



生体内での化学発癌剤誘発染色体切断および姉妹染色分体交換に対する造血刺激、sudan III 前処置の影響について

宗野, 和彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-05-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0627

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000627>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	そ 宗	の	か 野	ひ 和	と 彦	(兵庫県)
学位の種類	医学博士					
学位記番号	医博い第513号					
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当					
学位授与の日付	昭和61年5月31日					
学位論文題目	生体内での化学発癌剤誘発染色体切断および姉妹染色分体交換に対する造血刺激, Sudan III 前処置の影響について					
審査委員	主査	教授	杉	山	武	敏
		教授	伊	東	宏	教授 藤原美定

論文内容の要旨

〔緒言〕

姉妹染色分体間での染色体組換え, すなわち, 姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange, 以下SCEと略す) は, Taylorらが³H-thymidineによるオートラジオグラフィによるDNAの半保存的複製様式とともに発見したものである。さらに, Lattが確立した5-bromodeoxyuridine (BrdU) 標識法により姉妹染色分体分染法が改良されて, SCE現象は広く注目されるようになり, SCEの本態, 生成機構, 染色体異常との関連などの研究が進められているが, 依然不明な点が多い。現在, SCEはDNA損傷の1つの鋭敏な指標として注目され, 化学物質のSCE誘発能と変異原性・癌原性との相関が注目されている。杉山, 植田らは7,12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA), 8,12-trimethylbenz [a] anthracene (TMBA) などで誘発した染色体切断 (gapも含み, 以下CAと略す) と *in vitro* でのSCEの染色体内の分布が一致すること, DMBA投与24時間前に与えた採血 (貧血) や多血刺激でDMBAによるCAが, それぞれ増加, または減少することを示した。また, 伊藤らはazo色素, Sudan IIIの前処置がDMBA誘発CAを著しく抑制することを示した。

今回の研究では, *in vivo* の条件下で, SCEおよびCAが, (a) 共に造血刺激に依存するか, (b) 共にSudan IIIでの抑制を受けるかを検討し, SCEとCAとの相関関係について考察を試みた。

〔材料と方法〕

使用動物はLong-Evans系のラットで, 生後約30日の体重60~80gの雄を用いた。発癌剤としてD

MBA脂肪乳剤は50mg/kg体重を尾静脈より注射し、1-nitroso-1-butylurea (NBU) は、200mg/kg体重を胃のゾンデを用いて経口投与した。貧血は心臓穿刺で2.5ml/100g体重の割合で採血により、多血症は80% (v/v) の洗浄赤血球の生理食塩水浮遊液を、3ml/100g体重の割合で尾静脈内に投与して誘発した。SudanⅢ前処置は、SudanⅢを綿実油にとかしてDMBA投与の24時間前に胃ゾンデで2 mg/100g体重の割合で経口投与した。

染色体標本は屠殺1時間前に0.1% colchicineを0.3ml腹腔内に投与し、大腿骨骨髓細胞を用いて空気乾燥法で作製した。姉妹染色分体分染にはGotoらの方法を用いた。In vivoのBrdU投与方法としてBrdUをオブラートに包み、屠殺の24時間前に皮下に手術的に埋めこむ著者らの開発した方法をとった。染色体分析では染色体異常 (chromosome aberrations:CA) は1個体について100細胞、SCEは30細胞の染色体について単純Giemsa法で検索し、何れも細胞あたりの頻度で表現した。CAとSCEの染色体内での分布は、最も長い#1、#2の2染色体の長軸に沿って動原体からの相対距離を写真の上で計測し、染色体軸上にplotし、染色体上でのヒストグラムとして表わした。

〔結 果〕

(1)SCE検出可能な必要最小限のBrdU量は50mg/30g体重 (約1.7mg/g体重) であり、CAおよびSCEの頻度は、SCEの検出限界以上の範囲で両者共にBrdUの使用量に比例して増加した。また、8個体のBrdU50mg/30g体重投与時におけるCAおよびSCEは、細胞当たりそれぞれ0.09±0.03, 5.80±1.22であり、これを対照値とした。

(2)DMBA投与後、6、9時間後のCA及びSCEは、いずれも対照に比して増加し、CAの増加とSCEの増加とは一定の相関を示したが、18時間後ではSCEの頻度の増加とCAのそれとの間には多少のgapが見られた。NBUに関しては、投与後1時間では対照に比してCAは増加を示したが、SCEは増加を認めなかった。しかし、3、6時間後では、CA及びSCEはいずれも相関して増加し、時間依存性を示した。

(3)CA及びSCE誘発に対する造血刺激の影響については、DMBA投与後6時間、NBU投与後1,6時間では、前処置なしの群に比して、貧血群では何れも増加を示し、多血群ではいずれも減少を示した。

(4)DMBAによるCAおよびSCE誘発に対するSudanⅢ前処置の影響については、SudanⅢ前処置のDMBA投与後6時間のCAおよびSCEは、無処置に比して何れも減少を示した。

(5)CAとSCEとの相関については、対照群8個体、DMBA投与6時間の前処置なし、貧血、多血群、およびSudanⅢ前処置群、それぞれ4個体をプロットすると、 $y=0.066x-0.2543$ の直線上に乗ることが示された。

(6)造血刺激下におけるDMBAおよびNBU投与後6時間でのSCEの染色体内分布は、NBUでは前処置なし、貧血、多血群ともに#1染色体では動原体より約40%の部分、#2では30%と55%の部分に鋭くSCEが集中した。DMBAもNBU同様のパターンを示した。

〔考 察〕

現在SCEの検出にはBrdU標識法が用いられているが、今回の実験ではBrdUそれ自体が明らかにCAとSCEを誘発する薬剤であり、自然状態でのSCEおよびCAのBrdU濃度依存性が示された。Sudan IIIのDMBA不括性化を利用してCAとSCEの関係を調べたが、Sudan IIIはDMBA誘発CAおよびSCEの両方を抑制した。このことは、CA及びSCEの形成とそのSudan IIIによる抑制が共通の基盤に立つことを示している。

骨髄造血を刺激するerythropoietinが、DMBAによるSCE誘発をCA同様に促進するか否かを検討した結果、造血刺激はDMBAによるCA、SCEのみならずNBUによるCA、SCEをも増加させた。このerythropoietinのCA、SCE亢進作用は、化学発癌剤よりも細胞側に原因があり、おそらく転写の活性化によって発癌剤のDNA標的を拡げ、DNA損傷を亢進するものと考えられた。

染色体損傷の切断点 (breakpoint) の分布については多くの報告があるが、NBU、DMBAを用い、*in vivo*での切断点とSCEの局在を検討した結果、ほぼ同じ分布のpatternをとることが明らかになり、CAとSCEが関連した現象であることが示唆された。

CAとSCEのこのような平行性にもかかわらず、厳格には多少の解離がある。直接的に作用する癌原物質のNBUを用いた場合、投与後1時間でCAは上昇したがSCEは上昇しなかった。これと投与後6時間までのCAとSCEの頻度の起き方の解離の事実は、SCE形成にはDNA合成期を経ることが必要で、1時間以内のDNA損傷ではSCE形成が出来ないことを示している。また、DMBAの場合、投与後9時間まではCAとSCEは相関を示すが、18時間では両者の解離が認められた。これもDMBAによるDNA損傷が修復されずに切断やgapとして残ったものが相対的に増加したためと思われる。このようにSCEはいわゆるDNA損傷の修復過程に出来るもので、CAとSCEの発生に多くの共通過程はあるが、CAと根源的に異なる現象の可能性も完全には否定出来ないと考えられた。³H-dTやBrdUを使用する場合、標識物質によるCA、SCEが共に増加し、しかもSCEはこれらを用いずに証明が困難であるので、これらを使わないSCEの評価法の確立が望まれる。

論文審査の結果の要旨

今日、癌の発生機序の解明は急速に進みつつある。それは癌がいわゆる細胞性癌遺伝子（発癌遺伝子）の発現による細胞増殖制御異常であることが明らかになってきたからで、しかも、癌遺伝子が組換えられたり、核酸の塩基の異常などで発現の亢進、遺伝子の制御異常につながる事が明白になってきた。

この事実とは別に、発癌剤が細胞のDNAに作用して姉妹染色分体の間の組換え（SCE）を引き起こすことを杉山が1969年に初めて明らかにし、発癌作用との関係を推定した。その後、SCEを証明する方法が著しく改良され、発生機序、発癌作用との関係、癌原性スクリーニングへの応用に関して多くの研究が発表されるようになった。一方、発癌剤には染色体を切断する性質（CA）があるこ

とが以前から知られていた。これも一般に発癌剤と正に相関する。この意味で、この現象も発癌性の予知に利用された。

この両現象の関係について、今日なお意見の一致を見ていない。1955年にまずRevellが染色体切断現象を説明するうえで、SCEの関与を推定せざるを得ないと結論し、CAとSCEとの因果的な関係を推定した。これが有名な染色体切断の交換仮説である。この仮説に関して、まずTaylorが放射線の作用によるSCE現象を放射性同位元素による標識法で根拠のあることを証明した。

杉山ら、植田らはDMBA, 7, 8, 12-trimethylbenz (a) anthracene(TMBA)などで誘発した*in vivo*のCAと*in vitro*でのSCEでの染色体内の分布が一致すること、DMBA投与24時間前に与えた採血(貧血)や多血刺戟でDMBAによるCAが、それぞれ増加、または減少することを示した。また、伊藤らはazo色素、SudanⅢの前処置がDMBA誘発CAを著しく抑制することを示した。これらの処置は、杉山、Hugginsらによって発癌にも影響することが知られているものである。

本研究者は、*in vivo*の条件下で、SCEおよびCAが、(a)共に造血刺戟に依存するかどうか、(b)共にSudanⅢでの抑制を受けるかどうかを検討することによって、SCE、CA両現象の平行関係、すなわち、同一性を明らかにしようとした。そして結論として、一部の現象を除いてSCEの増加するさいはCAも相伴って増加すること、減少するときには相伴って減少することを示し、両者は同一現象の2つの面であるとの仮説に矛盾しないことを示した。

また、同位元素法と同様に、BrdUはSCEの証明に不可欠で、しかも最低約1.7mg/g体重の投与が必要で、それ以上の量ではCA、SCE共、BrdUの使用量に比例して増加した。しかも染色分体分染の限界点におけるBrdU量でのSCEの発生はCAに比べてかなり高く、このSCE作用がSCE、CA誘発についての一部の不一致の原因になっている可能性がある考え、thymidineやBrdUを使用しないSCEの検出法がない以上、相互の関係の追及にも限界があるとした。

このように、本研究者は化学発癌剤の染色体作用のうち、発癌に関係があるとされるSCEとCAのSudanⅢ作用下、増殖刺激下の頻度を解析して、このような人為的な影響条件下での増減に関しても、両者間に正の相関があることを示して、両者の因果関係の存在を推定した。この成果は両者の関係と本態解明に新しい知見を加えたもので、この分野の研究、および細胞癌化機序解明に貢献した。よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認めた。