発見があった。すなわち、薬物代謝酵素の誘導に関わる核内受容体である Constitutive Androstane Receptor (NR1I3、以下 CAR) のノックアウトマウスでは、PB による肝肥大及び肝腫瘍が誘発されないことが明らかとなり、PB によるげっ歯類での肝発がんには CAR が重要な役割を果たしていることが示された (19, 61, 64)。CAR は、活性化されることでシトクロム P450 (Cyp)、硫黄基転移酵素、及び UDP グルクロン酸転移酵素等の異物代謝酵素の発現を増加させる核内受容体である (1, 6, 50, 57)。CAR の活性化はげっ歯類及びヒトのいずれにおいても Cyp2b を誘導するが、肝臓由来の培養細胞を用いた研究では、げっ歯類では DNA 合成促進やアポトーシス抑制がみられるのに対し、ヒトの肝細胞ではこれらを示さなかった (14, 17)。さらに、2000 年代に入ってからヒト由来の CAR 及び他の核内受容体である Pregnane X Receptor (NR1I2、以下 PXR) を発現させた肝臓を持つマウスでは、PB によって肝肥大はみられるものの肝細胞増殖は起こらないことも明らかとなった (45)。

この事例を元に、げっ歯類での CAR を介した肝発がんについて、いくつかの科学的な要素を満たした場合はヒトへの外挿性がないとする Mode of Action (MOA) の考え方が提唱され、広く受け入れられつつある (4, 7, 18, 49)。その中で、肝肥大、肝細胞増殖などが CAR に関連したマウス肝発がんにおける重要な指標として挙げられており、それらを満たした化合物についてはヒトでの肝発癌性の懸念はないという判断が可能、としている (10, 18)。実際に、ピレスロイド系殺虫剤など、げっ歯類に肝発がん性を有する化合物について、MOA 分析を行うことで PB と類似の CAR を介したメカニズムであることを示し、ヒトへの外挿性が乏しいと判断している報告も複数ある (8, 37, 42)。

しかし、化学物質による CAR 活性化機序やその下流の薬物代謝酵素の誘導パスウェイや細胞増殖に至る過程は完全には解明されておらず (3, 43)、また化合物によっては CAR のみならず他の核内受容体にも作用して薬物代謝酵素の誘導や肝肥大を起こすことも知られている中で (35, 54)、画一的な基準で肝発がん性のリスク評価を行ってしまうことには大きな懸念が残る。このような問題意識から、本研究ではげっ歯類で肝肥大及び肝発がんの誘発の報告がある、以下の 2 種類の化学物質に注目した。

ピペロニルブトキシド (Piperonyl butoxide、以下 PBO) は農薬 (殺虫剤協力剤) あるいは食品添加物 (穀類の防虫剤) として広く使用されてきた化合物である。本剤の作用は、虫の体内におけるシトクロム P450 阻害により、有機リン系やピレスロイド系の殺虫剤がシトクロム P450 によって代謝、解毒されるのを妨げることによる。PBO はげっ歯類において Cyp2b を誘導して肝肥大を起こし (13, 60)、肝発がん性を示すことが報告されている (5, 21, 51, 52)。

デカブロモジフェニルエーテル (Decabromodiphenyl ether、以下 DBDE) は臭素含有率が高く燃えにくい性質を持つことから、家電製品に使われるプラスチックや内装材などに難燃剤として添加する形で使用されてきた。急性毒性は低く、また体内への吸収も僅かであるとされる一方で、げっ歯類では甲状腺や肝臓で発がん性を示すという報告がある (20, 33)。また、DBDE はラットにおいて Cyp2b の誘導を伴う小葉中心性の肝細胞肥大を示すことも知られている (58)。

PBO と DBDE のいずれについても、十分な数の *in vitro*, *in vivo* 遺伝毒性試験が実施されており、いずれの化学物質についても遺伝毒性はないことが知られている (20, 21, 33)。これらの情報から、PBO 及び DBDE は、げっ歯類で Cyp2b を誘導して肝肥大、肝発がんを誘発し、またその作用は非遺伝毒性的なものであるという点で、PB に類似した機序が働いている可能性が考えられる。しかしこ

れまでに、これらの化合物による肝肥大、肝発がん と CAR との関係について詳細に調べた報告はない。

そこで、本研究では PBO と DBDE による肝肥大と肝発がんにおける CAR の関与を明らかにし、PB 型の肝発がんに関わるイベント（肝肥大、肝細胞増殖活性の亢進等）との比較を行うことで、ヒトへの外挿性の有無を検討するため、一連の実験を実施した。本研究の注目すべき点は CAR の関与の検討を、野生型マウスと CAR ノックアウトマウス（以下 CARKO マウス）に各化合物を投与して比較したことである。CARKO マウスを使用することで、野生型マウスに誘発された肝臓腫瘍が CAR を介したものであるか、又は CAR 以外の経路が発がんに関わっているのか、を明確に示すことが可能である。

第 1 章では、PBO 及び DBDE による雄性マウスでの肝肥大及び肝発がんへの CAR の関与について調べた。また、比較のため肝肥大及び肝発がんへの CAR の関与が明らかとなっている PB を処置する群も設けた。まず、肝肥大における CAR の関与を調べるため、雄性の野生型マウス及び CARKO マウスに化合物を 1 週間又は 4 週間混餌投与し、肝重量、病理組織学的検査、薬物代謝酵素の誘導、及び肝細胞増殖活性について検討を行った。次に、肝発がんにおける CAR の関与を調べるため、肝発がんのイニシエーターであるジエチルニトロソアミン（Diethylnitrosoamine、以下 DEN）を用いたイニシエーション・プロモーションモデルを野生型マウス及び CARKO マウスに適用し、病理組織学的検査を用いて検討した。なお、イニシエーション・プロモーションモデルは、げっ歯類の肝発がんを調べる方法として国際的にも受け入れられている方法である（9）。

第 2 章では、げっ歯類での肝発がんが雌と比較して雄で多いこと（25, 44）、及び CAR の活性にも性差があることが知られていることに着目し（12, 16）、PBO と DBDE を雌性の野生型マウス及び

CARKO マウスに 4 週間、あるいは DEN 投与後に 27 週間混餌投与し、肝肥大、肝発がん と CAR との関連性において性差があるかどうかを調べた。

第 1 章及び第 2 章の結果から、PBO の肝肥大には CAR 以外の核内受容体の関与が示唆された。異物代謝に関わる核内受容体は CAR 以外にも PXR、Peroxisome proliferator-activated receptor (以下 PPAR)、Aryl hydrocarbon receptor (以下 AhR) など多岐にわたり、化学物質によっては複数の核内受容体を活性化させることで生体に作用を及ぼし、また投与用量によって活性化される核内受容体異なるというケースも報告されている (35, 42, 54)。第 1 章及び第 2 章では、肝発がんの解析に注力したため、腫瘍誘発が報告されている 1 用量のみで投与を実施したが、投与用量に応じた CAR を含めた複数の核内受容体の肝肥大への関与を詳細に調べるためには課題があった。そこで、第 3 章では、PBO を雄性の野生型及び CARKO マウスに複数用量投与し、肝肥大への CAR を含めた核内受容体の関与を詳細に検討することとした。

以上の実験により、PBO 及び DBDE によるマウスでの肝肥大及び肝発がんへの CAR の関与を調べることで、これらの化学物質による肝発がんのヒトへの外挿性を検討することを本研究の第一の目的とした。また、それぞれの化学物質による肝肥大及び肝発がんへの CAR 以外の核内受容体の関与を調べることで、Cyp2b 誘導化合物の MOA 分析の妥当性についても考察を加えることを第二の目的とした。

第 1 章

ピペロニルブトキシド及びデカブロモジフェニルエーテルによる

雄性マウスでの肝肥大及び肝発がんへの CAR の関与

緒言

ピペロニルブトキシド（以下 PBO）は農薬（殺虫剤協力剤）あるいは食品添加物（穀類の防虫剤）として広く使用されてきた化合物である（66, 67、本邦での農薬としての登録は 2004 年 7 月 1 日に失効）。この作用は、本剤のシトクロム P450 阻害作用により、虫の体内において有機リン系やピレスロイド系の殺虫剤がシトクロム P450 によって代謝、解毒されるのを妨げることによる。

デカブロモジフェニルエーテル（以下 DBDE）は臭素化難燃剤として広く使用されてきたが、その高い残留性等から POPs 条約（残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約）対象物質となり、研究レベルでの使用を除き、現在では世界的に製造及び使用の中止が決定された（48）。しかし、その難分解性から、環境中にはいまだに多く残留していると考えられている。

PBO 及び DBDE のいずれも、げっ歯類で肝肥大・肝発がんを誘発する報告があり（20, 21）、Cyp2b の誘導についても報告がある（58, 60）。またいずれの化合物も、遺伝毒性はないとされている。以上より、フェノバルビタール（以下 PB）に類似した機序で、肝肥大や肝発がんを誘発している可能性が考えられるが、これまでに CAR との関連についての十分な研究は行われていない。

そこで本章では、雄性の野生型マウスと CARKO マウスを用いて、PBO 及び DBDE による肝肥大及び肝発がんに関与しているかを調べた。肝発がんは、イニシエーション・プロモーションモデルを用いて評価した。

実験材料及び実験方法

化合物

本実験で用いた化合物の化学構造式を Figure 1-1 に示す。ピペロニルブトキシド (PBO、CAS No. 51-03-6、純度>90%)、デカブロモジフェニルエーテル (DBDE、CAS No. 1163-19-5、純度 98%)、及びフェノバルビタール (PB、CAS No. 57-30-7、純度 98%) は、和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より入手した。ジエチルニトロソアミン (DEN、CAS No. 55-18-5、純度 99.9%) は、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より入手した。

動物

C3H/HeNCrl マウスを背景とした CARKO マウス (64) は米国 NIH/NIEHS の根岸博士よりご厚意でご提供いただいた。同 KO マウスには C57BL 系統由来と C3H 系統由来マウスが存在するが、今回の実験の目的が肝発がん性であることから、同博士より肝腫瘍好発系である C3H 系統を供与頂いた。また、雌よりも雄で肝臓腫瘍が好発することから、本実験では雄を選択した。供与後、CARKO マウスは、国立医薬品食品衛生研究所内で継代繁殖させ、試験実施可能な個体数まで繁殖用動物数を確保したのち、本試験に用いた。野生型動物として雄性 C3H/HeNCrlCrlj を日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan) より購入した。なお、全ての動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会に承認を受け、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験の適切な実施に関する規定に準拠して行った。

化合物の投与

本実験は、実験 1、実験 2、及び実験 3 に分けて実施した。

実験 1 では化合物による肝肥大及び肝代謝酵素の誘導と CAR の関連を調べるため、4 週間の投与期間を設定した。実験 2 では化合物が早期の段階で野生型及び CARKO マウスの肝細胞の増殖に与える影響を調べるため、1 週間の投与期間を設定した。実験 1 及び実験 2 では、6 週齢の野生型及び CARKO のマウス各 20 匹を、体重を指標として無作為に 5 匹ずつの 4 群に分けた。なお野生型マウスについては 5 週齢でブリーダーより入荷した。動物は遺伝子型ごと、1 群毎に別々のケージに分けて、12 時間の明暗サイクル下で飼育を行った。投与群 3 群には PBO を 5000 ppm、DBDE を 50000 ppm、及び PB を 500 ppm の濃度で粉末基礎飼料（CRF-1, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan）に混餌投与し、実験 1 では 4 週間、実験 2 では 1 週間自由摂取させた。陰性対照群には基礎飼料を同様の期間自由摂取させた。各化合物の投与量（混餌濃度）については、各化合物についてマウスで肝肥大や肝発がん性が報告されている用量を参考に選択した（20, 21, 22, 33, 52, 62）。

実験 3 では PBO 及び DBDE による肝発がん性と CAR との関連を調べるため、肝発がんのイニシエーターである DEN を用いたイニシエーション・プロモーションモデルを用いた検討を行った（9）。野生型マウスについては、4 週齢でブリーダーより 80 匹を入荷し、5 週齢時に 1 群 20 匹の 4 群に分けた。CARKO マウスについては、5 週齢時に 1 群あたり 21 から 24 匹を 4 群に分けた。肝発がんのイニシエーション処置として、全ての動物について、5 週齢時に DEN を 90 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した。6 週齢から PBO、DBDE、あるいは PB をそれぞれ 5000, 50000, 及び 500 ppm の濃度で基礎飼料（粉状の CRF-1）に混餌投与し、27 週間自由摂取させた。また、陰性対照として、基礎飼料を自由摂取させる群を設定した。全ての実験において、化合物の混餌作業及び餌の交換は

週 1 回実施し、餌缶内に残った飼料は廃棄した。

動物の観察及び安楽死の方法

一般状態観察を 1 日 1 回以上実施した。体重及び摂餌量は、投与 13 週までは 1 週間に 1 回測定し、その後は 2 週間に 1 回測定した。投与 1、4、あるいは 27 週間後に、CO₂ 吸入による全身深麻酔下で、マウスを放血により安楽死させた。肝臓を肉眼的に観察後、重量を測定し、以下に記載する各検査用に切出しを行った。

肝臓の病理組織学的及び免疫組織化学的評価

4 週投与群（実験 1）では、放血安楽死後に肝臓重量を測定し、中間葉を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液によって固定した。パラフィン包埋した肝臓を薄切し、常法に従ってヘマトキシリンエオジン（HE）染色を実施した。さらに、ホルマリン固定した組織の一部から、肝細胞中の脂質の有無を調べるために凍結切片を作製し、オイルレッド O 染色を実施した。肝細胞肥大の程度は、軽度（mild）、中等度（moderate）、重度（marked）の 3 段階に分類した。分類は、個々の肝細胞の肥大の程度を元に行い、肝細胞肥大の領域（小葉中心部のみ、又は小葉中心部から中間葉まで）についても補足情報として記録を残した。加えて、パラフィン包埋切片について、抗 Cyp2b 抗体（Millipore Co., Billerica, MA）を用いた免疫組織化学を実施した。パラフィン包埋切片を抗体液とともに 4°C で一晩インキュベートし、ペルオキシダーゼで標識したデキストランポリマーが結合した二次抗体（Histofine Simple Stain mouse MAX PO(R), Nichirei, Tokyo, Japan）を反応させ、3-3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) により視覚化した。また、対比染色として、ヘマトキシリン染色を実施した。

27 週投与群（実験 3）では、放血安楽死後に肝臓を採取し、速やかに 10%中性緩衝ホルマリン溶液によって固定した。固定後、中間葉から 8 切片、外側左葉から 5 切片の計 13 切片を切出し、パラフィン包埋後に HE 染色を施した。肝臓の増殖性病変（変異肝細胞巣及び腺腫）については、構成される細胞の細胞質の特徴から、好酸性、好塩基性、及びその他の 3 つの分類を行った。個々の分類について、群毎の発生率（Incidence、増殖性病変を有する個体の割合）及び発生数（Multiplicity、個体ごとに観察された増殖性病変の数の平均値）を求めた。なお、肝臓の増殖性病変の分類については、INHAND（International Nomenclature and Diagnosis Criteria of Lesions in Rats and Mice, 55）に従った。

肝細胞の増殖活性

1 週投与群（実験 2）及び 4 週投与群（実験 1）のパラフィン包埋肝臓切片について、肝細胞増殖活性の検索を行った。パラフィン包埋切片について、抗 PCNA 抗体（Clone PC10, DAKO, Santa Clara, CA, USA）を用いた免疫組織化学を実施した。パラフィン包埋切片を抗体液とともに 4°Cで一晩インキュベートし、ペルオキシダーゼで標識したデキストランポリマーが結合した二次抗体（Histofine Simple Stain mouse MAX PO(Multi), Nichirei, Tokyo, Japan）を反応させ、3-3'-diaminobenzidine（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA）により視覚化した。また、対比染色として、ヘマトキシリン染色を実施した。PCNA 染色した切片を用いて、視野中にある PCNA 陽性細胞数を指標に評価した。すなわち、対物レンズ 10 倍の光学顕微鏡及び付属のデジタルカメラを用いて小葉中心部及び辺縁部が入るように無作為に複数視野を撮影し、少なくとも 1000 個以上の肝細胞中の PCNA 陽性細胞数の割合を算出した。

RT-real time PCR

4週投与群（実験1）の肝臓について、肝薬物代謝酵素で肝肥大に関連すると報告されている分子種を中心に解析を行った。安楽死後速やかに肝臓外側左葉の一部を液体窒素で凍結した。凍結した肝臓から、ISOGEN（Nippon Gene Co. Ltd., Tokyo, Japan）を用いて Total RNA を抽出した。抽出した 1 µg の Total RNA を High Capacity Reverse Transcription kit（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて逆転写し、TaqMan Fast Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems）及び TaqMan Gene Expression Assays（Applied Biosystems）を用いてリアルタイム PCR（7900HT Fast Real-time PCR System, Applied Biosystems）を実施した。本実験では、Cyp1a1 (Mm00487218_m1)、Cyp1a2 (Mm00487224_m1)、Cyp1b1 (Mm00487229_m1)、Cyp2b10 (Mm01972453_s1)、Cyp3a11 (Mm00731567_m1)、Cyp4a10 (Mm01188913_g1)、及び Cytochrome P450 reductase (Mm00435876_m1) のプライマープローブセットを用いた。それぞれの遺伝子発現レベルは、内因性の GAPDH (TaqMan Rodent GAPDH Control Reagent, Applied Biosystems) で標準化し、相対標準曲線法により計算した。また、Gadd45β は抗アポトーシス及び CAR に関連することが知られている (39, 40, 65) ことから、過去に小澤らが報告 (38) した方法で Gadd45β についても遺伝子発現レベルを調べた。

統計解析

統計解析は、対照群と化合物投与群（PBO 投与群、DBDE 投与群、及び PB 投与群）の比較を CARKO マウス及び野生型マウスそれぞれについて実施した。また、CARKO マウスと野生型マウスの比較を同じ投与群同士で比較した。体重、肝臓絶対重量、肝臓相対重量、肝細胞増殖活性、mRNA

発現量、及び肝臓増殖性病変の multiplicity のデータについて、F 検定により等分散性の検定を実施した。等分散性が認められた場合は Student の t 検定を、等分散性が認められなかった場合は Welch の t 検定を用い、それぞれ媒体対照群と化合物投与群との間で比較した。肝臓増殖性病変の発生頻度のデータは、Fisher の直接確率検定によって統計解析した。有意水準は 5% 及び 1% とした。

実験結果

一般状態、体重、及び肝臓重量

投与 1、4、及び 27 週後の最終体重及び肝重量の結果を Table 1-1 に示す。4 週投与実験の PBO 群の CARKO マウスの 1 例において、PBO 添加による摂餌量低下に起因した衰弱がみられ、PBO の投与開始から 13 日目に死亡が確認された。その他の動物では、化合物の投与に起因した一般状態の悪化及び死亡は認められなかった。全ての投与期間において、PBO 群の最終体重では陰性対照群と比較して有意な低値を示した。4 週投与実験では PBO 群で摂餌量の低値が認められていたことから、基礎飼料への PBO 添加による摂餌忌避によるものと考えられる。27 週投与実験では、全ての動物において DEN の腹腔内投与後に一過性の体重減少が認められたが、3~4 週間で回復した。27 週投与実験の PB 群の CARKO マウスの最終体重は、陰性対照群と比較して優位に低値であったが、同群では摂餌忌避行動は認められていなかった。肝臓重量に関しては、1 週及び 4 週投与実験において、PB 群では野生型マウスのみで、PBO 群では野生型及び CARKO マウスのいずれにおいても、著しい肝臓重量の高値がみられた。DBDE 群では 1 週投与では肝臓重量に影響を与えなかったが、4 週投与後には野生型のみで肝臓重量の有意な高値がみられた。PB 群の CARKO マウスでは、4 週投与後に陰性対照群と比較して有意な肝臓重量の低値がみられた。

肝臓の病理組織学的変化（腫瘍性病変以外の毒性変化）

4 週投与後の肝臓の病理組織学的変化の結果を Table 1-2 に示す。また、4 週投与後の代表的な肝臓の HE 染色像を Figure 1-2 に示す。4 週投与後では、化合物を投与された全ての野生型マウスに

において、肝細胞肥大が認められた。肝細胞肥大は PBO 群では小葉中心部から小葉中間帯にかけて高度に、DBDE 群では小葉中心性に中程度に、PB 群では小葉中心性に中程度から高度にみられた。一方の CARKO マウスでは、DBDE 及び PB 群では肝細胞肥大が認められなかったのに対し、PBO 群では小葉中心部のみ、又は小葉中心部から小葉中間帯にかけて軽度から中程度に肝細胞肥大が認められた。さらに、CARKO マウスの PBO 群及び DBDE 群の一部の個体では肝細胞の細胞質に空胞化が認められ、オイルレッド O 染色で陽性を示す脂質成分を含んでいた (Data not shown)。その他、野生型及び CARKO マウスの数例で、肝組織の急性炎症を示す、好中球の浸潤が認められた。

27 週投与後の肝臓の増殖性病変を除く病理組織学的変化の結果を Table 1-3 に示す。4 週投与後と同様、野生型マウスでは化合物を投与した全ての群で肝細胞肥大が認められた。CARKO マウスでは、4 週投与後と同様に PBO 群で小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、PB 群では肥大は認められなかったが、DBDE 群では 4 週投与後時点ではみられなかった小葉中心性の肝細胞肥大が、27 週時点では軽度又は中程度に認められた。小葉中心部の肝細胞の空胞化が、CARKO マウスの PBO 群及び DBDE 群で認められた。肝細胞肥大が認められた、野生型マウスの全ての化合物投与群及び CARKO マウスの PBO 群及び DBDE 群で、肝細胞の核及び細胞質の巨大化 (Karyocytomegaly) が認められた。Karyocytomegaly は PB 群においては野生型マウスの全例に認められたが、CARKO マウスでは認められなかった。限局性の肝細胞壊死巣が PBO 群の野生型及び CARKO マウスに散見されたが、発生頻度は CARKO マウスの方がやや高かった。好中球の浸潤が DBDE の CARKO マウスの約半数程度にみられた。クッパー細胞への黄色色素の沈着が全ての投与群に認められたが、発生頻度は DBDE の野生型マウスで最も高かった。本変化は単核細胞浸潤やグリソン氏鞘周囲の Oval cell の過形成を伴うものであった。

肝細胞増殖活性

1週及び4週投与実験での肝細胞増殖活性の結果を Figure 1-3 に示す。1週投与後では、陰性対照群と比較して統計学的に有意な PCNA 陽性細胞率の増加が、PBO 群及び PB 群の野生型マウスで認められ、統計学的な有意差はなかったものの PBO 群の CARKO マウスでも増加の傾向が認められた。4週投与後では、いずれの群においても PCNA 陽性細胞率は1%以下であった。

肝臓における Cyp 発現

4週投与後のマウス肝臓中の CyPs、Gadd45beta 及び Cyp reductase をコードした mRNA 発現量を Figure 1-4 に示す。Cyp2b10 の mRNA 発現レベルは PBO 群、DBDE 群、及び PB 群の野生型マウスで増加し、その程度は PBO 群と PB 群で顕著であった。CARKO マウスでは、陰性対照群を含むすべての群で Cyp2b10 mRNA 発現レベルが各群の野生型マウスと比較して低下し、DBDE 群及び PB 群では野生型マウスの陰性対照群と比較して大幅に低下したが、PBO 群の CARKO マウスではある程度の増加がみられた。Cyp3a11 mRNA は PBO 群の野生型及び CARKO マウスの両方で発現が誘導された。Cyp3a11 mRNA は PB 群の野生型及び CARKO マウスでも発現レベルが上がったが、PBO 群と比較して軽度であった。DBDE は野生型及び CARKO マウスにおいて、Cyp1a1、Cyp1a2 及び Cyp1b1 の mRNA 発現レベルを顕著に増加させた。Cyp1a2 mRNA は PBO 群の野生型及び CARKO マウスと PB 群の野生型マウスでも軽度の増加がみられた。Cyp4a10 mRNA は、全ての群で野生型マウスと比較して CARKO マウスで発現レベルが高く、特に PBO 群の CARKO マウスで高い発現がみられた。肝障害発生時に Nuclear factor-kappa B の下流で抗アポトーシス因子として働く Gadd45beta の

mRNA 発現レベルは、PBO 群の野生型及び CARKO マウスと PB 群の野生型マウスで発現レベルの増加がみられた。Cyp reductase mRNA 発現レベルは、PBO 群、DBDE 群、及び PB 群の野生型マウス及び PBO 群の CARKO マウスで増加していた。Cyp reductase mRNA は DBDE 群の CARKO マウスでも増加がみられたが、その程度は野生型マウスよりも軽度であった。

4 週投与後の肝臓の抗 Cyp2b 抗体による免疫組織化学の結果を Figure 1-5 に示す。陰性対照群の野生型マウスでは、小葉中心部の肝細胞のみが Cyp2b 陽性を示したが、全ての投与群の野生型マウスでは、より広範囲に Cyp2b 強陽性像が認められた。すなわち、PBO 群では小葉辺縁部まで、DBDE 群及び PB 群では小葉中間帯まで Cyp2b の陽性像が認められた。CARKO マウスでは、陰性対照群、DBDE 群、及び PB 群では小葉中心部に微弱な Cyp2b 陽性肝細胞がみられ、PBO 群では微弱ではあったが小葉中心部から小葉辺縁部までび慢性に Cyp2b 陽性像が認められた。

肝発がん性の解析

DEN による肝発がんイニシエーション後に 27 週投与を行ったマウス肝臓の肉眼像を Figure 1-6 に示す。肝臓表面の多数の結節が野生型マウスの PBO 群及び PB 群で認められた。一方で CARKO マウスの PBO 群及び PB 群では、結節はほとんど認められなかった。DBDE 群では野生型マウス及び CARKO マウスともに、肝臓表面の結節は陰性対照群よりも多く認められた。

光顕下の観察では、肝増殖性病変を変異肝細胞巣及び肝細胞腺腫に分類し、さらに細胞質の状態及び染色性から、好酸性、好塩基性、及びその他に分類した。典型的な好酸性及び好塩基性肝細胞腺腫の組織像を Figure 1-7 に示す。また、変異肝細胞巣及び肝細胞腺腫の発生頻度 (Incidence) を Table 1-4 に、発生数 (Multiplicity) を Figure 1-8 に示す。野生型マウスでは、PBO 群及び PB 群の全

例、ならびに DBDE 群においても半数強で好酸性変異肝細胞巣及び腺腫がみられた一方で、CARKO マウスのこれらの群では好酸性変異肝細胞巣及び腺腫の発生頻度は有意に低下し、DBDE 群では好酸性の変異肝細胞巣が 1 例のみ、PB 群では 1 例も認められなかった。好塩基性の変異肝細胞巣及び腺腫は、両遺伝子型の全群でみられたが、陰性対照群及び PB 群の CARKO マウスでは発生頻度がやや低かった。その他のタイプの変異肝細胞巣及び腺腫は、CARKO マウスの PB 群を除く全群に散見された。

発生数としては、野生型マウスの PBO 群における好酸性変異肝細胞巣及び腺腫が著しく多く認められ、本実験で観察した 1 個体分の肝臓標本上（個体あたり 13 切片）で変異肝細胞巣及び腺腫がそれぞれ平均 30 個以上確認された（Figure 1-8）。次いで、野生型マウスの PB 群における好酸性変異肝細胞巣及び腺腫が多く、それぞれ 1 個体平均で 10 個以上が確認された。野生型マウスの DBDE 群では好酸性の増殖性病変の発生数は陰性対照群と同程度であった。CARKO マウスでは、PBO 群で好酸性の増殖性病変の発生数が統計学的に有意に優位に増加したものの、その程度は野生型と比べ明らかに軽微であった。好塩基性の変異肝細胞巣及び腺腫の発生数は、いずれの遺伝子型においても、陰性対照群と比較して PBO 群（腺腫のみ）と DBDE 群（変異肝細胞巣及び腺腫）で軽度の増加がみられ、PB 群では減少した。野生型マウスと比較して CARKO マウスで減少する傾向がみられた。その他のタイプの増殖性病変は、野生型マウスのみで増加がみられ、変異肝細胞巣は DBDE 群及び PB 群で、腺腫は PBO 群及び PB 群で有意な増加がみられたが、その程度はいずれも軽微であった。なお、好塩基性及びその他のタイプの増殖性病変については、野生型と比較して CARKO マウスで発生数が少ない傾向がみられた。

考察

第1章では、PBO及びDBDEによるマウスでの肝肥大及び肝発がんとの関連について調べるため、雄性の野生型マウス及びCARKOマウスに対してこれらの化合物を1週間、4週間、又はDEN単回投与後に27週間混餌投与し、肝重量測定、病理組織学的検査、肝細胞増殖活性、及び肝薬物代謝酵素の発現量変化について検討を実施した。本実験で用いたPBO及びDBDE投与による雄性マウスでの肝肥大及び肝発がんへの関与が示唆される経路をFigure 1-9に示す。また、本実験で検討した化合物のPBタイプのMOAにおけるKey events/Associateve eventsをTable 1-5にまとめた。

本実験で明らかになったことの1点目として、PBO及びDBDEによる雄性マウス肝肥大におけるCARの関与が明確になり、またCAR以外の経路の存在が示唆されたことが挙げられる。PBO及びDBDEは野生型マウスへの4週間投与により、Cyp2bのmRNAレベル及び蛋白レベルでの発現増加、ならびに肝細胞肥大を誘発し、これらの点においてPBに類似したCyp2b誘導剤であることが本試験系においても確認できた。またCARKOマウスでは、DBDEはPBと同様にCyp2b誘導や肝細胞肥大を誘発しなかったことから、DBDEによる肝細胞肥大はCARに依存したものであると考えられた。一方、PBOではCARKOマウスにおいても高度の肝重量増加、肝細胞肥大がみられたことから、PBOはCAR以外の経路を介して肝細胞肥大を誘発していることが示唆された。PBOによる肝肥大に関わるCAR以外の経路としては、野生型及びCARKOマウスの両方でCyp3aのmRNA発現量が増加し、CARKOマウスでも野生型よりも弱いながらCyp2bの誘導がみられたことから、これらのCypを誘導することが知られているPXRが関与している可能性が考えられた(2, 10)。

DBDEの肝肥大はCARに依存していたものの、同化合物は野生型及びCARKOマウスの両方に

において Cyp1a1、1a2、1b1 の mRNA レベルを増加させたことから、CAR に依存しない Cyp1 family の誘導能も併せ持つことが明らかとなった。Lee らは DBDE が Sprague-Dawley 系ラットにおいて、CAR や PXR を介して Cyp1a2、3a1、及び 2b1 を誘導すると報告している (30)。また、Pacyniak らは DBDE を含む臭素化難燃剤は C57BL/6 系マウスにおいて、PXR の活性化を介して、Cyp2b や 3a を誘導するが、Cyp1a は誘導しないと報告している (41)。本実験結果及びこれらの報告から、DBDE は CAR あるいは他の経路を介して薬物代謝酵素を誘導するが、そのパターンは系統や種によっても異なると考えられた。

本実験で明らかになった 2 点目は、イニシエーション・プロモーションモデルを用いた肝発がん性の検討結果より、PBO による肝発がんは CAR が重要な役割を果たしている一方で、DBDE による肝発がんでは CAR 以外の経路の存在が示唆された点である。PBO は PB と同様に野生型マウスで好酸性の変異肝細胞巣／腺腫を誘発し、これらは CARKO マウスでは大幅に抑制されたことから、PBO による肝発がんは主に PB と同様のメカニズムで CAR を介して誘発されることが明らかとなった。DBDE は PB や PBO と異なり、野生型マウスにおいて好酸性の増殖性病変を誘発しなかった。一方で、DBDE は両遺伝子型のマウスにおいて好塩基性の変異肝細胞巣及び腺腫の発生数を増加させた。過去の報告から、PB によって誘発される肝増殖性病変は主に好酸性タイプであるとされており (11, 27, 59)、DBDE による腫瘍発生数の増加については CAR に依存しないものであると考えられた。CAR 以外の経路としては、4 週投与時の肝臓中 mRNA 解析において、DBDE は Cyp1 family の発現を誘導したことから Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) に作用する可能性が示唆される。TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) は AhR の誘導を介して DEN による肝発がんを増加させることが報告されており (26)、DBDE による好塩基性の増殖性病変の増加は、TCDD と同様に AhR を介

したものである可能性も考えられた。

げっ歯類における PB と類似した Cyp 誘導剤による肝発がんの MOA において、Holsapple らは肝肥大を Key event (発がんに関与するイベント) としていたが (18)、近年 Elcombe らは肝肥大を Associative events (発がんに関与する直接的な Key event ではないが、指標となり得るもの) の一つとして位置付けている (10)。本実験の PBO の結果からは、肝肥大そのものは PB で誘発されるような好酸性の腫瘍増加に直接つながるものではなく、CAR 及び Cyp2b の活性化の指標としてのイベントであることを支持するものであった。一方、MOA における Key events の一つとされる肝細胞増殖については、野生型マウスの PBO 及び PB 群の 1 週投与後で有意な増加がみられたのに加え、明らかな肝腫瘍発生数の抑制がみられた CARKO マウスの PBO 群でも増加傾向がみられた。また、肝障害発生時に抗アポトーシス因子として働く Gadd45beta の mRNA 発現レベルも、野生型マウスの PBO 群、PB 群、及び CARKO マウスの PBO 群で増加がみられた。上述の通り、PBO による好酸性の増殖性病変は主に CAR に依存していたが、PBO は CARKO マウスにおいても好酸性変異肝細胞巣/腺腫や、好塩基性肝細胞腺腫を軽度増加させた。PBO によるげっ歯類での発がん性については、活性酸素種の生成による酸化ストレスが関与しているという報告がある (24, 32)。また、げっ歯類における PXR の活性化は肝細胞増殖活性を亢進しないという報告 (47) の一方で、PXR を活性化させる Cyproterone acetate はげっ歯類で肝発がん性を示すという報告もある (56)。本実験において CARKO マウスによる PBO 投与で軽度増加した増殖性病変については、CAR 以外の因子として酸化ストレスや PXR の活性化を介して、肝肥大、肝細胞増殖活性の亢進、及びアポトーシスの抑制とった MOA の Key event / Associative event が関与している可能性も考えられた。

小括

本章では、雄性の野生型マウス及び CARKO マウスに、PBO、DBDE 及び PB を投与し、肝重量測定、病理組織学的検査、肝細胞増殖活性の検索、及び肝薬物代謝酵素の発現量変化の解析を行うことにより、これらの化合物による肝肥大及び肝発がんにおける CAR の役割を調べた。

その結果、DBDE による Cyp2b 誘導及び肝肥大は野生型マウスのみでみられたことから、PB と同じく CAR に依存していることが示されたが、PBO による肝肥大は野生型及び CARKO マウスの両方で発現し、Cyp3a の誘導もみられたことから PXR が関わっている可能性が示された。

肝発がんについては、PBO では野生型マウスのみで PB で誘発されるものと同じ好酸性の増殖性病変を誘発したことから、PBO による肝発がんでは主に CAR が関与していることが示された。一方の DBDE では、野生型及び CARKO マウスの両方で、好塩基性の増殖性病変の発生を増加させた。DBDE は Cyp1a family を誘導することから、本化合物の発がんには AhR が関わっている可能性が示唆された。

Table 1-1 Final body and liver weights in wild-type and CARKO male mice treated with piperonyl butoxide, decabromodiphenyl ether, or phenobarbital for 1, 4, and 27 weeks.

	Group	Wild-type	CAR knock-out
1-week (Exp.2)			
Final body weight (g)	Control	25.1 ± 0.5	22.3 ± 2.1
	Piperonyl butoxide	23.4 ± 1.0 **	21.9 ± 1.6
	Decabromodiphenyl ether	24.6 ± 0.9	24.1 ± 1.6
	Phenobarbital	25.3 ± 1.5	23.8 ± 1.9
Absolute liver weight (g)	Control	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1
	Piperonyl butoxide	2.1 ± 0.1 **	1.8 ± 0.2 **
	Decabromodiphenyl ether	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
	Phenobarbital	1.8 ± 0.2 **	1.4 ± 0.1
Relative liver weight (%BW)	Control	5.8 ± 0.1	5.5 ± 0.2
	Piperonyl butoxide	9.1 ± 0.6 **	8.1 ± 0.7 **
	Decabromodiphenyl ether	5.6 ± 0.2	5.7 ± 0.2
	Phenobarbital	7.3 ± 0.4 **	6.0 ± 0.2
4-week (Exp.1)			
Final body weight (g)	Control	29.2 ± 0.7	29.8 ± 3.9
	Piperonyl butoxide	25.8 ± 1.5 **	28.5 ± 0.5
	Decabromodiphenyl ether	28.3 ± 2.3	29.4 ± 2.2
	Phenobarbital	28.3 ± 1.1	30.2 ± 2.8
Absolute liver weight (g)	Control	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2
	Piperonyl butoxide	2.2 ± 0.1 **	2.6 ± 0.2 **
	Decabromodiphenyl ether	1.8 ± 0.2 **	1.6 ± 0.1
	Phenobarbital	1.7 ± 0.1 **	1.4 ± 0.1
Relative liver weight (%BW)	Control	4.9 ± 0.2	5.3 ± 0.3
	Piperonyl butoxide	8.6 ± 0.2 **	9.1 ± 0.8 **
	Decabromodiphenyl ether	6.2 ± 0.2 **	5.3 ± 0.1
	Phenobarbital	6.2 ± 0.1 **	4.7 ± 0.1 **
27-week (Exp.3)			
Final body weight (g)	Control	34.5 ± 2.6	34.9 ± 3.7
	Piperonyl butoxide	29.6 ± 1.1 **	31.1 ± 1.9 **
	Decabromodiphenyl ether	33.8 ± 2.8	34.9 ± 4.9
	Phenobarbital	33.9 ± 2.6	30.4 ± 3.2 **
Absolute liver weight (g)	Control	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2
	Piperonyl butoxide	3.0 ± 0.4 **	2.4 ± 0.2 **
	Decabromodiphenyl ether	1.9 ± 0.2 **	1.8 ± 0.3
	Phenobarbital	2.1 ± 0.4 **	1.3 ± 0.1 **
Relative liver weight (%BW)	Control	4.3 ± 0.5	4.6 ± 0.3
	Piperonyl butoxide	10.1 ± 1.3 **	7.8 ± 0.8 **
	Decabromodiphenyl ether	5.5 ± 0.3 **	5.1 ± 0.5 **
	Phenobarbital	6.2 ± 1.0 **	4.4 ± 0.2 *

The data are shown as mean ± SD.

Significantly different from the control group of each genotype: (* p < 0.05, ** p < 0.01: Student and Welch test)

Table 1-2 Histopathological findings of livers in wild-type and CARKO male mice treated with PBO, DBDE or PB for 4 weeks.

Findings	Control		PBO		DBDE		PB	
	Wild N=5	KO N=5	Wild N=5	KO N=4	Wild N=5	KO N=5	Wild N=5	KO N=5
Hepatocellular hypertrophy								
Mild	0	0	0	2 ^{a)}	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	2 ^{b)}	5 ^{a)}	0	3 ^{a)}	0
Marked	0	0	5 ^{b)}	0	0	0	2 ^{a)}	0
Neutrophil infiltration								
Mild	0	0	1	2	0	0	0	0
Focal necrosis								
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0
Vacuolation, hepatocyte ^{c)}								
Mild	0	0	0	3	0	2	0	0

Note; "Wild" indicates wild-type mice. "KO" indicates CARKO mice.

The numbers in column indicate the numbers of animals which showed each finding.

a) Hepatocellular hypertrophy was found at centrilobular area.

b) Hepatocellular hypertrophy was found at centrilobular to midzonal area.

c) Vacuolation of hepatocytes was found in centrilobular area.

Table 1-3 Histopathological non-neoplastic findings of livers in wild-type and CARKO male mice treated with PBO, DBDE or PB for 27 weeks after DEN initiation.

Findings	Control		PBO		DBDE		PB	
	Wild	KO	Wild	KO	Wild	KO	Wild	KO
	N=20	N=20	N=17	N=20	N=18	N=20	N=18	N=19
Hepatocellular hypertrophy ^{a)}								
Mild	0	0	0	2	1	11	0	0
Moderate	0	0	5	11	16	7	0	0
Marked	0	0	12	7	1	0	18	0
Karyocytomegaly								
Mild	0	0	6	5	6	7	9	0
Moderate	0	0	2	0	0	1	9	0
Neutrophil infiltration								
Mild	0	0	1	0	0	9	0	0
Focal necrosis								
Mild	0	0	3	7	1	1	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Single cell necrosis								
Mild	0	0	0	0	2	0	0	0
Yellow pigment deposition ^{b)}								
Mild	0	0	1	1	8	3	4	1
Vacuolation, centrilobular ^{c)}								
Mild	0	0	0	5	0	5	0	0
Moderate	0	0	0	3	0	3	0	0

Note; "Wild" indicates wild-type mice. "KO" indicates CARKO mice.

The numbers in column indicate the numbers of animals which showed each finding.

a) Hepatocellular hypertrophy was observed in centrilobular area.

b) Yellowish pigment deposition was found in foci of histiocytes and this change was occasionally accompanied by mononuclear cell infiltration and oval cell hyperplasia around periportal area.

c) Vacuolations in centrilobular area were supposed to be lipid accumulations which were seen in the same groups of CARKO mice in Exp. 3.

Table 1-4 Incidence of proliferative lesions in wild-type and CARKO male mice treated PBO, DBDE or PB for 27 weeks after DEN initiation.

Neoplastic lesion	Control		PBO		DBDE		PB		
	Wild N=20	KO N=20	Wild N=17	KO N=20	Wild N=18	KO N=20	Wild N=18	KO N=19	
Eosinophilic	altered foci	5	9	17 **	13 #	9	1 *, ##	18 **	0 *, ##
	adenomas	0	2	17 **	7 ##	2	0	18 **	0 ##
Basophilic	altered foci	18	13	16	14	18	18	15	5 *, ##
	adenomas	19	10 ##	16	15	17	18 *	13	1 **, ##
Other	altered foci	8	8	6	4	16 **	4 ##	15 *	0 **, ##
	adenomas	2	1	7	3	6	1	13 **	0 ##

Note; "Wild" indicates wild-type mice. "KO" indicates CARKO mice.

The numbers in column indicate the numbers of animals in which one or more lesions were found.

Significantly different from the control group of each genotype: (*p < 0.05, **p < 0.01: Fisher's test)

Significantly different from wild-type mice of each group: (#p < 0.05, ##p < 0.01: Fisher's test)

Table 1-5 Variability of events in PB like hepatocarcinogenic MOA in male mice compared to the control group of each genotype.

Events	PB		PBO		DBDE	
	Wild-type	CARKO	Wild-type	CARKO	Wild-type	CARKO
Liver hypertrophy	++	-	+++	+++	++	+
<i>Cyp2b</i> induction	+++	-	+++	++	++	-
Proliferating activity after 1-week treatment	+	-	+	±	-	-
Resistance to apoptosis (Gadd45beta expression)	++	-	++	++	-	-
Eosinophilic proliferative lesions	++	-	+++	+	-	-
Basophilic proliferative lesions	-	-	+	+	++	++

Note. -; no change, +; mild, ++; moderate, +++; marked

The authors defined each grade in the table, considering statistical significance or variations of absolute values.

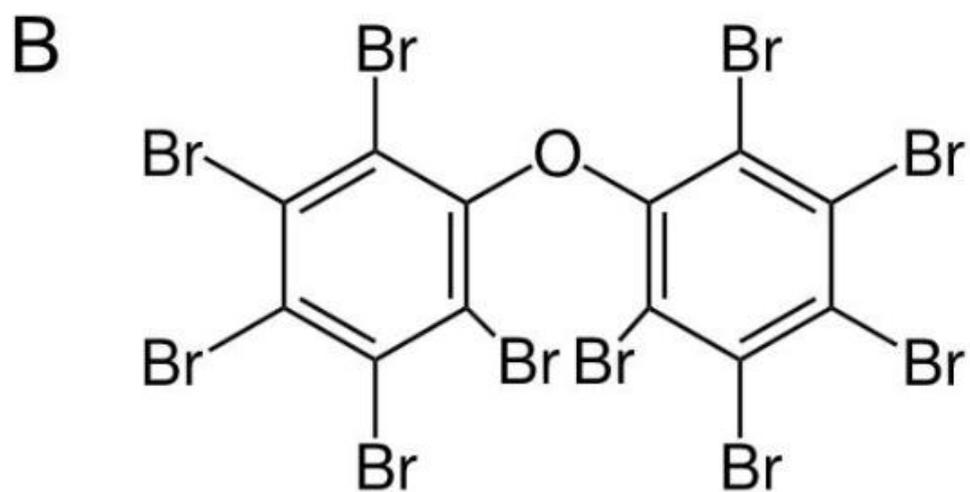
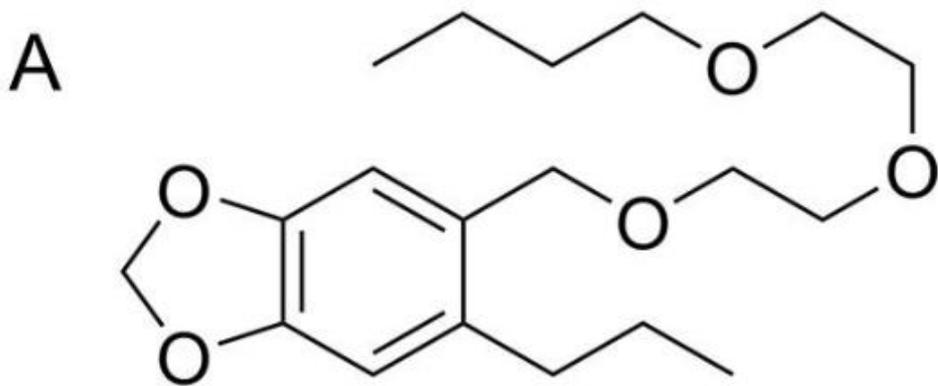


Figure 1-1 Chemical structural formulas of piperonyl butoxide (A) and decabromodiphenyl ether (B).

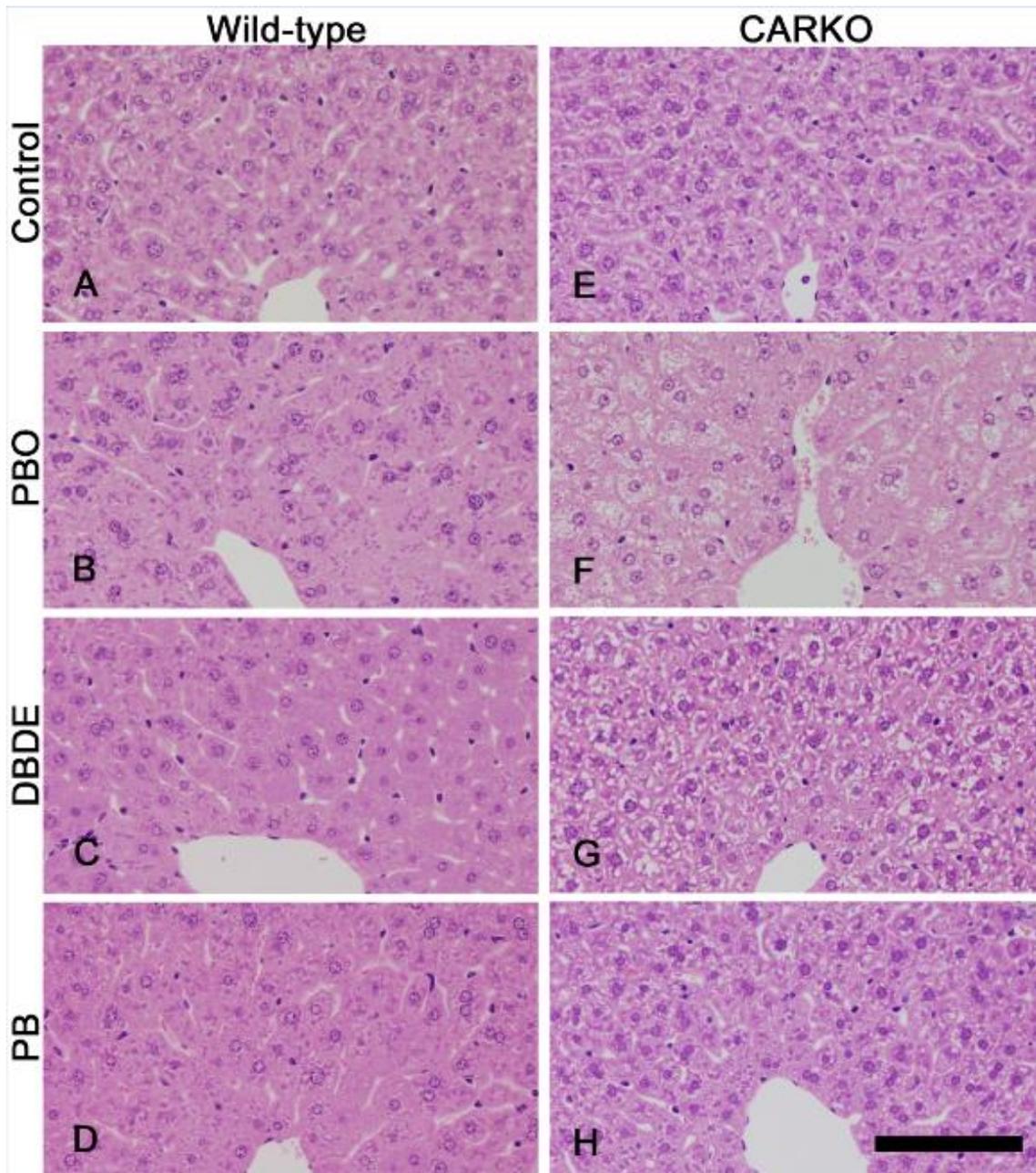


Figure 1-2 Livers of wild-type and CARKO male mice treated with PBO, DBDE and PB or fed basal diet (control group) for 4 weeks. A-D are from wild-type mice. E-H are from CARKO mice. A and E are from the control group. B and F are from the PBO group. C and G are from the DBDE group. D and H are from the PB group. Centrilobular hepatocellular hypertrophy was prominent in all treated group of wild-type mice (B, C and D). In CARKO mice, no hypertrophy was seen except for the PBO group (F). Vacuolations in centrilobular hepatocytes were also observed in the PBO group of CARKO mice (F). Hematoxylin and eosin (H&E) staining. The scale bar represents 100 μm .

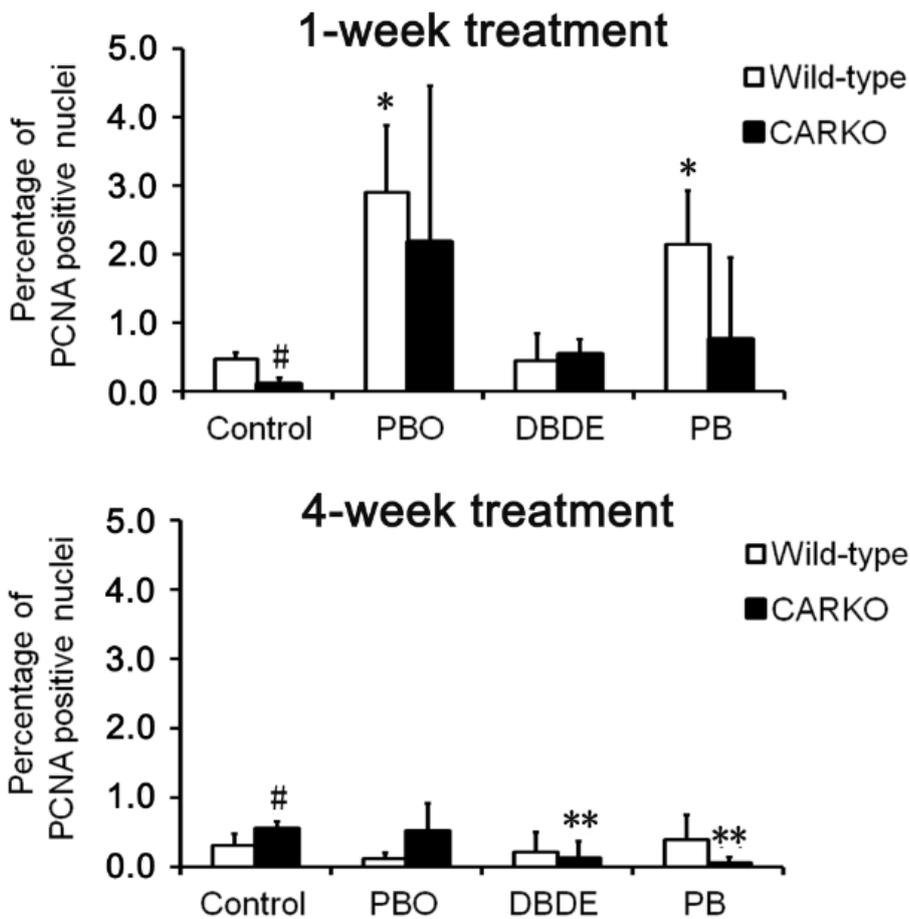


Figure 1-3 Labeling indices of hepatocytes after the 1- and 4-week treatment of test chemicals in male mice. Values represent mean \pm SD of each group and genotype. * and ** indicate statistically significant differences from the control group of each genotype (* p < 0.05, ** p < 0.01: Student and Welch test). # and ## indicate statistically significant differences from the wild-type animals of each group (# p < 0.05, ## p < 0.01: Student and Welch test).

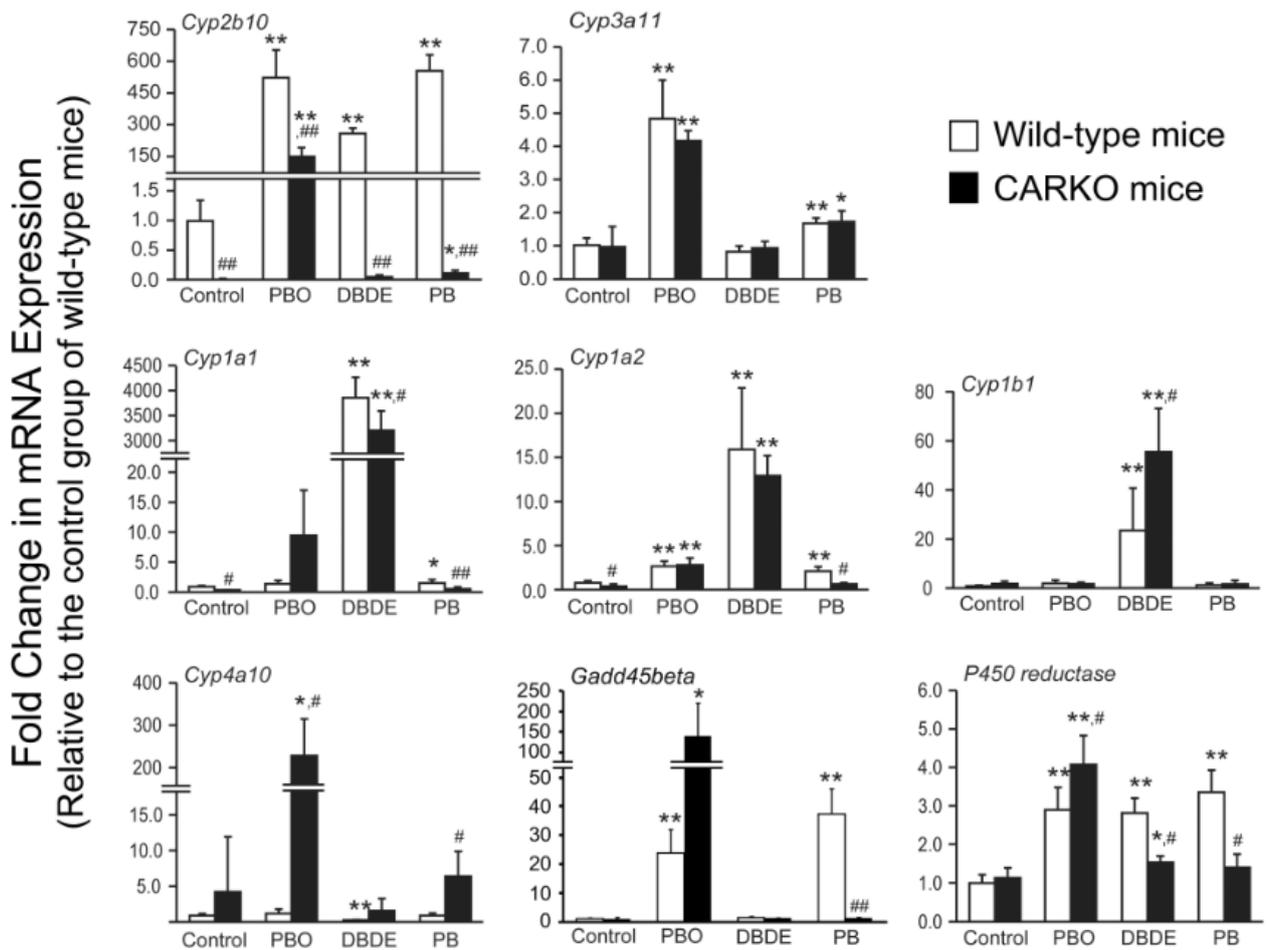


Figure 1-4 Relative mRNA expression levels of Cyp2b10, Cyp3a11, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, Cyp4a10, Gadd45beta, and P450 reductase in the liver of wild-type and CARKO male mice treated with test chemicals for 4 weeks. Values represent mean \pm SD of each group and genotype. The expression levels of each gene were divided by the expression levels of GAPDH mRNA of corresponding individuals. * and ** indicate statistically significant differences from the control group of each genotype (* p < 0.05, ** p < 0.01: Student and Welch test). # and ## indicate statistically significant differences from the wild-type animals of each group (# p < 0.05, ## p < 0.01: Student and Welch test).

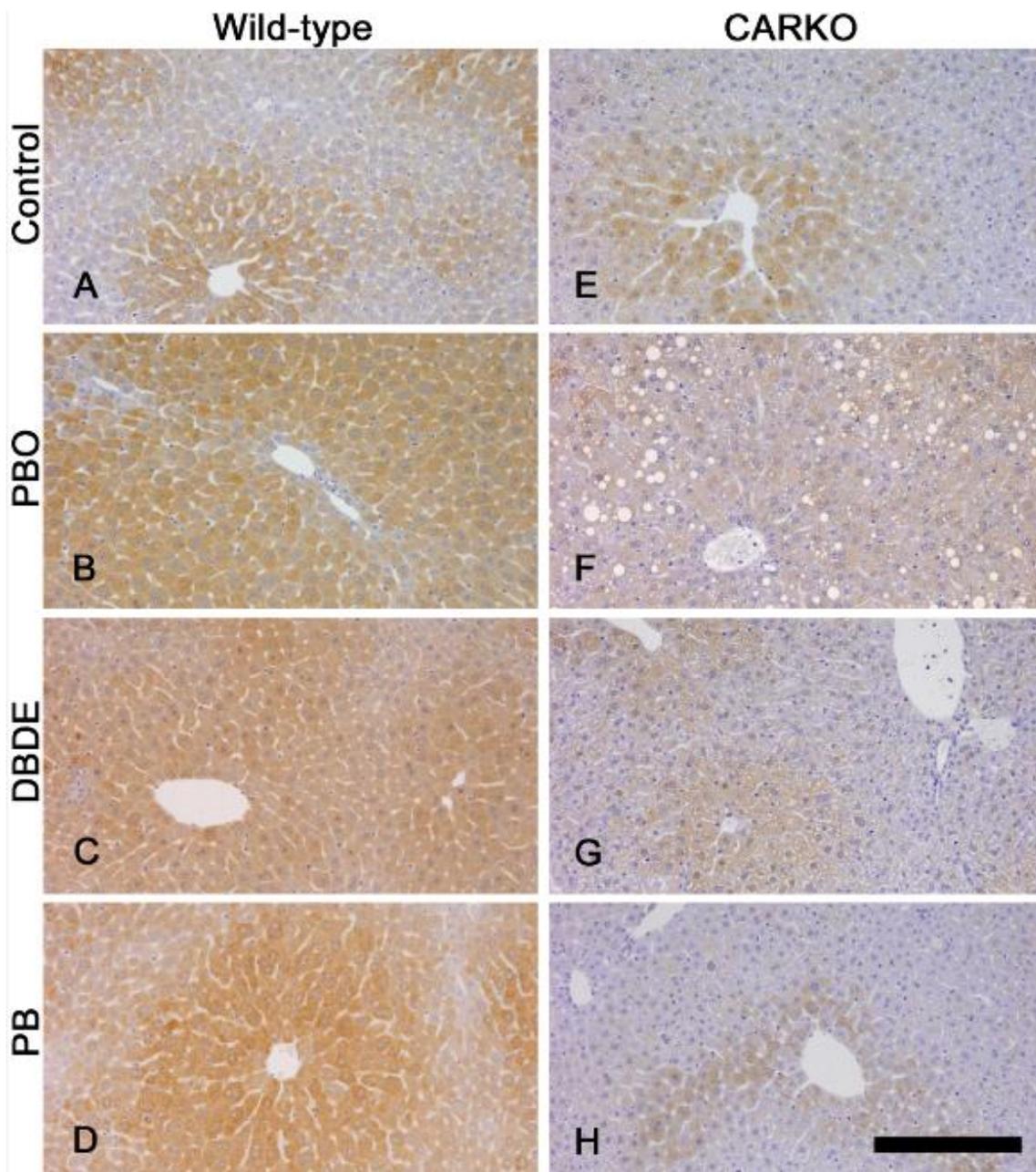


Figure 1-5 Liver sections stained with immunohistochemical reaction to Cyp2b. Livers were of wild-type and CAR KO male mice treated with PBO, DBDE and PBO or fed basal diet (control group) for 4 weeks. A-D are from wild-type mice. E-H are from CAR KO mice. A and E are from the control group. B and F are from the PBO group. C and G are from the DBDE group. D and H are from the PB group. Wild-type mice in the control group showed weak staining intensity in centrilobular area (A). In the PBO, DBDE and PB groups on wild-type mice, strong staining intensities were detected diffusely (B, C and D). In CAR KO mice, faint staining intensities were seen in centrilobular hepatocytes of the control, DBDE and PB groups (E, G and H). The staining intensities in the PBO group of CAR KO mice were also faint, however they were diffusely detected (F). The scale bar represents 200 μ m.

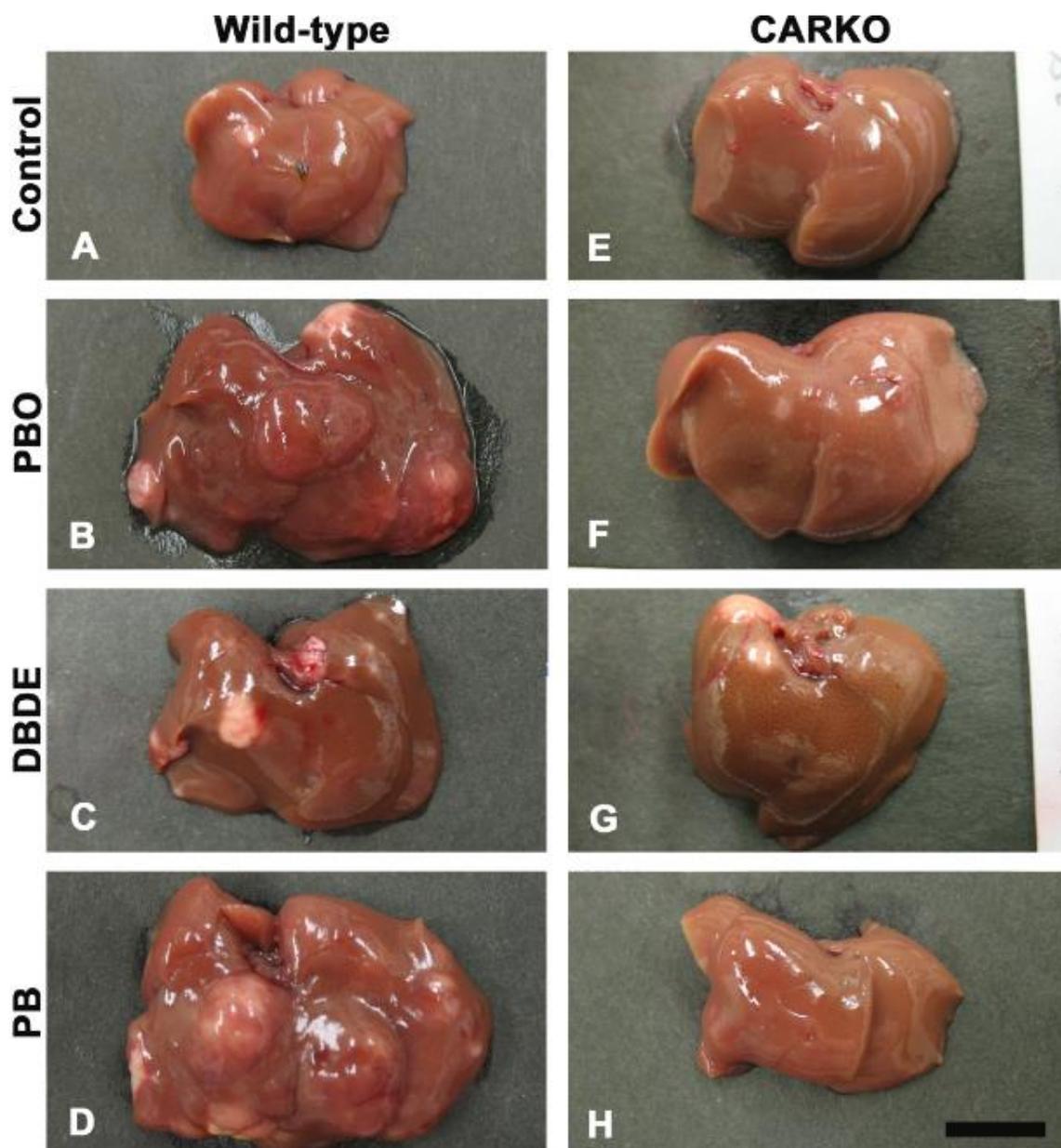


Figure 1-6 Macroscopic appearance of livers after the 27-week treatment of test chemicals. A-D are from wild-type male mice. E-H are from CARKO male mice. A and E are from the control group. B and F are from the PBO group. C and G are from the DBDE group. D and H are from the PB group. Wild-type mice treated with PBO and PB showed many protruding nodules on livers (B and D), however there are few or no nodules in those groups of CARKO mice (F and H). DBDE treatment induced pale nodules in both genotypes (C and G). The scale bar represents 1 cm.

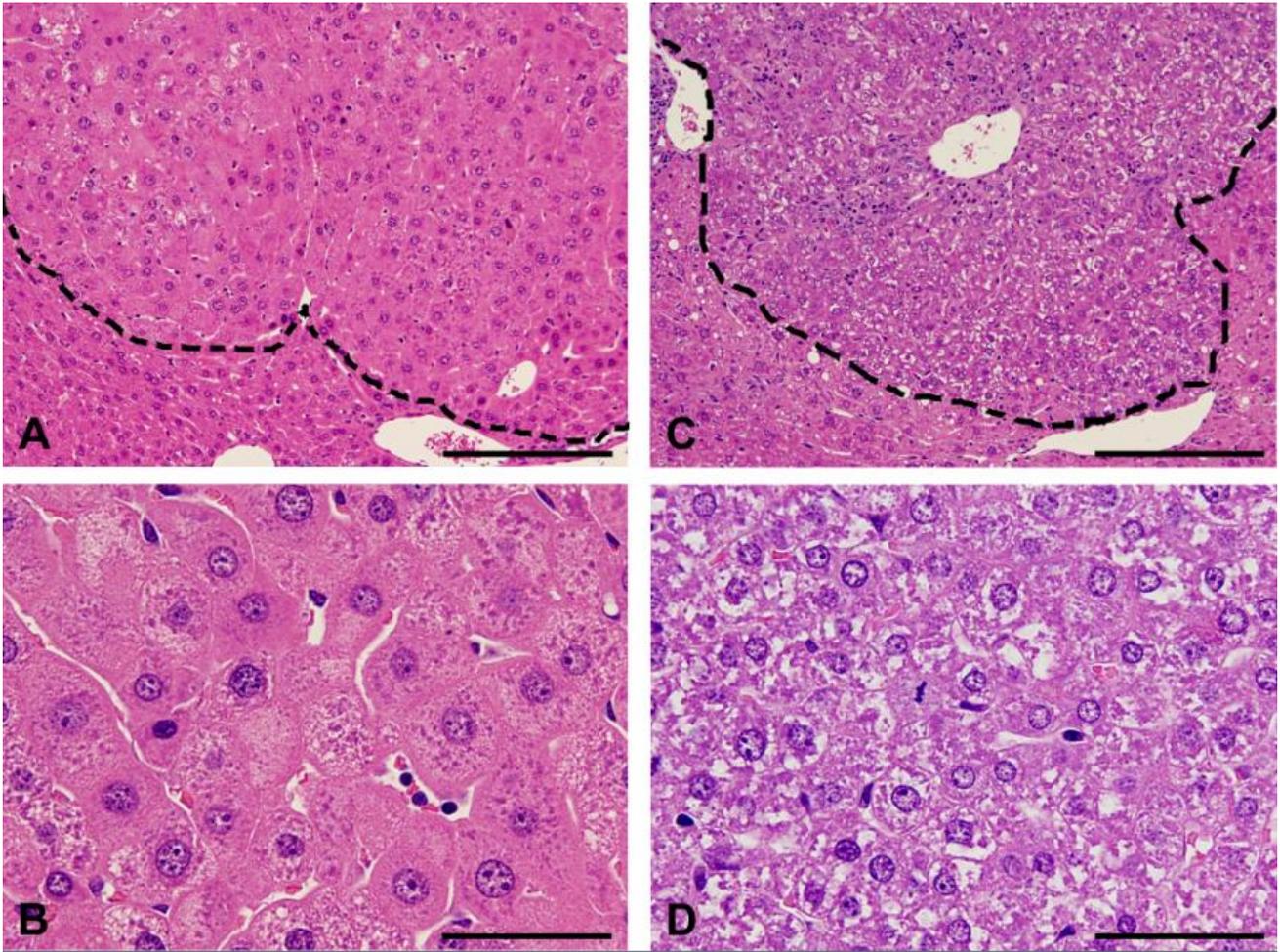


Figure 1-7 Typical appearance of eosinophilic and basophilic adenoma. (A) An eosinophilic adenoma, which is circumscribed by broken line, compresses surrounding liver parenchyma. (B) Higher magnification of A. Tumor cells have abundant eosinophilic cytoplasm. (C) A basophilic adenoma, which is circumscribed by broken line, compresses surrounding liver parenchyma. (D) Higher magnification of C. Tumor cells are small and have basophilic cytoplasm often containing glycogen. The scale bars in A and C represent 200 μm , and those in B and D represent 50 μm .

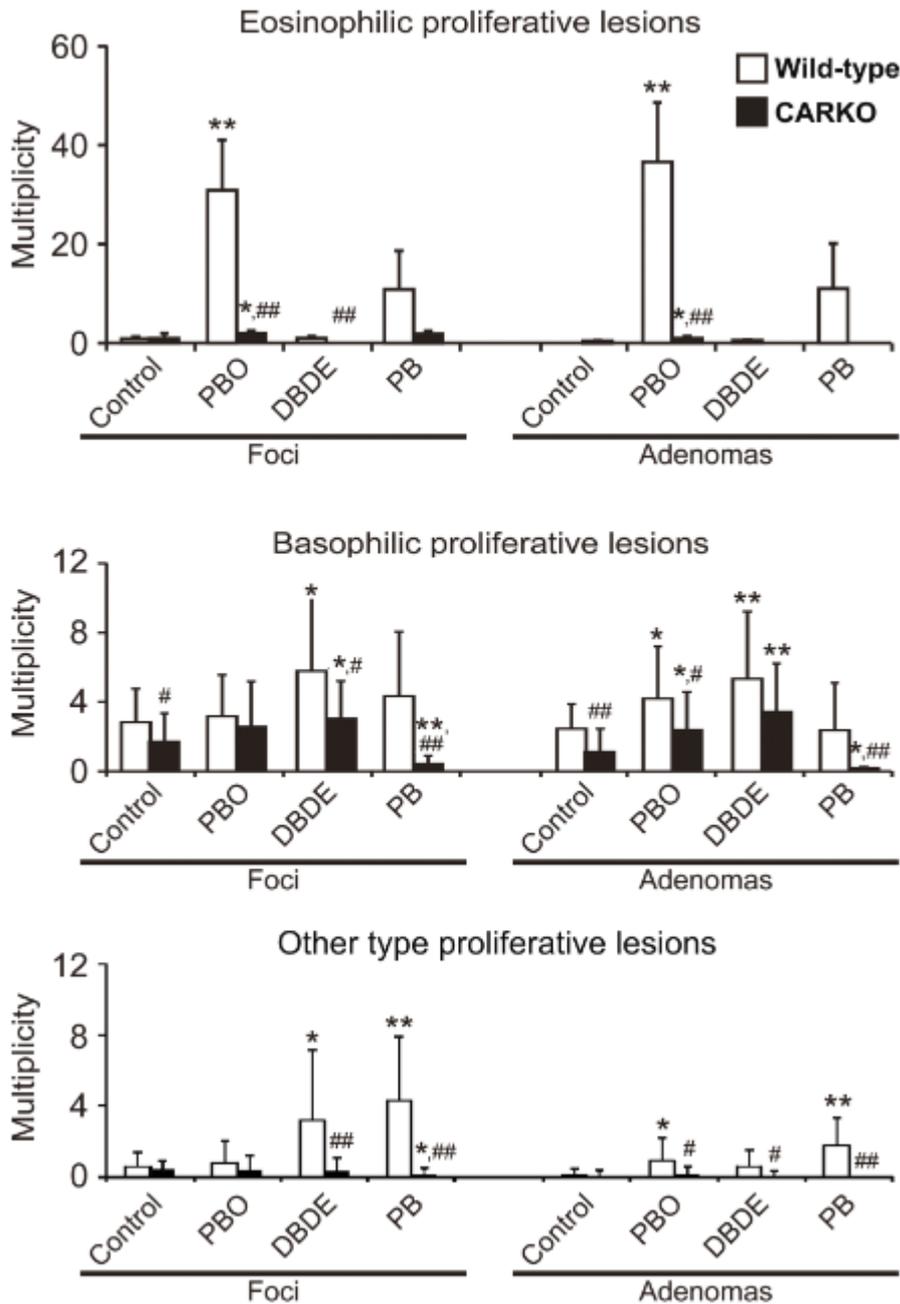


Figure 1-8 Multiplicity (average number per animal) of proliferative lesions that found in the 13 liver sections of each individual. Values represent mean \pm SD of each group and genotype. * and ** indicate statistically significant differences from the control group of each genotype (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Student and Welch test). # and ## indicate statistically significant differences from the wild-type animals of each group (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$: Student and Welch test).

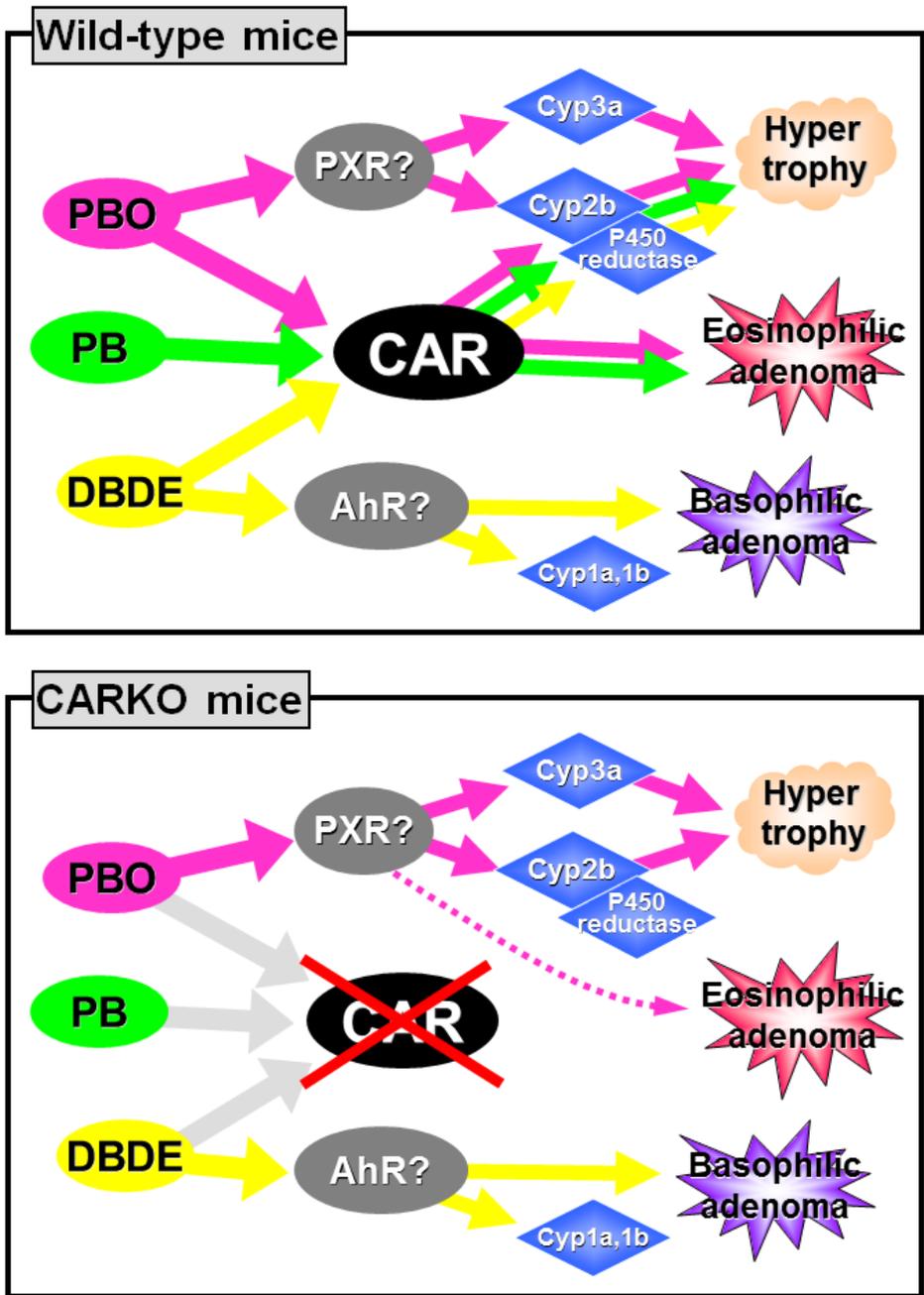


Figure 1-9 Schematic illustration of possible pathways in liver hypertrophy and adenoma induction in the wild-type (upper) and the CARKO (lower) mice treated with PBO, PB and DBDE. The pink, green, and yellow arrows indicate the possible pathways of PBO, PB, and DBDE, respectively.

第2章

ピペロニルブトキシド及びデカブロモジフェニルエーテルによる

雌性マウスでの肝肥大及び肝発がんへの CAR の関与

緒言

第1章では雄性マウスを用いて核内受容体を介した肝肥大や肝発がんに関する役割について検討した。一般的に、マウスにおいては加齢に伴う自然発生性の肝腫瘍、及び化学物質で誘発される肝腫瘍のいずれにも性差が存在することが知られている (25, 44)。Cyp 発現にも性差があることから、それを制御する核内受容体の肝肥大や肝発がんに関する役割にも雌雄差が存在する可能性が考えられる。また、男性ホルモン (テストステロン) の代謝物である Androstanol や Androstenol は、CAR の Inverse agonist として働いて転写活性を抑制することが知られている (12)。CD-1 系のマウスでは雄よりも雌の方が PB による肝細胞増殖が起こりやすく (29)、C57BL/10J 系マウスでは PB 投与によって雄では肝細胞腺腫に加えて肝細胞がんが誘発されるが、雌では肝細胞腺腫までしか誘発されないという報告もある (23)。また、エストロゲン作用を持つ可塑剤であるノニルフェノールは、雌性マウスでは CAR 依存的に、雄性マウスでは CAR 非依存的に Cyp2b10、Cyp2c29、及び Cyp3a11 の mRNA を誘導することが知られており (16)、化合物によっては CAR の活性化に明らかな性差が確認されている。ヒトの場合も肝臓がんの発生率は男性の方が多いと言われており (46)、外挿性を考えるうえでも雌マウスでの検討は重要と考える。

本章では雌性マウスを用いて、第1章で雄性マウスを用いて行ったものと同様の実験を行った。すなわち、PBO、DBDE 及び PB を雌性の野生型及び CARKO マウスに4週間、又は DEN の単回投与後に27週間混餌投与し、肝肥大、肝発がん と CAR との関連性を調べるとともに、雄性マウスの結果と比較して性差について検討した。

実験材料及び実験方法

化合物

PBO、DBDE、PB、及びジエチルニトロソアミン（DEN）は実験 1 で使用したのと同じものを使用した。

動物

第 1 章と同様に、国立医薬品食品衛生研究所で繁殖している CARKO マウス及び日本チャールス・リバー株式会社より購入した野生型マウスを用いた。本実験では、第 1 章で得られた雄性マウスでの結果に対し、雌性マウスを用いて同様の実験を行うことで、化合物投与による肝肥大、肝発がん と CAR との関係における性差を検討した。なお、全ての動物実験は国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会に承認を受け、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験の適切な実施に関する規定に準拠して行った。

化合物の投与

本実験は、実験 1 及び実験 2 に分けて実施した。

実験 1 では雌性マウスでの化合物による肝肥大及び肝代謝酵素の誘導と CAR の関連を調べるため、投与期間を 4 週間と設定した。6 週齢の野生型及び CARKO のマウス各 22 又は 24 匹を、体重を指標として無作為に 5 匹あるいは 6 匹ずつの 4 群に分けた。なお野生型マウスについては 5 週齢でブリーダーより入荷した。動物は遺伝子型ごと、1 群毎に別々のケージに分けて、12 時間の明暗サ

イクル下で飼育を行った。投与群 3 群の用量設定は第 1 章と同様とした。すなわち、各化合物について肝肥大、肝発がんが報告されている用量として、PBO を 5000 ppm、DBDE を 50000 ppm、及び PB を 500 ppm の濃度で粉末基礎飼料（CRF-1, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan）に混餌投与し、4 週間自由摂取させた。陰性対照群には基礎飼料を同様の期間自由摂取させた。

実験 2 では雌性マウスにおける PBO 及び DBDE による肝発がん性と CAR との関連を調べるため、第 1 章と同様に肝発がんのイニシエーターである DEN を用いたイニシエーション・プロモーションモデルを用いた検討を行った。野生型マウスについては、4 週齢でブリーダーより 83 匹を入荷し、5 週齢時に 1 群 20 又は 21 匹の 4 群に分けた。CARKO マウスについては、5 週齢時に 1 群あたり 22 から 25 匹を 4 群に分けた。肝発がんのイニシエーション処置として、全ての動物について、5 週齢時に DEN を 90 mg/kg の用量で単回腹腔内投与した。6 週齢から PBO、DBDE、あるいは PB をそれぞれ 5000、50000、及び 500 ppm の濃度で基礎飼料（粉状の CRF-1）に混餌投与し、27 週間自由摂取させた。また、陰性対照として、基礎飼料を自由摂取させる群を設定した。全ての実験において、化合物の混餌作業及び餌の交換は週 1 回実施し、餌缶内に残った飼料は廃棄した。

動物の観察及び安楽死の方法

一般状態観察を 1 日 1 回以上実施した。体重及び摂餌量は、投与 13 週までは 1 週間に 1 回測定し、その後は 2 週間に 1 回測定した。投与 4、あるいは 27 週間後に、CO₂ 吸入による全身深麻酔下でマウスを放血により安楽死させた。肝臓を肉眼的に観察後、重量を測定し、以下に記載する各検査用に切出しを行った。

肝臓の病理組織学的及び免疫組織化学的評価

第 1 章と同様に、実験 1 では肝臓の中間葉を用いて HE 染色、及び抗 Cyp2b 抗体 (Millopore Co., Billerica, MA) を用いた免疫組織化学的染色を実施した。作製した標本を用いて、肝肥大の程度及び肝細胞の Cyp2b 陽性強度及び範囲について調べた。

実験 2 の 27 週投与群では、第 1 章と同様の方法で肝発がん性について解析した。すなわち、変異肝細胞巣及び肝腫瘍を数えるため、肝臓の中間葉から 8 切片、外側左葉から 5 切片の計 13 切片を切出し、パラフィン包埋後に HE 染色を施した。肝臓の増殖性病変は、好酸性、好塩基性、その他 (明細胞性及び混合型) のいずれかに分類し、発生頻度 (Incidence) 及び発生数 (multiplicity) について計算した。

RT-real time PCR

実験 1 では、肝臓の右葉を用いて、第 1 章と同様の手法により RT-real time PCR を用いて遺伝子発現量を評価した。測定対象は、Cyp1a1 (Mm00487218_m1)、Cyp1a2 (Mm00487224_m1)、Cyp1b1 (Mm00487229_m1)、Cyp2b10 (Mm01972453_s1)、Cyp3a11 (Mm00731567_m1)、Cyp4a10 (Mm01188913_g1)、及び Cytochrome P450 reductase (Mm00435876_m1) として、GAPDH で標準化した発現量によって比較した。

統計解析

統計解析は、対照群と化合物投与群 (PBO 投与群、DBDE 投与群、及び PB 投与群) の比較を CARKO マウス及び野生型マウスそれぞれについて実施した。また、CARKO マウスと野生型マウス

の比較を同じ投与群同士で比較した。体重、肝臓絶対重量、肝臓相対重量、mRNA 発現量、及び肝臓増殖性病変の発生数 (multiplicity) のデータについて、F 検定により等分散性の検定を実施した。等分散性が認められた場合は Student の t 検定を、等分散性が認められなかった場合は Welch の t 検定を用いて、それぞれ媒体対照群と化合物投与群との間で比較した。肝臓増殖性病変の発生頻度 (Incidence) のデータは、Fisher の直接確率検定によって統計解析した。有意水準は 5%及び 1%とした。

実験結果

一般状態、体重、及び肝臓重量

雌性の野生型及び CARKO マウスにおける、各化合物の投与 4 週及び 27 週後の最終体重及び肝臓重量の結果を Table 2-1 に示す。いずれの動物においても化合物の投与に起因した一般状態の悪化及び死亡は認められなかった。4 週及び 27 週のいずれの投与期間においても、PBO 群の最終体重では陰性対照群と比較して有意な低値を示した。また 27 週投与の PB 群の最終体重も陰性対照群と比較して有意な低値を示した。肝臓重量については、4 週投与後の全ての化合物投与群の野生型マウスと PBO 群の CARKO マウスで、陰性対照群と比較して有意な肝臓絶対及び相対重量の高値がみられた。DBDE 群の CARKO マウスにおいても相対重量のみであったが肝臓重量の高値がみられた。

肝臓の病理組織学的変化（腫瘍性病変以外の毒性変化）

4 週投与後の肝臓の病理組織学的変化の結果を Table 2-2 に示す。また、4 週投与後の代表的な肝臓組織の HE 染色像を Figure 2-1 に示す。4 週投与後では、化合物を投与された全ての野生型マウスにおいて、肝細胞肥大が認められた。肝細胞肥大は PBO 群では小葉中心部から小葉辺縁部までび漫性に高度に、DBDE 群では小葉中心部から小葉中間帯にかけて中程度に、PB 群では小葉中心部から小葉中間帯にかけて高度にみられた。CARKO マウスでは、PB 群では肝細胞肥大が認められなかったのに対し、PBO 群では小葉中心部から小葉中間帯にかけて高度に、DBDE 群では小葉中心部に軽度から中程度に肝細胞肥大が認められた。その他、軽度の限局性の壊死巣及び炎症細胞の浸潤が、PBO 群の CARKO マウスと DBDE 群の両遺伝子型マウスに散見された。

27 週投与後の肝臓の病理組織学的変化の結果を Table 2-3 に示す。野生型マウスでは、DBDE 群の 1 例を除いた全ての化合物投与群において、肝細胞肥大が認められた。肝細胞肥大の範囲及び程度は、PBO 群ではび慢性に中程度から高度、DBDE 群では小葉中心部に軽度から中程度、及び PB 群では小葉中心部から小葉中間帯にかけて中程度から高度であった。CARKO マウスでは、PBO 群のみで肝細胞肥大がび慢性に中程度から高度にみられた。その他、DBDE 群の CARKO マウスを除く全群で軽度の限局性の壊死巣が散見されたが、PBO 群の両遺伝子型で頻度が高かった。軽度な単核細胞等の炎症細胞浸潤が陰性対照群の野生型マウスを除く全群で数例にみられた。肝細胞の空胞化が PBO 群の CARKO マウスにおいて散見された。

肝臓における Cyp 発現

Cyps 及び Cyp reductase をコードした mRNA 発現量を Figure 2-2 に示す。Cyp2b10 の mRNA 発現レベルは PBO 群、DBDE 群、及び PB 群の野生型マウスで増加し、その程度は PBO 群と PB 群で顕著であった。Cyp2b10 mRNA は PBO 群の CARKO マウスでも増加したが、その程度は野生型マウスよりも軽度であった。CARKO マウスの対照群及び DBDE 群の Cyp2b10 mRNA は、野生型マウスの陰性対照群と比較して大幅に減少し、CARKO マウスの PB 群では野生型マウスの陰性対照群と同程度であった。Cyp3a11 mRNA は PBO 群の野生型及び CARKO マウスの両方で発現が誘導された。Cyp3a11 mRNA は PB 群の野生型マウスでも発現レベルが上がったが、PBO 群と比較して軽度であった。また、野生型マウスと CARKO マウスの比較では、Cyp3a11 mRNA は CARKO マウスでやや発現レベルが高い傾向がみられた。DBDE は野生型及び CARKO マウスにおいて、Cyp1a1、Cyp1a2 及び Cyp1b1 の mRNA 発現レベルを顕著に増加させた。Cyp1a1 及び Cyp1a2 の mRNA は PBO 群の

両遺伝子型及び PB 群の野生型マウスでも発現増加がみられた。Cyp4a10 mRNA は、全ての群で野生型マウスと比較して CARKO マウスで発現レベルが高く、また野生型マウスでは陰性対照群と比較して各投与群では発現レベルが低下していた。Cyp reductase mRNA 発現レベルは、CARKO マウスの PB 群を除くすべての投与群で増加していた。

4 週投与後の肝臓の抗 Cyp2b 抗体による免疫組織化学の結果を Figure 2-3 に示す。陰性対照群の野生型マウスでは、小葉中心部の肝細胞のみが Cyp2b 弱陽性を示したが、全ての投与群の野生型マウスでは、より広範囲に Cyp2b 強陽性像が認められた。すなわち、PBO 群及び PB 群では小葉辺縁部まで、DBDE 群では小葉中間帯まで Cyp2b の陽性像が認められた。CARKO マウスでは、陰性対照群、DBDE 群、及び PB 群では小葉中心部に微弱な Cyp2b 陽性肝細胞がみられ、PBO 群では微弱ではあったが小葉中心部から小葉中間帯、あるいは小葉辺縁部までび漫性に Cyp2b 陽性像が認められた。

肝発がん性の解析

変異肝細胞巣及び肝細胞腺腫の発生頻度 (Incidence) を Table 2-4 に、発生数 (Multiplicity) を Figure 2-4 に示す。好酸性の増殖性病変の発生頻度については、野生型マウスの PBO 群及び PB 群では全例でみられ、CARKO マウスの PBO 群でも腺腫の発生頻度は少なかったものの変異肝細胞巣は全例でみられた。好酸性の増殖性病変は、DBDE 群の両遺伝子型及び PB 群の CARKO マウスでは 1 例もみられず、陰性対照群においてもごく少数例にみられたのみであった。好塩基性の増殖性病変は、両遺伝子型の全群でみられたが、腺腫の発生頻度は CARKO マウスの PBO 群でやや高かった。その他のタイプについては、変異肝細胞巣が野生型マウスの DBDE 群を除いた全群の少数例に散見

され、腺腫は CARKO マウスの PBO 群と野生型マウスの PB 群にそれぞれ 1 例みられたのみであった。

発生数としては、野生型マウスの PBO 群及び PB 群における好酸性増殖性病変が多かった。本実験で観察した肝臓標本上（個体あたり 13 切片）で、野生型マウスの PBO 群の変異肝細胞巣が 1 個体あたり平均 60 個以上、腺腫が 20 個弱、PB 群の変異肝細胞巣が 20 個弱、腺腫が数個確認された（Figure 2-4）。CARKO マウスでは、PBO 群において好酸性変異肝細胞巣が 1 個体平均で 5 個程度みられたが、その他の群では好酸性の増殖性病変はほとんど認められなかった。好塩基性の増殖性病変は、野生型マウスの DBDE 群で変異肝細胞巣が、CARKO マウスの PBO 群で腺腫が、それぞれ陰性対照群と比較して有意に増加したが、いずれの発生数も 1 個体平均で 1 個程度あるいはそれ以下であった。その他のタイプの増殖性病変は、いずれの群においても 1 個体平均で 0.5 個以下であった。

考察

本実験では、第1章で雄性マウスについて検討した PBO 及び DBDE による肝肥大及び肝発がん と CAR との関連について、雌雄差を調べるため、雌性の野生型マウス及び CARKO マウスを用いた検討を実施した。各化合物による肝肥大及び肝増殖性病変の誘発における、雌雄の比較を Table 2-5 に示す。

本実験において明らかになったことの1点目として、PBO による肝肥大、肝発がんについては雌雄で同様の傾向が認められたことが挙げられる。PBO の4週間投与において、雌性の野生型及び CARKO マウスともに顕著な肝重量増加及び肝細胞肥大がみられ、Cyp2b は mRNA レベル及び蛋白レベルで野生型では高度に、CARKO では軽度に誘導された。また、いずれの遺伝子型においても Cyp3a11 mRNA の発現レベルの増加がみられたことから、PBO による肝肥大には CAR に加えて PXR の様な他の因子が関与していることが、雄性マウスと同様に示された。DEN 単回投与後の PBO の27週間投与では、野生型マウスでは PB と同じく好酸性の変異肝細胞巣又は腺腫が全例で多数誘発され、CARKO マウスではその数が大幅に減少し、雌雄で同様の傾向がみられた。以上から、PBO は雌雄いずれの性別においても、CAR 及び PXR の活性化による肝肥大、及び CAR に依存した好酸性の増殖性病変を誘発することが明らかとなった。また、雄性マウスにおいて、PBO は CARKO マウスにおいても僅かながら好酸性／好塩基性の増殖性病変を増加させたが、雌性マウスにおいては好酸性の増殖性病変は若干増加させたものの、好塩基性の増殖性病変は対照群と比較して明らかな増加がみられなかった。これは後述する好塩基性及びその他のタイプの増殖性病変の、そもそもの発生数の雌雄差が関連すると考えられる。

本実験で明らかとなったことの2点目として、DBDEによる肝肥大でのCARの関与には雌雄差が示された。DBDEの4週投与において、雄性マウスではCARに依存した肝重量増加及び肝細胞肥大がみられていたのに対し、雌性マウスではCARKOにおいても軽度ではあるが肝重量増加及び小葉中心性の肝細胞肥大がみられたことから、CARに依存しない経路でも肝肥大が発生した。DBDEを投与した雌性CARKOマウスでは、mRNA及び蛋白レベルでCyp2b発現の亢進はみられず、Cyp1a1、Cyp1a2、及びCyp1b1のmRNA発現量については雌性の野生型及びCARKOマウスいずれにおいても有意な増加がみられたが、Cyp1 familyの変動は雄性CARKOマウスでも同様にみられたものであった。Cytochrome P450 reductaseのmRNAについては、雄性CARKOマウスよりも雌性CARKOマウスで発現増加の程度が大きかった。Cytochrome P450 reductaseは小胞体の膜上でNADPHからCypsに電子を供与する酵素であり(15)、本研究においてはマウスの性別や遺伝子型に関わらず、肝肥大の程度と相関するような発現変動がみられていることから、肝細胞内のCypsの量や活性を反映して発現量の変動するものと考えられる。本実験で検索した限りでは、DBDEによる雌雄のCARKOマウスでのCypsの発現パターンに差はなかったが、雌性マウスのみでみられた肝肥大については、誘導されたCyp1 familyの総量や今回検索していない酵素の誘導が関与している可能性が示唆された。

さらに、本実験で明らかになった3点目として、雌性マウスではDBDEによる明らかな腫瘍の増加がみられなかったことが挙げられる。雄性マウスではDBDEはCAR非依存的に好塩基性の増殖性病変を増加させたが、雌では野生型マウスでわずかに好塩基性の変異肝細胞巣が増加したのみであった。これは、腫瘍の細胞タイプによる発がん感受性の雌雄差が関連していると考えられる。イニシエーション・プロモーションモデルにおける増殖性病変について、PBやPBOによってCARを介して誘発された好酸性の増殖性病変については、雌雄両性の野生型マウスで変異肝細胞巣／腺腫

が全例でみられた。これは、CAR を介して誘発される好酸性タイプの増殖性病変の誘発は、雌雄での感受性に差がないことを示している。一方で、CAR に関与しない好塩基性やその他のタイプの変異肝細胞巣及び腺腫については、雄と比較して明らかに雌性マウスで発生数が少なかった (Figure 1-8 及び Figure 2-4 の比較)。ENU や DEN によって誘発されるマウスの肝腫瘍はテストステロンで亢進し (25)、エストロゲンによって抑制されることが知られている (34, 44)。本実験の結果及びこれらの報告から、今回の実験で用いた C3H バックグラウンドのマウスにおいては、CAR に依存しない好塩基性やその他のタイプの増殖性病変の感受性は雄の方が高く、その発生には性ホルモンが関与している可能性が考えられた。また、DBDE のように好塩基性の増殖性病変を増加させる化合物の評価には、雄を用いる方が適していると考えられた。

なお、PB によってマウスで誘発される肝腫瘍に関する研究は多々あるが (22, 62)、ほとんどの実験は雄性マウスのみを用いて実施されており、雌雄で誘発される腫瘍のタイプを比較した研究は意外なほど少ない。今回文献検索をした限りでは、C3H 系統のマウスにおいて PB によって誘発される腫瘍のタイプを、性別で比較した研究はなかった。第 1 章及び第 2 章の実験において、PB による C3H バックグラウンドのマウスにおいて、雌雄でほぼ同程度の好酸性増殖性病変を誘発し、好塩基性の増殖性病変は雄で多く誘発されることを見出したことは、本研究における新しい知見の一つである。

小括

本章では、雌性の野生型マウス及び CARKO マウスに PBO、DBDE 及び PB を投与し、病理組織学的検査及び肝薬物代謝酵素の発現量変化の解析を行うことにより、これらの化合物による肝肥大及び肝発がんにおける CAR の役割を調べ、また第 1 章の雄性マウスでの実験結果との比較を行った。その結果、PBO による肝肥大では CAR に依存しない経路が存在し、肝発がんについては CAR に依存した好酸性の病変が誘発され、雌雄差は認められなかった。一方の DBDE では、野生型及び CARKO マウスともに 4 週投与後に肝肥大がみられたことから、雄と異なり CAR に依存しない経路で肝肥大を誘発することが示された。また、雄性マウスでは DBDE によって好塩基性の増殖性病変が増加したが、雌性マウスでは陰性対照群やその他の群も含めて好塩基性及びその他のタイプの増殖性病変の発生が減少しており、DBDE 投与では好塩基性の変異肝細胞巣が増加したのみであった。好塩基性及びその他のタイプの増殖性病変の発生数に関する雌雄差の要因として、性ホルモンの影響が考えられた。

Table 2-1 Final body weights and liver weights in wild-type and CARKO female mice treated with piperonyl butoxide, decabromodiphenyl ether or phenobarbital for 4, and 27 weeks.

	Group	Wild-type	CAR knock-out
4-week (Exp.1)			
Final body weight (g)	Control	24.5 ± 2.0	27.2 ± 2.0
	Piperonyl butoxide	21.8 ± 0.7 *	23.7 ± 0.9 **
	Decabromodiphenyl ether	24.4 ± 1.6	26.7 ± 2.0
	Phenobarbital	25.1 ± 1.6	25.9 ± 1.6
Absolute liver weight (g)	Control	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1
	Piperonyl butoxide	2.0 ± 0.1 **	2.1 ± 0.2 **
	Decabromodiphenyl ether	1.6 ± 0.1 **	1.5 ± 0.2
	Phenobarbital	1.7 ± 0.2 **	1.4 ± 0.1
Relative liver weight (%BW)	Control	5.2 ± 0.3	5.1 ± 0.3
	Piperonyl butoxide	9.0 ± 0.2 **	8.7 ± 0.3 **
	Decabromodiphenyl ether	6.7 ± 0.1 **	5.6 ± 0.3 **
	Phenobarbital	6.7 ± 0.3 **	5.4 ± 0.1
27-week (Exp.2)			
Final body weight (g)	Control	31.8 ± 3.0	31.6 ± 5.5
	Piperonyl butoxide	26.1 ± 1.4 **	23.6 ± 2.5 **
	Decabromodiphenyl ether	31.1 ± 3.3	32.6 ± 4.3
	Phenobarbital	31.9 ± 3.2	27.6 ± 4.7 *

The data are shown as mean ± SD.

Significantly different from the control group of each genotype: (* p < 0.05, ** p < 0.01: Student and Welch test)

Table 2-2 Histopathological findings of livers in wild-type and CARKO female mice treated with PBO, DBDE or PB for 4 weeks.

Findings	Control		PBO		DBDE		PB	
	Wild N=6	KO N=6	Wild N=6	KO N=6	Wild N=5	KO N=6	Wild N=5	KO N=6
Hepatocellular hypertrophy								
Mild	0	0	0	0	0	1 ^{a)}	0	0
Moderate	0	0	0	0	5 ^{b)}	5 ^{a)}	0	0
Marked	0	0	6 ^{c)}	6 ^{b)}	0	0	5 ^{b)}	0
Infiltration, mixed								
Minimal	0	0	0	1	1	2	0	1
Focal necrosis								
Minimal	0	0	0	2	3	1	0	0
Vacuolation, hepatocyte								
Minimal	0	0	0	1	0	0	0	0

Note; "Wild" indicates wild-type mice. "KO" indicates CARKO mice.

The numbers in column indicate the numbers of animals which showed each finding.

a) Hepatocellular hypertrophy was found in centrilobular area.

b) Hepatocellular hypertrophy was found in centrilobular to midzonal area.

c) Hepatocellular hypertrophy was found in centrilobular to periportal area.

Table 2-3 Histopathological non-proliferative findings of livers in wild-type and CARKO female mice treated with PBO, DBDE or PB for 27 weeks.

Findings	Control		PBO		DBDE		PB	
	Wild N=20	KO N=20	Wild N=21	KO N=18	Wild N=18	KO N=19	Wild N=19	KO N=20
Hepatocellular hypertrophy								
Mild	0	0	0	0	15 ^{a)}	0	0	0
Moderate	0	0	17 ^{c)}	11 ^{c)}	2 ^{a)}	0	7 ^{b)}	0
Marked	0	0	4 ^{c)}	7 ^{c)}	0	0	12 ^{b)}	0
Infiltration, mononuclear								
Mild	0	3	1	5	0	1	1	3
Infiltration, mixed								
Mild	0	0	0	0	1	0	1	0
Focal necrosis								
Mild	1	2	11	12	4	0	4	2
Vacuolation, hepatocyte								
Mild	0	1	0	6	0	1	0	0

Note; "Wild" indicates wild-type mice. "KO" indicates CARKO mice.

The numbers in column indicate the numbers of animals which showed each finding.

a) Hepatocellular hypertrophy was found in centrilobular area.

b) Hepatocellular hypertrophy was found in centrilobular to midzonal area.

c) Hepatocellular hypertrophy was found in centrilobular to periportal area.

Table 2-4 Incidence of proliferative lesions in wild-type and CAR KO female mice treated PBO, DBDE or PB for 27 weeks after DEN initiation.

Neoplastic lesion	Control		PBO		DBDE		PB		
	Wild N=20	KO N=20	Wild N=21	KO N=18	Wild N=18	KO N=19	Wild N=19	KO N=20	
Eosinophilic	altered foci	3	1	21**	18**	0	0	19**	0##
	adenomas	0	0	21**	4*,##	0	0	16**	0##
Basophilic	altered foci	11	5	9	10	13	11	7	5
	adenomas	1	1	2	7*	1	2	0	0
Other	altered foci	5	2	2	5	0*	3	6	1#
	adenomas	0	0	0	1	0	0	1	0

Note: "Wild" indicates wild-type mice. "KO" indicates CAR knockout mice.

The numbers in column indicate the numbers of animals in which one or more lesions were found.

Significantly different from the control group of each genotype: (* p < 0.05, ** p < 0.001: Fisher's test)

Significantly different from the wild-type mice of each group: (# p < 0.05, ## p < 0.001: Fisher's test)

Table 2-5 Comparison of male and female mice in the response to chemical-inducible liver hypertrophy and tumor promotion.

Events	Phenobarbital		Piperonyl butoxide		Decabromodiphenyl ether	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Liver hypertrophy	Wild	Wild	Wild / KO	Wild / KO	Wild	Wild / KO
Dependance on CAR	Yes	Yes	No	No	Yes	No
Involvement of other nuclear receptors	No	No	Yes (PXR)	Yes (PXR)	Yes (AhR)	Yes (AhR)
Liver tumor promotion						
Eosinophilic type	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Basophilic type	No	No	Equivocal	Equivocal	Yes	Equivocal

Note: "Wild" indicates wild-type mice. "KO" indicates CAR knockout mice.

Red letters indicate the different response to the chemical between males and females.

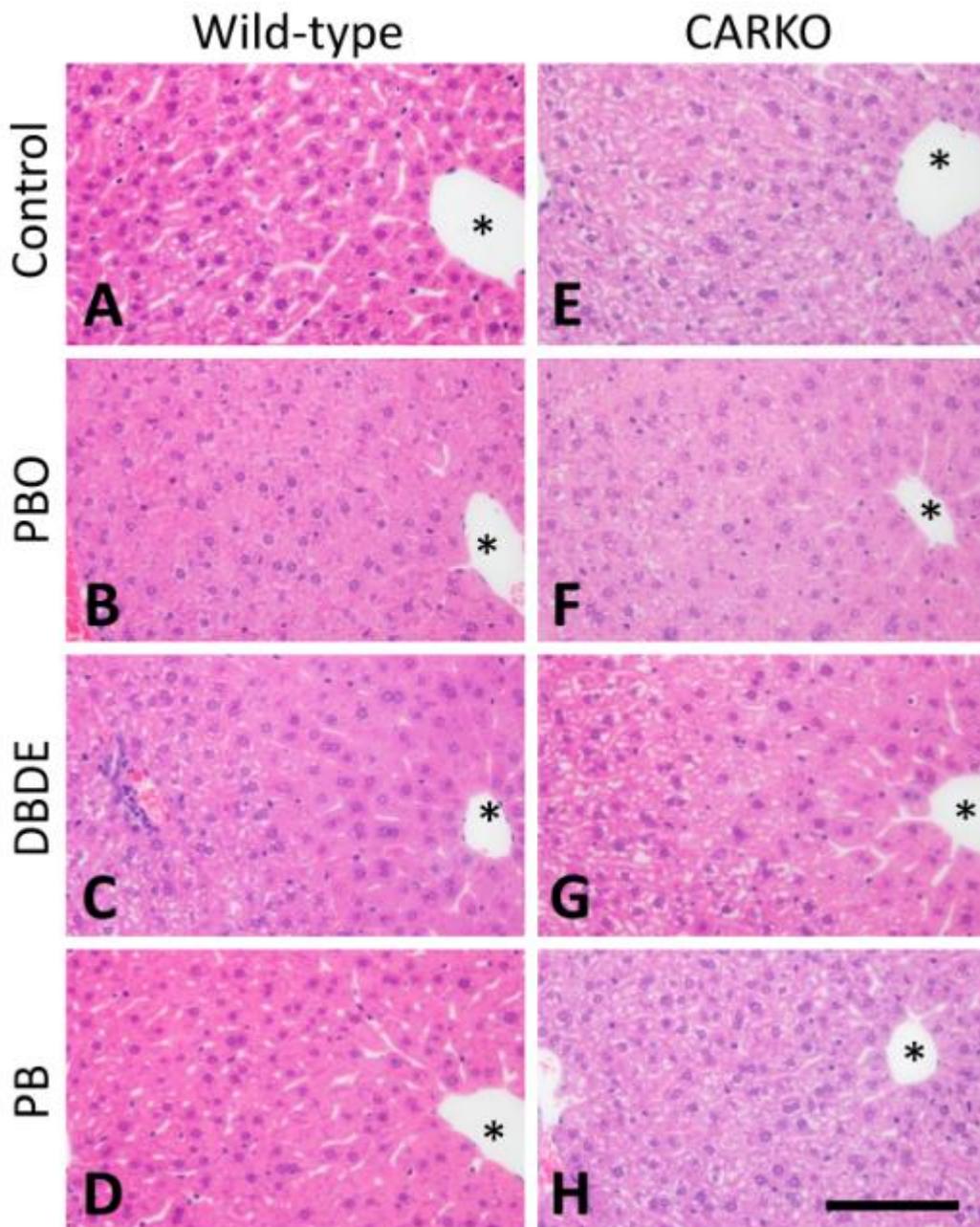


Figure 2-1 Livers of wild-type and CARKO female mice treated with PBO, DBDE and PB or fed basal diet (control group) for 4 weeks. A-D are from wild-type mice. E-H are from CARKO mice. A and E are from the control group. B and F are from the PBO group. C and G are from the DBDE group. D and H are from the PB group. Asterisks (*) represent central veins. Centrilobular hepatocellular hypertrophy was prominent in all treated group of wild-type female mice (B, C and D). In CARKO female mice, PBO group showed centrilobular to midzonal hypertrophy (F). DBDE group also showed centrilobular hypertrophy (G). PB treatment in CARKO mice resulted in no hypertrophy (H). Hematoxylin and eosin (H&E) staining. The scale bar represents 100 μ m.

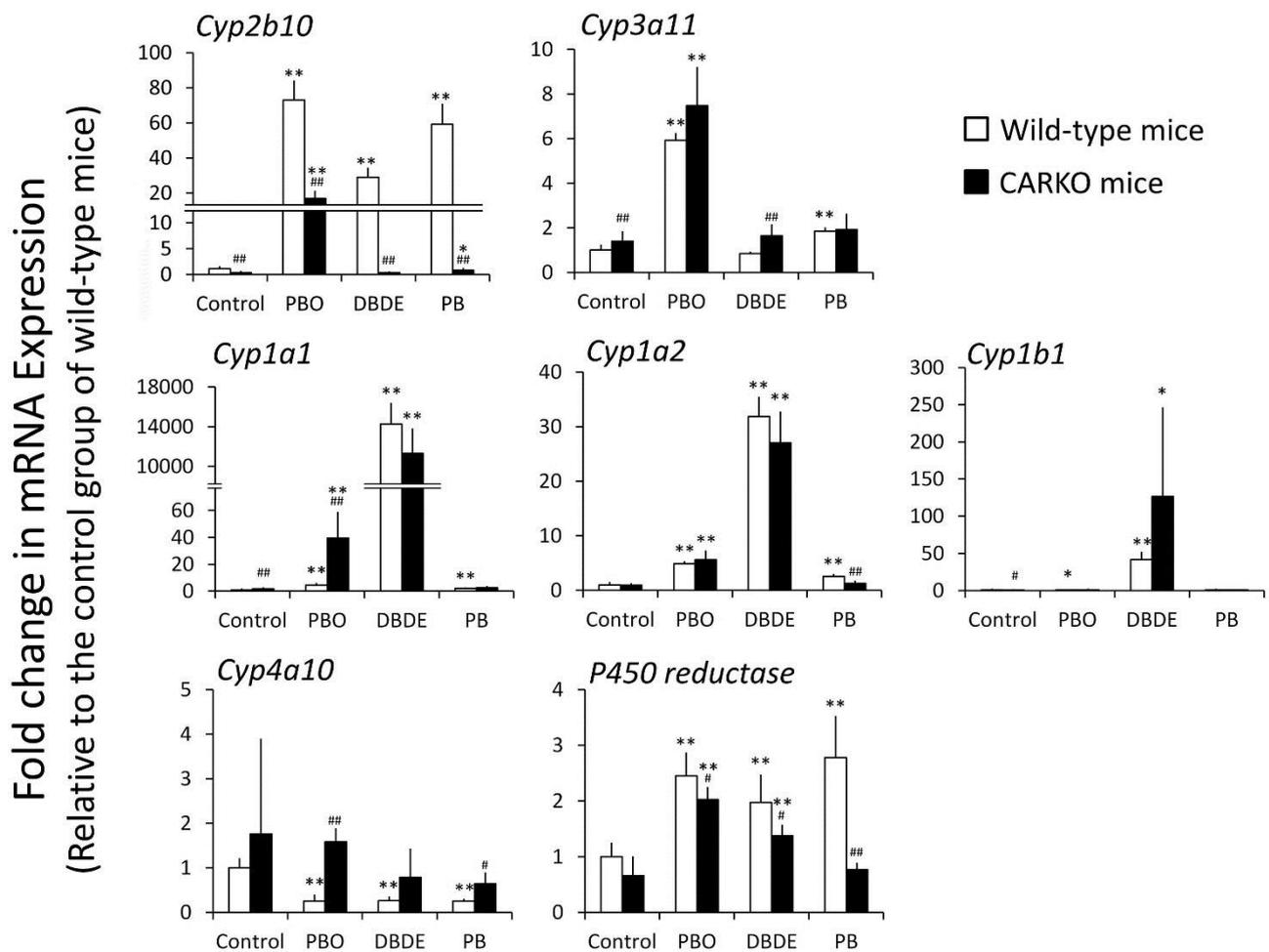


Figure 2-2 Relative mRNA expression levels of Cyp2b10, Cyp3a11, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1, Cyp4a10, and P450 reductase in the liver of wild-type and CARKO female mice treated with test chemicals for 4 weeks. Values represent mean \pm SD of each group and genotype. The expression levels of each gene were divided by the expression levels of GAPDH mRNA of corresponding individuals. * and ** indicate statistically significant differences from the control group of each genotype (* p < 0.05, ** p < 0.01: Student and Welch test). # and ## indicate statistically significant differences from the wild-type animals of each group (# p < 0.05, ## p < 0.01: Student and Welch test).

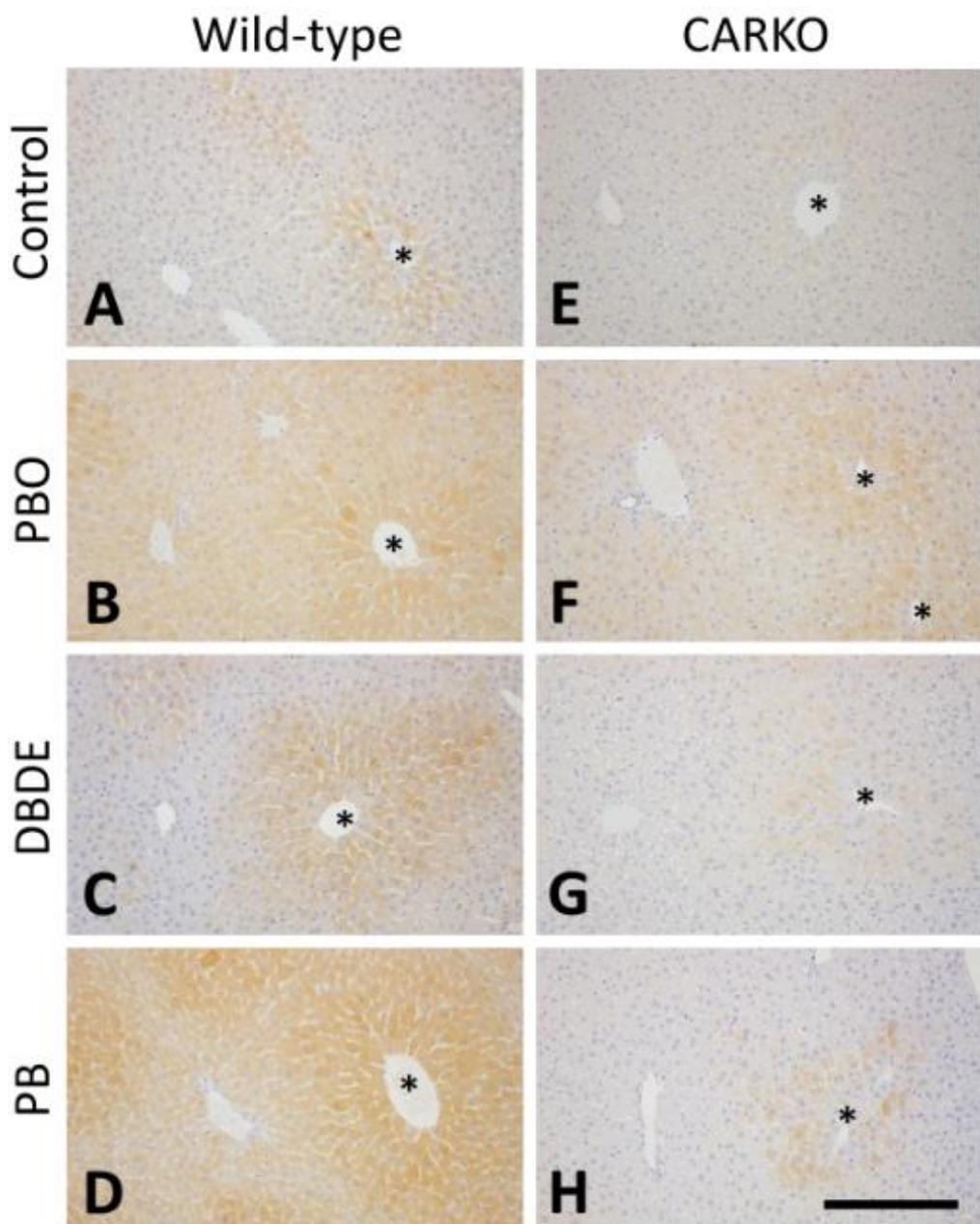


Figure 2-3 Liver sections stained with immunohistochemical reaction to Cyp2b. Livers were of wild-type and CARKO female mice treated with PBO, DBDE and PB or fed basal diet (control group) for 4 weeks. A-D are from wild-type mice. E-H are from CARKO mice. A and E are from the control group. B and F are from the PBO group. C and G are from the DBDE group. D and H are from the PB group. Wild-type mice in the control group showed weak staining intensity in centrilobular area (A). In the PBO and PB groups on wild-type mice, positive reactions were detected diffusely, while the positive signal in periportal area in the PB group was relatively weak (B and D). Wild type mice in the DBDE group showed positive reactions in centrilobular-midzonal area (C). In CARKO mice, faint staining intensities were seen in centrilobular hepatocytes of the control, DBDE and PB groups (E, G and H). The staining intensities in the PBO group of CARKO mice were also weak, however they were detected in centrilobular-midzonal area or diffusely (F).

The scale bar represents 200 μ m.

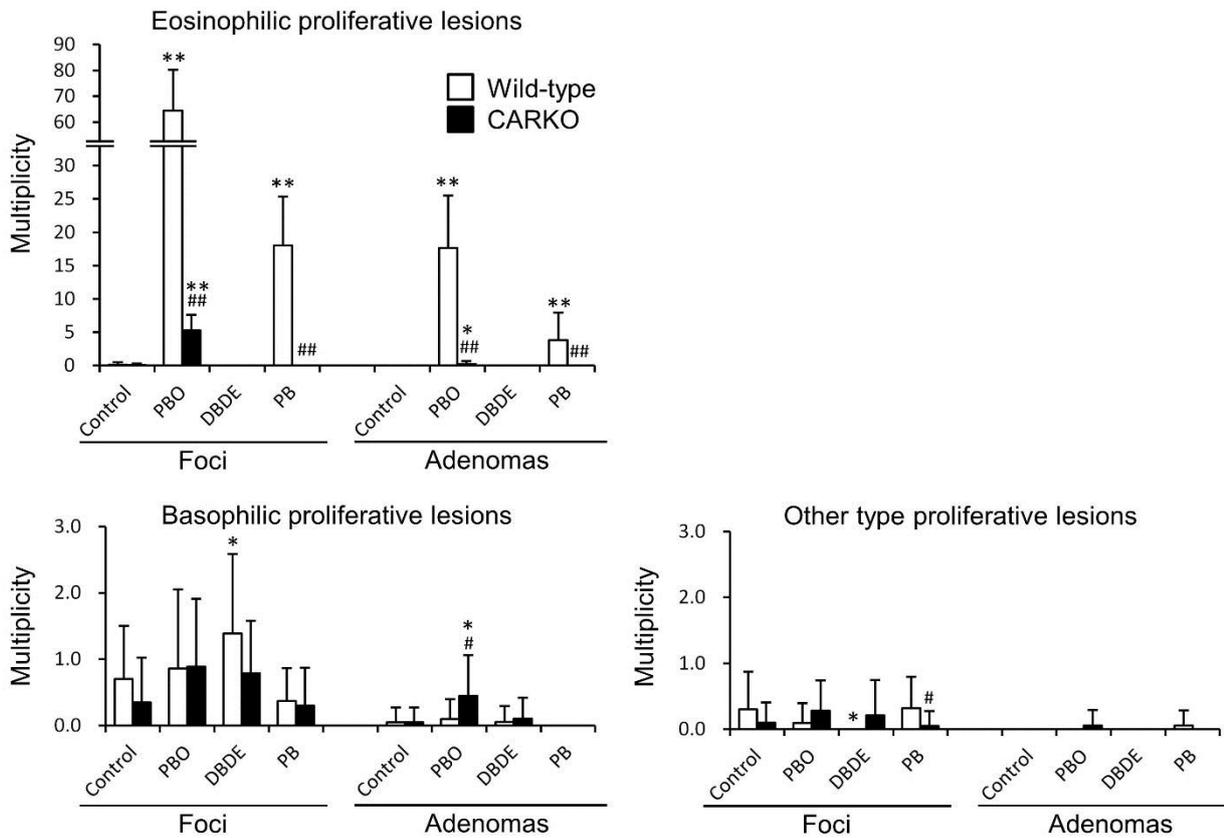


Figure 2-4 Multiplicity (average number per animal) of proliferative lesions that found in the 13 liver sections of each individual. Values represent mean \pm SD of each group and genotype. * and ** indicate statistically significant differences from the control group of each genotype (* p < 0.05, ** p < 0.01: Student and Welch test). # and ## indicate statistically significant differences from the wild-type animals of each group (# p < 0.05, ## p < 0.01: Student and Welch test).

第3章

ピペロニルブトキシドによる肝肥大における

CAR 及び他の核内受容体の関与と投与用量の関係

緒言

第1章の結果から、ピペロニルブトキシド (PBO) による肝肥大には CAR 以外の核内受容体の関与が示唆された。異物代謝に関わる核内受容体は CAR 以外にも PXR、PPAR、及び AhR など、多岐にわたることが知られている。化学物質によっては複数の核内受容体を活性化させることで生体に作用を及ぼすことがあり、また投与用量によって活性化される核内受容体が異なるというケースも報告されている (35, 42, 54)。

Tamura らは、トリアゾール系の抗真菌薬であるシプロコナゾールやフルコナゾールにおいて、低用量では CAR に依存していた肝肥大が、高用量では別の経路 (PXR が疑われる) も肝肥大に寄与していることを示している (54)。また Peffer らは、同じくトリアゾール系の抗真菌薬によるマウスでの肝肥大及び細胞増殖活性について、低用量では CAR に依存し、高用量では CAR 以外の経路も関与していることを報告している (42)。このように、ある種の化合物による肝肥大では、投与用量によって反応が異なり、関与する核内受容体も異なる可能性が示唆されている。

第1章及び第2章では腫瘍誘発用量での PBO 投与における肝肥大あるいは関連遺伝子の発現を調べ、CAR や PXR の関与の可能性を示したが、それ以外も含めた核内受容体の関与の詳細は依然として不明であった。第1章及び第2章で用いた PBO の腫瘍誘発用量では、重度の肝肥大や薬物代謝酵素の強い誘導がみられていたが、より低用量では、関与する核内受容体が異なってくる可能性も考えられる。そこで本章では、PBO を複数の用量で雄性の野生型及び CARKO マウスに1週間投与した時の肝肥大、及びそれぞれ CAR、PXR、AhR、及び PPAR によって主に活性化される第1相薬物代謝酵素である Cyp2b、Cyp3a、Cyp1a、及び Cyp4a の mRNA 及びタンパク質発現量を調べ、PBO

による肝肥大と CAR 及びその他の経路の関係性について検討した。

化合物

PBO は、第 1 章で用いたものと同じものを使用した。

動物

第 1 章及び第 2 章と同様に、国立医薬品食品衛生研究所で繁殖している雄性 CARKO マウス及び日本チャールス・リバー株式会社より購入した野生型マウスを用いた。なお、全ての動物実験は国立医薬品食品衛生研究所の動物実験委員会に承認を受け、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験の適切な実施に関する規定に準拠して行った。

化合物の投与

7 週齢の CARKO マウス及び野生型マウスを、体重を基にして無作為に 1 群 5 匹の 4 群に群分けした。動物は遺伝子型ごと、1 群毎に別々のケージに分けて、12 時間の明暗サイクル下で飼育を行った。投与群 3 群には PBO を実験 1 で用いた発がん用量である 5000 ppm を最高用量に、公比 5 で中用量 1000 ppm、及び低用量 200 ppm を設定し、粉末基礎飼料 (CRF-1, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) への混餌投与で 1 週間自由摂取させた。なお、中用量及び低用量は、PBO によるマウス肝臓への影響を調べた過去の報告 (13, 21, 52)、及び第 1 章の実験の結果から、軽度の肝肥大を示す用量、及び肝肥大を誘発しない用量を期待して設定した。陰性対照群には基礎飼料を同様の期間自由摂取させた。

動物の観察及び安楽死の方法

動物の一般状態は、1日1回以上観察した。体重は投与期間中に3回及び剖検日に1回、摂餌量は投与期間中に2回測定した。最終投与日の翌日に、イソフルランの吸入麻酔下で放血安楽死させ、肝臓の肉眼的観察、重量測定、及びサンプル採取を実施した。

肝臓の病理組織学的検査による肝肥大評価

肝臓の中間葉を10%中性緩衝ホルマリン溶液によって浸漬固定し、パラフィン包埋、薄切後にHE染色標本作製した。HE染色標本については、病理組織学的に肝細胞肥大の領域及び程度を評価した。すなわち、領域については小葉中心性、びまん性、及びびまん性だが小葉中心部はより重度、の3つに分類し、程度は軽微 (Slight)、軽度 (Mild)、中程度 (Moderate)、及び重度 (Severe) の4段階に分類した。

肝臓の免疫組織化学的評価

HE染色標本作製で用いたパラフィン切片を用いて、抗Cyp2b6抗体(マウスCyp2b10のヒトホモログ、ab69652, Abcam, Cambridge, MA, USA)、抗Cyp3a4抗体(マウスCyp3a11/3a13のヒトホモログ、ab3572, Abcam)、抗Cyp1a1/1a2抗体(ab111868, Abcam)、及び抗Cyp4a抗体(ab140635, Abcam)を用いた免疫組織化学を実施した。パラフィン包埋切片を抗体液とともに4℃で一晩インキュベートし、ペルオキシダーゼで標識したデキストランポリマーが結合した二次抗体 (Histofine Simple Stain mouse MAX PO, Nichirei, Tokyo, Japan) を反応させ、3-3'-diaminobenzidine (Sigma Chemical Co., St.

Louis, MO, USA) により視覚化した。また、対比染色としてヘマトキシリン染色を実施した。免疫組織化学の標本については、肝小葉内の領域ごとに、反応の強さを半定量的に評価した。すなわち、領域については小葉中心部、小葉中間帯、及び小葉辺縁部の 3 つに分類し、程度は陰性又はごく軽微 (None or very slight)、軽微 (Slight)、軽度 (Mild)、及び中程度 (Moderate) の 4 段階に分類した。

RT-real time PCR

肝臓の左葉を用いて、第 1 章と同様の手法により RT-real time PCR を用いて遺伝子発現量を評価した。Cyp1a1 (Mm00487218_m1)、Cyp2b10 (Mm01972453_s1)、Cyp3a11 (Mm00731567_m1)、Cyp4a10 (Mm02601690_gH)、及び cytochrome P450 reductase (Mm00435876_m1) の発現量を GAPDH で標準化して比較した。

統計解析

体重、肝臓絶対重量、肝臓相対重量、及び mRNA 発現量のデータをについて統計解析を実施した。遺伝子型ごとに、対照群と各用量の PBO 投与群の比較を行った。また、CARKO マウスと野生型マウスの比較をそれぞれの同じ投与群 (同化合物同用量) 同士で比較した。対照群と化合物投与群の比較は Dunnett 検定を用い、野生型と CARKO マウスとの比較では、第 1 章と同様に、Student の t 検定 (等分散性あり) あるいは Welch の t 検定 (等分散性なし) を用いた。有意水準は 5% 及び 1% とした。

実験結果

一般状態、体重、摂餌量、及び肝重量

投与 0～1 日目及び 5～6 日目の摂餌量及び被験物質の摂取量を Table 3-1 に示す。剖検時の体重及び肝重量を Table 3-2 に示す。投与期間中、一般状態の変化又は死亡はみられなかった。摂餌量は、1000 ppm 群及び 5000 ppm 群で対照群と比較して低値であった。PBO の摂取量は、低、中、及び高用量群でそれぞれ 44～56、186～220、及び 714～1122 mg/kg/day であった。CARKO マウスの 1000 ppm 群及び 5000 ppm 群では、対照群と比較して有意な体重低値がみられた。肝臓重量では、5000 ppm 群では両遺伝子型で、1000 ppm 群では野生型マウスのみで対照群と比較して有意な高値がみられた。

肝臓の病理組織学的変化

肝臓の HE 染色標本による病理組織学的結果を Table 3-3 に、対照群、1000 ppm 群及び 5000 ppm 群の典型的な HE 染色像を Figure 3-2 に示す。肝細胞肥大が、両遺伝子型の 5000 ppm 群と、野生型マウスの 1000 ppm 群にみられた。野生型マウスでは、1000 ppm 群では軽度の、5000 ppm 群では中程度から高度の肝細胞肥大が、主に小葉中心部に認められ、5000 ppm 群では肝細胞肥大が小葉中間帯から辺縁部まで及んでいた。CARKO マウスでは、5000 ppm 群のみで、中程度のび慢性肝細胞肥大がみられた。

肝臓における Cyps mRNA 発現

Cyps 及び Cyp reductase をコードした mRNA 発現量を Figure 3-1 に示す。Cyp2b10 の mRNA 発

現レベルは野生型マウスでは投与量に応じて増加し、対照群と比較して 1000 ppm 群では 120 倍以上、5000 ppm 群では 800 倍以上の増加がみられた。一方の CARKO マウスでは、5000 ppm 群では野生型マウスの対照群と比較して約 60 倍の増加がみられたが、1000 ppm 以下ではほとんど発現がみられなかった。Cyp3a11 の mRNA 発現レベルは野生型マウスでは 5000 ppm 群のみで統計学的に有意な増加がみられたのに対し、CARKO マウスでは全ての群で有意な増加がみられた。Cyp1a1 の mRNA 発現レベルは、CARKO マウスの 5000 ppm 群のみで統計学的に有意な増加がみられた。Cyp4a10 の mRNA 発現レベルは Cyp1a1 のパターンと類似し、CARKO マウスの 5000 ppm 群のみで著明な増加がみられた。Cytochrome P450 reductase の mRNA 発現レベルは、野生型マウスの 1000 ppm 群と両遺伝子型の 5000 ppm 群で統計学的に有意な増加がみられた。

肝臓における Cyps の免疫組織化学

抗 Cyp2b 抗体及び抗 Cyp3a 抗体を用いた免疫組織化学の組織像を Figure 3-2 に、抗 Cyp1a 抗体及び抗 Cyp4a 抗体を用いた免疫組織化学の組織像を Figure 3-3 に示す。また、各免疫組織化学の結果の模式図を Figure 3-4 に示す。野生型マウスでは、200 ppm 群から小葉中心部の肝細胞で中程度以上の Cyp2b 陽性反応がみられ、用量が上がるにつれて小葉中間帯、小葉辺縁部でも陽性反応が強くなった。CARKO マウスでは、Cyp2b 陽性反応は対照群及び 200 ppm 群ではほとんど確認できず、1000 ppm 以上ではび漫性に軽微な陽性反応がみられるのみであった。Cyp1a、Cyp3a、及び Cyp4a については、野生型マウスと CARKO マウスで同様の陽性反応がみられた。すなわち、1000 ppm までは対照群と同様に小葉中心部又は小葉中間帯までに軽微な陽性反応がみられ、5000 ppm で陽性反応の領域が小葉中間帯又は辺縁部まで拡大し、Cyp3a 抗体では小葉中心部の陽性反応はやや増強した。

考察

本実験では、PBO について第 1 章及び第 2 章で用いた発がん用量を高用量に設定し、中用量、低用量の 3 用量群で雄性の野生型及び CARKO マウスに混餌投与することで、PBO の肝肥大の発現に関わる核内受容体と投与用量の関係について検索した。

本実験の中用量以上での肝肥大、Cyp2b 及び Cyp3a の免疫組織化学、ならびに関与する核内受容体を Table 3-4 に示まとめた。本実験において明らかとなったこととして、PBO による肝肥大は、投与量によって関与する核内受容体が変わるとということが挙げられる。マウスでの発がん用量である 5000 ppm の混餌投与では、野生型及び CARKO マウスともに肝重量増加、びまん性の肝細胞肥大を誘発したが、Cyp2b の発現増加は野生型マウスのみで顕著にみられた。また、5000 ppm では両遺伝子型ともに Cyp3a11 mRNA 発現レベルが統計学的に有意に増加し、Cyp3a の免疫染色においてもびまん性の陽性反応がみられた。これらの結果は、5000 ppm の PBO による肝肥大には CAR 以外の経路として PXR が関与している可能性を示しており、第 1 章の結果と一致するものであった。さらに、本実験におけるより詳細な病理組織学的検索により、野生型マウスにおいては小葉中心部でより強い肝細胞肥大及び抗 Cyp2b 抗体に対する陽性反応が観察されたことから、PBO の 5000 ppm における肝細胞肥大には、小葉中心部において CAR が寄与していることが示唆された。

興味深いことに、中用量の 1000 ppm 投与では、野生型マウスのみで小葉中心性の肝肥大、Cyp2b10 mRNA 発現レベルの増加、及び抗 Cyp2b 抗体に対する小葉中心性の陽性反応増強が認められた。これらの結果は、1000 ppm においては 5000 ppm と異なり、CAR のみが肝肥大の誘発に寄与していることを示した。1000 ppm において Cyp3a11 mRNA の発現は、CARKO マウスのみで有意な

増加がみられたが、抗 Cyp3a 抗体による免疫組織化学では陰性対照群と同程度の陽性反応であり、本用量では PXR の活性化は軽微なものに留まっていると考えられた。低用量の 200 ppm ではいずれの遺伝子型でも肝肥大はみられず、野生型マウスにおける抗 Cyp2b 抗体に対する小葉中心部での若干の陽性反応の増強と、CARKO マウスにおける Cyp3a11 mRNA 発現レベルの軽度の上昇以外は代謝酵素の変動はみられなかった。

CAR と PXR は同じ NR1 ファミリーに属し、異物の解毒において活性化された際に標的となる薬物代謝酵素の遺伝子についてもオーバーラップしているものがあることが報告されている (10, 31, 63)。本実験において、1000 ppm では CARKO マウスの方が Cyp3a11 mRNA 発現レベルが高くなったことは、CAR 欠損に対して代償的に PXR の活性化が亢進している可能性が考えられる。また 5000 ppm においては、CAR の活性化のみで対処しきれない PBO の曝露に対して、PXR も動員して対処している可能性も考えられる。

Cyp1a1 及び Cyp4a10 mRNA 発現レベルについては、5000 ppm の CARKO マウスで顕著な増加がみられた。PB は CARKO マウスにおいて PPAR α 及び Cyp4a10/4a14 の mRNA 発現を誘導するという報告があり (53, 57)、5000 ppm の PBO 投与時には CAR が欠損していることで PPAR が活性化が促進される可能性が示唆された。しかしながら、免疫組織化学の結果は mRNA 発現レベルと一致せず、5000 ppm では野生型及び CARKO マウスのいずれにおいても Cyp1a 及び Cyp4a の発現領域の拡大がみられた。抗 Cyp1a 抗体は Cyp1a1 だけでなく Cyp1a2 とも交差し、無処置マウスでの mRNA 発現量は Cyp1a2 の方が多い。本実験において Cyp1a2 mRNA の発現は検討していないが、高用量の PBO が両遺伝子型のマウスで同程度に Cyp1a2 を誘導していると仮定すると、免疫組織化学の結果は妥当であると言える。抗 Cyp4a 抗体も同様に、Cyp4a10 のみならず Cyp4a12、Cyp4a14 とも交差す

ることから、他の Cyp4a family も含めて mRNA を検索することで、高用量の PBO での PPAR の関与についてより深い考察が可能になると考えられる。

小括

PBO の高用量 5000 ppm では野生型及び CARKO の双方で肝肥大が認められ、CAR 以外にも肝肥大に関わる経路があることが示された。CAR 以外の経路としては、CYP3a が強く誘導されたことから、PXR が関わる可能性が考えられた。一方で、1000 ppm においては野生型マウスのみで Cyp2b の誘導及び肝肥大がみられ、CARKO マウスでは肝肥大はみられなかった。よって、1000 ppm の PBO 投与においては、主に CAR の活性化により肝肥大が誘発され、PXR の関与は小さいことが示された。

以上より、PBO による肝肥大では、投与量によって関与する核内受容体が変わることが明らかとなった。

Table 3-1 Food intake and calculated PBO intake.

Group	Dose (ppm)	Day 0–1		Day 5–6	
		Food intake (g/animal/day)	PBO intake (mg/kg/day)	Food intake (g/animal/day)	PBO intake (mg/kg/day)
Wild-type					
Control	0	6.10	0	5.28	0
PBO_low	200	6.02	52	5.38	44
PBO_middle	1000	4.46	193	5.40	220
PBO_high	5000	3.30	714	4.74	1049
CARKO					
Control	0	6.58	0	6.52	0
PBO_low	200	7.04	56	6.02	44
PBO_middle	1000	5.16	207	4.70	186
PBO_high	5000	4.34	865	5.54	1121

All values are the mean values of each group for each genotype.

Table 3-2 Final body weight and liver weight.

Group	(n=)	Final body weight	Absolute liver weight	Relative liver weight
		(g)	(g)	(% of body weight)
		5	5	5
Wild-type				
Control		24.9 ± 1.3	1.2 ± 0.1	4.9 ± 0.3
PBO_low		26.0 ± 0.7	1.2 ± 0.1	4.7 ± 0.3
PBO_middle		25.0 ± 1.0	1.4 ± 0.1*	5.7 ± 0.4**
PBO_high		23.4 ± 1.1	1.9 ± 0.1**	8.1 ± 0.3**
CARKO				
Control		27.8 ± 1.3	1.5 ± 0.1	5.2 ± 0.2
PBO_low		27.7 ± 1.1	1.4 ± 0.1	5.0 ± 0.2
PBO_middle		25.4 ± 1.2*	1.3 ± 0.1	5.3 ± 0.3
PBO_high		25.3 ± 1.0**	1.8 ± 0.1**	7.2 ± 0.3**

All values are mean ± S.D. (n = 5 for each group for each genotype)

*, **: Significantly different from the corresponding controls at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 3-3 Histopathological findings of livers in wild-type and CARKO mice treated with PBO for 1 week.

Findings of livers	Genotype:		Wild-type			CARKO			
	Group:	Control	PBO 200 ppm	PBO 1000 ppm	PBO 5000 ppm	Control	PBO 200 ppm	PBO 1000 ppm	PBO 5000 ppm
	No. of mice examined:	5	5	5	5	5	5	5	5
No findings		5	5	2	0	5	5	5	0
Hepatocellular hypertrophy									
Centrilobular	mild	0	0	3	0	0	0	0	0
	moderate	0	0	0	2	0	0	0	0
Diffuse	moderate	0	0	0	0	0	0	0	5
Diffuse and severer in the centrilobular area	severe	0	0	0	3	0	0	0	0

Table 3-4 Summary of effects of middle- and high-dose PBO on liver hypertrophy and Cyp2b/Cyp3a immunohistochemistry in wild-type and CARKO mice.

Dose	Genotype	Hypertrophy	Cyp2b	Cyp3a	Nuclear receptors involved
Middle 1000 ppm	Wild-type	Centrilobular	Centrilobular to midzonal	Not increased	CAR
	CARKO	Not detected	Not increased	Not increased	
High 5000 ppm	Wild-type	Diffuse and severer in centrilobular area	Diffuse but stronger in centrilobular area	Diffuse	CAR and Others (possibly PXR)
	CARKO	Diffuse	Diffuse and weak	Diffuse	

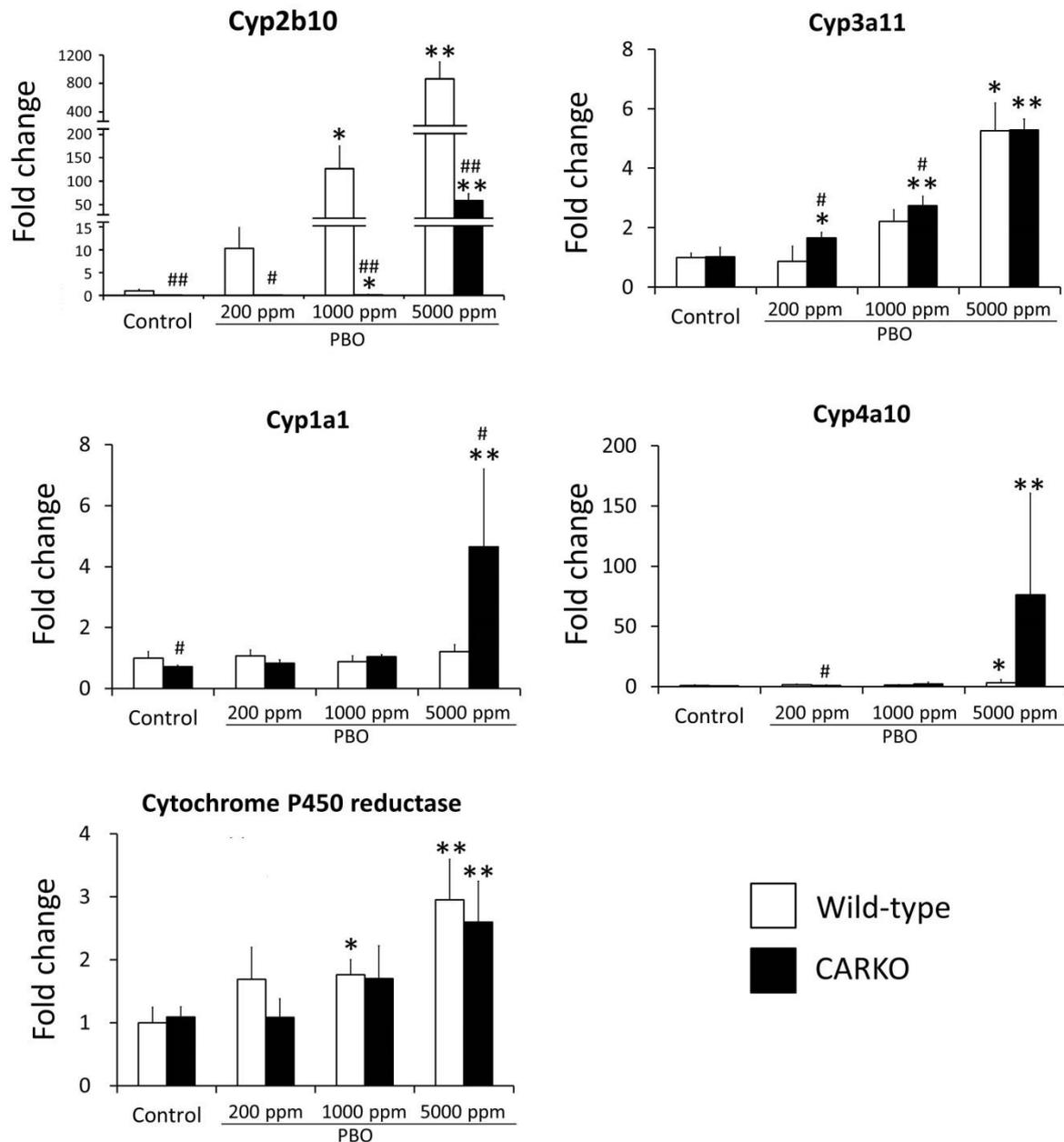


Figure 3-1 Relative mRNA expression levels of Cyp-encoding genes and cytochrome P450 reductase. Values represent the mean \pm SD of each group and genotype. * and ** indicate statistically significant differences from the control group of each genotype (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Dunnett's t-test). # and ## indicate statistically significant differences from the wild-type animals of each group (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$: Student's and Welch's t-tests).

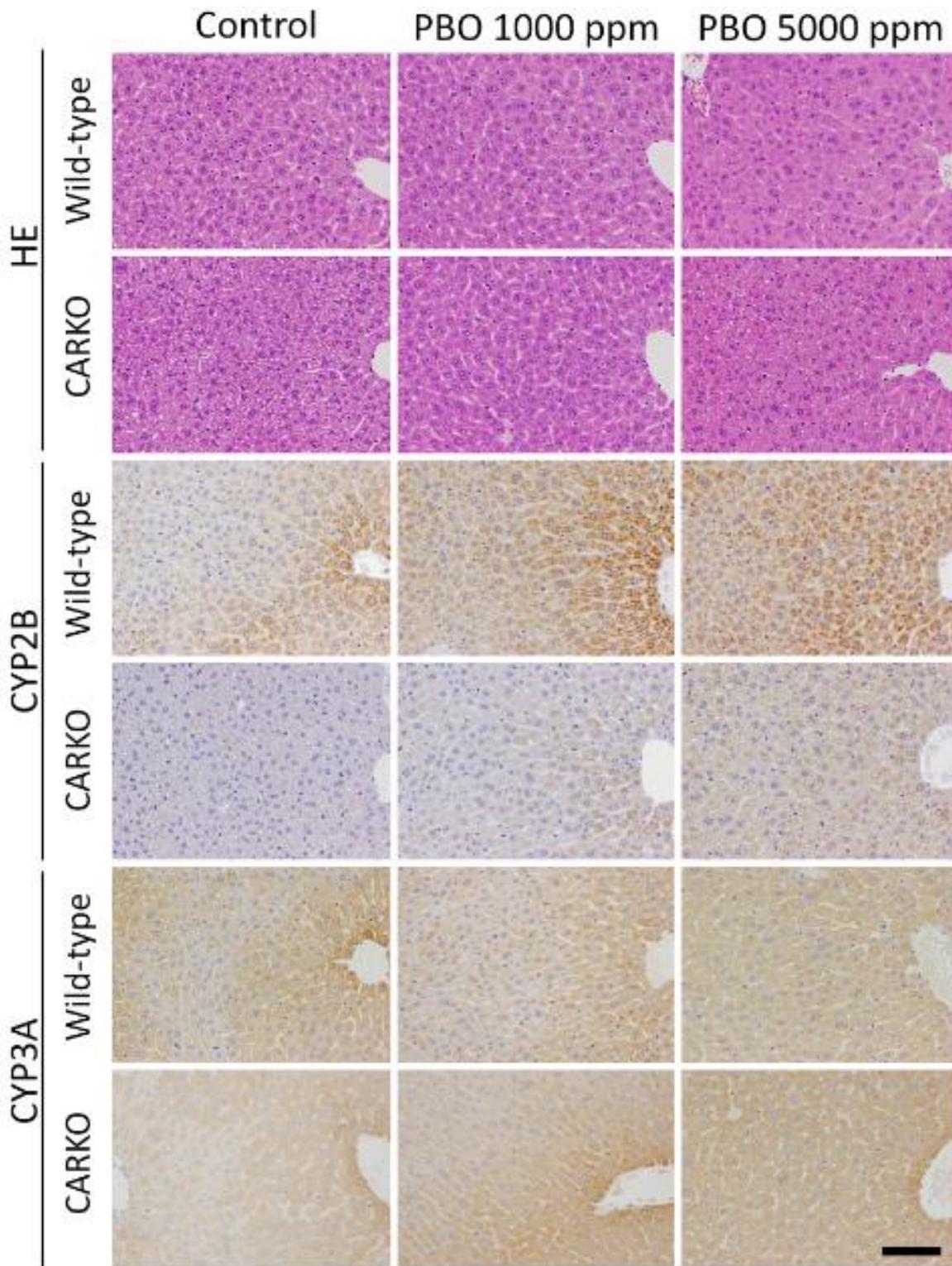


Figure 3-2 H&E sections or immunohistochemistry for Cyp2b and Cyp3a in the livers of wild-type and CARKO mice in the control, middle-dose, and high-dose groups. Upper row represents H&E. Middle row and lower row represent Cyp2b and Cyp3a, respectively. The blood vessel on the right side in each photo is the central vein. Bar = 100 μ m

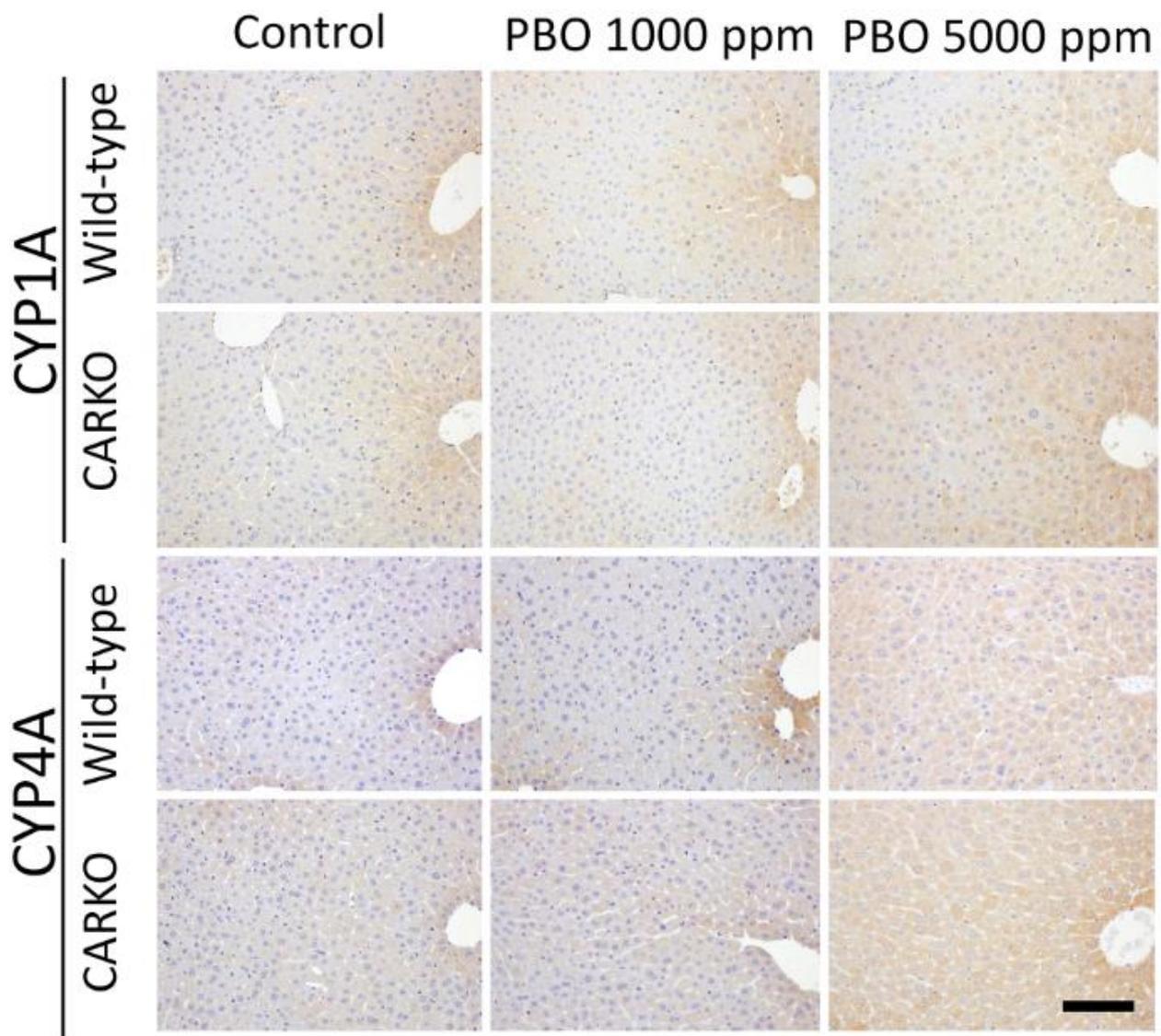


Figure 3-3 Immunohistochemistry for Cyp1a and Cyp4a in the liver of wild-type and CARKO mice in the control, middle-dose, and high-dose groups. Upper row and lower row represent Cyp1a and Cyp4a, respectively. The blood vessel on the right side in each photo is the central vein. Bar = 100 μ m

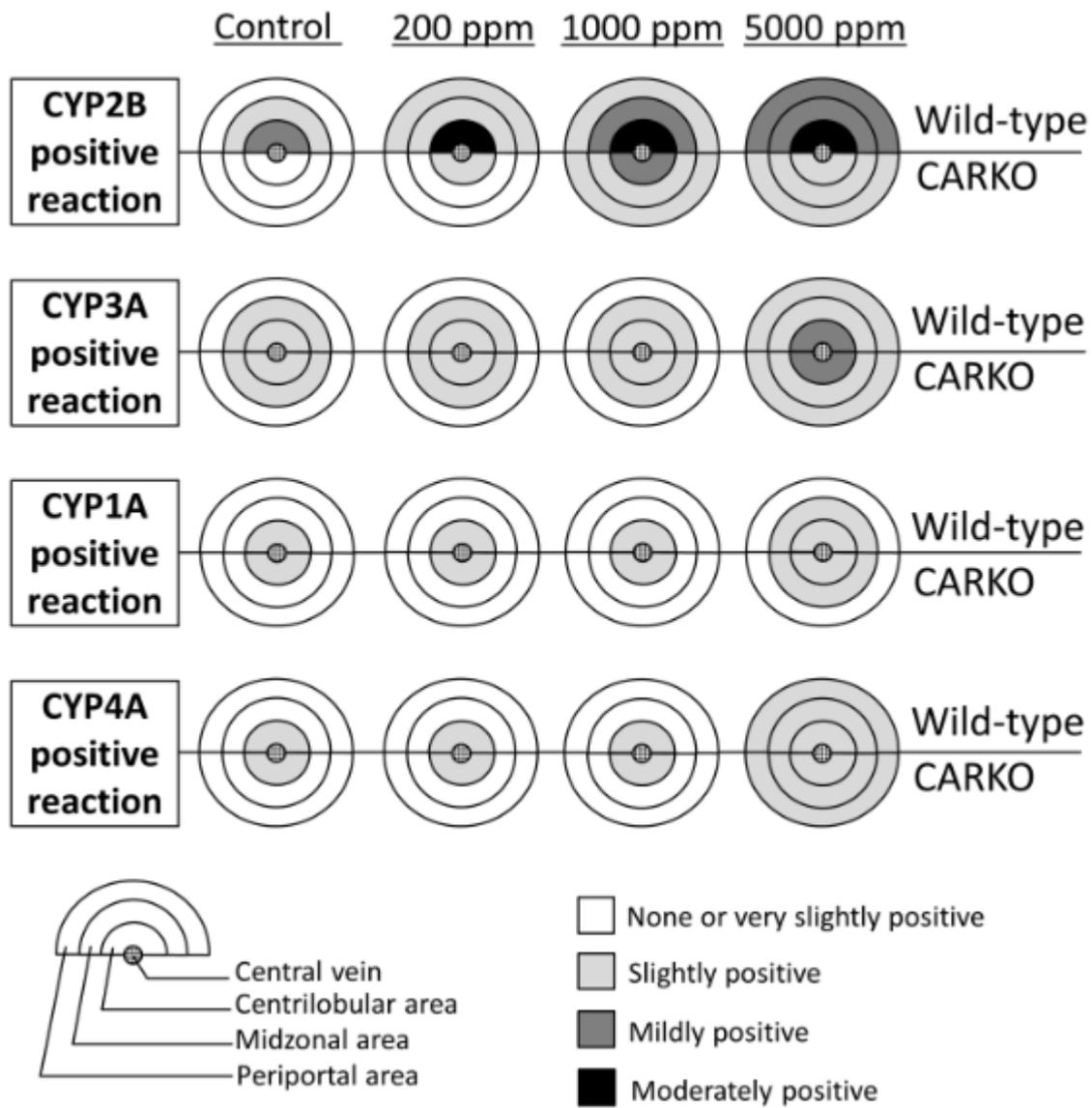


Figure 3-4 Histological localization of positive reactions for Cyp2b, Cyp3a, Cyp1a, and Cyp4a in the liver. Concentric circles represent hepatic lobules. Upper and lower hemispheres represent hepatic lobules from wild-type and CARKO mice, respectively.

総括ならびに結論

本研究では、げっ歯類で Cyp2b を誘導して肝肥大・肝発がんを起こすことが知られ、その病理発生に CAR の活性化が疑われるピペロニルブトキシド（以下 PBO、5, 13, 21, 51, 52, 60）及びデカブロモジフェニルエーテル（以下 DBDE、20, 33, 58）について、MOA 分析を行いこれらの化合物による肝発がん性のヒトへの外挿性を検討することを第一の目的とした。実験では、野生型及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を混餌投与し、肝重量測定、病理組織学的検査、肝細胞増殖活性、及び肝薬物代謝酵素の発現量変化について調べ、ヒトへの外挿性がないとされる PB 型の肝発がんに関わるイベント（CAR 活性化、肝細胞増殖活性の亢進、肝増殖性病変の誘発等）との比較を行った。また、PBO 及び DBDE による肝肥大及び肝発がんにおける CAR 以外の核内受容体の関与を調べることで、Cyp2b 誘導化合物の MOA 分析の妥当性を検討することを第二の目的とした。

第 1 章では、雄性の野生型マウス及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を 1 週間、4 週間あるいは肝発がんイニシエーターであるジエチルニトロソアミン（DEN）単回投与後に 27 週間混餌投与し、肝肥大及び肝発がんにおける CAR の関与を調べた。その結果、PBO の 5000 ppm 混餌投与では、野生型マウスで強く Cyp2b を誘導し、CAR 活性化の関与が示された。一方、肝肥大については野生型マウスと CARKO マウスの両方で認められ、Cyp3a が遺伝子型に関わらず誘導されたことから、本剤による肝肥大には CAR 以外に pregnane X receptor（PXR）が関与している可能性が示された。肝発がん性については、PBO は PB と同様に、野生型マウスで好酸性の増殖性病変を誘発し、CARKO マウスではこれが大幅に抑制されたことから、PBO による肝発がんは主に CAR に依存していることが明らかとなった。ただし、PBO は CARKO マウスにおいても僅かながら陰性対照群よりも増殖性

病変の発生頻度及び発生数が高く、CAR 以外にも酸化ストレスや PXR を介した肝臓での代謝変化が腫瘍発生に寄与している可能性も考えられた。DBDE の 50000 ppm 混餌投与では、野生型マウスのみで Cyp2b の誘導及び肝肥大が認められ、DBDE の肝肥大は CAR に依存していることが明らかとなった。一方、DBDE による肝発がん性については、野生型及び CARKO マウスの両方で好塩基性の増殖性病変を増加させたことから、CAR に依存しない経路で肝発がんを促進する可能性が示唆された。DBDE は Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1 の mRNA 発現レベルを上昇させたことから、肝発がん促進作用には aryl hydrocarbone receptor (AhR) が関与している可能性が考えられた。

第 2 章では、マウスの肝腫瘍の発生頻度には性差がある事、化合物によっては CAR の感受性にも性差があることから (16)、雌性の野生型マウス及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を 4 週間、あるいは DEN 単回投与後に 27 週間混餌投与し、第 1 章に準じた各種検査を実施し、雌雄差を検討した。その結果、PBO による肝肥大、肝発がんについて雌雄差は認められなかった。すなわち、雌マウスにおいても肝肥大には CAR 以外に PXR の関与が疑われた一方で、肝発がんについては CAR に依存して好酸性の増殖性病変を誘発した。DBDE については、雄での肝肥大は CAR に依存していたのに対し、雌では CAR 以外の経路が肝肥大に寄与する可能性が示された。また、雄性マウスで DBDE 投与により CAR に依存せず増加した好塩基性の増殖性病変は、雌では野生型マウスで変異肝細胞巣がみられたのみで腫瘍発生には至らなかった。DBDE 投与群に限らず、好塩基性の増殖性病変は雄と比較して全体的に雌で少なく、雌雄で感受性の違いがみられた。DEN によるイニシエーション作用によって誘発される好塩基性の肝腫瘍は性ホルモンによる影響を受けることが知られており (25, 44)、本実験において DBDE により誘発される好塩基性の増殖性病変の感受性に雌雄差があった要因の一つとして、性ホルモンの影響が疑われた。

第3章では、第1章及び第2章の実験において肝肥大における CAR 以外の核内受容体の関与が示唆された PBO について、投与用量と活性化される核内受容体の関連性について調べた。第1章及び第2章で用いた 5000 ppm は重度の肝肥大及び多数の肝腫瘍を誘発し、組織学的に軽度の肝障害もみられる用量であったため、中用量、低用量としてそれぞれ 1000 及び 200 ppm を設定し、1 週間の混餌投与を行った。その結果、CAR に加えて PXR の寄与による肝肥大がみられた 5000 ppm と異なり、中用量の 1000 ppm では野生型マウスのみで肝肥大、Cyp2b10 mRNA 発現レベルの増加、及び抗 Cyp2b 抗体に対する小葉中心性の陽性反応増強がみられたことから、1000 ppm での肝肥大には CAR のみが寄与していることが明らかとなった。本実験の結果から、PBO による酵素誘導及び肝肥大では、その投与量により関与する核内受容体が異なることが示された。

以上の実験結果から、PBO 及び DBDE の肝発がん性について PB タイプの MOA における Key events との整合性を検討した結果を Text table に示す。

Text table: Comparison between the result of this research and the mode of action for phenobarbital-like nongenotoxic carcinogen.

Key events	PB	PBO 1000 ppm	PBO 5000 ppm	DBDE
CAR activation	Yes	Yes	Yes	Yes
Altered gene expression specific to CAR activation	Yes	Yes	Yes	Yes
Increased cell proliferation	Yes	-	Yes	No
Clonal expansion leading to altered foci	Yes (Eos type)	-	Yes (Eos type)	Yes (Baso type)
Hepatocellular adenoma	Yes (Eos type)	-	Yes (Eos type)	Yes (Baso type)
Involvement of other nuclear receptor	No	No	Yes (PXR)	Yes (AhR)

- : Not examined, Eos type: eosinophilic type, Baso type: basophilic type

DBDE による発がんについては CAR 以外の経路が疑われる。すなわち、DBDE は CAR 依存的に Cyp2b の誘導を示したものの、肝細胞増殖活性の亢進はみられず、PB で特徴的な好酸性の腫瘍も誘発しなかった。また Cyp1 family を誘導し AhR の関与も示唆されたことから、DBDE は PB とは異なるタイプの肝発がんプロモーション作用を有すると考えられる。以上より、MOA 分析によって、「ヒトへの外挿性なし」との判断はできないと結論した。しかし、本研究において DBDE は好塩基性タイプの腫瘍発生がもともと少ない雌マウスでは腫瘍発生を誘発しなかったこと、及び今回 DBDE で用いた用量は 50000 ppm と非常に高濃度であり、また DBDE の生体への吸収性は非常に低いと言われていることから (58)、実際のリスク管理においては、げっ歯類で誘発される腫瘍のタイプに応じた発生メカニズム考察や、ヒトでの暴露量も含めた考察が必要になるであろう。

PBO については、CAR 活性化、Cyp2b 等の誘導、細胞増殖活性の亢進、好酸性の変異肝細胞巣／腺腫の誘発と、PB タイプの MOA の Key events を満たしていた (10, 18)。一方、PBO では CARKO マウスでも僅かながらに増殖性病変を増加させ、肝肥大では PXR といった他の核内受容体の関与も示されたことから、CAR 以外の経路も弱いながら肝発がん促進に寄与している可能性が示された。MOA 分析結果のヒトへの外挿性については、Key events の確認に加えてヒトと実験動物間での暴露量や代謝機能の違いを考慮に入れる必要があるが (4)、第 3 章では、1000 ppm の PBO による肝肥大においては、CAR のみが関与していることを明らかにした。本研究では 1000 ppm の PBO による変異肝細胞巣や腺腫の誘発に関しては調べていないが、この用量では増殖性病変の発生も完全に CAR に依存していることが推察され、その場合は PBO によるげっ歯類での肝発がん性については「ヒトへの外挿性なし」と判断できる可能性が高い。非遺伝毒性の発がん物質のリスク評価においては、“閾値”を考慮するため (36)、PBO についてはマウスにおいて CAR のみが関与する用量と、ヒトでの

暴露量を比較することで、適切な評価が可能になると考えられる。

化学物質のげっ歯類での肝発がん性について、ヒトへの外挿性を検討するために用いられる MOA 分析は、人類の生活を豊かにする化学物質を適切に管理しながら使用していくために、非常に有用なツールである。しかし、通常実施されている野生型マウスやラットを用いた毒性試験では、CAR に依存した肝肥大や肝発がんによって他の経路を介した作用がマスクされてしまう可能性があり、潜在的なリスクを見逃す恐れがある。本研究では、げっ歯類で Cyp2b を誘導する非遺伝毒性の化学物質である PBO 及び DBDE について、CARKO マウスを効果的に用いることで、肝肥大／肝発がんにおける CAR 及びその他の核内受容体の関与を明らかにすることができた。また、複数の用量を設定した実験により、CAR 及び他の核内受容体の関与が変化する閾値を見出すことができた。これらの結果と MOA 分析を組み合わせることにより、PBO によるげっ歯類での発がん性については PB と類似した CAR を介したメカニズムが働いており、ヒトへの外挿性が乏しいこと、及び DBDE によるげっ歯類での発がん性については CAR 以外に AhR の関与が疑われ、ヒトへの発がん性についてはより慎重なリスク評価が必要であることが明らかとなった。本研究で用いた化合物に限らず、Cyp2b 誘導化合物の発がん性について CARKO マウスを用いた実験手法を MOA 分析と組み合わせることで、より正確で信頼性の高い評価を行うことができると結論した。

本論文の一部は以下に公表した。

1. Sakamoto, Y., Inoue, K., Takahashi, M., Taketa, Y., Kodama, Y., Nemoto, K., Degawa, M., Gamou, T., Ozawa, S., Nishikawa, A., and Yoshida, M.: Different pathways of constitutive androstane receptor-mediated liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis in mice treated with piperonyl butoxide or decabromodiphenyl ether. *Toxicologic Pathology*, 41:1078-1092, 2013.

Copyright © 2013 by The Author(s). Reprinted by permission of SAGE Publications.

DOI: 10.1177/0192623313482055

2. Sakamoto, Y., Yoshida, M., Tamura, K., Takahashi, M., Kodama, Y., and Inoue, K.: Dose-dependent difference of nuclear receptors involved in murine liver hypertrophy by piperonyl butoxide. *The Journal of Toxicological Sciences*, 40:787-796, 2015.

DOI: 10.2131/jts.40.787

謝辞

本稿作成に際し、懇篤なご指導、ご助言を賜りました、麻布大学獣医学部 獣医病理学研究室 代田欣二 教授、麻布大学獣医学部 獣医薬理学研究室 浅井史敏 教授、白井明志 准教授に深甚たる謝意を表します。

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して終始御指導、ご鞭撻を賜りました食品安全委員会 委員 吉田緑 博士、国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 井上薫 博士（本研究の実施時は、両名とも国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部第二室に所属）に謹んで深謝の意を表します。

本研究に際し、御指導・御協力賜り、実験にご協力くださいました、国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センターセンター長 西川秋佳 博士、国立医薬品食品衛生研究所 病理部部长 小川久美子 博士、国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 児玉幸夫 博士、岩手医科大学薬学部 薬物代謝動態学講座 小澤正吾 教授、蒲生俊恵 助教、国立医薬品食品衛生研究所 病理部 高橋美和 博士、入江かをる 博士、森川朋美 女史、小松芳美 女史、才川紋子 女史に心から感謝いたします。

引用文献

1. Assem, M., Schuetz, E. G., Leggas, M., Sun, D., Yasuda, K., Reid, G., Zelcer, N., Adachi, M., Strom, S., Evans, R. M., Moore, D. D., Borst, P., and Schuetz, J. D.: Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J. Biol. Chem.*, 279: 22250-22257, 2004.
2. Beigneux, A. P., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C., and Feingold, K. R.: Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293: 145-149, 2002.
3. Blanco-Bose, W. E., Murphy, M. J., Ehninger, A., Offner, S., Dubey, C., Huang, W., Moore, D. D., and Trumpp, A.: C-Myc and its target FoxM1 are critical downstream effectors of constitutive androstane receptor (CAR) mediated direct liver hyperplasia. *Hepatology*, 48: 1302-1311, 2008.
4. Boobis, A. R., Daston, G. P., Preston, R. J. and Olin, S. S.: Application of key events analysis to chemical carcinogens and noncarcinogens. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 49: 690–707, 2009.
5. Butler, W. H., Gabriel, K. L., Osimitz, T. G., and Preiss, F. J.: Oncogenicity studies of piperonyl butoxide in rats and mice. *Hum. Exp. Toxicol.*, 17: 323-330, 1998.

6. Chen, X., Zhang, J., Baker, S. M., and Chen, G.: Human constitutive androstane receptor mediated methotrexate induction of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hSULT2A1). *Toxicology*, 231: 224-233, 2007.
7. Cohen, S. M., Klaunig, J., Meek, M. E., Hill, R. N., Pastoor, T., Lehman-McKeeman, L., Bucher, J., Longfellow, D. G., Seed, J., Dellarco, V., Fenner-Crisp, P., and Patton, D.: Evaluating the human relevance of chemically induced animal tumors. *Toxicol. Sci.*, 78: 181-186, 2004.
8. Deguchi, Y., Yamada, T., Hirose, Y., Nagahori, H., Kushida, M., Sumida, K., Sukata, T., Tomigahara, Y., Nishioka, K., Uwagawa, S., Kawamura, S., and Okuno, Y.: Mode of action analysis for the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced rat liver tumors: evidence for hepatic CYP2B induction and hepatocyte proliferation. *Toxicol. Sci.*, 108: 69-80, 2009.
9. Diwan, B. A., Rice, J. M., Ohshima, M., and Ward, J. M.: Interstrain differences in susceptibility to liver carcinogenesis initiated by N-nitrodiethylamine and its promotion by Phenobarbital in C57BL/6NCr, C3H/HeNCrMTV- and DBA/2NCr mice. *Carcinogenesis*, 7: 215-20, 1986.
10. Elcombe, C. R., Peffer, R. C., Wolf, D. C., Bailey, J., Bars, R., Bell, D., Cattley, R. C., Ferguson, S. S., Geter, D., Goetz, A., Goodman, J. I., Hester, S., Jacobs, A., Omiecinski, C. J., Schoeny, R., Xie, W., and Lake, B. G.: Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: A case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator. *Crit. Rev. Toxicol.*, 44:64-82, 2014.

11. Evans, J. G., Collins, M. A., Savage, S. A., Lake, B. G., and Butler, W. H.: The histology and development of hepatic nodules in C3H/He mice following chronic administration of phenobarbitone. *Carcinogenesis*, 7, 627-631. 1986.
12. Forman, B. M., Tzameli, I., Choi, H. S., Chen, J., Simha, D., Seol, W., Evans, R. M., and Moore, D. D.: Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature*, 395: 612-615, 1998.
13. Fujitani, T., Tanaka, T., Hashimoto, Y., and Yoneyama, M.: Subacute toxicity of piperonyl butoxide in ICR mice. *Toxicology*, 83: 93-100, 1993.
14. Haswell, S. C., and Roberts, R. A.: The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics. *Pharmacol. Ther.* 82: 63-70, 1999.
15. Henderson, C. J., Otto, D. M., Carrie, D., Magnuson, M. A., McLaren, A. W., Rosewell, I., and Wolf, C. R.: Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.*, 278: 13480-13486, 2003.
16. Hernandez, J. P., Mota, L. C., Huang, W., Moore, D. D., and Baldwin, W. S.: Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicology*, 256: 53-64, 2009.

17. Hirose, Y., Nagahori, H., Yamada, T., Deguchi, Y., Tomigahara, Y., Nishioka, K., Uwagawa, S., Kawamura, S., Isobe, N., Lake, B.G., and Okuno, Y.: Comparison of the effects of the synthetic pyrethroid Metofluthrin and phenobarbital on CYP2B form induction and replicative DNA synthesis in cultured rat and human hepatocytes. *Toxicology*, 258: 64-69, 2009.
18. Holsapple, M. P., Pitot, H. C., Cohen, S. M., Boobis, A. R., Klaunig, J. E., Pastoor, T., Dellarco, V. L., and Dragan, Y. P.: Mode of action in relevance of rodent liver tumors to human cancer risk. *Toxicol. Sci.*, 89: 51-56, 2006.
19. Huang, W., Zhang, J., Washington, M., Liu, J., Parant, J. M., Lozano, G., and Moore, D. D.: Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol Endocrinol.*, 19: 1646-1653, 2005.
20. INCHEM (1994). International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 162, Brominated diphenyl ethers.

Available at: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc162.htm>
21. INCHEM (1995). Monograph 903. Piperonyl butoxide (Pesticide residues in food: 1995 evaluations Part II Toxicological & Environmental).

Available at: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr15.htm>

22. International Agency for Research on Cancer (IARC), Phenobarbital and its sodium salt. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 79, 2001.
23. Jones, H. B., Orton, T. C., and Lake, B. G.: Effect of chronic phenobarbitone administration on liver tumour formation in the C57BL/10J mouse. *Food. Chem. Toxicol.*, 47: 1333-1340, 2009..
24. Kawai, M., Saegusa, Y., Dewa, Y., Nishimura, J., Kemmochi, S., Harada, T., Ishii, Y., Umemura, T., Shibutani, M., and Mitsumori, K.: Elevation of cell proliferation via generation of reactive oxygen species by piperonyl butoxide contributes to its liver tumor-promoting effects in mice. *Arch. Toxicol.*, 84: 155-164, 2010.
25. Kemp, C. J., and Drinkwater, N. R.: Genetic variation in liver tumor susceptibility, plasma testosterone levels, and androgen receptor binding in six inbred strains of mice. *Cancer Res.*, 49: 5044-5047, 1989.
26. Kennedy, G. D., Nukaya, M., Moran, S. M., Glover, E., Weinberg, S., Balbo, S., Hecht, S. S., Pitot, H. C., Drinkwater, N. R., and Bradfield, C. A.: Liver tumor promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is dependent on the aryl hydrocarbon receptor and TNF/IL-1 receptors. *Toxicol. Sci.*, 140: 135-143, 2014.
27. Kolaja, K. L., Stevenson, D. E., Walborg, E. F. Jr, and Klaunig, J. E.: Reversibility of promoter induced hepatic focal lesion growth in mice. *Carcinogenesis*, 17: 1403-1409, 1996.
28. Lamminpää, A., Pukkala, E., Teppo, L., and Neuvonen, P. J.: Cancer incidence among patients using antiepileptic drugs: a long-term follow-up of 28,000 patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 58: 137-41, 2002.

29. Ledda-Columbano, G. M., Pibiri, M., Concas, D., Molotzu, F., Simbula, G., Cossu, C., and Columbano, A.: Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand, TCPOBOP. *Carcinogenesis*. 24: 1059-1065, 2003.
30. Lee, E., Kim, T. H., Choi, J. S., Nabanata, P., Kim, N. Y., Ahn, M. Y., Jung, K. K., Kang, I. H., Kim, T. S., Kwack, S. J., Park, K. L., Kim, S. H., Kang, T. S., Lee, J., Lee, B. M. and Kim, H. S.: Evaluation of liver and thyroid toxicity in Sprague-Dawley rats after exposure to polybrominated diphenyl ether BDE-209. *J. Toxicol. Sci.*, 35: 535-45, 2010.
31. Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J. T., and Kliewer, S. A.: Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol. Pharmacol.*, 62: 638–646, 2002.
32. Muguruma, M., Unami, A., Kanki, M., Kuroiwa, Y., Nishimura, J., Dewa, Y., Umemura, T., Oishi, Y., and Mitsumori, K.: Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats. *Toxicology*, 236: 61-75, 2007.
33. National Toxicology Program (NTP), (1986). NTP Technical Report Series No. 309. Toxicology and carcinogenesis studies of decabromodiphenyl oxide (CAS No. 1163-19-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed studies). NIH Publication No. 86-2565, NIEHS, Research Triangle Park, NC.

34. Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., and Karin, M.: Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*. 317: 121-124, 2007.
35. Nesnow, S., Ward, W., Moore, T., Ren, H., and Hester, S. D.: Discrimination of tumorigenic triazole conazoles from phenobarbital by transcriptional analyses of mouse liver gene expression. *Toxicol. Sci.*, 110: 68-83, 2009.
36. Nohmi, T., Masumura, K., and Toyoda-Hokaiwado, N.: Transgenic rat models for mutagenesis and carcinogenesis. *Genes. Environ.*, 39: 11. 2017
37. Osimitz, T. G., and Lake, B. G.: Mode-of-action analysis for induction of rat liver tumors by pyrethrins: relevance to human cancer risk. *Crit. Rev. Toxicol.*, 39: 501-11, 2009.
38. Ozawa, S., Gamou, T., Habano, W., Inoue, K., Yoshida, M., Nishikawa, A., Nemoto, K., and Degawa, M.: Altered expression of GADD45 genes during the development of chemical-mediated liver hypertrophy and liver tumor promotion in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 613-623, 2011.
39. Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D. U., Pham, C. G., Nelsbach, A. H., Melis, T., De Smaele, E., Tang, W. J., D'Adamio, L., and Franzoso, G.: Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat. Cell Biol.*, 6: 146-153, 2004.

40. Papa, S., Monti, S. M., Vitale, R. M., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., De Smaele, E., Dathan, N., Pedone, C., Ruvo, M., and Franzoso, G.: Insights into the structural basis of the GADD45beta-mediated inactivation of the JNK kinase, MKK7/JNK2. *J. Biol. Chem.*, 282: 19029–19041, 2007.
41. Pacyniak, E. K., Cheng, X., Cunningham, M. L., Crofton, K., Klassen, C. D., and Guo, G. L.: The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, are pregnane X receptor activators. *Toxicol. Sci.*, 97: 94-102, 2007.
42. Peffer, R. C., Moggs, J. G., Pastoor, T., Currie, R. A., Wright, J., Milburn, G., Waechter, F., and Rusyn, I.: Mouse liver effects of cyproconazole, a triazole fungicide: role of the constitutive androstane receptor. *Toxicol. Sci.*, 99: 315-25, 2007.
43. Phillips, J. M., and Goodman, J. I.: Multiple genes exhibit Phenobarbital-induced constitutive active/androstane receptor-mediated DNA methylation changes during live tumorigenesis and in liver tumors. *Toxicol. Sci.*, 108: 273-89, 2009.
44. Poole, T. M., and Drinkwater, N. R.: Two genes abrogate the inhibition of murine hepatocarcinogenesis by ovarian hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5848-5853, 1996.
45. Ross, J., Plummer, S. M., Rode, A., Scheer, N., Bower, C. C., Vogel, O., Henderson, C. J., Wolf, C. R., and Elcombe, C. R.: Human constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR)

support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and chlordane in vivo. *Toxicol. Sci.*, 116: 452-66, 2010.

46. Seton-Rogers, S. Hepatocellular carcinoma: gender differences. *Nat. Rev. Cancer.*, 14: 578, 2014.
47. Shizu, R., Benoki, S., Numakura, Y., Kodama, S., Miyata, M., Yamazoe, Y., and Yoshinari, K.: Xenobiotic-induced hepatocyte proliferation associated with constitutive active/androstane receptor (CAR) or peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) is enhanced by pregnane X receptor (PXR) activation in mice. *PLoS One.* 8: e61802, 2013.
48. Sindiku, O., Babayemi, J., Osibanjo, O., Schlummer, M., Schluep, M., Watson, A., and Weber, R.: Polybrominated diphenyl ethers listed as Stockholm Convention POPs, other brominated flame retardants and heavy metals in e-waste polymers in Nigeria. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 22:14489-14501, 2015.
49. Sonich-Mullin, C., Fielder, R., Wiltse, J., Baetcke, K., Dempsey, J., Fenner-Crisp, P., Grant, D., Hartley, M., Knaap, A., Kroese, D., Mangelsdorf, I., Meek, E., Rice, J. M., and Younes, M.; International Programme on Chemical Safety.: IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 34: 146-152, 2001.
50. Sugatani, J., Kojima, H., Ueda, A., Kakizaki, S., Yoshinari, K., Gong, Q. H., Owens, I. S., Negishi, M., and Sueyoshi, T.: The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin

UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology*, 33: 1232-8, 2001.

51. Takahashi, T., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T., and Yoneyama, M.: Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in F344 rats: induction of hepatocellular carcinoma. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 22: 293-303, 1994.
52. Takahashi, T., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T., and Yoneyama, M.: Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in CD-1 mice: induction of hepatocellular carcinoma. *Toxicology*, 124: 95-103, 1997.
53. Tamasi, V., Juvan, P., Beer, M., Rozman, D. and Meyer, U.A.: Transcriptional activation of PPAR alpha by phenobarbital in the absence of CAR and PXR. *Mol. Pharm.*, 6: 1573–1581, 2009.
54. Tamura, K., Inoue, K., Takahashi, M., Matsuo, S., Irie, K., Kodama, Y., Ozawa, S., Nishikawa, A. and Yoshida, M.: Dose-response involvement of constitutive androstane receptor in mouse liver hypertrophy induced by triazole fungicides. *Toxicol. Lett.*, 221: 47–56, 2013.
55. Thoolen, B., Maronpot, R. R., Harada, T., Nyska, A., Rousseaux, C., Nolte, T., Malarkey, D. E., Kaufmann, W., Kütler, K., Deschl, U., Nakae, D., Gregson, R., Vinlove, M. P., Brix, A. E., Singh, B., Belpoggi, F., and Ward, J. M.: Proliferative and nonneoplastic lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol. Pathol.*, 38: 5S-81S, 2010.
56. Tucker, M. J., Kalinowski, A. E., and Orton, T. C.: Carcinogenicity of cyproterone acetate in the mouse. *Carcinogenesis*, 17: 1473-1476, 1996.

57. Ueda, A., Hamadeh, H.K., Webb, H. K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C. A., Lehmann, J. M., and Negishi, M.: Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* 61: 1-6, 2002.
58. Van der Ven, L. T., van de Kuil, T., Leonards, P. E., Slob, W., Cantón, R. F., Germer, S., Visser, T. J., Litens, S., Håkansson, H., Schrenk, D., Van den Berg, M., Piersma, A. H., Vos, J. G., and Opperhuizen, A.: A 28-day oral dose toxicity study in Wistar rats enhanced to detect endocrine effects of decabromodiphenyl ether (decaBDE). *Toxicol. Lett.* 179: 6-14, 2008.
59. Ward, J. M.: Increased susceptibility of livers of aged F344/NCr rats to the effects of phenobarbital on the incidence, morphology, and histochemistry of hepatocellular foci and neoplasms. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 71: 815-823, 1983.
60. Watanabe, T., Manabe, S., Ohashi, Y., Okamiya, H., Onodera, H., and Mitsumori, K.: Comparison of the Induction Profile of Hepatic Drug-metabolizing Enzymes Between Piperonyl Butoxide and Phenobarbital in Rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 11: 1-10, 1998.
61. Wei, P., Zhang, J., Egan-Hafley, M., Liang, S., and Moore, D. D.: The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature*, 407: 920-3, 2000.

62. Whysner, J., Ross, P. M., and Williams, G. M.: Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacol. Ther.*, 71: 153-91, 1996.
63. Xie, W., Barwick, J.L., Simon, C.M., Pierce, A.M., Safe, S., Blumberg, B., Guzelian, P.S. and Evans, R.M.: Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes. Dev.*, 14: 3014–3023, 2000.
64. Yamamoto, Y., Moore, R., Goldsworthy, T. L., Negishi, M., and Maronpot, R. R.: The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer Res.*, 64: 7197-200, 2004.
65. Yamamoto, Y. and Negishi, M.: The antiapoptotic factor growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta regulates the nuclear receptor constitutive active/androstane receptor-mediated transcription. *Drug Metab. Dispos.*, 36: 1189–1193, 2008.
66. 公益財団法人 日本食品化学研究振興財団、厚生労働省行政情報、添加物使用基準リスト 2、各添加物の使用基準及び保存基準（平成 28 年 6 月 8 日改正まで記載）、
URL:<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/a11c0985ea3cb14b492567ec002041df/8aa11687a2aaf0c4492570650018d5ba?OpenDocument>

67. 独立行政法人 農林水産消費安全技術センター (FAMIC)、登録失効農薬情報、登録失効有効成分一覽、URL: <https://www.acis.famic.go.jp/toroku/sikkouseibun.htm>

要旨

現代人は、環境や食事・水を介して様々な化学物質に暴露されている。これらの化学物質については、人体に与える影響のポテンシャルや暴露量との関係についてリスク評価が行われている。その一つの手法として、主にげっ歯類を用いた毒性試験が取り入れられており、ヒトへの有害性の推測に有用な情報をもたらしている。一方、生理機能や代謝反応には動物種差があることから、毒性試験の結果については実験動物における反応や影響の発現メカニズムを考慮した上でヒトへの外挿性を検討する必要がある。特に実験動物で発がん性が認められた化学物質の場合、ヒトへの外挿性の判断は有害性評価の最も重要なポイントとなる。

げっ歯類とヒトでの発がん性について種差が明らかとなっている化学物質の一例としてフェノバルビタール（以下 **PB**）が挙げられる。**PB** は実験的にげっ歯類で肝肥大、肝発がんを起こすことが知られている。一方、ヒトにおいては疫学的研究結果から肝発がんに関与しないことが知られている。この種差については近年の研究の進展により徐々に明らかにされてきた。すなわち、げっ歯類において **PB** は、cytochrome P450 2b (Cyp2b) 等の代謝酵素誘導や肝細胞増殖を起こし、肝肥大・肝発がんを誘発するが、異物の解毒／代謝に関わる核内受容体である constitutive androstane receptor (**CAR**) をノックアウトしたマウス (**CARKO** マウス) では肝肥大／肝発がんが誘発されない。一方、ヒト由来の **CAR** を発現させたマウスへの暴露では肝肥大は起こるものの、肝細胞増殖が起こらない。これらの知見の蓄積により、Cyp2b 誘導化合物によるげっ歯類での肝発がんについて、**CAR** の関与やその他 **PB** の代謝といくつかの共通する key event を有する場合は、「ヒトへの外挿性なし」とする mode of action (**MOA**) の考え方が提唱され、広く受け入れられつつある。しかし、化学物質

による CAR 活性化機序やその下流の薬物代謝酵素の誘導パスウェイ、あるいは細胞増殖に至る過程は完全には解明されておらず、様々な Cyp2b 誘導化合物がある中で、画一的な基準で肝発がん性のリスク評価を行ってしまうことには大きな懸念が残る。

そこで本研究では、げっ歯類で Cyp2b を誘導して肝肥大・肝発がんを起こすピペロニルブトキシド (PBO) 及びデカブプロモジフェニルエーテル (DBDE) について、肝肥大及び肝発がん と CAR との関連性について調べ、これら Cyp2b 誘導化合物の肝発がん性のヒトへの外挿性を検討することを第一の目的とした。実験では、野生型及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を混餌投与し、肝重量測定、病理組織学的検査、肝細胞増殖活性、及び肝薬物代謝酵素の発現量変化について検討するとともに、PB 型の肝発がんに関わる変化 (肝肥大、肝細胞増殖活性の亢進等) の比較を行い、外挿性について考察した。また、発がん性における CAR 以外の核内受容体の関与についても調べることで、Cyp2b 誘導化合物の MOA 分析の妥当性を検討することを第二の目的とした。

第 1 章では、雄性の野生型マウス及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を 1 週間、4 週間、あるいは肝発がんイニシエーターであるジエチルニトロソアミン (DEN) 単回投与後に 27 週間混餌投与し、肝肥大及び肝発がんにおける CAR の関与を調べた。その結果、PBO の 5,000 ppm 混餌投与では、野生型マウスで強く Cyp2b を誘導し CAR の活性化が示されたが、肝肥大は野生型マウスと CARKO マウスの両方で認められた。PBO の投与では遺伝子型に関わらず Cyp3a の誘導もみられ、本剤による肝肥大には CAR 以外に pregnane X receptor (PXR) も関与している可能性が示された。肝細胞増殖活性は、野生型マウスでは PBO と PB で、CARKO マウスでは PBO のみで亢進していた。肝発がん性については、PBO は PB と同様に、野生型マウスで好酸性の増殖性病変を誘発し、CARKO マウスではこれが大幅に抑制されたことから、PBO による肝発がんは主に CAR に依存していること

が明らかとなった。ただし、PBO は CARKO マウスにおいても陰性対照群よりも増殖性病変の発生頻度及び発生数が僅かながら高く、CAR 以外にも酸化ストレスや PXR を介した肝臓での代謝変化も腫瘍発生に寄与している可能性も考えられた。DBDE の 50,000 ppm 混餌投与では、野生型マウスのみで Cyp2b の誘導及び肝肥大が認められ、DBDE の肝肥大は CAR に依存していることが明らかとなった。一方、DBDE による肝発がん性については、野生型及び CARKO マウスの両方で好塩基性の増殖性病変を増加させ、Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp1b1 の mRNA 発現レベルを上昇させたことから、肝発がん促進作用には aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関与している可能性が考えられた。

第 2 章では、マウスの肝腫瘍の発生頻度には性差があること、化合物によっては CAR の感受性にも性差があることから、雌性の野生型マウス及び CARKO マウスに PBO 又は DBDE を 4 週間、あるいは DEN 単回投与後に 27 週間混餌投与し、第 1 章に準じた各種検索を実施し雌雄差を検討した。その結果、PBO による肝肥大、肝発がんについて雌雄差は認められなかった。すなわち、雌マウスにおいても肝肥大には CAR 以外に PXR の関与が疑われた一方で、肝発がんについては CAR に依存して好酸性の増殖性病変が誘発された。DBDE については、雄での肝肥大は CAR に依存していたのに対し、雌では CAR 以外の経路が肝肥大に寄与する可能性が示された。また、雄性マウスで DBDE 投与により CAR に依存せず増加した好塩基性の増殖性病変は、雌では野生型マウスで変異肝細胞巢の若干の増加がみられたのみであり、雌雄で感受性の違いがみられた。DEN によるイニシエーション作用によって誘発される好塩基性の肝腫瘍は性ホルモンによる影響を受けることが知られており、本実験において DBDE により誘発される好塩基性の増殖性病変の感受性の雌雄差と一致するものであった。

第 3 章では、PBO による肝肥大における投与用量と活性化される核内受容体の関連性について

調べた。本章では 5,000 ppm（高容量）に加え、中用量（1,000 ppm）、低用量（200 ppm）の PBO 投与群を設定し、1 週間の混餌投与を行い、CAR、PXR、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)、及び AhR の各核内受容体の標的である Cyp2b、Cyp3a、Cyp4a、及び Cyp1a の発現を mRNA 及びタンパクレベルで解析した。その結果、高用量と異なり中用量では野生型マウスのみで肝肥大、Cyp2b10 mRNA 発現レベルの増加、及び抗 Cyp2b 抗体に対する小葉中心性の陽性反応増強がみられたことから、中用量での肝肥大には CAR のみが寄与していることが明らかとなった。本章の実験結果から、PBO による酵素誘導及び肝肥大では、投与量により関与する核内受容体が異なることが示された。

以上の研究結果から、DBDE による発がんについては CAR 以外の経路が示唆され、PB とは異なるタイプの肝発がんプロモーション作用を有すると考えられ、MOA 分析によって「ヒトへの外挿性なし」との判断はできないと結論した。しかし、DBDE は好塩基性の腫瘍がもともと少ない雌マウスでは腫瘍を誘発しなかったこと、及び本研究での DBDE は 50,000 ppm と非常に高濃度であり、また DBDE の生体吸収性は非常に低いと言われていることから、実際のリスク管理においては、げっ歯類で誘発される腫瘍のタイプに応じた発生メカニズム考察や、ヒトでの暴露量も含めた考察が必要になるであろう。

PBO については、CAR 活性化、好酸性の変異肝細胞巣／腺腫の誘発などの PB タイプの MOA の key events を満たしていた。一方、PBO は CARKO マウスでも僅かながらに増殖性病変を増加させ、肝肥大には PXR といった他の核内受容体の関与も示されたことから、CAR 以外の経路も弱いながら肝発がん促進に寄与する可能性が示唆された。しかしながら、MOA 分析結果のヒトへの外挿性については、key events の確認に加えてヒトと実験動物間での暴露量や代謝機能の違いを考慮に入れる必要があり、第 3 章では 1,000 ppm の PBO による肝肥大には、CAR のみが関与していることを明

らかにした。よって、1,000 ppm では増殖性病変の発生も完全に CAR に依存していることが推察され、その場合は「ヒトへの外挿性なし」と判断できる可能性が高いと考えた。

化学物質のげっ歯類での肝発がん性について、ヒトへの外挿性を検討するために用いられる MOA 分析は、化学物質を適切に管理しながら使用していくために非常に有用なツールである。しかし、通常実施されている野生型マウスやラットを用いた毒性試験では、CAR に依存した肝肥大や肝発がんによって他の経路を介した作用がマスクされてしまう可能性があり、潜在的なリスクを見逃す恐れがある。本研究では、げっ歯類で Cyp2b を誘導する非遺伝毒性の化学物質である PBO 及び DBDE について、CARKO マウスを効果的に用いることで、肝肥大／肝発がんにおける CAR 及びその他の核内受容体の関与を明らかにし、げっ歯類での発がん性のヒトへの外挿性判断を行った。また、本研究で用いた化合物に限らず、Cyp2b 誘導化合物の発がん性について CARKO マウスを用いた実験手法を MOA 分析と組み合わせることで、より正確で信頼性の高い評価を行うことができると結論した。

Abstract

There are many kinds of chemicals, which are naturally derived or artificially synthesized, in the atmosphere of modern life of humans. We are exposed to them by oral route as additives or residues in food or water, by respiration, or by cutaneous contact. To assess the effects of these chemicals to humans, a lot of experimental procedures have been undertaken. One of them is toxicity study with laboratory animals, usually with rodents such as rats and mice, and they provide useful information to speculate hazardous properties of the chemicals to humans. On the other hand, we have to consider the relevance of the toxic information obtained from animal studies to human reactions based on the mechanism of action, since each animal species have different physiological and metabological function. Especially in a case that carcinogenic potential was found in laboratory animals, the extrapolation to the humans would be the most important point in its risk assessment.

One of the cases that species difference of carcinogenicity between rodents and humans has been clearly defined is phenobarbital (hereafter PB). PB is known to induce liver hypertrophy and liver tumor in rodents. In humans, it has been widely used as antiepileptic drug; however, comprehensive epidemiological researches revealed that hepatocarcinogenic property of PB in rodents is not relevant to humans. After late 1990's, extensive researches using gene engineering have gradually revealed the mechanism of this species difference. PB induces liver hypertrophy accompanied by the induction of certain drug metabolic enzymes such as various cytochrome P450s (particularly Cyp2b), stimulation of cell proliferation activity, and inhibition of

apoptosis, then long-term treatment with PB promotes liver tumorigenesis in rodents. However, in the mice lacking the gene of the constitutive androstane receptor (CAR, NR1I3), the nuclear receptor related to detoxification and metabolism of xenobiotics, PB does not induce Cyp2b, liver hypertrophy, or liver tumor; clearly indicating that CAR is essential for PB-inducible liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis in mice. On the contrary, it was reported that the mice which express human CAR in their hepatocytes shows liver hypertrophy but no hepatocellular proliferation, suggesting that CAR is involved in the difference of susceptibility in the hepatocarcinogenic potential of PB between rodent and human.

These researches for the species difference in the PB-inducible liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis developed into a concept of the Mode of Action (MOA) analysis, which is used to assess the extrapolation of chemically induced hepatocarcinogenesis. In the MOA analysis, if rodents given a chemical show some key events like CAR activation, liver hypertrophy, hepatocellular proliferation, and so on, the hepatocarcinogenic potential of the chemical is considered “not human relevant.” However, there are various compounds that induce Cyp2b, and the mechanism of CAR activation by those chemical substances, the induction pathway of drug-metabolizing enzymes downstream thereof, or the process leading to cell proliferation has not been fully elucidated. Under such circumstances, there is a great concern that risk assessment of liver carcinogenicity will be conducted according to a uniform standard.

Therefore, in this research, the involvement of CAR in liver hypertrophy and liver tumor induction were examined for piperonyl butoxide (PBO) and decabromodiphenyl ether (DBDE), which are known to induce Cyp2b and cause liver hypertrophy and tumor in rodents, and examined the extrapolation of their hepatocarcinogenic property to humans. In the experiments, wild-type and CAR knock-out (CARKO) mice

were given PBO and DBDE in the diet and examined liver weight, histopathological examination, hepatocyte proliferative activity, and expression levels of hepatic drug-metabolizing enzymes, then the extrapolation of the hepatocarcinogenic property of PBO and DBDE to humans were discussed by MOA analysis. In addition, involvement of nuclear receptors other than CAR was investigated in the experiments in order to discuss the validity of the MOA analysis.

In the Chapter 1, male wild-type and CAR^{KO} mice were given PBO and DBDE in the diet for 1 week, 4 weeks, or 27 weeks (after a single intraperitoneal administration of diethyl nitrosamine (DEN), which is a liver tumor initiator), and the involvement of CAR in liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis was investigated. As a result, strong induction of Cyp2b, which indicates CAR activation, was observed in wild-type mice at 5000 ppm of PBO, but increase in liver weights and hepatocellular hypertrophy were observed in both wild-type and CAR^{KO} mice. Since PBO induced Cyp3a regardless of genotype, it was supposed that not only CAR but the pregnane X receptor (PXR, NR1I2) are involved in the liver hypertrophy caused by PBO. Hepatocellular proliferative activity was increased in PBO and PB groups in wild-type mice and in PBO group in CAR^{KO} mice. Regarding hepatocarcinogenesis, PBO induced eosinophilic proliferative lesions in wild-type mice as in PB, and those were considerably suppressed in CAR^{KO} mice, hence hepatocarcinogenesis by PBO is mainly dependent on CAR. In CAR^{KO} mice, however, PBO has a higher incidence of proliferative lesions than those in the negative control group, thus oxidative stress or the change in metabolic status in the liver via PXR may also contribute to tumorigenesis in addition to CAR. In DBDE treatment at 50000 ppm in the diet, induction of Cyp2b and liver hypertrophy were observed only in wild-type mice, and it was revealed that liver hypertrophy by DBDE is dependent on CAR. On the other hand, DBDE

increased the number of basophilic proliferative lesions in both wild-type and CARKO mice, suggested that DBDE promotes liver carcinogenesis by a route independent on CAR. Since DBDE increased the mRNA expression levels of Cyp1a1, 1a2, and 1b1, the aryl hydrocarbon receptor (AhR) may be involved in the liver tumor promoting effect by DBDE.

In the Chapter 2, sex difference in the relationship between liver hypertrophy/tumor induction and CAR activation was examined, since incidences of liver tumor in mice are generally different by sex and some chemicals were reported to have different effect on CAR activation between males and females. Female wild-type and CARKO mice were treated with PBO and DBDE for 4 weeks, or 27 weeks after single administration of DEN, then various examinations such as histopathology and mRNA expression levels were carried out in accordance with the Chapter 1. In consequence, there was no sex difference in liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis induced by PBO. That is, PXR was suspected to be involved in liver hypertrophy in addition to CAR, while eosinophilic proliferative lesions were induced depending on CAR in female mice as well as in males. As for DBDE, liver hypertrophy in males was dependent on CAR, whereas in females a route other than CAR could contribute to liver hypertrophy. In addition, there was a sex difference in the promoting effect of basophilic proliferative lesions which were CAR-independently induced by DBDE in male mice but not obviously induced in female mice. The sex difference in susceptibility of basophilic proliferative lesions by DBDE is probably related to sex hormones considering the report which says that the induction of basophilic tumors by DEN initiation is altered by sex hormones.

In Chapter 3, the relationship between dose levels of PBO and the involvement of nuclear receptors including CAR and others. In this experiment, in addition to 5000 ppm, male mice were treated with 1000 and

200 ppm of PBO in the diet for 1 week, and investigate the activation of CAR, PXR, PPAR and AhR by examine the target phase I liver metabolizing enzymes of each nuclear receptors, Cyp2b, Cyp3a, Cyp4a, and Cyp1a, respectively, in mRNA and protein levels. As a result, 5000 ppm of PBO induced liver hypertrophy regardless of CAR and the involvement of PXR was indicated by Cyp3a induction. On the contrary, 1000 ppm of PBO exhibited liver hypertrophy and Cyp2b induction only in wild-type mice; indicated that only CAR contributes at 1000 ppm of PBO. The result of this experiment revealed that the involvement of nuclear receptors alters by the dose levels of PBO.

Based on the results from the experiments in the Chapter 1 to 3, liver tumor induction by DBDE has a pathway other than CAR and DBDE has a different mechanism of liver tumor promotion when compared to PB. Therefore, according to the MOA analysis, it cannot be said “not human relevant.” DBDE, however, did not induce basophilic-type tumors in female mice, thus more detailed discussion depending on the type of tumor induced in rodents will be needed for the risk management of DBDE. Also, considering that the dose level of DBDE in this research was extremely high at 50000 ppm, and that it was reported that the orally administrated DBDE has very low absorbance to the body, it will be very important to discuss the exposure levels to humans in the risk management of the chemical.

Meanwhile, the effects of PBO coincide with the key events in PB-type MOA such as Cyp2b induction, increase in hepatocellular proliferative activity, and induction of eosinophilic altered foci/adenomas. However, PBO slightly increased liver proliferative lesions even in CARKO mice and the involvement of PXR was suspected in the liver hypertrophy, suggesting the possibility that other pathways other than CAR contribute to the promotion of hepatocarcinogenesis. In the MOA analysis, it is necessary to take into consideration the key

events as well as the differences on exposures or metabolic function between laboratory animals and humans. The experiment in Chapter 3 revealed that only CAR is responsible for the liver hypertrophy induced by low dose of PBO. Hepatocarcinogenic property of PBO at low dose has not been investigated in this research, but it is supposed that the occurrence of liver tumors is also dependent on CAR at low dose, and in that case, it could be judged as “not human relevant”.

The MOA analysis used to examine the extrapolation to humans for chemical hepatocarcinogenicity in rodents is a helpful tool for appropriate risk management of chemicals which can enrich our life. However, with traditional toxicity studies using wild-type mice or rats, there is a possibility that strong effect of CAR on the liver hypertrophy and tumor induction may cover the involvement of other pathway and that may make us misunderstand the potential risk of the chemical. In the present research, the effective use of CAR KO mice shed light on the involvement of CAR and other nuclear receptors in liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis. From the above, by combining experiments with CAR KO mice and the MOA analysis, it is possible to conduct more accurate and highly reliable evaluation for hepatocarcinogenic property of Cyp2b-inducible chemicals.