

ラットにおけるコリン欠乏アミノ酸食による  
肝発癌に対する phenyl *N-tert*-butyl nitronne  
およびその誘導体のおよぼす影響

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

榎 並 倫 宣

EFFECTS OF PHENYL *N-tert*-BUTYL NITRONE AND ITS DERIVATIVES  
ON HEPATOCARCINOGENESIS IN RATS FED A CHOLINE-DEFICIENT,  
L-AMINO ACID-DEFINED DIET

TOMONORI ENAMI

*Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University*

Received October 13, 2000

*Abstract* : The present study examined effects of phenyl *N-tert*-butyl nitronne (PBN) and its derivatives on the early phase of hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined (CDAA) diet. Male Wistar rats, 6 weeks old, were fed the CDAA diet for 16 weeks without or with PBN or its derivatives admixed into the diet at concentrations of 0.009, 0.045 or 0.090%, and then sacrificed. The livers were assessed for the induction of glutathione *S*-transferase placental form (GST-P)-positive lesions and apoptosis, proliferation and oxidative injuries in hepatocytes. The numbers of GST-P-positive lesions were decreased only by the high dose of PBN. In contrast, the lesion sizes were decreased by all of the doses of 4-OHPBN and the high doses of PBN and 3-OHPBN. PBN, 4-OHPBN and 3-OHPBN inhibited the induction of the borderline cirrhosis, enhanced hepatocellular apoptosis in GST-P-positive lesions, inhibited apoptosis in surrounding tissue, and reduced the induction of oxidative damage on nuclear DNA and extranuclear components of hepatocytes. In addition, 4-OHPBN inhibited proliferating activity of hepatocytes both in GST-P-positive lesions and in surrounding tissue. Neither 2-OHPBN nor 2-SPBN exerted any of the effects described above.

These results indicate that PBN, 4-OHPBN and 3-OHPBN inhibit the growth of putative preneoplastic lesions induced in the livers of rats fed the CDAA diet by reducing oxidative stress and liver injury. Among these, 4-OHPBN, a major metabolite of PBN, can exert the most superior effects because of the additional inhibition of hepatocyte proliferation. In conclusion, PBN inhibits endogenous hepatocarcinogenesis in rats fed the CDAA diet depending on its metabolic activation into 4-OHPBN, through antioxidative effects and possibly by regulating the oxidative stress-related signal transduction.

(*奈医誌*. J. Nara Med. Ass. 51, 468~482, 2000)

**Key words** : choline-deficient L-amino acid-defined diet, phenyl *N-tert*-butyl nitronne derivative, apoptosis, oxidative stress, hepatocarcinogenesis

## 緒 言

癌は、日本人の死因の第1位を占め<sup>1-2)</sup>、その診断技術と有効な治療方法の開発が必要とされていると共に、発生と進展の予防に関する方法の開発が重要な研究課題となっている。癌の制御には、質的に異なる発癌の多段階の機構を解明し、それらの機構に基く各段階での抑制または進展を阻止せしめる戦略の確立が必要である<sup>3-4)</sup>。化学予防は、癌の発生と進展を阻止し得る天然あるいは人工の化学物質を動物実験系を用いて検出し、その発癌抑制機構を解明し、ヒトへ外挿せんとするものである<sup>3-4)</sup>。

Phenyl *N*-*tert*-butyl nitron (PBN) は、その優れたラジカル捕捉作用のゆえにスピントラップ法によるフリーラジカル検出に使用されるニトロソ類のひとつである<sup>5)</sup>。PBN は、種々の動物実験系において、エンドトキシンショック<sup>6)</sup>、外傷性ショック<sup>7)</sup>、細菌性髄膜炎<sup>8)</sup>、脳<sup>9-10)</sup> および心<sup>11-12)</sup> における虚血再還流傷害、化学物質による神経変性疾患<sup>13-14)</sup>、奇形<sup>15-16)</sup>、糖尿病<sup>17-18)</sup> などの誘発や老化<sup>19-20)</sup> に対して抑制的な効果を示すものと報告されている。これらの効果は、PBN による抗酸化作用のみならず、NO 生成に対する阻害作用とシグナル伝達異常に対する抑制作用も関与している<sup>5)</sup>。活性酸素と活性窒素による諸反応や誘導型シクロオキシゲナーゼ(COX 2) を含む種々のシグナル伝達因子の異常は、癌の発生と進展の機構において、重要な役割を果していることが明らかとなりつつある<sup>21-32)</sup>。PBN は、これらの変化をいずれも抑制する<sup>5)</sup> ことより、癌に対する化学予防効果を示し得る物質と期待される。しかしながら、PBN の発癌に対する影響については、Nakae<sup>33)</sup> らによりコリン欠乏アミノ酸(CDAA)食によるラット肝発癌系において、前癌病変の発生と成長を抑制せしめることが報告されたのみである。PBN による肝発癌に対する抑制効果の機構は、酸化性 DNA 傷害の生成抑制と COX 2 活性の阻害の関与するものと示唆されている<sup>33)</sup> が、その詳細について、不明の点が多い。

ラットにおける CDAA 食による肝発癌系は、発癌物質を投与することなく、脂肪肝、肝細胞の死と増殖、肝硬変に至る線維増生を背景として、前癌病変の発生と成長・進展により、肝細胞癌を高率に誘発せしめる<sup>34)</sup>。したがって、本系は、ヒトの C 型肝炎ウイルス感染に起因する肝細胞癌の発生過程<sup>35)</sup> に類似する組織学的変化を母地として、内因性の機構により肝発癌を進展させる特徴を有している。さらに、本系における肝発癌の機構には、酸化的ストレスおよびシグナル伝達異常が相互に関連しつつ関与することが判明している<sup>34)</sup>。以上の観点より、本

系は、PBN の如き酸化性ストレスとシグナル伝達異常を抑制する化学物質による発癌に対する化学予防の可能性とその機構を検索する研究に有用である。

本研究は、PBN の肝発癌に対する化学予防効果の機構を詳細に解明する目的で、CDAA 食によるラット肝発癌に対して PBN とその誘導体の及ぼす影響を検索した。

## 材料および方法

### 1. 動物

動物は、Wistar 系雄性ラット(日本チャールス・リバー株式会社、神奈川県厚木市)110 匹を 5 週齢にて購入し、1 週間の馴化の後、6 週齢にて実験に用いた。ラットは、ステンレス製金網ケージに個別に収容し、温度 23 ± 3 °C、相対湿度 55 ± 5 %、換気回数 10~15 回/時間、12 時間明暗サイクルの条件下にて、飼料および水道水を自由に与えて飼育した。

### 2. 飼料および化学物質

飼料は、CDAA 食および対照のコリン添加アミノ酸(CSAA)食を Dyets Inc. (Bethlehem, PA, USA) より購入した。CDAA 食と CSAA 食の組成は既報<sup>34,36-37)</sup> の如くで、これらの飼料は到着直後より 4°C にて保存した。化学物質(Fig. 1)は、PBN とその水酸化誘導体である 4-hydroxyphenyl *N*-*tert*-butyl nitron (4-OHPBN)、3-hydroxyphenyl *N*-*tert*-butyl nitron (3-OHPBN) および 2-hydroxyphenyl *N*-*tert*-butyl nitron (2-OHPBN) を Robert A. Floyd・古武弥茂両博士(Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, OK, USA) より御供給いただいた。さらに、2-sulfoxyphenyl *N*-*tert*-butyl nitron (2-SPBN) を Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, USA) より購入した。

### 3. 実験プロトコール

実験は、1 群 5 匹の 22 群にて行った。第 1 群は CDAA 食単独投与群とし、第 2-4 群は CDAA 食に PBN をそれぞれ 0.009(低用量)・0.045(中用量)・0.090(高用量)% の濃度で飼料に混じて投与した群とした。第 5-7・8-10・11-13・14-16 群は、CDAA 食にそれぞれ 4-OHPBN・3-OHPBN・2-OHPBN・2-SPBN を PBN と同様の用量にて混じて投与した群とした。第 17 群は CSAA 食単独投与群とし、第 18-22 群は CSAA 食に PBN・4-OHPBN・3-OHPBN・2-OHPBN・2-SPBN をそれぞれ高用量にて混じて投与した群とした。PBN とその誘導体の用量は、Nakae らの報告<sup>33)</sup> を基に設定したが、PBN の水酸

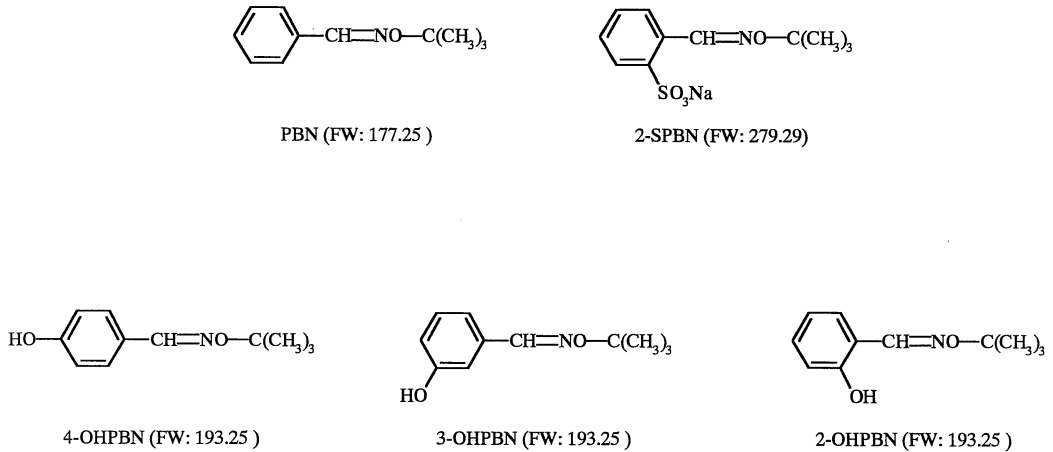


Fig. 1. Chemical structures and molecular weights of PBN derivatives used in the present study.

化誘導体の水に対する低溶解度ゆえに、混餌投与を選択した。全動物は、実験開始後 16 週にてエーテル麻酔下に放血屠殺し、肝を摘出した。肝は、重量測定後、左右外側葉および内側葉より幅 5 mm の切片を切り出して 10 %中性緩衝ホルマリン固定・パラフィン包埋し、残部を液体窒素で急速凍結後  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。体重、摂水量および摂餌量は、週 1 回の頻度で測定し、PBN およびその誘導体の摂取量を算出した。

#### 4. 組織学的および免疫組織化学的検索

組織学的および免疫組織化学的検索は、ホルマリン固定・パラフィン包埋した肝より作製した厚さ  $3\ \mu\text{m}$  の連続切片 5 枚を用いて行った。組織学的検索は、常法にしたがってヘマトキシリン・エオシン (H & E) およびマッソン・トリクローム染色を施し、光顕的に観察した。さらに、肝における線維化の程度は、マッソン・トリクローム染色標本にて青色を呈する線維成分の切片全体に対する面積占有率を IPAP 画像解析システム(住化テクノス株式会社, 大阪府大阪市)を用いて算出し、定量的に検索した。肝における前癌病変の発生は、ウサギ抗ラット胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST-P) ポリクローナル抗体 (Medical and Biological Laboratories, 愛知県名古屋) と Vectastain *Elite* ABC kit (rabbit IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いたアビジン・ビオチン・コンプレックス法に

て免疫組織化学的に検索した<sup>38)</sup>。GST-P 陽性病変の個数および大きさは、IPAP 画像解析システムを用いて定量的に解析した。一方、GST-P 陽性病変とその周囲肝組織におけるアポトーシス細胞の発生は、第 1・4・7・10・13・16・17 群のみについて検索した。検索は、ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Intergen Company, Purchase, NY, USA)<sup>39)</sup> と抗 GST-P 抗体および ENVISION/AP Kit (DAKO A/S, Copenhagen, Denmark) を用いて、ペンタナ NX 免疫染色システム (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) による二重染色を行い、GST-P 陽性病変内部と周囲組織のそれぞれについて、肝細胞 5000 個 (ただし、GST-P 陽性病変内では 1000-5000 個) 中の ApopTag 陽性細胞の出現百分率を、アポトーシス指数として算出した。また、GST-P 陽性病変とその周囲組織における肝細胞の増殖活性は、第 1・4・7・10・13・16・17 群のみについて検索した。検索は proliferating cell nuclear antigen 標識 EPOS キット (DAKO)<sup>40-41)</sup> を用いて、アポトーシス検索と同様の染色・計測方法にて、PCNA 標識の出現百分率を、増殖指数として算出した。

#### 5. 生化学的検索

生化学的検索は、超低温保存肝標本を用いて行った。肝細胞の核 DNA における酸化性傷害の生成は、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) の量を指標として、

既報の方法<sup>42)</sup>を用いて検索した。肝細胞の核外成分の酸化性傷害の生成は、第1・4・7・10・13・16・17群のみについて、チオバルビツール酸反応物質(TBARS)の量を指標に、既報の方法<sup>43)</sup>を用いて検索した。

6. 統計

上記の各検索により得られた結果は、InStat (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)ソフトウェアによりパーソナルコンピュータを用いて統計学的に解析した。多群間の解析は、one-way ANOVAの後、Dunnettの多群検定により行った。特定の2群間の解析は、正規分布時にStudentのt-test、非正規分布時にwelchのt-testを用いて行った。統計学的解析の結果は、P値が0.05未満である場合に、有意と判定した。

結 果

1) 実験の詳細

全動物は、実験期間を通じて生存した。最終体重、肝相対重量および摂餌量は、CDAA食単独投与群と

CSAA食単独投与群の間に差を認めず、PBNおよびその誘導体の併用投与による影響も認めなかった(Table 1)。体重と摂餌量から算出したPBNおよびその誘導体の摂取量は、物質による差はなく、低用量投与群で5.49-5.74、中用量投与群で27.59-28.87、高用量投与群で56.06-58.50 mg/kg/dayであり、いずれも投与用量に応じて増加した(Table 1)。

2) CDAA食による肝障害に対するPBNおよびその誘導体の及ぼす影響

CDAA食単独投与群の肝は、脂肪肝と境界型肝硬変の像を呈した(Fig. 2A)。肝実質においては、濃縮核を有し、胞体の縮小による周囲よりの隔絶を示すアポトーシスの組織学的特徴を示す肝細胞死と、肝細胞の核分裂像を散見した。PBNおよびその誘導体は、いずれもCDAA食と併用投与しても脂肪肝に対して影響を与えなかったが、PBN・4-OHPBN (Fig. 2B)・3-OHPBNの併用投与は、CDAA食による線維増生を用量に依存して抑制する傾向を示した。2-OHPBNと2-SPBNの併用投与は、CDAA食による線維増生に対して影響を与えなかった。

Table 1. Details of experiment

| Group | Treatment(s)         | Effective number of rats | Final body weight (g) | Relative liver weight (g/100g body weight) | Average food intake (g/kg body weight/day) | Average exposure to PBN derivatives (mg/kg body weight/day) |
|-------|----------------------|--------------------------|-----------------------|--|--|---|
| 1     | CDAA                 | 5                        | 530±52 <sup>1)</sup>  | 3.81±0.41                                  | 63±2                                       | 0   |
| 2     | CDAA+PBN, low        | 5                        | 506±61                | 3.47±0.29                                  | 64±3                                       | 5.74±0.27   |
| 3     | CDAA+PBN, middle     | 5                        | 511±24                | 4.17±0.47                                  | 62±2                                       | 27.90±1.03  |
| 4     | CDAA+PBN, high       | 5                        | 506±45                | 3.99±0.54                                  | 62±2                                       | 56.08±2.09  |
| 5     | CDAA+4-OHPBN, low    | 5                        | 497±45                | 4.10±0.47                                  | 64±3                                       | 5.76±0.31   |
| 6     | CDAA+4-OHPBN, middle | 5                        | 505±24                | 4.05±0.56                                  | 62±2                                       | 27.74±0.75  |
| 7     | CDAA+4-OHPBN, high   | 5                        | 509±11                | 3.91±0.52                                  | 65±2                                       | 58.50±1.89  |
| 8     | CDAA+3-OHPBN, low    | 5                        | 517±34                | 4.55±0.59                                  | 64±1                                       | 5.76±0.13   |
| 9     | CDAA+3-OHPBN, middle | 5                        | 504±29                | 3.89±0.49                                  | 63±4                                       | 28.33±1.74  |
| 10    | CDAA+3-OHPBN, high   | 5                        | 520±13                | 3.61±0.67                                  | 63±2                                       | 56.49±1.67  |
| 11    | CDAA+2-OHPBN, low    | 5                        | 564±57                | 3.53±0.35                                  | 62±3                                       | 5.62±0.28   |
| 12    | CDAA+2-OHPBN, middle | 5                        | 527±38                | 3.97±0.32                                  | 64±4                                       | 28.87±1.73  |
| 13    | CDAA+2-OHPBN, high   | 5                        | 524±70                | 4.12±0.43                                  | 62±3                                       | 56.06±2.30  |
| 14    | CDAA+2-SPBN, low     | 5                        | 522±23                | 3.55±0.78                                  | 61±2                                       | 5.49±0.17   |
| 15    | CDAA+2-SPBN, middle  | 5                        | 533±10                | 4.00±0.38                                  | 61±1                                       | 27.59±0.47  |
| 16    | CDAA+2-SPBN, high    | 5                        | 513±40                | 3.92±0.46                                  | 63±2                                       | 56.43±1.82  |
| 17    | CSAA                 | 5                        | 499±59                | 2.67±0.46 <sup>2)</sup>                    | 60±2                                       | 0   |
| 18    | CSAA+PBN, high       | 5                        | 511±36                | 3.05±0.28                                  | 61±3                                       | 57.61±1.30  |
| 19    | CSAA+4-OHPBN, high   | 5                        | 512±33                | 2.56±0.19                                  | 62±1                                       | 56.42±2.48  |
| 20    | CSAA+3-OHPBN, high   | 5                        | 502±25                | 2.59±0.27                                  | 60±2                                       | 57.75±3.46  |
| 21    | CSAA+2-OHPBN, high   | 5                        | 488±41                | 2.64±0.31                                  | 63±1                                       | 56.22±2.82  |
| 22    | CSAA+2-SPBN, high    | 5                        | 491±36                | 2.68±0.39                                  | 61±3                                       | 56.66±3.49  |

<sup>1)</sup> The values are the means±standard deviations.

<sup>2)</sup> Significantly different from the group 1 value.

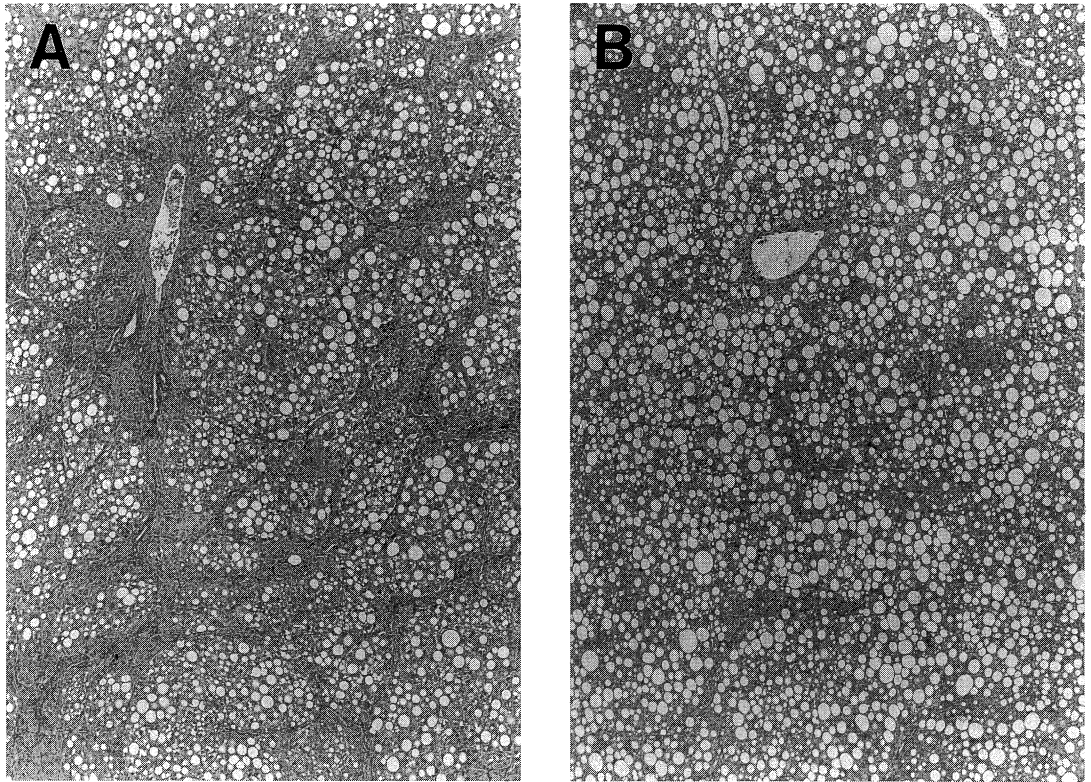


Fig. 2. Representative liver histology : A, group 1 (CDAA) ; B, group 7 (CDAA+4-OHPBN, high) : H&E stain,  $\times 10$ .

CDAA 食による線維増生の強度と、これに対して PBN およびその誘導体の併用投与の示す効果を定量的に解析すると、CDAA 食単独投与群の線維占有率は、CSAA 食単独投与群のその 2 倍強まで有意に増加した (Table 2)。一方、PBN・4-OHPBN・3-OHPBN の高用量併用投与群の線維占有率は、CDAA 食単独投与群の値の 51-58% まで有意に減少したが、その効果の強度に物質による差を認めなかった (Table 2)。2-OHPBN と 2-SPBN の高用量併用投与は、CDAA 食による線維占有率増加に影響しなかった (Table 2)。CSAA 食の単独投与または PBN およびその誘導体との併用投与は、特記すべき肝の組織学的変化を誘発しなかった。

3) CDAA 食による GST-P 陽性病変に対する PBN およびその誘導体の及ぼす影響

GST-P 陽性病変の定量的解析結果は、Table 2 に示す。同病変は、CDAA 食を与えた第 1-16 群の全てに発生

したが、CSAA 食を投与した第 17-22 群には発生しなかった。PBN およびその誘導体の併用投与は、CDAA 食により誘発された GST-P 陽性病変の個数に対し、PBN の高用量併用投与群のみで CDAA 食単独投与群の値の 52% までの減少をを認めた以外、有意な影響を与えなかった。一方、同病変の大きさは、PBN と 3-OHPBN の高用量併用投与により、CDAA 食単独投与群の値のそれぞれ 19 と 9% まで有意に縮小した。これに対し、4-OHPBN の併用投与は、低用量群において既に上記 2 物質と同等に、CDAA 食単独投与群の値の 24% までの縮小がみられ、中 (19%) および高 (18%) 用量群にても縮小が維持された。2-OHPBN と 2-SPBN の併用投与は、有意な影響を与えなかった。

4) CDAA 食による肝細胞のアポトーシスと細胞増殖に対する PBN およびその誘導体の及ぼす影響

CDAA 食単独投与群の肝細胞におけるアポトーシス

Table 2. Fibrotic changes and numbers and sizes of GST-P-positive lesions in the livers

| Group | Treatment(s)         | Effective number of rats | Fibrotic changes (% area occupied by collagen fiber) | GST-P-positive lesions     |                           |
|-------|----------------------|--------------------------|--|----------------------------|---------------------------|
|       |                      |                          |  | Numbers(/cm <sup>3</sup> ) | Sizes(mm <sup>3</sup> )   |
| 1     | CDAA                 | 5                        | 0.788±0.290  | 11.54±9.25 <sup>1)</sup>   | 0.140±0.111               |
| 2     | CDAA+PBN, low        | 5                        | n.a. <sup>3)</sup>                                   | 6.45±2.79                  | 0.057±0.036               |
| 3     | CDAA+PBN, middle     | 5                        | n.a.   | 6.20±2.11                  | 0.106±0.064               |
| 4     | CDAA+PBN, high       | 5                        | 0.402±0.019 <sup>2)</sup>                            | 6.04±2.63 <sup>2)</sup>    | 0.027±0.021 <sup>2)</sup> |
| 5     | CDAA+4-OHPBN, low    | 5                        | n.a.   | 13.58±5.19                 | 0.033±0.034 <sup>2)</sup> |
| 6     | CDAA+4-OHPBN, middle | 5                        | n.a.   | 11.98±0.99                 | 0.027±0.011 <sup>2)</sup> |
| 7     | CDAA+4-OHPBN, high   | 5                        | 0.485±0.078 <sup>2)</sup>                            | 9.91±7.57                  | 0.025±0.010 <sup>2)</sup> |
| 8     | CDAA+3-OHPBN, low    | 5                        | n.a.   | 8.90±4.01                  | 0.165±0.176               |
| 9     | CDAA+3-OHPBN, middle | 5                        | n.a.   | 7.84±2.81                  | 0.067±0.036               |
| 10    | CDAA+3-OHPBN, high   | 5                        | 0.458±0.112 <sup>2)</sup>                            | 9.39±4.60                  | 0.013±0.007 <sup>2)</sup> |
| 11    | CDAA+2-OHPBN, low    | 5                        | n.a.   | 8.62±3.76                  | 0.068±0.036               |
| 12    | CDAA+2-OHPBN, middle | 5                        | n.a.   | 11.52±3.63                 | 0.144±0.147               |
| 13    | CDAA+2-OHPBN, high   | 5                        | 0.622±0.257  | 7.62±2.95                  | 0.034±0.013               |
| 14    | CDAA+2-SPBN, low     | 5                        | n.a.   | 11.46±5.72                 | 0.064±0.094               |
| 15    | CDAA+2-SPBN, middle  | 5                        | n.a.   | 9.38±1.61                  | 0.187±0.131               |
| 16    | CDAA+2-SPBN, high    | 5                        | 0.551±0.156  | 7.62±2.88                  | 0.061±0.071               |
| 17    | CSAA                 | 5                        | 0.347±0.076 <sup>2)</sup>                            | 0 <sup>2)</sup>            | —                         |
| 18    | CSAA+PBN, high       | 5                        | n.a.   | 0                          | —                         |
| 19    | CSAA+4-OHPBN, high   | 5                        | n.a.   | 0                          | —                         |
| 20    | CSAA+3-OHPBN, high   | 5                        | n.a.   | 0                          | —                         |
| 21    | CSAA+2-OHPBN, high   | 5                        | n.a.   | 0                          | —                         |
| 22    | CSAA+2-SPBN, high    | 5                        | n.a.   | 0                          | —                         |

<sup>1)</sup> The values are the means±standard deviations.

<sup>2)</sup> Significantly different from the group 1 value.

<sup>3)</sup> not assessed

指数は、CSAA 食単独投与群のその 30 倍に増加したが、GST-P 陽性病変内では周囲組織より半減していた (Table 3)。PBN・4-OHPBN・3-OHPBN は、高用量にて CDAA 食と併用投与すると、GST-P 陽性病変内の肝細胞アポトーシス指数を CDAA 食単独投与群のその 3-4 倍に増加せしめる一方、周囲組織においては 38-40% に減少せしめた (Table 3)。その結果、これらの群では、CDAA 食単独投与群とは逆に、前癌病変内のアポトーシス指数が周囲組織の 3-5 倍に達する高値を示した (Table 3)。これらの効果の強度は、物質間で差がなかった。2-OHPBN と 2-SPBN は、CDAA 食と併用投与しても、アポトーシス指数に有意な影響を与えなかった (Table 3)。一方、CDAA 食単独投与群の肝細胞増殖指数は、CSAA 食単独投与群のその 6 倍に増加し、GST-P 陽性病変内では周囲組織の 2 倍に達していた (Table 3)。4-OHPBN は、高用量にて CDAA 食と併用投与すると、GST-P 陽性病変内の肝細胞増殖指数を CDAA 食単独投与群の値の 31% に減少せしめるのみならず、周囲組織においても 49% に減少せしめた (Table 3)。その結果、

この群の GST-P 陽性病変内における肝細胞増殖指数は、周囲組織に比し、なお高値ながらほぼ同程度となった (Table 3)。PBN およびその他の誘導体は、CDAA 食と併用投与しても、肝細胞増殖指数に有意な影響を与えなかった (Table 3)。

5) CDAA 食による酸化性肝細胞傷害に対する PBN およびその誘導体の及ぼす影響

CDAA 食の単独投与は、肝細胞の核 DNA における 8-OHdG 量を、CSAA 食単独投与群の値の 4 倍に増加せしめた (Table 3)。PBN・4-OHPBN・3-OHPBN は、CDAA 食と併用投与すると、いずれの用量においても 8-OHdG 量を CDAA 食単独投与群の値の 15-29% に減少せしめた (Table 3)。この効果は、用量依存性を示さず、物質間で程度に差はなかった。2-OHPBN は CDAA 食と併用投与しても 8-OHdG 量に影響せず、2-SPBN は高用量のみにて軽度の 8-OHdG 量の減少作用を示した (Table 3)。一方、CDAA 食の単独投与は、肝細胞における TBARS 量を、CSAA 食単独投与群の値の 34 倍に増加せしめた (Table 3)。PBN・4-OHPBN・3-OHPBN

Table 3. Apoptotic indices, proliferating cell nuclear antigen-labelling indices (PCNA-LI), 8-OHdG levels and TBARS levels in the livers

| Group | Treatment(s)        | Effective number of rats | Apoptotic indices(%)       |                         | PCNA-LI(%)                |                         | 8-OHdG levels (/10 <sup>6</sup> dGs) | TBARS levels (pmol MDA eq./mg protein) |
|-------|---------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|
|       |                     |                          | In the lesions             | In the surroundings     | In the lesions            | In the surroundings     |                                      |  |
| 1     | CDA                 | 5                        | 3.37±0.83 <sup>3)</sup>    | 6.70±0.43               | 6.36±0.59 <sup>3)</sup>   | 3.02±0.29               | 16.76±5.51 <sup>1)</sup>             | 448±139                                |
| 2     | CDA+PBN, low        | 5                        | n.a. <sup>4)</sup>         | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 2.94±0.58 <sup>2)</sup>              | n.a.                                   |
| 3     | CDA+PBN, middle     | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 2.59±0.30 <sup>2)</sup>              | n.a.                                   |
| 4     | CDA+PBN, high       | 5                        | 12.75±1.31 <sup>3,4)</sup> | 2.39±0.24 <sup>2)</sup> | 6.18±0.35 <sup>3)</sup>   | 2.70±0.50               | 3.38±0.61 <sup>2)</sup>              | 235±132 <sup>2)</sup>                  |
| 5     | CDA+4-OHPBN, low    | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 3.79±1.59 <sup>2)</sup>              | n.a.                                   |
| 6     | CDA+4-OHPBN, middle | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 4.94±2.03 <sup>2)</sup>              | n.a.                                   |
| 7     | CDA+4-OHPBN, high   | 5                        | 9.07±1.03 <sup>3,4)</sup>  | 2.65±0.65 <sup>2)</sup> | 1.99±0.28 <sup>2,3)</sup> | 1.49±0.19 <sup>2)</sup> | 2.73±1.16 <sup>2)</sup>              | 204±66 <sup>2)</sup>                   |
| 8     | CDA+3-OHPBN, low    | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 3.60±1.20 <sup>2)</sup>              | n.a.                                   |
| 9     | CDA+3-OHPBN, middle | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 3.18±0.36 <sup>2)</sup>              | n.a.                                   |
| 10    | CDA+3-OHPBN, high   | 5                        | 10.98±1.28 <sup>3,4)</sup> | 2.52±0.53 <sup>2)</sup> | 5.88±0.34 <sup>3)</sup>   | 3.01±0.40               | 3.18±0.36 <sup>2)</sup>              | 281±55 <sup>2)</sup>                   |
| 11    | CDA+2-OHPBN, low    | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 14.80±3.74                           | n.a.                                   |
| 12    | CDA+2-OHPBN, middle | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 18.94±5.10                           | n.a.                                   |
| 13    | CDA+2-OHPBN, high   | 5                        | 3.48±0.51 <sup>3)</sup>    | 6.12±0.58               | 6.78±0.30 <sup>3)</sup>   | 2.94±0.49               | 14.46±2.80                           | 345±82                                 |
| 14    | CDA+2-SPBN, low     | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 16.78±3.61 <sup>2)</sup>             | n.a.                                   |
| 15    | CDA+2-SPBN, middle  | 5                        | n.a.                       | n.a.                    | n.a.                      | n.a.                    | 18.50±6.01                           | n.a.                                   |
| 16    | CDA+2-SPBN, high    | 5                        | 2.75±0.41 <sup>3)</sup>    | 6.36±0.33               | 6.20±0.14 <sup>3)</sup>   | 2.67±0.33               | 8.26±6.55 <sup>2)</sup>              | 424±117                                |
| 17    | CSA                 | 5                        | —                          | 0.22±0.02 <sup>2)</sup> | —                         | 0.52±0.16 <sup>2)</sup> | 3.85±1.52 <sup>2)</sup>              | 13±24 <sup>2)</sup>                    |
| 18    | CSA+PBN, high       | 5                        | —                          | n.a.                    | —                         | n.a.                    | 5.12±0.81                            | n.a.                                   |
| 19    | CSA+4-OHPBN, high   | 5                        | n.a.                       | —                       | n.a.                      | 3.32±1.07               | n.a.                                 | n.a.                                   |
| 20    | CSA+3-OHPBN, high   | 5                        | n.a.                       | —                       | n.a.                      | 2.55±1.59               | n.a.                                 | n.a.                                   |
| 21    | CSA+2-OHPBN, high   | 5                        | n.a.                       | —                       | n.a.                      | 3.44±0.53               | n.a.                                 | n.a.                                   |
| 22    | CSA+2-SPBN, high    | 5                        | n.a.                       | —                       | n.a.                      | 2.27±1.25               | n.a.                                 | n.a.                                   |

<sup>1)</sup> The values are the means±standard deviations.

<sup>2)</sup> Significantly different from the group 1 value.

<sup>3)</sup> Significantly different from the value in the surroundings.

<sup>4)</sup> not assessed

は、高用量で CDAA 食と併用投与した群において、TBARS 量を CDAA 食単独投与群の値の 46-63% に減少せしめた (Table 3). この効果の程度は、各物質間で差はなかった (Table 3). 2-OHPBN と 2-SPBN は、CDAA 食と併用しても TBARS 量に影響しなかった (Table 3).

## 考 察

以上の結果より、PBN とその水酸化誘導体である 4-OHPBN および 3-OHPBN は、ラットにおける CDAA 食による肝発癌に対して抑制効果を示すが、同じく PBN の誘導体である 2-OHPBN と 2-SPBN にその効果のないことが明らかとなった。さらに、発癌抑制効果を示した 3 種の物質の中で、4-OHPBN は、もっとも顕著な効果を示した。PBN の本発癌系に対する抑制効果は、Nakae らによる報告<sup>39)</sup> に示されたものより弱いものであったが、彼らが飲水中に混じて PBN を投与したのに対し、本研究では混餌投与にて実験を行っており、この投与経路の違いが PBN の効果の程度に差を反映されたものと考えられる。CDAA 食の投与により誘発された GST-P 陽性病変の個数は、PBN の高用量併用投与のみにて減少したが、4-OHPBN または 3-OHPBN の併用投与によって影響されなかった。一方、これら 3 種の物質の併用投与は、いずれも肝前癌病変の大きさを有意に縮小した。酵素偏倚を示す肝前癌病変の個数と大きさは、それぞれ前癌肝細胞成分の発生と成長の指標とされている<sup>44)</sup> ことより、4-OHPBN および 3-OHPBN は、PBN に関して既に Nakae らの報告<sup>39)</sup> にて示唆されている如く、本発癌系における肝前癌病変の発生に比し、その成長に対して、より強い抑制効果を示すものと考えられる。CDAA 食によるラット肝発癌系において、8-OHdG 量および TBARS 量の増加をそれぞれ指標とする肝細胞の核 DNA および核外成分の酸化性傷害は、それぞれ前癌肝細胞成分の発生と成長に関与し<sup>45-46)</sup>、さらに、肝細胞のアポトーシスによる死と増殖および線維増生として観察される組織学的肝障害も、前癌病変の成長に関与する<sup>34)</sup> もと報告されている。本研究においても、これらの肝細胞成分の酸化性傷害や組織学的肝障害は、肝発癌を抑制した PBN・4-OHPBN・3-OHPBN により抑制される一方、肝発癌に影響しなかった 2-OHPBN や 2-SPBN によって抑制されなかった。したがって、PBN・4-OHPBN・3-OHPBN の肝発癌に対する抑制効果は、肝における酸化性ストレスと細胞障害の抑制に基いて発揮されたものと示唆される。

アポトーシスは、発癌刺激に対する生体防御反応のひ

とつとして前癌性細胞成分を排除する役割を果し<sup>47-51)</sup>、前癌性細胞および癌細胞の生存と成長にあたっては、しばしばアポトーシスの促進と抑制に関するシグナル伝達系に異常が検出される<sup>52-56)</sup>。一方、アポトーシス関連シグナル伝達系は活性酸素をセカンドメッセンジャーのひとつとし、アポトーシスの消長は細胞および組織の酸化還元状態に強く影響される<sup>47,57-62)</sup>。CDAA 食によるラット肝発癌系においては、投与開始後 3 日の早期より、TBARS 量の増加を指標とする肝細胞核外成分の酸化性傷害の誘発と共にアポトーシスが誘発され、投与継続により増加するが、GST-P 陽性病変内においては、周辺組織に比べてアポトーシスの誘発が抑制されていることが報告されている<sup>34)</sup>。したがって、本発癌系において、酸化性ストレスの誘導によるアポトーシス関連シグナル伝達系の変動によって前癌性または非前癌性の変化を呈する肝細胞の排除が開始される一方、一部の癌性肝細胞は、このシグナル伝達系のさらなる変動により、CDAA 食投与の継続によって誘導の持続する酸化性ストレスに誘発されるアポトーシスに対する抵抗性を獲得し、自己保存能力の向上を背景として、前癌病変へと成長するものと考えられる。このことは、化学発癌物質による肝前癌病変の成長と進展の要因のひとつとされる前癌性肝細胞成分の化学物質の毒性に対する抵抗性の獲得<sup>63)</sup> と同様の現象が、CDAA 食による内因性の発癌機構においても誘発されることを示唆する。本研究において、PBN・4-OHPBN・3-OHPBN は、GST-P 陽性病変内のアポトーシス発生を著明に促進するのみならず、周囲肝組織のそれを抑制した。したがって、これらの物質は、前癌肝細胞成分と非前癌肝細胞成分に対して異なる作用を発揮し、前者の排除を促進すると共に、後者を保護して再生に備え、結果的に肝発癌を抑制したものと考えられる。PBN は、種々の *in vitro* および *in vivo* の実験系において、その抗酸化作用に基き、tumor necrosis factor- $\alpha$ ・interleukin-1 $\alpha$ ・interleukin-1 $\beta$ ・interferon- $\gamma$ ・*c-fos* など種々のシグナル伝達因子の mRNA または蛋白質の発現や<sup>64-66)</sup>、activator protein-1・nuclear factor (NF)- $\kappa$ B などのトランスクリプション因子の活性化を抑制<sup>66-67)</sup>すると共に、NF- $\kappa$ B の下流に位置する *caspase 3* や *fas-A* の遺伝子発現をも抑制するものと報告されている<sup>68)</sup>。これらの諸因子は、アポトーシス関連シグナル伝達系にも関与し<sup>47-51,57-62,69-72)</sup>、それらの一部は、CDAA 食投与により、ラット肝において発現または活性化される可能性が示されている<sup>34)</sup>。したがって、本研究の結果の内、少なくとも GST-P 陽性病変の周囲肝組織におけるアポトーシスの抑制は、PBN・4-OHPBN・3-OHPBN



によるそれらの諸因子の発現または活性化の抑制に基づいているものと考えられるが、前癌性細胞におけるアポトーシスの促進の機序については、今後の研究課題である。

細胞増殖制御機構の破綻は、癌の発生と進展における重要な要素のひとつである<sup>54,73-74</sup>。前癌性細胞および癌細胞は、しばしば細胞増殖制御に関連する諸因子に異常を生じ、自律性のある高度の増殖活性を示す<sup>54,73-74</sup>。一方、ラットにおける食餌性コリン欠乏は、肝に誘発される腫瘍性病変とその周囲組織において、酸化性ストレスの関与の下に、種々の増殖因子およびその受容体の変動をはじめとする多彩な増殖関連シグナル伝達系の修飾を誘導する<sup>62,75-79</sup>。CDA食は、活性酸素・活性窒素・NF- $\kappa$ B および種々のサイトカインの関与するシグナル伝達により誘導される<sup>6,80-84</sup> COX 2 を誘導し<sup>33</sup>、予備実験においては、早期より transforming growth factor- $\beta$  の mRNA 発現が増強されることも見出されつつある。本発癌系は、投与開始後 1 日において検出される肝細胞の核 DNA における 8-OHdG 量の増加<sup>34</sup> に引き続き、2 日以内に *c-myc* および *c-Ha-ras* の mRNA 発現の増強<sup>85</sup>、3 日以後には TBARS 量の増加と共に肝細胞の増殖が誘導される<sup>34</sup>。さらに、GST-P 陽性病変内における肝細胞増殖活性は、周囲肝組織におけるそれより高度である<sup>34</sup>。したがって、本発癌系においては、酸化性ストレスの関与の下に、細胞増殖関連遺伝子の発現異常と肝細胞死による再生性増殖刺激に基づいて、肝細胞の増殖が誘導されるものと考えられる。さらに、前癌性肝細胞成分の増殖活性は、細胞増殖制御機構の破綻により、再生性の刺激のみによる非前癌性肝細胞成分の増殖より高度であるものと推察される。Nakae らは、CDA食により誘導される COX 2 の活性が PBN により抑制されることを見出し、それが PBN による肝発癌の抑制に貢献していると報告している<sup>33</sup>。しかし、本研究において、彼らの報告に比べて PBN による肝発癌抑制効果が弱かったことも関連して、PBN は、3-OHPBN と共に、CDA食により誘導される肝細胞増殖に影響しなかった。これに対して、4-OHPBN は、GST-P 陽性病変内および周囲肝組織の双方において、肝細胞の増殖活性を減少せしめ、この効果は特に前癌病変内において著明であった。このことは、4-OHPBN の PBN および 3-OHPBN より優れた肝発癌効果を説明する要因のひとつたり得る。

PBN は、NADPH 生成系存在下にラット肝ミクロゾーム分画と反応させると、唯一の代謝物として 4-OHPBN を産生する<sup>86</sup>。また、PBN は、*in vivo* にてラットに投与しても、肝組織と胆汁・尿・血漿中に、遊離型または抱合型の 4-OHPBN を検出せしめる<sup>86</sup>。これら

の知見に基づき、4-OHPBN は、PBN の主たる代謝物として、その薬理作用の発揮に重要な役割を果たすものと考えられている<sup>5,86</sup>。本研究における 4-OHPBN の PBN より強い肝発癌抑制効果も、この観点から考えて妥当な結果である。本研究は、3 種の PBN 水酸化誘導体の水酸基の位置により肝発癌抑制効果の強度が異なり、特に 2-OHPBN にて有意な効果の得られないことを明らかにした。しかしながら、その理由は不明であり、今後の研究が必要である。これに対して、2-SPBN についての肝発癌抑制効果の欠如は、この誘導体が PBN やその水酸化誘導体より強い水親和性を示す<sup>5</sup> ことより説明できるであろう。2-SPBN のラジカル捕捉作用の強度は、PBN のそれに遜色せず、水性環境下ではむしろ強い<sup>5</sup>。また、2-SPBN は、水親和性領域における酸化性ストレスの影響の強い種々の酸化性障害実験系において有意な抑制効果を示す<sup>87-89</sup>。一方、脂溶性の強い抗酸化剤である *N,N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine は、CDA食により誘発される GST-P 陽性病変の個数に影響することなく、その大きさを縮小することが報告されている<sup>45</sup>。同様に、脂溶性のビタミン C 誘導体である 2-*O*-octadecylascorbic acid は、CDA食によるラット肝発癌に対して、水溶性の L-ascorbic acid に比し、より強い抑制効果を示す<sup>90</sup>。したがって、本研究の結果は、CDA食によるラット肝発癌機構における、脂質親和性領域に誘導される酸化性ストレスの重要性を示唆するものである。

## 結 語

ラットにおける CDA食による内因性肝発癌系を用い、GST-P 陽性を示す肝前癌病変の発生に対して PBN とその誘導体の及ぼす影響とその機序について検索し、以下の結果を得た。

1. CDA食投与により誘発される GST-P 陽性病変の発生個数は、PBN の 0.090 % の用量による混餌併用投与によって減少した。PBN のより低い用量での投与または使用した PBN 誘導体の投与は、病変の個数に影響しなかった。
2. 同病変の大きさは、4-OHPBN の 0.009, 0.045, 0.090 % の用量による混餌併用投与によって同程度に縮小した。PBN と 3-OHPBN は、0.090 % の用量のみにて、同様の効果を示した。2-OHPBN または 2-SPBN は、病変の大きさに影響しなかった。
3. PBN, 4-OHPBN, 3-OHPBN は、CDA食による境界型肝硬変の誘発を抑制した。2-OHPBN または 2-SPBN は、肝における線維増生に影響しなかった。

4. PBN, 4-OHPBN, 3-OHPBN は, CDAА 食により誘発される GST-P 陽性病変内における肝細胞のアポトーシスを促進する一方, 病変周囲組織におけるそれを抑制した。2-OHPBN または 2-SPBN は, 肝細胞のアポトーシスに影響しなかった。

5. 4-OHPBN は, CDAА 食により誘発される GST-P 陽性病変内およびその周囲組織における肝細胞増殖を抑制した。PBN またはその他の PBN 誘導体は, 肝細胞増殖に影響しなかった。

6. PBN, 4-OHPBN, 3-OHPBN は, CDAА 食による肝細胞の核 DNA と核外成分における酸化性傷害の誘発を抑制した。2-OHPBN または 2-SPBN は, 肝細胞成分の酸化性傷害に影響しなかった。

以上の結果より, ラットにおいて, PBN, 4-OHPBN, 3-OHPBN は, CDAА 食により誘発される肝前癌病変の成長を, 酸化性ストレスと肝細胞障害の抑制に基いた機構で抑制することが判明した。これらの物質の中で, PBN の主たる代謝物でもある 4-OHPBN は, 肝細胞増殖をも抑制することにより, 他の 2 物質に比し, 優れた肝発癌抑制効果を示した。したがって, PBN は, 代謝を介し, 抗酸化作用とそれに関連する種々のシグナル伝達異常の矯正ないし調整作用に基いて, 肝発癌を抑制することが判明し, この物質は肝癌に対する有力な化学予防物質の候補となり得るものと考えられる。

本研究の一部は, 厚生省がん研究助成金による補助を受けたものであることをここに付記する。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御指導, 御校閲を賜りました奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室小西陽一教授に深甚なる謝意を捧げますと共に, 御校閲, 御助言をいただきました奈良県立医科大学第 3 内科学教室福井 博教授ならびに第 2 病理学教室小西登教授に深謝いたします。さらに, 本研究の遂行にあたり御指導を賜った同腫瘍病理学教室中江 大助教授および貴重な被験物質を御供給いただいた Oklahoma Medical Research Foundation の Robert A. Floyd 博士と古武 弥茂博士に深く感謝の意を表します。また, 御協力をいただきました岸田秀樹先生と楠岡 修先生をはじめとする腫瘍病理学教室の諸兄姉に感謝いたします。

## 文 献

1) Ministry of Health and Welfare, Japan : Statis-

tics and Other Data/ Summary of Vital Statistics / Trend in leading cause of death (per 100,000 population). English Home Page of Ministry of Health and Welfare, Japan <http://www.mhw.go.jp/english/index.html>:[http://www.mhw.go.jp/english/database/populate/pop1\\_t1.html](http://www.mhw.go.jp/english/database/populate/pop1_t1.html), 2000.

- 2) 杉村 隆, 垣添忠生, 長尾美奈子 : がんと人間. 岩波書店, 東京, p 40-41, 1997.
- 3) Chemoprevention Working Group : Prevention of cancer in the next millennium : Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. Cancer Res. **59** : 4743-4758, 1999.
- 4) Hursting, S. D., Slaga, T. J., Fischer, S. M., DiGiovanni, J. D. and Phang, J. M. : Mechanism-based cancer prevention approaches : targets, examples, and the use of transgenic mice. J. Natl. Cancer Inst. **91** : 215-225, 1999.
- 5) Kotake, Y. : Pharmacologic properties of phenyl N-tert-butyl nitron. Antiox. Redox Signal. **1** : 481-499, 1999.
- 6) Miyajima, T. and Kotake, Y. : Spin trapping agent, phenyl N-tert-butyl nitron, inhibits induction of nitric oxide synthase in endotoxin-induced shock in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. **215** : 114-121, 1995.
- 7) Novelli, G. P., Angiolini, P., Tani, R., Consales, G. and Bordini, L. : Phenyl-t-butyl-nitron is active against traumatic shock in rats. Free Radic. Res. Commun. **1** : 321-327, 1986.
- 8) Leib, S. L., Kim, Y. S., Chow, L. L., Sheldon, R. A. and Täuber, M. G. : Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. J. Clin. Invest. **98** : 2632-2639, 1996.
- 9) Clough-Helfman, C. and Phillis, J. W. : The free radical trapping agent N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN) attenuates cerebral ischaemic injury in gerbils. Free Radic. Res. Commun. **15** : 177-186, 1991.
- 10) Phillis, J. W. and Clough-Helfman, C. : Protection from cerebral ischemic injury in gerbils with the spin trap agent, N-tert-butyl- $\alpha$ -phenyl-

- nitron (PBN). *Neurosci. Lett.* **116** : 315-319, 1990.
- 11) **Vrbjar, N., Zöllner, S., Haseloff, R. F., Pissarek, M. and Blasig, I. E.** : PBN spin trapping of free radicals in the reperfusion-injured heart. Limitations for pharmacological investigations. *Biochem. Mol. Cell Biochem.* **186** : 107-115, 1998.
  - 12) **Bradamante, S., Monti, E., Paracchini, L., Lazzarini, E. and Piccinini, F.** : Protective activity of the spin trap tert-butyl- $\alpha$ -phenyl nitron (PBN) in reperfused rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **24** : 375-386, 1992.
  - 13) **Colado, M. I., O'Shea, E., Granados, R., Murray, T. K. and Green, A. R.** : In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br. J. Pharmacol.* **121** : 889-900, 1997.
  - 14) **Colado, M. I. and Green, A. R.** : The spin trap reagent  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur. J. Pharmacol.* **280** : 343-346, 1995.
  - 15) **Parman, T., Wiley, M. J. and Wells, P. G.** : Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat. Med.* **5** : 582-585, 1999.
  - 16) **Wells, P. G., Kim, P. M., Laposa, R. R., Nicol, C. J., Parman, T. and Winn, L. M.** : Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat. Res.* **396** : 65-78, 1997.
  - 17) **Ho, E., Chen, G. and Bray, T. M.** : Alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) inhibits NF- $\kappa$ B activation offering protection against chemically induced diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* **28** : 604-614, 2000.
  - 18) **Iovino, G., Kubow, S. and Marliiss, E. B.** : Effect of  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron on diabetes and lipid peroxidation in BB rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **77** : 166-174, 1999.
  - 19) **Saito, K., Yoshioka, H. and Cutler, R. G.** : A spin trap, N-tert-butyl- $\alpha$ -phenyl nitron extends the life span of mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** : 792-794, 1998.
  - 20) **Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Landum, R. W., Cheng, M. S., Wu, J. F. and Floyd, R. A.** : Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl- $\alpha$ -phenyl nitron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 3633-3636, 1991.
  - 21) **Bartsch, H.** : Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention : a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat. Res.* **462** : 255-279, 2000.
  - 22) **Marnett, L. J.** : Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21** : 361-370, 2000.
  - 23) **Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., Stevenson, D. E. and Walborg, E. F. Jr.** : The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **106**, Suppl. 1 : 289-295, 1998.
  - 24) **Trosko, J. E. and Inoue, T.** : Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis. *Stem Cells* **15**, Suppl. 2 : 59-67, 1997.
  - 25) **Moochhala, S. and Rajnakova, A.** : Role of nitric oxide in cancer biology. *Free Radic. Res.* **31** : 671-679, 1999.
  - 26) **Maeda, H. and Akaike, T.** : Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry* **63** : 854-865, 1998.
  - 27) **Wink, D. A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. W. and Mitchell, J. B.** : The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis* **19** : 711-721, 1998.
  - 28) **Felley-Bosco, E.** : Role of nitric oxide in genotoxicity : implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis. Rev.* **17** : 25-37, 1998.
  - 29) **Prescott, S. M. and Fitzpatrick, F. A.** : Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1470** : M69-78, 2000.
  - 30) **Fosslien, E.** : Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **30** : 3-21, 2000.
  - 31) **Kelly, D. L. and Rizzino, A.** : Growth regulatory

- factors and carcinogenesis : the roles played by transforming growth factor beta, its receptors and signaling pathways. *Anticancer Res.* **19** : 4791-4807, 1999.
- 32) **McCormick, F.** : Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* **9** : M53-56, 1999.
- 33) **Nakae, D., Kotake, Y., Kishida, H., Hensley, K. L., Denda, A., Kobayashi, Y., Kitayama, W., Tsujiuchi, T., Sang, H., Stewart, C. A., Tabatabaie, T., Floyd, R. A. and Konishi, Y.** : Inhibition by phenyl N-tert-butyl nitron of early phase carcinogenesis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Cancer Res.* **58** : 4548-4551, 1998.
- 34) **Nakae, D.** : Endogenous liver carcinogenesis in the rat. *Pathol. Int.* **49** : 1028-1042, 1999.
- 35) **Hayashi, J., Aoki, H., Arakawa, Y. and Hino, O.** : Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* **42** : 205-210, 1999.
- 36) **Nakae, D., Yoshiji, H., Maruyama, H., Kinugasa, T., Denda, A. and Konishi, Y.** : Production of both 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA and  $\gamma$ -glutamyltransferase-positive hepatocellular lesions in rats given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Jpn. J. Cancer Res.* **81** : 1081-1084, 1990.
- 37) **Nakae, D., Yoshiji, H., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Tamura, K., Denda, A., and Konishi, Y.** : High incidence of hepatocellular carcinomas induced by a choline deficient L-amino acid defined diet in rats. *Cancer Res.* **52** : 5042-5045, 1992.
- 38) **Obara, T., Makino, T., Ura, H., Yokose, Y., Kinugasa, T., Moore, M. A., Sato, K. and Konishi, Y.** : Comparative histochemical investigation of the glutathione S-transferase placental form and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase during N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Carcinogenesis* **7** : 801-805, 1986.
- 39) **Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H. P., Toyka, K. V. and Lassmann, H.** : Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* **71** : 219-225, 1994.
- 40) **Tsutsumi, Y., Serizawa, A. and Kawai, K.** : Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen : application to intra-operative frozen diagnosis. *Pathol. Int.* **45** : 108-115, 1995.
- 41) **Van der Loos, C. M., Naruko, T. and Becker, A. E.** : The use of enhanced polymer one-step staining reagents for immunoenzyme double-labeling. *Histochem. J.* **28** : 709-714, 1996.
- 42) **Nakae, D., Mizumoto, Y., Kobayashi, E., Noguchi, O. and Konishi, Y.** : Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue. *Cancer Lett.* **97** : 233-239, 1995.
- 43) **Nakae, D., Yamamoto, K., Yoshiji, H., Kinugasa, T., Maruyama, H., Faber, J. L. and Konishi, Y.** : Liposome-encapsulated superoxide dismutase prevents liver necrosis induced by acetaminophen. *Am. J. Pathol.* **136** : 787-795, 1990.
- 44) **Pitot, H. C., Campbell, H. A., Maronpot, R., Bawa, N., Rizvi, T. A., Xu, Y. H., Sargent, L., Dragan, Y. and Pyron, M.** : Critical parameters in the quantitation of the stages of initiation, promotion, and progression in one model of hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol. Pathol.* **17** : 594-612, 1989.
- 45) **Nakae, D., Mizumoto, Y., Yoshiji, H., Andoh, N., Horiguchi, K., Shiraiwa, K., Kobayashi, E., Endoh, T., Shimoji, N., Tamura, K., Tsujiuchi, T., Denda, A. and Konishi, Y.** : Different roles of 8-hydroxyguanine formation and 2-thiobarbituric acid-reacting substance generation in the early phase of liver carcinogenesis induced by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* **85** : 499-505, 1994.
- 46) **Kobayashi, Y., Nakae, D., Akai, H., Kishida, H., Okajima, E., Kitayama, W., Denda, A., Tsujiuchi, T., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. and Konishi, Y.** : Prevention by 1'-acetoxychavicol acetate of the induction but not growth of putative preneoplastic, glutathione S-transferase placental form-positive, focal lesions in the livers of rats fed a choline-deficient, L-

- amino acid-defined diet. *Carcinogenesis* **19** : 1809-1814, 1998.
- 47) **Nose, K.** : Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol. Pharm. Bull.* **23** : 897-903, 2000.
- 48) **Johnson, D. E.** : Programmed cell death regulation : basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* **14** : 1340-1344, 2000.
- 49) **Afford, S. and Randhawa, S.** : Apoptosis. *Mol. Pathol.* **53** : 55-63, 2000.
- 50) **Jacotot, E., Ferri, K. F. and Kroemer, G.** : Apoptosis and cell cycle : distinct checkpoints with overlapping upstream control. *Pathol. Biol.* **48** : 271-279, 2000.
- 51) **O'Connor, L., Huang, D. C., O'Reilly, L. A. and Strasser, A.** : Apoptosis and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12** : 257-263, 2000.
- 52) **Wang, X. W.** : Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res.* **19** : 4759-4771, 1999.
- 53) **Lowe, S. W. and Lin, A. W.** : Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21** : 485-495, 2000.
- 54) **Pelengaris, S., Rudolph, B. and Littlewood, T.** : Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Genet.* **10** : 100-105, 2000.
- 55) **Reed, J. C.** : Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* **17** : 2941-2953, 1999.
- 56) **Wyllie, A. H., Bellamy, C. O., Bubb, V. J., Clarke, A. R., Corbet, S., Curtis, L., Harrison, D. J., Hooper, M. L., Toft, N., Webb, S. and Bird, C. C.** : Apoptosis and carcinogenesis. *Br. J. Cancer* **80, Suppl. 1** : 34-37, 1999.
- 57) **Banni, S., Salgo, M. G., Evans, R. W., Corongiu, F. P. and Lombardi, B.** : Conjugated diene and trans fatty acids in tissue lipids of rats fed an hepatocarcinogenic choline-devoid diet. *Carcinogenesis* **11** : 2053-2057, 1990.
- 58) **Takeuchi, Y., Morii, H., Tamura, M., Hayaishi, O. and Watanabe, Y.** : A possible mechanism of mitochondrial dysfunction during cerebral ischemia : inhibition of mitochondrial respiration activity by arachidonic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **289** : 33-38, 1991.
- 59) **Schulze - Osthoff, K., Bakker, A. C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W. A., and Fiers, W.** : Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.* **267** : 5317-5323, 1992.
- 60) **Hennet, T., Richter, C. and Peterhans, E.** : Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces superoxide anion generation in mitochondria of L 929 cells. *Biochem. J.* **289** : 587-592, 1993.
- 61) **Sluss, H. K., Barrett, T., Derijard, B. and Davis, R. J.** : Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell Biol.* **14** : 8376-8384, 1994.
- 62) **Kostura, M. J., Tocci, M. J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A. G., Chartrain, N. A. and Schmidt, J. A.** : Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1  $\beta$  convertase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 5227-5231, 1989.
- 63) **Farber, E.** : The step-by-step development of epithelial cancer : from phenotype to genotype. *Adv. Cancer* **70** : 21-48, 1996.
- 64) **Pogrebniak, H., Matthews, W., Mitchell, J., Russo, A., Samuni, A. and Pass, H.** : Spin trap protection from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Surg. Res.* **50** : 469-474, 1991.
- 65) **Robinson, K. A., Stewart, C. A., Pye, Q. N., Nguyen, X., Kenney, L., Salzman, S., Floyd, R. A. and Hensley, K.** : Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture. *J. Neurosci. Res.* **55** : 724-732, 1999.
- 66) **Sang, H., Wallis, G. L., Stewart, C. A. and Kotake, Y.** : Expression of cytokines and activation of transcription factors in lipopolysaccharide-administered rats and their inhibition by phenyl N-tert-butyl nitron (PBN). *Arch. Biochem. Biophys.* **363** : 341-348, 1999.
- 67) **Kotake, Y., Sang, H., Miyajima, T. and Wallis, G. L.** : Inhibition of NF- $\kappa$ B, iNOS mRNA, COX 2 mRNA, and COX catalytic activity by phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Biochim. Biophys. Acta.* **1448** : 77-84, 1998.
- 68) **Stewart, C. A., Hyam, K., Wallis, G., Sang, H.,**

- Robinson, K. A., Floyd, R. A., Kotake, Y. and Hensley, K.** : Phenyl-N-tert-butyl-nitronone demonstrates broad-spectrum inhibition of apoptosis-associated gene expression in endotoxin-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **365** : 71-74, 1999.
- 69) **Weber, C. and Erl, W.** : Modulation of vascular cell activation, function, and apoptosis : role of antioxidants and nuclear factor- $\kappa$ B. *Curr. Top. Cell Regul.* **36** : 217-235, 2000.
- 70) **Cook, S. J., Balmanno, K., Garner, A., Millar, T., Taverner, C. and Todd, D.** : Regulation of cell cycle re-entry by growth, survival and stress signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **28** : 233-240, 2000.
- 71) **Kalvakolanu, D. V.** : Interferons and cell growth control. *Histol. Histopathol.* **15** : 523-537, 2000.
- 72) **Diehl, A. M.** : Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol. Rev.* **174** : 160-171, 2000.
- 73) **Krupp, G., Klapper, W. and Parwaresch, R.** : Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cell Mol. Life Sci.* **57** : 464-486, 2000.
- 74) **Mori, H., Sugie, S., Yoshimi, N., Hara, A. and Tanaka, T.** : Control of cell proliferation in cancer prevention. *Mutat. Res.* **428** : 291-298, 1999.
- 75) **Shinozuka, H., Masuhara, M., Kudo, Y. and Katyal, S. L.** : Growth factor and receptor modulations in rat liver by choline-methionine deficiency. *J. Nutr. Biochem.* **4** : 610-617, 1996.
- 76) **Zeisel, S. H.** : Choline. A nutrient that is involved in the regulation of cell proliferation, cell death, and cell transformation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **399** : 131-141, 1996.
- 77) **Zeisel, S. H.** : Nutrients, signal transduction and carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **369** : 175-183, 1995.
- 78) **Albright, C. D., Zeisel, S. H. and Salganik, R. I.** : Choline deficiency induces apoptosis and decreases the number of eosinophilic preneoplastic foci in the liver of OXYS rats. *Pathobiology* **66** : 71-76, 1998.
- 79) **Albright, C. D. and Zeisel, S. H.** : Choline deficiency causes increased localization of transforming growth factor-beta 1 signaling proteins and apoptosis in the rat liver. *Pathobiology* **65** : 264-270, 1997.
- 80) **Duval, D. L., Miller, D. R., Collier, J. and Billings, R. E.** : Characterization of hepatic nitric oxide synthase : identification as the cytokine-inducible form primarily regulated by oxidants. *Mol. Pharmacol.* **50** : 277-284, 1996.
- 81) **Schmedtje, J. F. Jr., Ji, Y. S., Liu, W. L., DuBois, R. N. and Runge, M. S.** : Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- $\kappa$ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272** : 601-608, 1997.
- 82) **Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. and Nathan, C.** : Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269** : 4705-4708, 1994.
- 83) **Tamir, S. and Tannenbaum, S. R.** : The role of nitric oxide (NO $\cdot$ ) in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta.* **1288** : F31-36, 1996.
- 84) **Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G. and Needleman, P.** : Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 7240-7244, 1993.
- 85) **Tsujiuchi, T., Kobayashi, E., Nakae, D., Mizumoto, Y., Andoh, N., Kitada, H., Ohashi, K., Fukuda, T., Kido, A., Tsutsumi, M., Denda, A. and Konishi, Y.** : Prevention by methionine of enhancement of hepatocarcinogenesis by coadministration of a choline-deficient L-amino acid-defined diet and ethionine in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* **86** : 1136-1142, 1995.
- 86) **Reinke, L. A., Moore, D. R., Sang, H., Janzen, E. G. and Kotake, Y.** : Aromatic hydroxylation in PBN spin trapping by hydroxyl radicals and cytochrome P-450. *Free Radic. Biol. Med.* **28** : 345-350, 2000.
- 87) **Fallon, J., Matthews, R. T., Hyman, B. T. and Beal, M. F.** : MPP+ produces progressive neuronal degeneration which is mediated by oxidative stress. *Exp. Neurol.* **144** : 193-198, 1997.
- 88) **Harkins, J. D., Carney, J. M., Meier, M., Leak, S. C. and Tobin, T.** : Effect of  $\alpha$ -phenyl-tert-butyl-nitronone on endotoxin toxemia in horses. *Vet. Hum. Toxicol.* **39** : 268-271, 1997.
- 89) **Schulz, J. B., Henshaw, D. R., Siwek, D., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Cipolloni, P. B.,**

- Kowall, N. W., Rosen, B. R. and Beal, M. F. :**  
Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J. Neurochem.* **64** : 2239-2247, 1995.
- 90) **Mizumoto, Y., Nakae, D., Yoshiji, H., Andoh, N., Horiguchi, K., Endoh, T., Kobayashi, E., Tsujiuchi, T., Shimoji, N., Denda, A., Tsujii, T., Nagao, M., Wakabayashi, K. and Konishi, Y. :**  
Inhibitory effects of 2-O-octadecylascorbic acid and other vitamin C and E derivatives on the induction of enzyme-altered putative preneoplastic lesions in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Carcinogenesis* **15** : 241-246, 1994.