

論文要旨

Induction of Sarcomas by a Single Subcutaneous Injection of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene into Neonatal Male Sprague-Dawley Rats: Histopathological and Immunohistochemical Analyses

(新生仔期雄SDラットへの7,12-DMBA単回皮下注射による肉腫の誘発：組織病理学的及び免疫組織化学的解析)

田口 周平

目的：化学発癌は悪性腫瘍の主原因の一つであり、芳香族炭化水素は主要な化学発癌物質である。これまで多くの動物実験で、新生仔期ないし胎児期では化学物質に対する感受性が高く腫瘍の発育が早い、また経胎盤性ないし新生仔期の発癌物質暴露は後々の腫瘍の発育に影響しうることを示されてきた。一方、肉腫誘発動物実験は方法が簡便であることから、hostの感受性、化学物質の発癌性、腫瘍の発生過程の研究などのために数多くなされてきた。これまでのところ、新生仔期 rat に対して発癌物質を暴露し肉腫の発生を観察した study は少なく、免疫染色を基に誘発した肉腫を分類したり、肉腫の誘発過程を組織学的に観察した study は少ない。これらに取り組むことが動物実験における肉腫誘発過程の理解に貢献すると考えられた。

方法

【実験1】新生仔期雄SDラットの背部に種々の量のDMBA (Group I: 0, Group II: 1, Group III: 10, Group IV: 100, Group V: 500, Group VI: 1000 μ g) を皮下注射し、腫瘤形成ないし day 250 まで経過観察した後、局所を組織学的に検索した。

【実験2】DMBA 500 μ g を種々の日齢 (Group V: 0, Group VII: 3, Group VIII: 7, Group IX: 14, Group X: 21 日齢) の新生仔期ないし幼仔期雄SDラットの背部に皮下注射し、腫瘤形成ないし day 250 まで経過観察した後、局所を組織学的に検索した。

【実験3】新生仔期雄SDラットの背部にDMBA 500 μ g を皮下注射し、day 7, 14, 21, 49, 63, 77, 91, 105, 109 における局所を組織学的に検索した。

結果

【実験1】Group I, II, III, IV, Vにおいてそれぞれ有効動物数の0, 0, 0, 62, 94%で肉腫が発生し、その内の約半数は横紋筋肉腫であった。肉腫の平均潜伏期間はGroup Vで148日、Group IVで203日であった。横紋筋肉腫の発生頻度はGroup Vで47%、Group IVで15%であった。

【実験2】Group V, VII, VIII, IX, Xにおいてそれぞれ有効動物数の94, 70, 64, 50, 44%で肉腫が発生し、肉腫の平均潜伏期間はそれぞれ148, 173, 157, 196, 203日、横紋筋肉

論文要旨

腫の発生頻度はそれぞれ 47, 50, 27, 14, 22% であった。

〔実験3〕 day 21, 49, 63 では一部のラットにおいて横紋筋芽細胞ないし筋線維芽細胞に類似する間葉系細胞の増殖が見られたが、cluster 形成は明らかでなかった。day 77以降では一部（21～50%）のラットにおいて筋肉層に近接する部に横紋筋細胞様の異型細胞からなる cluster が形成されていた。また day 77以降では一部（7～33%）のラットにおいて DMBA 注射部に生じた cyst に近接する部に筋線維芽細胞様の異型間葉系細胞からなる cluster が形成されていた。

結論

実験2と種々の文献比較より、皮下組織における化学発癌性は新生仔期が最も高いと推察された。実験1, 2で生じた肉腫はいずれも免疫染色（MyoD1, Myoglobin, Desmin, α -SMA, S-100）で比較的一様なパターンを示しており、大まかな組織学的分類が可能と考えられた。横紋筋肉腫の発生頻度は新生仔期に近いほど、また発癌物質の量が多いほど高い傾向が見られ、横紋筋肉腫と他の肉腫との間にはこれらの条件の違いにより感受性が異なると推察された。実験3で見られた横紋筋細胞様の異型細胞からなる cluster 及び筋線維芽細胞様の異型間葉系細胞からなる cluster は、いずれも肉腫の土壌と考えられた。またこれらの病変が発生した部位の違いから、実験1, 2で生じた横紋筋肉腫と他の肉腫は異なる original cells から発生した可能性が推察されたが、これに関しては、間葉系組織における多能性幹細胞の報告があり、現時点で断定できないと考えられた。

Toxicologic Pathology 2006 年 34 巻 4 号 (336-347 頁) 掲載

論文審査の要旨

報告番号	医研第 639 号	氏名	田口 周平
審査委員	主査	小宮 節郎	
	副査	高松 英夫	河野 嘉文

Induction of Sarcomas by a Single Subcutaneous Injection of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene into Neonatal Male Sprague-Dawley Rats: Histopathological and Immunohistochemical Analyses

(新生仔期雄 SD ラットへの 7,12-DMBA 単回皮下注射による肉腫の誘発:組織病理学的及び免疫組織化学的解析)

Toxicologic Pathology 2006; 34: 336-347

過去の動物実験において、胎仔期ないし新生仔期では成熟期と比べて化学発癌物質に対する感受性が高いことと、ラット皮下組織は発癌物質投与後に高率に肉腫を発生することが示されている一方、肉腫の発生過程に関しては不明な点が多い。本研究は、化学発癌物質投与に対する新生仔期ラット皮下組織の感受性、誘発される肉腫の組織像、及び投与後初期の組織像を調べることを目的としている。

新生仔期及び幼仔期の雄 SD ラットの背部皮下に 7,12-DMBA 500 μ g を注射し、腫瘤形成ないし day 250 まで経過観察した後、局所を組織学的に検索した。次に新生仔期雄 SD ラットの背部皮下に DMBA 500 μ g を注射し、腫瘤形成前の初期病変を経時的、組織学的に検索した。

本研究で得られた新知見は以下に要約される。

1. 新生仔期に DMBA 500 μ g を注射された群では高率に腫瘤形成が見られた。組織学的には横紋筋肉腫、悪性線維性組織球腫、平滑筋肉腫などの肉腫からなり、横紋筋肉腫が約半数を占めていた。
2. 肉腫発生頻度は幼仔期よりも新生仔期に注射された群で高かった。
3. 免疫染色で Myoglobin 陰性、MyoD1 陽性を示す肉腫が一定頻度に見られ、電子顕微鏡で Z-band が見られたことから、ヒトの胎児型に類似する横紋筋肉腫と考えられた。
4. 初期病変検索では day 77 以降において、皮筋層に隣接する部に rhabdomyoblast 様の異型間葉系細胞からなる cluster の形成が、DMBA 注射部に生じた嚢胞様病変に隣接する部に非横紋筋系の異型間葉系細胞からなる cluster の形成が見られた。

特に初期病変検索において rhabdomyoblast 様の異型間葉系細胞からなる cluster の発生部位とその他の異型間葉系細胞からなる cluster の発生部位が若干異なったという所見は、発癌物質皮下投与によるラット肉腫誘発実験に対して異なる発生母地という新たな形態的指標を与えたと考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 639 号	氏名	田口 周平
審査委員	主査	小宮 節郎	
	副査	高松 英夫	河野 嘉文

主査および副査の3名は、平成18年12月18日、学位請求者、田口周平君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 論文タイトルで single という語を強調した理由は？
 (回答) 少ない dose の本物質を複数回投与することにより肉腫を誘発した論文もあるためである。

質問2) オスのラットを使った理由は？
 (回答) 特にない。当初はまずオスを調べたらどうかと言うことで、オスを選んだ。

質問3) 言葉の定義を伺いたい。Neonate と infant の違いは？
 (回答) 出生後24時間までが neonate と考えられる。Infant は明確ではないが、生殖可能日齢(70~80 生日)以前の意味で使用した。

質問4) 実験1, 2で腫瘍が20 mm となった時点で解剖した理由は？
 (回答) ラットへの苦痛を緩和させたく、腫瘍が20 mm 大となった時点で解剖した。

質問5) 実験1で高容量(DMBA 1,000 μg)群の死亡率が高いが死因は何か？
 (回答) 1,000 μg 投与群で3匹解剖し、心、肺、肝、腎、脾、骨髄を検索した。いずれも肝臓で高度の脂肪化が見られ、肝不全が死因と考えられた。

質問6) 500 μg 群の生存率は3週までの期間に急に下がっているのはなぜか？
 (回答) DMBA の毒性による死亡と考えられる。この時期の死亡が多いのは、皮下注射による吸収の遅延が推察されるが、はっきりとは分からない。

質問7) 本実験で alveolar type の横紋筋肉腫が発生していない理由はなぜか？
 (回答) Alveolar type は高N/C比の異型細胞が胞巣状に増殖し、線維性隔壁を形成するものと定義されている。本実験では alveolar type と同様の細胞の増殖からなる横紋筋肉腫がみられたが、線維性隔壁形成が明瞭でなかったために、あえて alveolar type に分類しなかった。

質問8) Sesame oil を溶媒として使った理由は？
 (回答) 当教室で伝統的に DMBA を sesame oil に溶いたものを用いて乳癌発癌研究を行っているためであり、それ以外に特に理由はない。

質問9) DMBA を発癌物質として選んだ理由は？
 (回答) 当教室で伝統的に DMBA を用いて乳癌発癌研究を行っているために、それに準じた。DMBA 注射により肉腫を誘発した論文が散見されることも参考にした。

質問10) 成熟ラットに発癌物質を投与した場合、肉腫発生頻度は量に比例するか？
 (回答) 過去の論文で成熟ラットに対し DMBA 8 mg という大量を皮下注射すると肉腫が100%生じていることと、新生仔期ラットを用いた本実験でdoseに比例して肉腫発生頻度が増加する傾向が見られることから、成熟ラットでも同様と思われる。

問 11) 本実験で肉腫が発生した時期はヒトではどの時期に相当するか？

(回答) 実験 I の Group V の平均潜伏期が 150 日位、Group IV の平均潜伏期が 200 日位で、これらはいずれもヒトでは成人に相当する。

質問 12) 臨床の小児領域で見る横紋筋肉腫は本実験で誘発された横紋筋肉腫よりももっと若い時期の発症と考えられるが、本実験における肉腫の発癌機序をどう考えるか？

(回答) 本実験では皮下注射部に嚢胞様病変が永続するため、発癌刺激がある程度の期間継続すると考えられる。ヒトの胎生期に相当する時期に発癌物質を注射され、その時点から発癌刺激が継続し、成熟期に至って腫瘍形成に至ったと考えられる。

質問 13) ヒトの横紋筋肉腫は胎生期の影響によりでてくると考えられるか？

(回答) ヒトの横紋筋肉腫が何故発生するのかについては現在ほとんどわかっていない。胞巣型横紋筋肉腫では t(1;13) や t(2;13) により特異的なキメラ遺伝子が形成され、12q13-15 や 2p24 領域の遺伝子が増幅されるという。胎児型横紋筋肉腫や多形型横紋筋肉腫では複雑な染色体異常が報告されているが、特異的な染色体異常は見出されていない。横紋筋肉腫は兄弟発生が少ないことや、その他の種々の腫瘍が合併しやすい点が特徴として挙げられている。

質問 14) 異型 rhabdomyoblast が発癌物質注入部より少し離れたところに増殖するメカニズムはどう考えられるか？

(回答) 皮筋層に隣接した部に異型 rhabdomyoblast からなる cluster が生じているので、注入操作による皮筋層骨格筋の破壊と再生が関係していると推察している。

質問 15) 注入部位を腹腔内に投与した場合には癌が発生するのではないか？

(回答) 発癌剤を腹腔内に注射して他臓器に癌を誘発した実験はあるが、局所に中皮腫などが多数発生したと言う論文は検索範囲で見られない。

質問 16) 発生母地、注入部位によって発生する腫瘍は癌あるいは肉腫と異なり、また組織型も異なるのではないか？

(回答) はい。DMBA では経口投与による乳癌、皮膚塗布による扁平上皮癌、腹腔内投与による子宮血管腫、卵巣内注射による卵巣癌誘発の実験がある。

質問 17) ヒトでは横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、悪性線維性組織球腫が筋肉内に発生することが多くて皮下での発生は少ないが、筋肉内注射を選ばなかったのはなぜか？

(回答) 発癌物質の筋肉内注射により筋肉損傷が生じ、成長するラットに苦痛となると考えられたため、筋肉内注射を選ばなかった。

質問 18) 発癌剤が単一で投与量も一定にした単純な実験系なのに、多種の腫瘍が発生しているのは何故か？

(回答) DMBA 注射部 cyst 隣接部に筋線維芽細胞様の非横紋筋系間葉細胞が増生しており、間葉系細胞は多分化能があるので、それらが種々の肉腫となっていったと推測する。

質問 19) できた腫瘍を別のラットに移植できる可能性は？

(回答) 移植は本実験で用いたラットでは可能と考えられる。なぜなら当教室では DMBA 誘発の乳癌を同じラットに移植した実験を行えているからである。

質問 20) 移植した場合、脱分化がよく見られるが、組織像はどう変化するとと思われるか？

(回答) 大変興味があることで、それらを今後検索することが大事だと思われる。

質問 21) リンパ節転移、他臓器転移はあったか？

(回答) 胸腔、腹腔を肉眼的に全例見たが、転移があったのは 2 例しかなかった。いずれも原発巣は多形性悪性線維性組織球腫様の腫瘍で、胸腔内、腹腔内、骨格筋に転移していた。リンパ節腫大はなく、転移部の組織にリンパ節構造はなかった。

質問 22) 横紋筋肉腫の診断の拠り所とした電顕写真で、Z-band は周期の点で問題ないか？

(回答) Z-band の周期を計測したら 2-3 μm であった。ラットのヒラメ筋の sarcomere の長さは 2.1 μm 未満という報告があるが、これは受動的短縮時の計測であるので、本電顕写真の Z-band 様構造は周期の点で横紋筋の Z-band に矛盾しないと考える。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。