

学位論文題名

マウス皮膚二段階発癌モデルを用いた環境中化学物質の
イニシエーター作用の検出並びに作用強度の
数量化に関する実験病理学的研究

学位論文内容の要旨

近年の発癌研究の発展により、発癌物質が環境中に広く存在するという事実が明らかとなり、ヒトの癌の多くは我々自身をとりまく環境因子に原因があるとの認識が持たれるようになった。それに伴い、発癌試験成績の評価に関する問題が重要視されるようになり、現在では、化学物質の発癌性に関する安全性の評価を行うに当たっては、単に発癌性があるか否かの成績だけではなく、各々の物質による発癌がどのような機構で起こり(質的評価)、どの程度の強さのものであるか(量的評価)という、作用機序と作用強度の両面の検討が必要であるとの認識がもたれつつある。

そこで筆者は、環境中化学物質の発癌性の安全性評価を、二段階発癌モデルを応用し、作用機序及び作用強度の両面より検討することを試みた。二段階発癌モデルの対象臓器には、化学物質に対する感受性が高く、既知のプロモーターが存在し、さらに、定量的な解析に向いていることより、マウスの皮膚を選択した。本研究では、環境中化学物質のイニシエーター作用の検出並びにその作用強度の数量化を目的とし、以下の検討を行った。

まず、皮膚発癌実験においては、使用する動物の毛周期が試験結果を大きく左右する可能性があることより、あらかじめマウスの毛周期について検索した。マウスでは、皮膚の厚さが毛周期に伴い周期的に変化した。この事実に基づき、5系統(DBA/2, BALB/c, C57BL/6, ICR, SENCAR)のマウスの背部皮膚の毛周期を詳しく検索した。出生後1回目及び2回目の毛周期は、全系統のマウスではほぼ同様のパターンを示した。1回目の発育期は2日齢より開始し、皮膚の厚さは8日齢で最大値を示し、その後漸減し18~24日齢で最小値を示した(1回目の静止期)。2回目の発育期の開始日は28~37日齢で、全系統で雌は雄より3~4日遅れて開始した。皮膚の厚さは1回目の静止期で最小値を示した直後より漸増し、2回目の発育期の開始日の2~4日後にピークを示し再び漸減した。52日齢では全系統の全てのマウスが2回目の静止期であっ

た。2回目の静止期は比較的長時間持続したが、3回目の発育期の開始日は、系統、個体間ではらつき、DBA/2, C57BL/6 ではスポット状の発毛を示した。DBA/2 及び BALB/c の一部の雄マウスでは、140日齢に至っても3回目の発育期は認められなかった。

マウス皮膚に発生する腫瘍の病理組織像（組織型）を検索する目的で、5系統（C57BL/6, BALB/c, DBA/2, BDF1, CDF1）の雌マウスの背部皮膚に、MMNG500 μ gあるいはDMBA50 μ gを1回塗布した後、TPAあるいは溶媒のみを2年間にわたり塗布し、二段階発癌を行った。その結果、合計717個（330個体；55%）の腫瘍が発生した。発生した腫瘍は病理組織学的に多様な組織型を示し、その種類は次のようであった：扁平上皮乳頭腫、扁平上皮癌、角化棘細胞腫、基底細胞腫瘍、皮脂腺腫、毛囊上皮腫、黒色腫、肥満細胞腫、皮膚線維腫、線維肉腫、血管腫、血管肉腫、骨腫、骨肉腫、肉腫（診断不可能）、乳腺腫瘍（A型腺癌、B型腺癌、C型腺癌、角化腺癌、混合腺癌、癌肉腫）。使用したイニシエーターの種類、プロモーション処置の有無、動物の系統の違いにより、発生した腫瘍の組織型の発現に差が認められた。MMNGをイニシエーターとして投与した処置群では、真皮あるいは皮下組織由来の腫瘍が特徴的に、あるいは高頻度に発生し、DMBAをイニシエーターとして投与した処置群では、表皮及び皮膚付属器由来の腫瘍、色素細胞由来及び乳腺腫瘍が特徴的に、あるいは高頻度に発生した。皮膚発癌実験において、その実験結果の評価をするためには、病理組織学的検索を実施することが重要と考えられた。

マウス皮膚二段階発癌モデルで、イニシエーター活性を感度高く、しかも正確に検出できる試験系の開発を目的とし、以下に示す3点の検討を行った。すなわち、被検物質を投与する際の毛周期がイニシエーター活性に及ぼす影響、被検物質を分割投与した場合の影響、プロモーターの投与濃度の影響について検討した。その結果、皮膚二段階発癌モデルを用いてイニシエーター活性を感度良く正確に検出するためには、毛周期の静止期にイニシエーション処理を行う必要があることを明らかにした。また、10回の分割イニシエーション処理（1週間2回×5週間）によっても十分なイニシエーター活性が検出でき、その検出能力は単回イニシエーション処置よりも優れていることが示された。このマウス皮膚二段階発癌実験において、ICRマウスに週2回のプロモーション処置を行う場合のTPAの至適濃度は、0.1mlのアセトンに溶解した2.5 μ gであることが示された。

上記のように確立されたマウス皮膚二段階発癌モデルを用い、炭水化物の熱分解生成物8種（レボグルコサン、レボグルコセノン、3-デオキシグルコソン、5-ヒドロキシメチル-2-フルフラール、フルフラール、メチルフルフラール、グリオキザール、チアゾリジン）及び食品添加

物3種（AF-2, BHA, BHT）のイニシエーター作用を検索し、その応用性を検討した。この実験終了時における腫瘍発生率は、チアゾリジン/TPA 群, AF-2/TPA 群と、対照の溶媒/TPA 群との間で統計学的有意差を示した。また、Peto の傾向検定によりチアゾリジン/TPA 群, レボグルコサン/TPA 群, レボグルコセノン/TPA 群, フルフラール/TPA 群, AF-2/TPA 群, BHA/TPA 群と対照の溶媒/TPA 群との間に、実験期間中における腫瘍発生状況に統計学的有意差が認められた。以上の結果より、6物質（チアゾリジン, レボグルコサン, レボグルコセノン, フルフラール, AF-2, BHA）にイニシエーター作用のあることが示唆され、著者が確立したマウス皮膚二段階発癌モデル系が、環境中化学物質のイニシエーター活性を感度高く、しかも正確に検出できる優れた試験系であることが確認された。

イニシエーター活性の量的評価を行う目的で、マウス皮膚二段階発癌試験で得られたデータを既知発癌物質（標準発癌物質）の容量反応データと比較し、被験物質の発癌（イニシエーター活性）強度を比較値で評価する方法を検討した。標準発癌物質としては、ベンズピレリンの類縁化合物である DMBA を選び、著者が確立した皮膚二段階発癌モデルにおける、そのイニシエーター活性の容量反応性のデータを求めた。その結果、0.0064 nmol から20 nmol の容量の範囲内では、DMBA のイニシエーター活性は腫瘍発生率、1匹当たりの腫瘍発生個数、平均潜伏期間ともに高い容量相関性を示した。この容量反応性データを基準にし、上記の実験でイニシエーター作用が陽性とされた炭水化物の熱分解生成物4種及び食品添加物2種の、イニシエーター活性の強度を DMBA に対する比較値で数量化した。その結果、6種の化学物質の皮膚に対するイニシエーター活性の強度は、いずれも DMBA に比較すると極めて低かった。本法によるイニシエーター活性の作用強度の数量化は、マウス皮膚二段階発癌モデルで得られた結果を容易に、しかも客観的に数量化することができ、かつまた相互に比較することも可能であった。よって、本方法は、化学物質の発癌性に関する安全性の量的評価を行う際に極めて有効な方法と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 板 倉 智 敏
副 査 教 授 杉 村 誠
副 査 教 授 佐 藤 文 昭
副 査 教 授 藤 田 正 一

近年の発癌研究の発展により、環境中発癌物質が広く存在するという事実が明らかになり、これら化学物質の発癌性に関する安全性の評価方法が重要な課題となっている。申請者は、マウス皮膚二段階発癌モデルを応用した、環境中化学物質の発癌性の安全性の評価方法について研究し、本論文をまとめた。本論文は144頁からなり、5章で構成されている。

第1章では、発癌物質の感受性に密接に関係するとされている毛周期をマウスについて検索し、その詳細を明らかにした。第2章では、二段階発癌により誘発させた717個の皮膚腫瘍について、病理組織学的検索を実施し、マウスの皮膚腫瘍の病理学的診断基準を確立した。第3章では、イニシエーター活性を精度よく検出するための、マウス皮膚二段階発癌モデル系の確立を行い、毛周期の静止期における10回の分割イニシエーション処理が検出能力に優れること、並びにプロモーター12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) の至適濃度を明らかにした。第4章では、環境中化学物質のイニシエーター作用の検索を実施し、検索した11物質中6物質にイニシエーター作用のあることを示し、確立されたマウス皮膚二段階発癌モデル系が優れた試験系であることを明らかにした。第5章では、イニシエーター活性の作用強度を標準発癌物質との相対比較値で評価する方法について検討し、本法が、マウス皮膚二段階発癌モデルで得られた結果の量的評価に有用であることを示した。

以上のように、申請者は環境中化学物質のイニシエーター作用の検出並びに作用強度の数量化を、マウス皮膚二段階発癌モデルを用いて検索する優れた試験系を開発し、その有用性を実証した。これらの知見は、化学物質の発癌性に関する安全性の評価を行う上で、重要な情報をもたらす。癌一次予防の達成に大きな貢献をするものと考えられる。よって、審査員一同は、宮川義史氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。