



Ethyl nitrosourea 経胎盤誘発脳腫瘍モデルにおける 12-O-tetradecaoyl-phorbol-13-acetate の発癌促進 効果

穀内, 隆

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1991-01-23

(Date of Publication)

2012-07-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1488

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3057254>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001488>

※ 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。



Ethyl nitrosourea 経胎盤誘発脳腫瘍モデルにおける
12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate の発癌促進効果

神戸大学医学部脳神経外科教室（指導：松本 悟教授）

穀 内 隆

神戸大学医学部紀要 第50巻 第1号 別刷

平成元年3月

EthylNitrosourea 経胎盤誘発脳腫瘍モデルにおける 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate の発癌促進効果

神戸大学医学部脳神経外科教室 (指導: 松本 悟教授)

穀 内 隆

(平成元年2月23日 受付)

要 約

マウス皮膚発癌モデルにおいて二段階発癌理論が提唱されて以来、種々の臓器における発癌プロモーターが報告されているが、脳腫瘍モデルにおいては、発癌プロモーターの作用は報告されていない。今回、EthylNitrosourea (ENU) 経胎盤誘発脳腫瘍モデルに対する 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) の発癌促進効果を in vivo-in vitro assay 系および ENU 誘発後の microtumor 発生過程の両面より検討を加えた。その結果、ENU を発癌剤として投与されたラット胎仔脳細胞の悪性変化に対して、TPA が強いプロモーター作用を示し、さらに ENU 経胎盤誘発後の microtumor の発生に対して、TPA が促進効果を示す点が明らかになった。以上より、中枢神経系の発癌過程で二段階発癌理論が適応されることが示唆された。

緒 言

マウス皮膚発癌モデルにおいて二段階発癌理論が証明されて以来¹⁾、種々の臓器^{2, 3, 4)}、培養系⁵⁾等において、種々の発癌プロモーターが報告されている。なかでも croton triglium より抽出された diterpene alcohol phorbol ester は、最も強力な皮膚発癌プロモーターであり⁶⁾、特に 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) は、種々の組織に対して発癌促進作用を示すとされている^{2, 7)}。他方、脳腫瘍モデルにおいては、発癌プロモーターの作用は現在まで報告されていない。今回、EthylNitrosourea (ENU) 経胎盤誘発脳腫瘍モデルにおける TPA の発癌促進効果を、in vivo-in vitro assay 系⁸⁾および ENU 誘発後の microtumor 発生過程の両面より検討を加えた。

材料および方法

1, In vivo での ENU 処理 (Fig. 1)。

IN VIVO

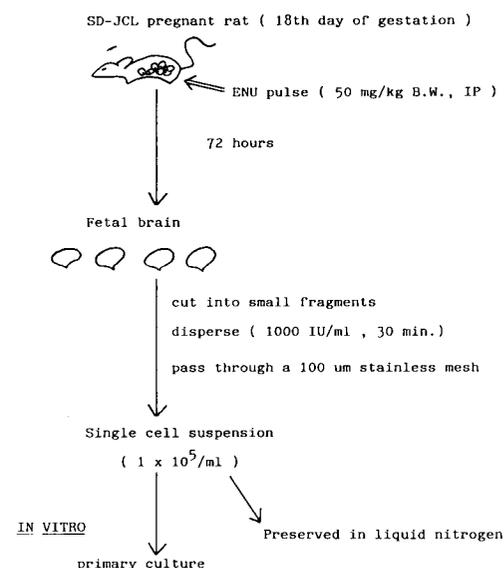


Fig. 1 : Method of in vivo-in vitro assay.

妊娠18日目の SD-JCL ラット (平均体重250g) に、ENU を disodium phosphate buffer, pH6.0 に溶解後直ちに 50mg/kg B.W. を腹腔内に投与した。一方、妊娠18日目の SD-JCL ラットの腹腔内に、ENU の溶解液のみを投与したラットを対照群とした。培養系への移行は、ENU 投与72時間後に、胎仔脳組織を無菌的に摘出し、0.5mm角に細切、Disperse 処理 (1000IU/ml, 30min.) の後、100μm ステンレスメッシュを通して、単離細胞として 60mm Petri dish に plating を行って培養系に移した。実験は、

key words : EthylNitrosourea, brain tumor, tumor promoter, neurogenic carcinogenesis, two-stage carcinogenesis.

ENU 投与胎仔脳細胞および ENU 非投与胎仔脳細胞 (対照群) を各々以下の6群にわけ、培養系での悪性転化を観察した。1), 無処理, 2), アセトン処理 (0.01% V/V), 3), TPA (0.1ng/ml) 処理, 4), TPA (1.0ng/ml) 処理, 5), TPA (10.0ng/ml) 処理, および6), TPA (50.0ng/ml) 処理。

2, 単層培養系。
培養液として、Eagle minimum essential medium に、10%胎仔牛血清、L-glutamine (398 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、および抗生物質 (penicillin G 100IU/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した growth medium を用い、37°C CO₂ incubator にて 5% CO₂・95% Air の条件下に単層培養を行った。細胞が confluent に達した時点で、0.25%トリプシン処理を10分間行って継代維持した。

3, 発癌プロモーター処理。

発癌プロモーターとしては、TPA を用い、初代培養時より、TPA をアセトンで溶解後、growth medium で希釈して各群の培養液中に添加した。なおアセトンの最終濃度は、0.01% (V/V) に調整し、TPA とアセトンは、週2回交換した。また各実験群で最低3つの dish を用いて実験を行った。

4, In vitro での発癌過程の解明。

細胞の経時的形態学的変化は、位相差顕微鏡にて観察を行った。

細胞増殖の経時的変化は、各群の成長曲線を求め、population doubling time を算出して検討した。

軟寒天上でのコロニー形成能は、MacPherson and Montagnier の方法⁹⁾に準じた。すなわち、 1×10^5 個の単離細胞を 0.3% Noble special agar を含んだ 4 ml の growth medium に浮遊させ、60-mm Petri dish 内の 0.5% 軟寒天上に重畳した。以後約2週間培養を続け、50個以上の細胞から成るコロニーを数え、plating efficacy を算出した。なおコロニー数が10個以下 (plating efficacy : 0.01% 以下) の場合は、コロニー形成能なしと判定した。実験は、1つの実験群に対して triplicate して行い、平均と標準偏差を算出して統計学的処理を行った。

植物凝集素 concanavalin A (Con A) に対する細胞凝集能の変化は、Kakizoe ら^{10, 11)}の方法を若干改良して行った。つまり Con A (200 または 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含む phosphate buffered saline (pH 7.2) 40 μl に、 4×10^3 個の単離細胞を浮遊させ、micromixer にて、37°C, 30分間攪拌し、凝集細胞を hemocytometer にて計算した。50個以上の細胞より成る凝集塊を陽性と判定し、200個の単離細胞に対する凝集塊の percentage を算定した。なお、そ

れぞれの群での実験は、すべて triplicate して行った。また、Con A の競合阻害剤 α -methyl-D-mannoside (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加して、Con A 凝集能の阻害反応に関して検討を加えた。

In vivo への可移植性の検討は、培養開始後60, 90, 120, 150, および180日目の各実験群の単離細胞 (1×10^5 個) を、10 μl の培養液に浮遊させ、4週令雄 SD-JCL ラットの右頭頂葉内に経眼窩的に移植した。移植30日後に、ラットを屠殺し肉眼的および組織学的に移植部位の腫瘍形成を確認した。

5, glial fibrillary acidic protein (GFAP) および S-100 蛋白に対する免疫組織化学。

培養細胞を、冷 McClean's paraformaldehyde-periodinate-lysine 液で30分間固定後、PBS で2回洗浄。ウサギ抗 GFAP およびウサギ抗 S-100 蛋白抗体 (Dako Corp., Santa Barbara) を用いて、peroxidase-antiperoxidase 法¹²⁾で、GFAP および S-100 蛋白の発現を検討した。

6, In vivo 実験。

妊娠18日目の SD-JCL ラット24匹に対して、ENU (50mg/kg B.W.) を腹腔内に投与後、以下の6群に分け、各種処理を行った。1), 無処理群, 2), 0.01% アセトン処理群, 3), TPA (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 処理群, 4), TPA (1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 処理群, 5), TPA (10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 処理群, および6), TPA (50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 処理群。TPAは、アセトンで溶解後、生理食塩水にて希釈し投与した。アセトンの最終濃度は、0.01% (V/V) に調整した。なお、TPA およびアセトンの投与は、胎生期は連日、新生仔期は、生後20週令まで週2回腹腔内投与を行った。その後、各群4匹づつの新生仔ラットを、生直後、1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, および20週令に屠殺し、摘出脳を 100 μm の連続切片として、microtumor の発生を組織学的に検討した。なお microtumor の判定は、直径1mm以下の腫瘍を Wechsler 等の方法¹³⁾に基づいた。

結 果

1, 培養ラット胎仔脳細胞の形態学的変化。

ENU 処理群および対照群の初代培養細胞の形態を対比すると、両群共に類似の細胞形態を示しており、胞体が大きく扁平な上皮様の細胞を中心に、その細胞に重なって細長い細胞突起を有する小さな細胞が認められた (Fig. 2)。これら培養細胞では、GFAP (Fig. 3 A) および S-100 蛋白 (Fig. 3 B) 共に強陽性所見を示した。また培養後期の癌性変化をきたした細胞においても、GFAP および S-100 蛋白は、



Fig. 2 : Morphology of primary cultured cells. Phase contrast, $\times 400$.

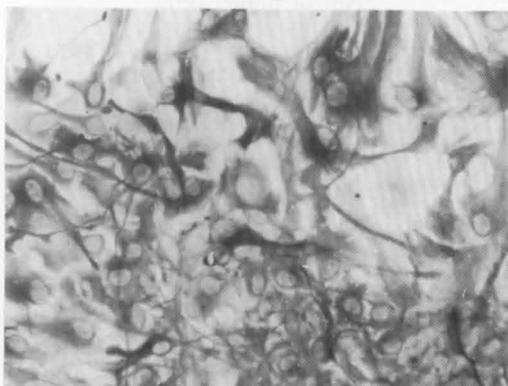
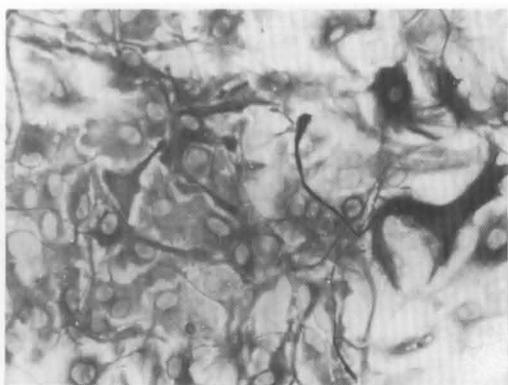


Fig. 3 : Immunohistochemical stains of GFAP (A) and S-100 protein (B) in the ENU-exposed cells at primary culture. $\times 400$.

弱陽性所見を維持していた。

培養30日後、TPA 添加 ENU 処理群では、典型的な “piled up focus” を示し始めた (Fig. 4 A)。一方 TPA 非添加 ENU 処理群では、confluent の状態で規則的な敷石状配列を示していた (Fig. 4 B)。

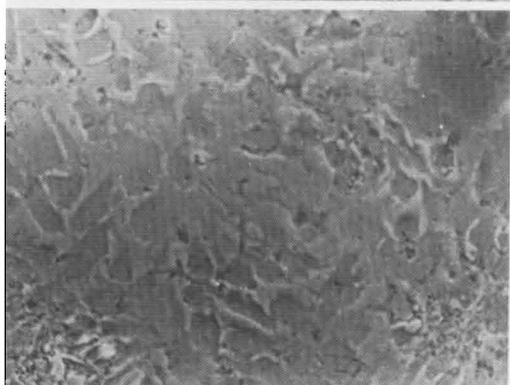
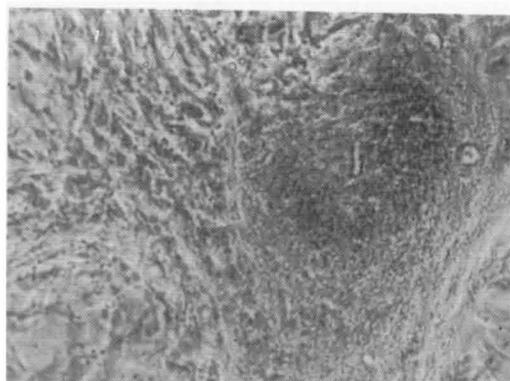


Fig. 4 : Morphologies of cultured cells at 30 days after culture. A ; ENU-exposed cells treated with TPA (1.0 ng/ml). B ; ENU-exposed cells. Phase contrast, $\times 400$.

さらに、TPA 非添加 ENU 処理群における “piled up focus” の出現は、培養120日目頃より認められ始めた。個々の細胞の形態学的変化をみると、培養90日目頃より、TPA 添加 ENU 処理群で胞体の縮小化と bipolar な細長い細胞突起が認められ始めた (Fig. 5 A)。一方、TPA 非添加 ENU 処理群の細胞形態は、培養90日目以後もほぼ初代培養時の形態を保っていた (Fig. 5 B)。またアセトン添加 ENU 処理群では、TPA 非添加 ENU 処理群と同様の細胞形態を示していた。さらに対照群 (ENU 非投与群) においては、TPA 添加の有無にかかわらず形態学的変化は認められなかった。

2. 細胞増殖におよぼす変化 (Fig. 6)。

初代培養時の population doubling time は、対照群では、 41.2 ± 1.1 時間を示し、TPA 非添加 ENU 処理群では、 42.1 ± 2.1 時間と両者に有意な差を認めなかった ($P > 0.2$)。しかしながら TPA 添加 ENU 処理群では、培養30日目頃より population doubling time は、 22.8 ± 2.9 時間と急激に促進し、

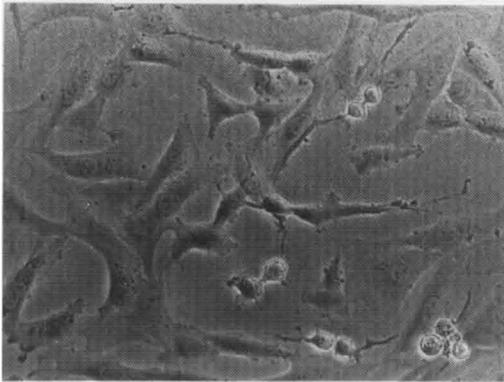
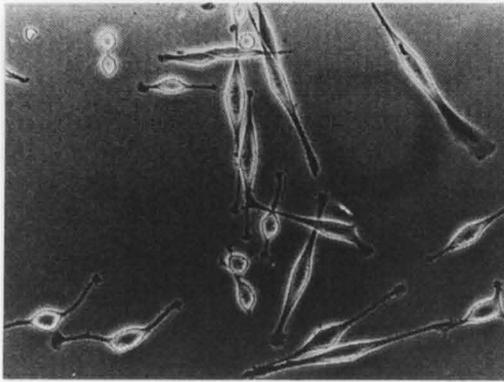


Fig. 5 : Morphologies of cultured cells at 90 days after culture. A ; ENU-exposed cells treated with TPA (1.0 ng/ml). B ; ENU-exposed cells. Phase contrast, $\times 400$.

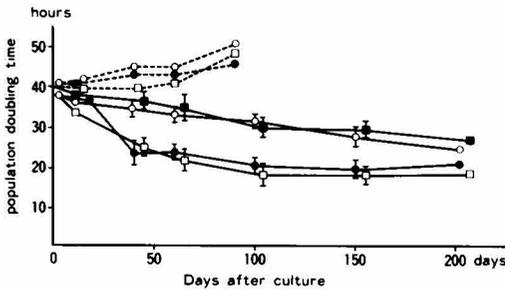


Fig. 6 : Changes of population doubling times in each experimental group. \bigcirc — \bigcirc ; control group, \bullet — \bullet ; control group treated with TPA (1.0 ng/ml), \square — \square ; control group treated with TPA (50.0 ng/ml), \bigcirc — \bigcirc ; ENU group, \bullet — \bullet ; ENU group treated with TPA (1.0 ng/ml), \square — \square ; ENU group treated with TPA (50.0 ng/ml), \blacksquare — \blacksquare ; ENU group treated with 0.01 acetone. Points, mean of 3 replicate cultures ; bars, standard deviation.

TPA 非添加 ENU 処理群の 36.2 ± 3.1 時間に比べ有らかな有意差を認めた ($P < 0.001$)。一方、アセトン添加 ENU 処理群では、TPA 非添加 ENU 処理群に比べて有意差を認めなかった ($P > 0.2$)。また対照群では、TPA 添加の有無にかかわらず、培養 100 日目以後は、細胞増殖は認められず、死滅する傾向にあった。

3, 軟寒天上でのコロニー形成能の変化 (Table 1)。

Table 1 : Changes of colony forming efficacy in semisolid soft agar medium at various intervals after culture.

Experimental group	Days after culture							
	0 day	10 days	20 days	40 days	80 days	120 days	150 days	180 days
ENU only	0	0	0	<0.01	0.04 $\pm 0.021^a$	0.088 ± 0.067	1.8 ± 0.51	3.6 ± 1.11
ENU plus TPA (1.0 ng/ml)	/	<0.01	0.018 ± 0.007	2.88 $\pm 0.91^b$	9.02 $\pm 3.10^b$	9.31 $\pm 2.71^b$	8.81 $\pm 5.6^c$	9.06 $\pm 4.3^d$
ENU plus TPA (1.0 ng/ml)	/	0.626 ± 0.016	0.09 ± 0.01	2.50 $\pm 0.72^b$	9.10 $\pm 5.50^b$	11.20 $\pm 3.21^b$	9.92 $\pm 4.15^c$	7.61 $\pm 8.12^d$
ENU plus TPA (10.0 ng/ml)	/	<0.01	0.051 ± 0.013	1.92 $\pm 1.08^b$	6.63 $\pm 2.35^b$	8.52 $\pm 3.55^b$	9.56 $\pm 3.86^c$	8.71 $\pm 4.20^d$
ENU plus TPA (50.0 ng/ml)	/	0.037 ± 0.038	0.093 ± 0.04	3.97 $\pm 1.59^b$	8.31 $\pm 2.51^b$	7.59 $\pm 2.60^b$	7.51 $\pm 3.30^c$	8.12 $\pm 3.20^d$
ENU plus acetone (0.01%)	/	0	0	0	0.031 $\pm 0.005^a$	0.11 $\pm 0.03^a$	1.21 $\pm 0.20^a$	2.1 $\pm 0.97^a$

- a plating efficacy (%) in semisolid soft agar was calculated as follows ;

$$\% = \frac{\text{No. of colony}}{\text{No. of plated cells}} \times 100$$
- b differs from the ENU group at $P < 0.005$.
- c differs from the ENU group at $P < 0.005$.
- d not significant.

培養40日目には、TPA 非添加 ENU 処理群では、いまだにコロニー形成能が認められないのに対して、TPA (1.0 ng/ml) 添加 ENU 処理群では、plating efficacy は、 $2.50 \pm 0.72\%$ を示し早期のコロニー形成能の獲得を認めた。培養150日目には、TPA 非添加 ENU 処理群においても、 $1.8 \pm 0.51\%$ の plating efficacy を示したが、TPA (1.0 ng/ml) 添加 ENU 処理群の $9.92 \pm 4.15\%$ に比べると低値を示していた ($P < 0.05$)。また対照群では、TPA 添加の有無にかかわらずコロニー形成能は認められなかった。

4, Con A 凝集能の変化 (Fig. 7)。

TPA 添加 ENU 処理群では、培養30HH頃より、Con A 凝集能が亢進し始めたが、一方、TPA 非添加 ENU 処理群では、Con A 凝集能の亢進は、培養90日目頃より認められ始めた。この Con A

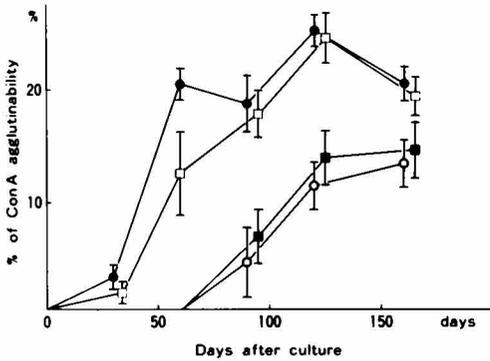


Fig. 7 : Changes of percentage of Con A agglutnability in each experimental group at various intervals after culture. ○ ; ENU, ● ; ENU group treated with TPA (1.0 ng/ml), □ ; ENU group treated with TPA (50.0 ng/ml) ■ ; ENU group treated with 0.01% acetone. Points, mean of 3 replicate cultures ; bars,S.D.

では、60~100% と高率の可移植性を示していた。なお、アセトン添加 ENU 処理群では、TPA 非添加 ENU 処理群と比べて可移植率に有意差を認めなかった。

脳内移植後30日目の肉眼的所見を検討すると、TPA 添加 ENU 処理群では、中心部壊死を有する macrotumor が周囲組織とは境界鮮明に増殖していた (Fig. 8)。

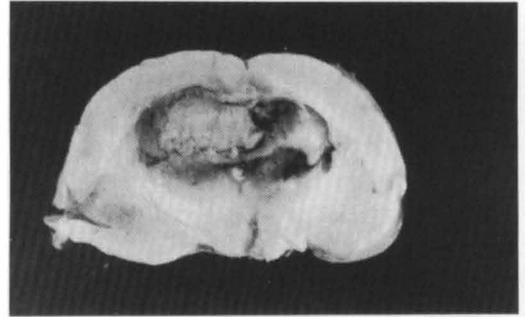


Fig. 8 : Macrotumor at 30 days after the implantation of cultured cells of ENU group treated with TPA (1.0 ng/ml).

凝集能は、20 μg/ml α-methyl-D-manno side 添加によって完全に抑制された。なお、対照群では Con A 凝集能は認められなかった。

5, In vivo への可移植性の変化 (Table 2)。

Table 2 : Tumorigenicity of cultured cells in vivo.

Experimental Group	Days after culture				
	60 days	90 days	120 days	150 days	180 days
ENU only	0/8 (0)*	0/10 (0)	0/9 (0)	1/10 (10)	2/10 (20)
ENU plus TPA (1.0ng/ml)	2/8 (25)	8/10 (80)	9/9 (100)	10/10 (100)	5/5 (100)
ENU plus TPA (10.0ng/ml)	1/8 (12.5)	5/10 (50)	7/10 (70)	7/10 (70)	4/5 (80)
ENU plus TPA (50.0ng/ml)	1/5 (20)	6/8 (75)	6/10 (60)	6/10 (60)	5/5 (100)
ENU plus acetone (0.01%)	0/6 (0)	0/5 (0)	0/6 (0)	0/10 (0)	1/5 (20)

a

$$\% = \frac{\text{No. of rats formed tumor}}{\text{No. of rats for implantation}} \times 100$$

Numbers in parenthesis, percentage of tumorigenicity was calculated as follows ;

TPA 添加 ENU 処理群では、培養60日目ですでに 12.5~25.0% の可移植性を獲得したのに対して、TPA 非添加 ENU 処理群では、培養150日目に至って始めて 10% の可移植性を獲得したのにすぎなかった。さらに培養150日目の TPA 添加 ENU 処理群

TPA 非添加 ENU 処理群の肉眼的所見も TPA 添加 ENU 処理群とは、明らかな差異を認めなかった。組織学的所見では、TPA 添加 ENU 処理群では、高い細胞密度を示し、個々の細胞形態はほぼ均一で、mitosis も豊富に認められた (Fig. 9 A)。一方、TPA 非添加 ENU 処理群では、より疎な細胞配列を示し、壊死部が多く、個々の細胞形態は pleomorphic であり多核巨細胞を多く含んでいた (Fig. 9 B)。

6, In vivo 実験。

ENU 処理群 (group 1) における microtumor の出現は、生後10週令で認められ、アセトンと ENU 処理群 (group 2) との間に有意差を認めなかった。一方、TPA と ENU 処理群では、microtumor (Fig. 10) は、生後3週令で最も早期に確認し得た (Table, 3)。なお、TPA 単独処理では、何ら発癌効果は認められなかった。次に、microtumor の発生部位をみると (Table 4), ENU 処理群では、subependymal area (55.6%) と white matter (44.4%) に発生しているのに対して、TPA 処理を加えることによって、cortex にも microtumor の発生が認められた。microtumor の組織学的検討では (Table 5), TPA と ENU 処理群では、mixed glioma のなかで pleomorphic type が主体を占めるのに比べて (Fig. 11A), ENU 処理群では、

isomorphous type が主体を占めていた (Fig. 11B)。

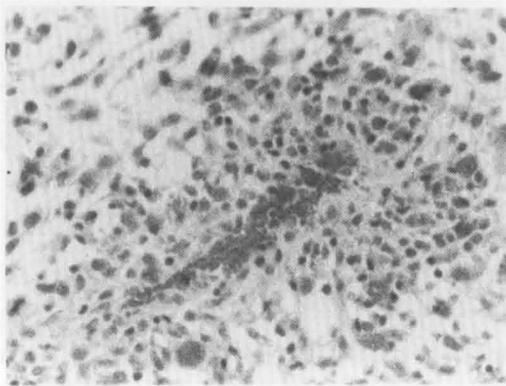
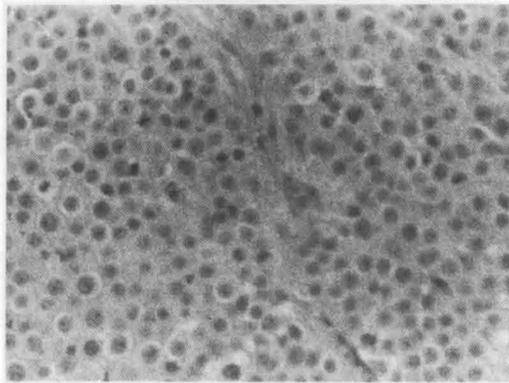


Fig. 9 : Photomicrographs showed the histological findings of growing tumors at 30 days after the implantation of cultured cells at 150th day after culture. A ; ENU group treated with TPA (1.0ng/ml). B ; ENU group. H&E, ×400.

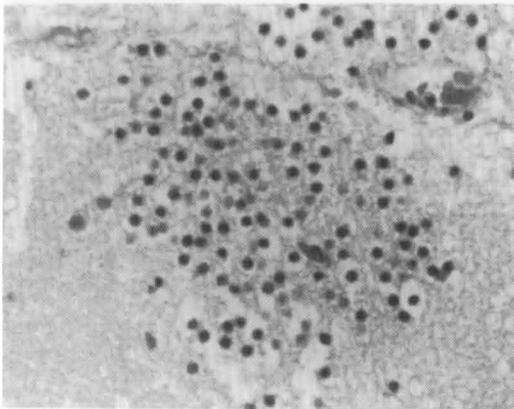


Fig.10 : Microtumor at subependymal area developed at 3-week-old treated with TPA (1.0 ug/kg) after the initiation with ENU. H&E, ×200.

Table 3 : Incidence of microtumors at an appropriate time of autopsy treated with various doses of TPA or 0.01% acetone following the transplacental exposure of ENU.

Group	Treatment	gestate	Time of autopsy								No. of tumors / No. of tumor-
			1-	3-	5-	7-	10-	12-	15-	20-week-old	
1	ENU	0/4 ^{a)}	0/4	0/4	0/4	1/4	3/4	3/4	3/4	3/4	9/23
2	ENU + 0.1% acetone	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	3/4	3/4	3/4	9/23 ^{b)}
3	ENU + TPA(0.1μg/kg)	0/4	0/4	0/4	1/4	3/4	4/4	3/4	4/4	4/4	18/14 ^{c)}
4	ENU + TPA(1.0μg/kg)	0/4	0/4	0/4	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	20/12 ^{d)}
5	ENU + TPA(10.0μg/kg)	0/4	0/4	1/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	23/9 ^{e)}
6	ENU + TPA(50.0μg/kg)	0/4	0/4	1/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	22/18 ^{e)}

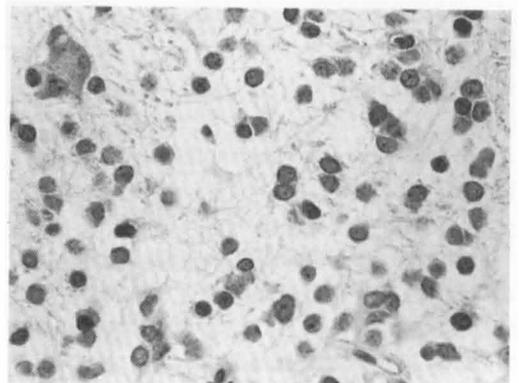
- * Cumulative incidence of tumors.
- a) No. of rats with tumor/No. of autopsied rats
- b) Statistically not significant differences versus group 1.
- c) Statistically significant differences versus group 1 (P<0.05).
- d) Statistically significant differences versus group 1 (P<0.05).
- e) Statistically significant differences versus group 1 (P<0.05).

Table 4 : Location of microtumors.

Group	Cerebrum				
	subependymal area	white matter	cortex	Pons	Cerebellum
1	5 (56.2%)	4 (41.4)	0	0	0
2	6 (64.7)	3 (31.3)	0	0	0
3	8 (47.1)	7 (41.2)	2 (11.8)	0	0
4	11 (55.0)	8 (40.0)	1 (5.0)	0	0
5	11 (47.8)	10 (41.1)	2 (8.7)	1 (4.3)	0
6	12 (54.5)	7 (31.8)	3 (13.0)	0	0

Table 5 : Histological findings of microtumors.

Group	Oligodendrogloma	Astrocytoma	Mixed glioma				Unclassified
			isomorphous	pleomorphic	Glioblastoma	Ependyma	
1	4 (44.4%)	1 (11.1%)	3 (33.3)	0	0	0	1 (11.1)
2	3 (33.3)	2 (22.2)	4 (44.4)	0	0	0	0
3	3 (32.8)	2 (21.8)	1 (10.4)	1 (9.8)	0	0	3 (31.4)
4	8 (40.0)	3 (15.0)	3 (15.0)	2 (10.0)	0	0	2 (10.0)
5	10 (44.5)	1 (4.3)	11 (47.7)	5 (21.7)	0	0	2 (8.7)
6	11 (38.0)	3 (10.3)	1 (4.3)	6 (21.3)	0	0	1 (4.3)



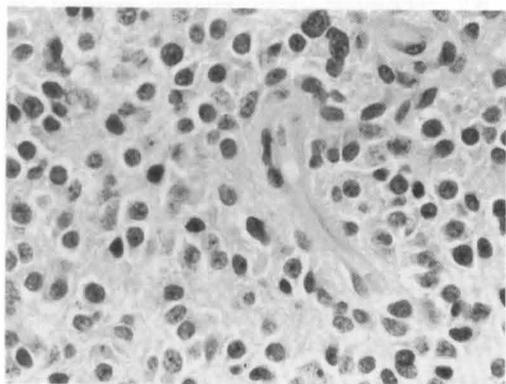


Fig.11: Photomicrographs showed the histological findings of microtumors.

A; Pleomorphous type of mixed glioma treated with TPA (1.0 ug/kg) after the initiation with ENU.

B; Isomorphous type of mixed glioma treated with ENU alone.
H&E, $\times 400$.

考 察

培養系における正常細胞の悪性変化をとらえる指標として種々な criteria が報告されている。たとえば、“piled up focus” の出現^{14, 15)}、軟寒天上でのコロニー形成能^{9, 16, 17)}、植物凝集素 Con A に対する凝集能の亢進¹⁸⁾、saturation density の増大 (contact-inhibition の消失)¹⁹⁾、plasminogen activator の誘導¹⁹⁾、fibronectin の減少^{19, 20)}、さらには in vivo への可移植性の獲得²¹⁾ が報告されている。これら種々の criteria の中で、軟寒天上でのコロニー形成能および in vivo への可移植性の獲得の 2 点の指標が、正常細胞の悪性変化を最も良く反映すると指摘されている^{9, 21)}。Laerum and Rajewsky⁸⁾ は、ENU (75 mg/kg) 経胎盤投与後 20~90 時間目に、胎仔脳細胞を培養系に移して悪性変化の過程を検討しているが、形態学的な面からは、“piled up focus” は培養 40~100 日目に出現し、軟寒天上でのコロニー形成能の獲得は、培養 100~200 日目に認められたと述べている。さらには、可移植性の獲得は培養 200 日目以降であったと指摘している。我々の実験も彼らとほぼ同様の in vivo-in vitro 分析法を用いたが、ENU 処理群における形態学的変化、plating efficacy の変化、および in vivo での可移植性の結果は、彼らの結果とほぼ同様の所見であった。一方、ENU を経胎盤的に投与された胎仔脳細胞に対して持続的に低濃度の TPA を作用させると、培養早期に世代交代時間の短縮が認められ、また形態学的な

“piled up focus” の出現は、ENU 処理群に比べて約 90 日早期に認められた。そして軟寒天上でのコロニー形成能は、ENU 処理群に比べて約 110 日早期に出現し、さらには in vivo への可移植性は、約 90 日早期に認められた。以上の結果より、ENU を発癌剤として投与されたラット胎仔脳細胞の悪性変化に対して、TPA が強いプロモーター作用を示した点が示唆された。また in vivo 実験からも明らかに、ENU 経胎盤誘発 microtumor の発生に対して、TPA が発癌促進効果を示すことが明らかとなった。

現在までに神経系組織に対する TPA の作用を検討した報告は数少なく、わずかに神経芽細胞腫において、neurite 形成を TPA が阻害したとする報告²²⁾ と、胎仔ニワトリ神経節細胞の neurite 成長を誘導する神経成長因子の作用を TPA が阻害したとする報告²³⁾ にすぎない。中枢神経系の発癌モデルにおいて、TPA が発癌プロモーターとして作用するという我々の結果は、今後の脳腫瘍の発生過程および増大過程を解明していく上で、ひとつの糸口となりうると考えられる。

ところで、TPA の作用に関しては、現在までに多種の生物学的・生化学的作用機構が論じられている。細胞機能における分化の修飾作用^{24, 25, 26, 28)}、細胞膜機能の修飾²⁹⁾、細胞形態および細胞増殖におよぼす変化²⁹⁾、酵素・蛋白・核酸などの高分子物質合成の刺激^{24, 29)}、cell cycle pattern への影響³⁰⁾ などが報告されている。今回の報告は、TPA の作用機序に対する詳細な検討は加えていないが、培養細胞の悪性変化の指標であり、かつ悪性転換された細胞の表面変化をとらえると考えられている Con A 凝集能^{11, 16)} を検討した結果、TPA 添加 ENU 処理群では、悪性変化をきたす以前の培養早期 (培養 30 日前後) にすでに Con A 凝集能が亢進していた。この点は、ENU を投与された胎仔脳細胞の細胞膜機能 (時に D-glucose または D-mannose に対する receptor^{11, 16)}) に対する TPA の作用を示唆しており興味深い事実である。

また前述したごとく、TPA は神経芽細胞および胎仔ニワトリ神経節細胞の分化機能を阻害するとする報告が認められるが^{19, 22)}、我々の形態学的変化の所見から考察すると、TPA が細胞の分化機構を阻害するという所見よりは、かえって細胞の分化を促進させる作用を有している点が示唆される。つまり、ENU を投与された胎仔脳細胞は、TPA の添加によって、bipolar な細胞突起の伸展延長傾向を認めた。この細胞突起の伸展所見は、細胞分化の 1 つの指標と考えられる点であるが、一方、ENU 処理細胞では、悪性

変化を示す培養150日目以後においても初代培養時の所見, つまり未熟な glioblast の所見を保っていた³¹⁾。また悪性変化した細胞の in vivo への移植組織像の所見を考えると, TPA 添加 ENU 処理群では, TPA の濃度にかかわらず細胞は均一な形態を示していた。他方, ENU 処理群では, 壊死部および多核巨細胞を数多認め, 個々の細胞形態も pleomorphic な傾向を示していた。この ENU 処理群の組織学的所見は, glioblastoma multiforme の所見に類似しており,³²⁾ TPA 添加 ENU 処理群の組織像に比べより未分化な所見と考えられる。以上の点を考慮すると, 他の報告にみられるごとく^{24,25,26)}, TPA は ENU を投与された胎仔脳細胞に対して, その発癌過程を促進する以外に, 細胞の分化に対しても促進させる作用を有していることが推測される。このように, TPA は, 細胞生物学的な面では, 胎仔脳細胞の発癌または悪性変化を促進させる反面, 形態学的には, ENU 単独で悪性変化した細胞に比べて, TPA で処理された発癌細胞はより分化傾向を示すという一見して相反する作用を示している。この点に対する考察として, 1), 形態学的な面から細胞分化を規定する困難性, 2), 癌化(悪性変化)と分化とは, 全く異なる機序の存在, 3), TPA が, 正常細胞に対して発癌 promoter として作用し, 一方悪性細胞に対しては分化促進剤として作用する点, などが考えられるが, 今後の問題点とされよう。

参 考 文 献

- 1) Berenblum, I., Shubik, P. : The role of croton oil application associated with a single pointing of a carcinogen, in tumor induction of the mouse's skin. *Br. J. Cancer* 1 : 379-382, 1947.
- 2) Armuth, V., Berenblum, I. : Systemic promoting action of phorbol in liver and lung carcinogenesis in AKR mice. *Cancer Res.* 32 : 2259-2262, 1972.
- 3) Armuth, V., Berenblum, I. : Possible two stage transplacental liver carcinogenesis in C57Bl/6 mice. *Int. J. Cancer* 20 : 292-295, 1977.
- 4) Nakanishi, K., Fukushima, S., Hagiwara, A., Tamano, S., Ito, N. : Organ-specific promoting effects of phenobarbital sodium and sodium saccharin in the induction of liver and urinary bladder tumors in male F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 68 : 497-500, 1982.
- 5) Mondal, S., Brankow, D. W., Heidelberger, C. : Two-stage chemical oncogenesis in cultures of C 3 H / T 1 / 2 cells. *Cancer Res.* 36 : 2254-2260, 1976.
- 6) Hecker, E. : Structure-activity relationships in Diterpene esters irritant and cocarcinogenic to mouse skin. In, *Cocarcinogenesis*. Slaga, T. J., Sivak, A., Boutwell, R. K., ed. p11-48, 1978.
- 7) Coerttler, K., Loehrke, H. : Diaplacental carcinogenesis : Initiation and the carcinogens dimethylbenzanthracene (DMBA) and urethane during fetal life and postnatal promotion with the phorbol ester TPA in a modified-2-stage Berenblum/Mottram experimentys. *Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol.* 372 : 29-38, 1976.
- 8) Laerum, C. D., Rajewsky, M. F. : Neplastic transformation of fetal rat brain cells in culture after exposure to ethylnitrosourea in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 55 : 1177-1187, 1975.
- 9) MacPherson, L., Montagnier, I. : Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* 23 : 291-294, 1964.

さて, 以上述べたごとく, phorbol ester の一種である TPA が ENU 経胎盤誘発脳腫瘍において発癌プロモーターとして作用することは明らかと考えられる。ところで, phorbol ester の各種マウス臓器への結合親和性を検討した結果から^{29, 33)}, 脳組織が他の臓器に比べてより高い結合能(皮膚の7.5倍の結合能)を示すといわれている。これは, phorbol ester receptor が脳組織に多量に存在することを示唆しており, また phorbol ester receptor と発癌プロモーターの作用とは相関性があると報告されている³⁴⁾。このような観点からも, TPA が脳組織に強い親和性を有しており, 実験脳腫瘍モデルにおいて発癌プロモーターとして作用することは理論的にも十分に推測しうる点と考えられる。

今後, TPA の発癌促進機構を解明する上で今回用いた in vivo-in vitro assay および in vivo 実験モデルは有用となりうる。さらに, 細胞分化と発癌との関連に関して TPA がいかなる作用をはたしているのか, 発癌遺伝子との関連も含めて今後の発展が期待しうる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました神戸大学医学部脳神経外科教室松本悟教授に心から御礼申し上げます。

- 10) Kakizoe, T., Kawachi, T., Okuda, M. : Concanavalin A agglutination of bladder cells of rats treated with bladder carcinogenesis ; a rapid new test to detect bladder carcinogens. *Cancer Lett.* 5 : 285-290, 1978.
- 11) Kakizoe, T., Komatsu, H., Niiijima, T., Kawachi, T., Sugimura, T. : Increased agglutinability of bladder cells by concanavalin A after administration of carcinogens. *Cancer Res.* 40 : 2006-2009, 1980.
- 12) Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Cuculis, J. J., Meyer, H. G. : The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry, *J. Histochem. Cytochem.* 18 : 315-333, 1970.
- 13) Wechsler, W., Klehues, P., Matsumoto, S., Zulch, K. J., Ivankovic, S., Preussman, R., Druckrey, H. : Pathology of experimental neurogenic tumor chemically induced during prenatal and postnatal life. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 159 : 360-408, 1969.
- 14) Barker, B. E., Sanford, K. K. : Cytological manifestation of neoplastic transformation in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 44 : 39-63, 1970.
- 15) DiPaolo, J. A., Donovan, P., Nelson, R. : Quantitative studies of in vitro transformation by chemical carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.* 42 : 867-876, 1969.
- 16) Borex, C. : Symposium on transformation in vitro. Malignant transformation in vitro : Criteria, biological markers, and application in environmental screening of carcinogens. *Rad. Res.* 79 : 209-232, 1979.
- 17) Montesano, R., Drevon, C., Kuroki, T., Vincent, L. S., Handleman, S., Sanford, K. K., DeFeo, D., Weinstein, I. B. : Test for malignant transformation of rat liver cells in culture : Cytology, growth in soft agar, and production of plasminogen activator. *J. Natl. Cancer INST.* 59 : 1651-1658, 1977.
- 18) Smith, H. S., Scher, C. D., Todaro, G. J. : Induction of cell division in medium lacking serum growth factor by SV 40. *Virology* 44 : 359-370, 1971.
- 19) McCabe, R. P., Evans, C. H. : Plasminogen activator, fibronectin, lymphotoxin sensitivity, and natural skin reactivity relationships to guinea pig cell tumorigenicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 68 : 329-336, 1982.
- 20) Furcht, L. T., Mosher, D. F., Wendelschaffer, G. : Effects of cell density and transformation on the information of a fibronectin extracellular filamentous matrix on human fibroblasts. *Cancer Res.* 38 : 4618-4623, 1978.
- 21) Evans, C. H., DiPaolo, J. A. : Neoplastic transformation of guinea pig fetal cells in culture induced by chemical carcinogens. *Cancer Res.* 35 : 1035-1044, 1975.
- 22) Ishii, Fibach, E., Yamasaki, H., Weinstein, I. B. : Tumor promoters inhibit morphological differentiation in cultured neuroblastoma cells. *Science (Wash. D. C.)* 200 : 556-559, 1978.
- 23) Ishii, D. N. : Effect of tumor promoters on the response of cultured embryonic chick ganglion to nerve growth factor. *Cancer Res.* 38 : 3886-3893, 1978.
- 24) Cohen, R., Pacifici, M., Rubinstein, N., Biehl, J., Holtzer, H. : Effect of a tumor promoter on myogenesis. *Nature (Lond.)* 266 : 538-540, 1977.
- 25) Huberman, E., Callahan, M. F. : Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 : 1293-1297, 1979.
- 26) Payetta, R., Biehl, J., Toyama, Y., Heltzer, H. : Effects of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate on the differentiation of Friend erythroleukemia cells in culture. *Cancer Res.* 40 : 2465-2474, 1980.
- 27) Roversa, G., O'Brien, T. G., Diamond, L. : Tumor promoters inhibit spontaneous differentiation of Friend erythroleukemia cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 : 2894-2898, 1977.
- 28) Yamasaki, H., Fibach, E., Nudel, V., Weinstein, I. B., Rifkind, R. A., Marks, P. A. : Tumor promoters inhibit spontaneous and induced differentiation of murine erythroleukemia cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 : 3451-3455, 1977.
- 29) Dunphy, W. G., Declos, K. B., Blumberg, P. M. : Characterization of specific binding of [³H] phorbol 12, 13-dibutyrate and [³H] phorbol 12-myristate-13-acetate to mouse brain. *Cancer Res.* 40 : 3635-3641, 1980.
- 30) Kinzel, V., Richards, J., Stöhr, M. : Responses of synchronized HeLa cells to the tumor-promoting phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate as evaluated by flow cytometry. *Cancer Res.* 41 : 306-309, 1981.
- 31) Lim, R., Troy, S. S., Turriff, D. E. : Fine structure of cultured glioblasts before and after stimulation by a glia maturation factor. *Exp. Cell Res.* 106 : 357-372, 1977.
- 32) Rubinstein, L. J. : Tumors of the central nervous system. Rubinstein, L. J. ed., Armed Forces Institute of Pathology, p55-85, 1970.
- 33) Nagle, D. S., Jaken, S., Castagen, M., Blumberg, D. M. : Variation with embryonic development and regional localization of [³H] phorbol 12, 13-dibutyrate binding to brain. *Cancer Res.* 41 : 89-93, 1981.

- 34) Estensen, R. D., DeHoogh, D. K., Cole, C. F. : Binding of [^3H] 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate to intact to intact human peripheral blood lymphocytes. *Cancer Res.* 40 : 1119-1124, 1980.

PROMOTING EFFECT OF 12-O-TETRADECANOYL PHORBOL-13-
ACETATE ON THE NEUROGENIC CARCINOGENESIS INITIATED WITH
THE TRANSPLACENTAL EXPOSURE OF N-ETHYL-N-NITROSOUREA.

TAKASHI KOKUNAI

Department of Neurosurgery Kobe University School of Medicine.
(Director : Prof. Satoshi Matsumoto)

ABSTRACT

In order to investigate the possibility that the theory of two-stage carcinogenesis can be applied to neurogenic carcinogenesis, we analysed the promoting effect of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) on the in vitro malignant transformation of fetal rat brain cells and on the occurrence of neurogenic microtumors exposed in utero to Ethylnitrosourea (ENU). From the results of cellular morphology, concanavalin A agglutinability, colony forming efficacy in semisolid soft agar, and tumorigenicity in vivo, malignant transformation of fetal rat brain cells appeared earlier in the ENU group treated with TPA than in the untreated ENU group. And the treatment with TPA caused the earlier occurrence of microtumors than the initiation of ENU alone. On the basis of these observations, it is suggested that TPA might be effective as a tumor promoter on ENU-induced neurogenic carcinogenesis.