

マウスヒフデノAHHカッセイドトBPユウハツシュヨウトノカンケイ

木下, 洋夫
九州大学医療技術短期大学部一般教育教授

<https://doi.org/10.15017/138>

出版情報：九州大学医療技術短期大学部紀要. 11, pp.23-28, 1984-03-01. 九州大学医療技術短期大学部
バージョン：
権利関係：



マウス皮膚での AHH 活性度と BP 誘発腫瘍との関係

木 下 洋 夫*

Relationship between Levels of AHH Activity and Susceptibility to BP Induced Tumor in Mice Skin

Nadao Kinoshita

緒 言

Benzo (a) pyrene (以下 BP と略す) は自然界に見出された最初の癌原性化合物で 1933 年に Cook 等²⁾ により石炭タールの中から初めて純粋に単離された。BP は主として動物の皮膚ならびに肺に腫瘍を発生させるが、タバコタールや汚染大気中に比較的多く検出されるため特に人の肺癌と何らかの関係があるのではないかと考えられている。しかし、BP そのものは化学的にも生物学的にも不活性であり、細胞内の microsomes に結合している arylhydrocarbon hydroxylase (以下 AHH と略す) により代謝され、初めて一部活性化がおき、これが発癌とかわりをもっている。AHH による BP の代謝では同時に多くの非活性化も行われるため、AHH 量が BP 発癌にどのように影響をあたえるかを検討することは人間の癌の研究に大変意義のあることである。

Wattenberg 等¹²⁾ はマウスに AHH の誘発剤である flavone 類をあたえた場合、BP の経口投与による肺腫瘍の抑制を見ており、その際、AHH 量の誘発能の強い flavone ほど BP 誘発肺腫瘍の抑制が強いと報告している。また、著者等⁵⁾ は AHH 阻害剤をマウスの皮膚に塗布して BP 誘発腫瘍の増加を観察した。

今回は両者の関係を更に詳しく調べる意味で

5 系列のマウスを用いて、それぞれの皮膚における AHH 活性と BP 誘発腫瘍を調べ、若干の知見を得たので報告する。

実験材料と方法

1) 動物と飼料、飼育

九州大学純系動物飼育場より生後 4 ~ 5 週令の雄性マウス ddN, CF # 1, (以上閉鎖集団系) ならびに AKR, C3H/He, C57BL/6 (以上近交系) を供給してもらい、更に動物実験室で 1 週間飼育した後実験を開始した。動物室での温度は 21°C ~ 24°C に保ち、飼料は日本クレア固型飼料 CE-2 を常時、水と共に充分量与えて飼育した。

2) 薬品類

発癌剤の BP と AHH 誘発剤の benzo(a)anthracene (以下 BA と略す) は Sigma 社の製品を更にシリカゲル-カラムクロマトグラフィーによりヘキサン-エタノール (50:50) で溶出精製純品化したものを使用した。免疫抑制剤の imuran は九州大学医学部泌尿器科から頂いた。AHH 活性の測定に必要な 3HO-BP は著者等⁷⁾ が合成したものをを用いた。発腫瘍プロモーターのクロトン油は和光純薬株式会社の製品をそのまま 1% アセトン溶液として使用した。

3) 分析機器

AHH 活性の測定に MPF-2A 型、日立分光蛍光光度計を使用した。

* 九州大学医療技術短期大学部一般教育教授

マウス皮膚でのAHH活性度とBP誘発腫瘍との関係

4) AHH活性の測定

マウス皮膚でのAHH活性の測定は誘発剤としてBAを用い、Nabert and Gelboin⁸⁾の方法に準じたKinoshita and Gelboin⁶⁾の方法で行った。

5) BPによる誘発腫瘍

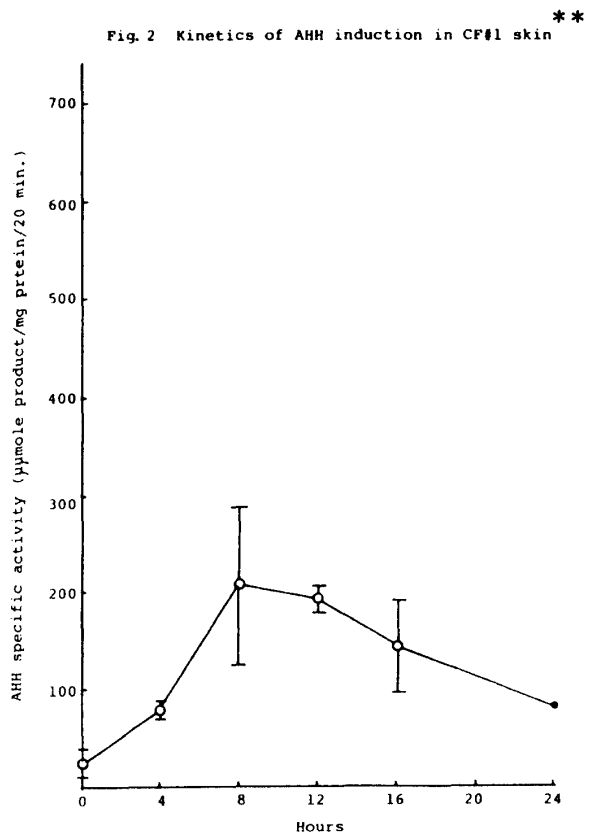
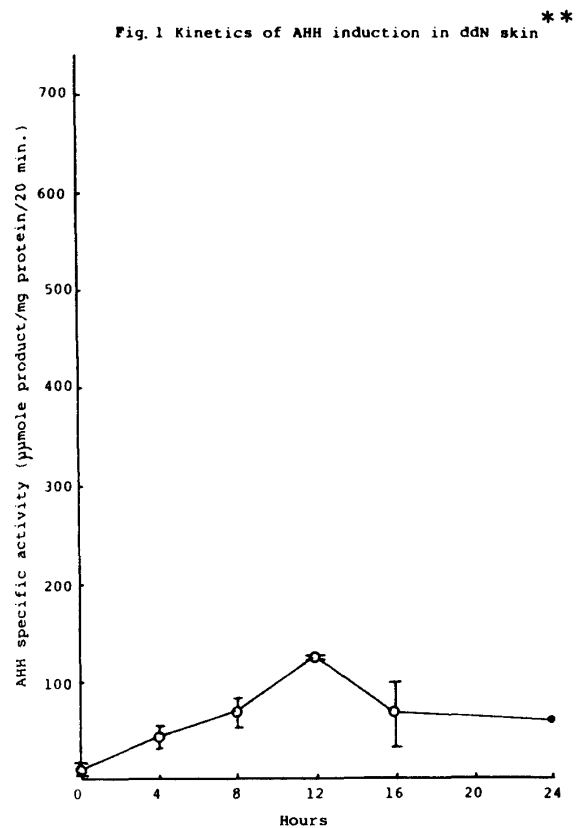
5系列のマウスについて、それぞれControl群、BP群、BP-imuran群をもうけた。BP群では最初にBPの100 $m\mu$ moles/0.2 ml-アセトンを週2回(月曜日と木曜日)のわりでマウス背部に塗布し、2.5週(5回)後、週1回(水曜日)のわりで1%クロトン油-アセトン溶液を0.2 mlづつ実験終了時まで塗布しつづけた。BP-imuran群はBP群と同じ実験に更にimuranの200 μ g/0.2 ml-0.01 N NaOHをマウス腹腔内に週2回(月曜日と金曜日)、実験終了時まで投与しつづけた。Control群は上記BP群のBP塗布のかわりにアセトンを0.2 mlづつ5回塗布した後、1%クロトン油-アセトン溶液を実験終了時まで週1回のわりで塗布しつづけた。実験期間中を通して薬物の塗布前日に電気クリッパーでマウス背部の毛を刈りた。最初の薬物の塗布から25週目で実験を中止した。

結 果

1) マウス皮膚でのAHH活性

Fig.1はddNマウスの皮膚におけるAHH活性とその誘発度を時間的に調べたものでBA投与後12時間で最高値120の比活性を示した。Fig.2はCF#1マウスの場合で8時間後が最高で191、Fig.3はC57BL/6マウスで12時間後に最高値67を、Fig.4はC3H/Heマウスの場合で、やはり12時間後が最高で218を、Fig.5はAKRマウスで8時間後に最高値297を示した。Fig.1からFig.5までを通して云えることは、AHH活性はBAを塗布して大体8時間から12時間で最高になること、それぞれのマウスの皮膚における平常時(0時間)のAHH活性には大きな差はないにも拘らずBAを塗布した後に誘発されるAHHはマウスの系列で大きな差があることである。誘導されたAHH活性の大きさを全マウスで整理すると、AKR>C3H/He>CF#1

>ddN>C57BL/6となった。



木下 洋 夫

Fig. 3 Kinetics of AHH induction in C57BL/6 skin **

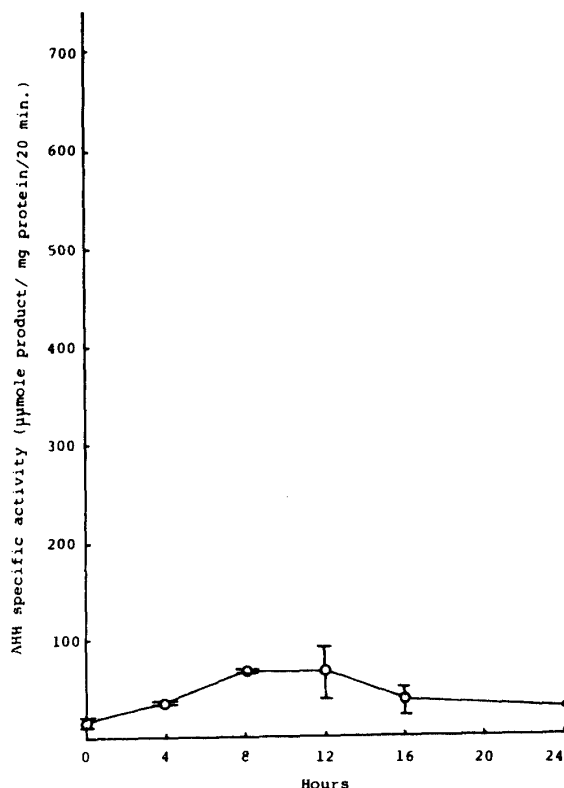


Fig. 5 Kinetics of AHH induction in AKR skin **

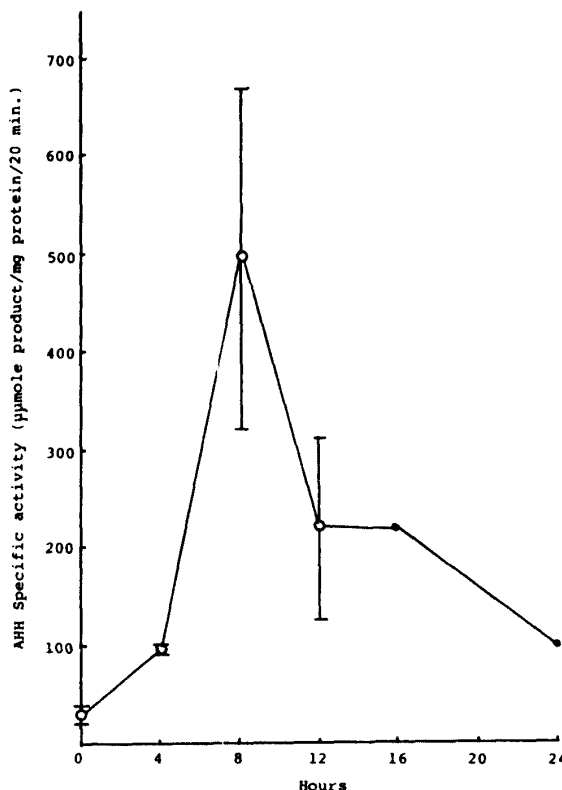
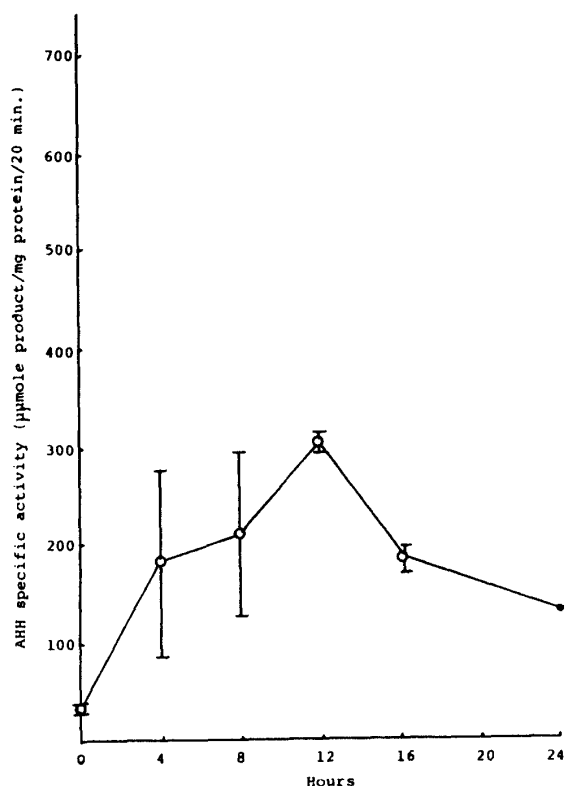


Fig. 4 Kinetics of AHH induction in C3H/He skin **



** 縦軸はマウス皮膚ホルモジネートの AHH 活性を表し、37°C、20分間のインキュベーションで皮膚ホルモジネート蛋白量 mg あたりの 3H0-BP 産生を μmole 数で示している。横軸は BA 投与後の時間を示す。
 図中○は3匹のマウスの皮膚を用いた実験を2回行い、その平均値を示す。又 —○— は実験値の中を示す。●は1回の実験値を示す。

2) マウス皮膚でのBP誘発腫瘍

Table 1は腫瘍実験マウス数、ならびに実験条件とその結果をまとめたものである。AKRマウスと他のControl群には実験期間中腫瘍の発生は見られなかった。BP群の腫瘍の発生率は、C57BL/6 ≧ ddN > CF#1 > C3H/He > AKRとなり、前記AHH誘発実験の結果と比較するとAHH誘発度の低いマウスほど腫瘍の発生率が大きい結果となった。また、途中、imuranを投与して免疫抑制を行った実験では3系列のマウス(dN, CF#1, C3H/He)で明らかに腫瘍の発生期の短縮、腫瘍数の増加が見られたが、C57BL/6マウスでは影響がないか、少しの腫瘍数の減少が見られた。

マウス皮膚でのAHH活性度とBP誘発腫瘍との関係

Table 1. マウス皮膚でのBPによる腫瘍実験

| マウス | | *1 処置法 | 使用 動物数 | *2 有効 動物数 | 最初の腫瘍 発生時期 (週) | 担腫瘍 動物数 | 全腫瘍数 | 全腫瘍数 有効動物数 |
|---------------|---------|-----------|-----------|-----------------|----------------------|------------|------|---------------|
| 閉鎖 集団 系 | ddN | Control | 16 | 14*3 | — | 0 | 0 | 0 |
| | | BP | 16 | 16 | 18 | 4 | 8 | 0.50 |
| | | BP-imuran | 16 | 16 | 15 | 6 | 25 | 1.56 |
| | CF#1 | Control | 16 | 13*3 | — | 0 | 0 | 0 |
| | | BP | 16 | 16 | 19 | 2 | 3 | 0.19 |
| | | BP-imuran | 16 | 15 | 15 | 5 | 6 | 0.40 |
| 近 交 系 | C57BL/6 | Control | 15 | 13*3 | — | 0 | 0 | 0 |
| | | BP | 15 | 14 | 18 | 4 | 8 | 0.57 |
| | | BP-imuran | 15 | 14 | 19 | 4 | 5 | 0.36 |
| | C3H/He | Control | 15 | 15*3 | — | 0 | 0 | 0 |
| | | BP | 15 | 14 | 21 | 1 | 1 | 0.07 |
| | | BP-imuran | 15 | 10 | 18 | 2 | 2 | 0.20 |
| | AKR | Control | 16 | 16*3 | — | 0 | 0 | 0 |
| | | BP | 16 | 11*3 | — | 0 | 0 | 0 |
| | | BP-imuran | 16 | 14*3 | — | 0 | 0 | 0 |

*1 「実験材料と方法」の所に記載

*2 最初に腫瘍が発生したときの実験マウス数

*3 腫瘍を生じなかったマウス群で実験終了時(25週)の生存マウス数

考 察

Wattenberg 等¹²⁾はBPによるマウス肺誘発腫瘍の際、同時にAHH誘発能に差がある3種類の flavones を用いて、その影響を調べたがAHHの強い誘発剤である β -naphthoflavone(別名5,6-benzoflavoneとも云う)が最も腫瘍発生を抑制し、AHHの中等度の誘発剤である quercetin pentamethylether が中間的な抑制をし、AHHを誘発しない rutin は抑制しなかったと報告している。著者等⁵⁾はBPによるマウス皮膚での腫瘍の形成がAHH活性を強く阻害す7,8-benzoflavoneを同時に塗布することにより、わずかであるが腫瘍が増加することを観察した。Watanabe 等¹¹⁾はC3H/HeマウスとDBA/2マウスの皮膚でのAHH量を測定しBP発癌との関係を調べたが、矢張り、AHH活性の低いDBA/2の方が発癌率が高い結果を得た。しかし、7,8-benzoflavoneを同時に塗布した実験では両マウスの発癌を抑制した成績を報告している。また、Slaga 等¹⁰⁾はマウス皮

膚でのBP誘発腫瘍実験で、7,8-benzoflavone, quercetinなどのAHH阻害剤で腫瘍の抑制があったと報告している。以上、これらの研究成果の矛盾は使用動物の違いや実験設定の相異など種々あげられるが、とにかく、AHH活性とBP誘発腫瘍との関係は混迷の状態である。今回、著者はAHHの誘発剤や阻害剤を一切用いずAHH量の異なる5系列のマウス皮膚でBPの誘発腫瘍を検討した結果、AHH誘発度の低いマウス程BPによる腫瘍形成が多いことを証明し得た。しかし発癌過程にはまだ多くの要因が考えられ、本実験で、そのまゝ低AHH活性がBP発癌を増加させると確定するには不十分のようである。少しでも動物側の条件を一致させる意味で免疫抑制剤 imuran を使用した。ddN, CF#1, C3H/Heの各マウスにおいては imuran で腫瘍の発生時期が早まり、また、腫瘍数も増加しAHH活性と発生腫瘍の関係は維持されたが、しかし、C57BL/6マウスはこの順序に従わない結果が出た。こゝでも生物学的な反応の複雑多様性が現われている。Daynes

木下 洋夫

等³⁾は紫外線照やBP処理によるマウス皮膚発癌で数種類の免疫抑制剤の効果を検討している。そして、その効果は種々で明らかに免疫抑制が発癌のしやすさに反映しないことを報告している。著者の今回の実験においてもC57BL/6マウスが他の3系列のマウスと結果を異にしているが生物を使用した実験では動物や薬品、実験方法の一寸した相違も慎重に取扱う必要がある。

AHH活性が喫煙婦人と非喫煙婦人の胎盤を比較すると明らかに前者が高いので人間も酵素誘導があることがわかった⁹⁾。人の癌とAHH活性とを結びつけるものがあるか否かを調べるため、人の血液からリンパ球を単離培養してAHH活性を測定し肺癌患者が正常人より高いという報告がある^{1),4)}。これらの結果は明らかに今回の著者のマウスの場合と相反している。この相違について著者は次のように考えている。

1) 人のAHHレベルはマウスに比べて非常に低い、そのためBPの活性化に尚、不充分であり高いAHH活性を必要とするのではないか。これに反してマウスのAHHレベルはBPの活性化に充分で増加したAHH量は更に不活性化に作用するようになる。2) AHH活性は各組織で異なるので人の肺癌を問題にする場合、肺のAHHレベルを測定すべきである。

本実験でマウスの皮膚を使用してAHH活性とBP発癌の関係を検討した。この問題について、これまで多数の研究者が報告しているが必ずしも意見の一致は見えない。これはBPはAHHによる活性化が必要だがAHHは同時に不活性化も充分行うためと考えられる。一般にAHHレベルが人に較べて高いマウス類では低いAHH誘発度がBP発癌の危険性を有し、AHHが非常に低い人間では高いAHH誘発度が肺癌の危険性を有していると著者は考えている。

要 約

本実験はAHH活性とBP発癌の関係を検討する意味で行われた。

1) 5系列のマウス(ddN, CF#1, C57BL/6, C3H/He, AKR)を用いてbenzo(a)anthraceneによるマウス背部皮膚でのAHH誘発

度を測定し、AKR>C3H/He>CF1>ddN>C57BL/6の順で大きな差があることがわかった。

2) これらのマウス皮膚でのBP-クロトン油による腫瘍誘発実験で腫瘍の発生率はC57BL/6≧ddN>CF#1>C3H/Heの順序であった。AHH誘発の非常に高いAKRマウスでは25週の実験期間中には腫瘍の発生は認められなかった。つまり、マウスの皮膚におけるBP誘発腫瘍はAHH活性度の低いマウスほど高い結果となった。

3) 同時に免疫抑制剤の腫瘍発生に対する効果を調べたところ3系列(ddN, CF#1, C3H/He)のマウスでは腫瘍発生期の短縮、腫瘍数の増加を見たが、C57BL/6マウスは反対の結果であった。免疫能の抑制が発癌を促進することは確かだが、それに従わない場合もあることが示唆された。

4) 本実験の結果を通して人のAHH活性と肺癌との関係の問題にふれて討議した。

文 献

- (1) Arnott, M.S., Yamauchi, T., and Johnston, D.A.: Aryl hydrocarbon hydroxylase in human cancer populations. In: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, edited by Jones, P.W., and Leber, P., 779-791, Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, MI, 1979.
- (2) Cook, J.W., Hewett, C.L., and Hieger, I.: The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Part I, II, and III. J.Chem Soc., 395-405, 1933.
- (3) Daynes R.A., Harris, C.C., Conner, R.J., and Elchald, E.J.: Skin cancer development in mice exposed chronically to immunosuppressive agents. J. Natl. Cancer Inst., 62, 1075-1081, 1979.
- (4) Kellermann, G., Shaw, C.R., and Kellermann, M.L.: Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogen-

マウス皮膚でのAHH活性度とBP誘発腫瘍との関係

- ic carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 289, 934-937, 1973.
- (5) Kinoshita, N., and Gelboin, H. V.: Aryl hydrocarbon hydroxylase and polycyclic hydrocarbon tumorigenesis: Effect of the enzyme inhibitor 7, 8-benzoflavone on tumorigenesis and macromolecule binding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 69, 824-828, 1972.
- (6) Kinoshita, N., and Gelboin, H. V.: The role of aryl hydrocarbon hydroxylase in 7, 12-dimethyl benzo(a)-anthracene skin tumorigenesis: On the mechanism of 7, 8-benzoflavone inhibition of tumorigenesis. *Cancer Res.*, 32, 1329-1339, 1972.
- (7) Mori, M., and Kinoshita, N.: New cyclization reaction on 3-hydroxybenzo(a) pyrene synthesis. *Memoirs of Kyushu Univ. School of Health Sciences*, No.2, 27-34, 1975.
- (8) Nebert D.W., and Gelboin, H.V.: Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. *J. Biol. Chem.*, 243, 6242-6249, 1968.
- (9) Nebert D.W., Winker, J., and Gelboin, H.V.: Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human placenta from cigarette smoking and nonsmoking women. *Cancer Res.*, 29, 1763-1769, 1969.
- (10) Slaga, T. J., et al.: Lack of involvement of 6-hydroxymethylation in benzo(a) pyrene skin tumor initiation in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61, 451-455, 1978.
- (11) Watanabe, M., Watanabe, K., Konno, K., and Sato, H.: Genetic differences in the induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and benzo(a) pyrene carcinogenesis in C3H/He and DBA/2 strains of mice. *Gann*, 66, 217-226, 1975.
- (12) Wattenberg, L.W., and Leong, J. L.: Inhibition of the carcinogenic action of benzo(a) pyrene by Flavones. *Cancer Res.*, 30, 1922-1925, 1970