

氏名・(本籍) 手塚 則 明 (福島県)  
学位の種類 博士 (医学)  
学位記番号 博士 (論) 第223号  
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
学位授与年月日 平成9年12月25日  
学位論文題目 Effects of partial hepatectomy on initiation of liver cell foci by 4-nitroquinoline 1-oxide, a non-hepatocarcinogen, and generation of DNA adducts in rats  
(ラットにおいて肝部分切除が非肝発癌物質である4ニトロキノリン1オキサイドによる肝細胞巢のイニシエーション活性とDNA付加体生成に与える影響)

審査委員 主査 教授 木村 博  
副査 教授 小玉 正 智  
副査 教授 森 渥 視

## 論文内容の要旨

### 【目的】

この実験ではラット肝部分切除 (PH) 後に経時的に非肝発癌物質である4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を投与し、glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性肝細胞巢とDNA付加体生成数の変化を観察しその関係を考察することにより、PHによって誘発された肝細胞の増殖が、4NQO-DNA付加体生成に与える影響および、GST-P陽性細胞巢を基準として評価されるイニシエーション活性と4NQO-DNA付加体との関係を検討した。

### 【方法】

実験ⅠのGST-P陽性細胞巢の変化は4NQO (20mg/kg) をPH前6時間から6時間毎に切除後24時間まで1回投与する群を設定した。その後2週間は基礎飼料で飼育し、0.025%AAF含有飼料に変更し2週間飼育した。4NQO投与後3週目にCCl<sub>4</sub>を投与した。5週間後に生存したラットを犠牲死させ、肝の切片をGST-P陽性細胞巢の免疫染色のため冷却したアセトンで固定した。GST-P陽性細胞巢の免疫染色はABC法で行い、GST-P陽性細胞巢は画像解析装置を用いてその数と面積を計測した。

実験Ⅱaは4NQO投与後の4NQO-DNA付加体の至適測定時間を決定する為に行った。肝部分切除後6時間にトリチウムラベルした4NQO (【<sup>3</sup>H】4NQO) を投与し、それぞれ3匹ずつを6時間、12時間、20時間、48時間後に頸椎脱臼で犠牲死させた。また別に偽手術及び手術無しの群を設定し術後6時間に【<sup>3</sup>H】4NQOを投与し、20時間後に犠牲死させた。実験Ⅱbは【<sup>3</sup>H】4NQOを実験Ⅰと同一のタイミングで投与し一群3-4匹を発ガン物質投与後20時間後に頸椎脱臼で犠牲死させた。Ⅱa、Ⅱbでは犠牲死後、肝、脾、肺を摘出しDNA付加体測定まで-80°Cで保存した。DNA付加体は10<sup>6</sup>ヌクレオチドあたりの放射活性で表現した。

### 【結果】

GST-P陽性細胞巢はPH後4NQO投与までの時間が長いほど増加する傾向を示した。

実験Ⅱaの4NQO-DNA付加体量は無手術群よりPH群が有意に高く、脾での量は肝での量より高値であったが肺での量は同様の値であった。実験Ⅱbでは4NQO-DNA付加体はPHを加えないコントロール群では少量 (0.50/10<sup>6</sup> nucleotide) しか観察されなかった。PH前6時間の群では少量の増加が認められた (0.80/10<sup>6</sup> nucleotide)。PH直後から18時間後までの群では有意な上昇 (1.05-1.27/10<sup>6</sup> nucleotide) が認められたが24時間後の群では減少していた。同様の傾向は脾および肺でも認められ、絶対値は脾および肺が高値であった。

## 【考 察】

動物実験では短期間でイニシエーションを受けた細胞を固定することは困難である。この実験系では2-AAFとCCl<sub>4</sub>を投与することによりイニシエーションを受けた細胞を選択的に分裂させ速やかに細胞巣を誘導することが可能である。細胞分裂が肝発癌に重要な役割を果たすことは、通常1回投与では成体ラットに対し腫瘍を誘導しない物質をPHなどの分裂刺激を加えた時に投与すると発癌性を示すことから明らかにされてきた。この実験では明らかな肝発癌物質ではない4NQOによるGST-P陽性細胞巣誘導をPHが増強した。我々の実験では4NQOの至適投与タイミングはDNA合成の最初のピークであるPH後24時間であった。

Widlakらは2-AAFを用いPHを行なった群が行わない群に比較し優位に高いDNA付加体量を示すことを報告している。彼らはDNA付加体量の高値は成長時期および細胞周期と関係していると考察している。しかし、今回の実験ではPH施行群とsham手術群が同様のDNA付加体量を示し、また、肺と脾の付加体量がPH施行群で有意に高値であったことから付加体生成に関して成長期におけるDNAの複製および細胞周期は決定的な要素ではないことが示唆された。術後の全身状態の変化が4NQOの代謝活性物質の循環に影響を与えていることが示唆された。

PHはラットに対して大きなストレスであり、4NQOの吸収、代謝、修復に大きな影響を与えるであろう。4NQOは2段階で代謝され、反応性に富んだ代謝産物4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4HAQO)がDNAと結合する。4HAQOはDT-diaphoraseで不活性な4-aminoquinoline 1-oxideに代謝されるが、この不活化は主に肝で行われるため、代謝能力の低下したPH後の肝ではこの不活化が低下し全体として解毒作用が低下することが考えられる。

今回の実験ではPH後のラットでは4NQO-DNA付加体およびGST-P陽性細胞巣の両方が増加していた。しかし、24時間後に投与した群では4NQO-DNA付加体は減少傾向にあるのにも関わらず、GST-P陽性細胞巣は増加している。その原因は4NQO-DNA付加体量の測定が投与後20時間の時点に限定したことでDNA修復過程を考慮していないことが原因となっている可能性がある。20時間後の測定は標的臓器である脾の4NQO-DNA付加体量が最大値となる時点を実験IIaより導いた。また、この結果は4NQO-DNA付加体量が単純な経路でGST-P陽性細胞巣に繋がっていないことを示しており、今後の検討が必要である。

## 【結 論】

肝発癌性を持たない発癌物質でもこの実験系でイニシエーション活性を評価できる可能性が示唆された。効果的なDNA付加体量の増加を伴った細胞分裂増殖が肝細胞のイニシエーション活性に関係することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究はラット肝部分切除モデルを用い、肝に対する発癌性の報告されていない4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)を投与し、4NQO-DNA付加体とglutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性肝細胞巣を指標として評価されるイニシエーション活性の関係を検討したものである。

肝部分切除を施行したラットに6時間毎に4NQOを経口投与、2-acetylaminofluoreneでプロモーションを行い5週間後に犠牲死させると、肝部分切除を施行した群では、施行しなかった群に対して有意にGST-P陽性細胞巣は増加した。同様のタイミングでトリチウムでラベルした4NQOを投与し、20時間後に犠牲死させたラットで4NQO-DNA付加体量を測定すると、肝部分切除を施行した群では、施行しなかった群に対して有意に肝細胞における4NQO-DNA付加体量は増加した。また、肝部分切除を施行した群では、4NQOの標的臓器である肺、脾でもDNA付加体量は増加していた。

以上の結果から、肝部分切除を用いたこのモデルによって肝に対する発癌性の報告されていない物質でも、そのイニシエーション活性を評価することが可能であることが示唆された。

4NQO-DNA付加体の増加とイニシエーション活性の関係を肝部分切除を用いた系で考察したこの論文は、化学発癌機構の解明に大きく寄与し得る優れたものである。よって、博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。