

ラット肝および肺の腫瘍発生に対する抗甲状腺物質の修飾作用

竹川 潔・三森 国敏・小野寺博志・下 武男
高橋 正一*・安原加壽雄・高橋 道人

Modifying Effects of Goitrogens on the Tumor Development
in the Liver and Lung of Rats

Kiyoshi Takegawa, Kunitoshi Mitsumori, Hiroshi Onodera, Takeo Shimo,
Masakazu Takahashi*, Kazuo Yasuhara and Michihito Takahashi

In order to investigate whether goitrogens and liver enzyme-inducers modify the tumorigenesis in the liver or lung, 6-week old male F344 rats were given single subcutaneous injection of DHPN, and starting one week later received water containing goitrogens, namely sulfadimethoxine (SDM), propylthiouracil (PTU) and potassium thiocyanate (KSCN), or an enzyme-inducer, phenobarbital (PB), for 19 weeks ad libitum. Although the number of GST-P positive foci in the liver was significantly increased in the PB group as compared to the control group, there were no significant fluctuations in the SDM, PTU and PB groups. With respect to the lung, it is suggested that SDM, KSCN and PB may enhance the lung tumorigenesis, since the multiplicities of hyperplasias of alveolar epithelia were increased in groups treated with these compounds.

Keywords : lung tumorigenesis, promotion, goitrogen, F344/DuCrj rat

(Received May 31, 1996)

はじめに

甲状腺の機能を抑制する各種の抗甲状腺物質や肝臓の薬物代謝酵素を誘導する物質が、甲状腺の濾胞上皮由来の腫瘍を誘発することが知られている。甲状腺を標的の一つとする *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) でイニシエーション処置したラットに、これらの物質を投与する短期の二段階発癌実験においては、甲状腺に濾胞上皮由来の過形成や腫瘍等の増殖性病変が誘発される¹⁻¹¹⁾。これらの物質は、甲状腺ホルモンの合成を抑制するからあるいはそれらのホルモンの代謝・排泄を増強することにより、血中の甲状腺ホルモンレベルを低下させ、その結果ネガティブフィードバックによって血中 TSH が上昇してその増殖刺激により甲状腺濾胞由来の増殖性病変の発生が増強されると考えられている¹²⁻¹⁵⁾。DHPN はラットに皮下投与した場合、甲状腺の他、肝臓および肺を標的とするが^{16,17)}、肝臓においては、その腫瘍発生が薬物代謝酵素誘導物質により増強されることが報告されている^{18,19)}。しかし、甲状腺ホルモンの合成を抑制する抗甲状腺物質が肝臓の腫瘍発生に影響を与えるのかどうか、またやはり DHPN の標的臓器であるラットの肺の腫瘍発生に対して抗甲状腺物質や

薬物代謝酵素誘導物質が影響を与えるか否かについては検討されていない。今回われわれは、DHPN でイニシエーション処置したラットに、3種の抗甲状腺物質すなわち sulfadimethoxine (SDM), propylthiouracil (PTU) および potassium thiocyanate (KSCN) ならびに薬物代謝酵素誘導物質の phenobarbital (PB) を投与して、肝臓および肺の腫瘍発生に対する修飾作用の有無を検討した。

実験材料および方法

4週齢の雄性 F344 ラットを日本チャールス・リバー(株) (厚木) から入手し、床敷を敷いたプラスチックケージに5匹ずつ収容して、温度 23±2℃、湿度 60±5%、12時間明暗周期の動物室で飼育した。2週間馴化した後、異常のみられなかった25匹の動物を実験に用いた。飼料として粉末飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業(株), 東京) を自由に摂取させた。飲料水としては馴化期間中には水道水をあたえ、実験開始後は下に記すとおり飲水投与を行った。DHPN および KSCN をナカライテスク (京都) から、SDM を Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A) から、PTU を和光純薬工業(株) (大阪) から、PB を岩城製薬(株) (東京) から入手した。

馴化終了後、25匹のラットに DHPN を 2800 mg/kg の用量で単回皮下投与した。その1週間後に各群5匹からな

* 佐々木研究所 病理部

る5群に分け、19週間にわたりSDM, PTU, KSCNおよびPBをそれぞれ0.1%, 0.1%, 0.5%および0.05%の濃度で蒸留水に溶解し飲料水として自由に摂取させた。対照群には蒸留水を19週間与えた。DHPNの投与量はこれまでの実験結果からイニシエーション作用を示し、かつ動物を死亡させない量として選択した。SDM, PTU, KSCNおよびPBについては、先に行った実験において甲状腺ろ胞上皮由来の増殖性病変を誘発した量を選択した。

投与期間終了後、動物にエーテル麻酔を施し、腹大動脈から採血して血清試料を採取し、血清中の甲状腺ホルモンT3およびT4ならびにTSH値を測定した。T3およびT4はT3-DainapackおよびT4-Dainapack (Abbot Laboratories, U.S.A)を用いMicroparticle Enzyme ImmunoassayおよびFluorescence Polarization Immunoassayでそれぞれ測定した。TSHはDr. A. F. Parlow (Pituitary and Antisera Center, Harbor-UCLA Medical Center, U.S.A.)より供与されたNIADDK radioimmunoassay kitを用いて測定した。採血後放血致死させた動物を解剖し、肝臓重量を測定した。肝臓および肺を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋して4~5 μ mの厚さに薄切し、HE染色を施して病理組織学的に検査した。肺については、切片中に認められた増殖性病変の個数を光学顕微鏡下で計数し、肺切片の面積を画像解析装置IPAP (住化テクノス, 兵庫)で計測して、単位面積あたりの増殖性病変の個数を算出した。肝臓については、胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST-P) について免疫染色を行った。抗GST-Pポリクローナル抗体 (MBL, 名古屋)を一次抗体として用い、streptavidin biotin complex (DAKO, Glostrup, Denmark)を用い、3,3'-diaminobenzidine (DAB)で発色し、カウンター染色としてヘマトキシリンで核染色した。肝臓切片中のGST-P陽性巣の個数を光学顕微鏡下で計数し、肝臓切片の面積を画像解析装置IPAPで測定して、単位面積あたりのGST-P陽性巣の個数を算出した。

血清中の甲状腺ホルモン値およびTSH値、最終体重、肝臓重量、肺の単位面積あたりの増殖性病変の個数および肝臓の単位面積あたりのGST-P陽性巣の個数について、各群毎に平均値および標準偏差を求め、対照群との差をStudentのt検定で検定した。肺の増殖性病変の発生率については対照群と各投与群との差をFisherの直接確立法で検定した。

結 果

血清中のT3値はKSCN群を除く各投与群で、T4値は全投与群で対照群に比べて有意に低下した。TSH値はPTU群で対照群に比し有意な高値を示したが、SDM群では差がなく、KSCNおよびPB群では逆に低値を示し

Table 1. Serum levels of thyroid hormones and TSH in rats treated with goitrogens for 19 weeks after DHPN initiation

Treatment after DHPN initiation	No. of animals	Serum levels (ng/ml)		
		T3	T4	TSH
0.1%SDM	4	0.39±0.05*	25.9±1.8*	54.98±34.26
0.1%PTU	5	0.21±0.07*	9.7±1.2*	108.10±9.91*
0.5%KSCN	5	0.56±0.04	33.0±1.2*	8.74±1.92*
0.05%PB	5	0.43±0.08*	40.4±2.5*	8.60±2.18*
Control	5	0.66±0.10	46.5±1.7	13.5±1.8

*: Significantly different from the control group at P<0.01.

Table 2. Body weights and liver weights of rats given goitrogens for 19 weeks after DHPN initiation

Treatment after DHPN initiation	No. of animals	Body weight (g)	Liver weight	
			Absolute (g)	Relative (g/100 BW)
0.1%SDM	4	293±33*	7.038±1.186*	2.4±0.2*
0.1%PTU	5	131±6*	3.342±0.245*	2.5±0.2*
0.5%KSCN	5	320±11*	8.255±0.495*	2.6±0.1*
0.05%PB	5	353±10	12.364±0.455*	3.5±0.1*
Control	5	349±10	9.900±0.500	2.8±0.1

*: Significantly different from the control group at P<0.01.

Table 3. Severity of centrilobular hepatocellular hypertrophy in rats treated with goitrogens for 19 weeks after DHPN initiation

Treatment after DHPN initiation	No. of animals	Severity of hypertrophy
0.1%SDM	4	-
0.1%PTU	5	-
0.5%KSCN	5	+
0.05%PB	5	++
Control	5	-

+: Slight; ++: Marked; -: No abnormalities detected.

た (Table 1)。最終解剖時の体重はPB群を除くすべての投与群において対照群に比べて有意に低い値を示した。肝臓重量は絶対および相対重量ともに対照群に比べてSDM, PTUおよびKSCN群で有意に減少し、PB群で増加した (Table 2)。肝臓について病理組織学的に検索した結果、小葉中心性の肝細胞肥大がKSCN群で軽度に、PB群で顕著に認められた (Table 3)。肝臓の単位面積あたりのGST-P陽性巣の個数は対照群に比し、PB群で著

Table 4. Multiplicity of GST-P positive foci in the liver of rats treated with goitrogens for 19 weeks after DHPN initiation

Treatment after DHPN initiation	No. of animals	No. of GST-P positive foci per square centimeter of the liver
0.1%SDM	4	5.78±4.85
0.1%PTU	5	1.58±1.20
0.5%KSCN	5	4.00±1.58
0.05%PB	5	41.44±4.40*
Control	5	2.60±1.38

*: Significantly different from the control group at P<0.01.

しく増加したが、SDM、PTUおよびKSCN群のいずれにおいても有意な差異はみられなかった (Table 4)。肺においては、肺胞上皮過形成がPTU群を除く各投与群および対照群で高率に発生したが、SDM、KSCNおよびPB群のいずれにおいても対照群の発生率との間に有意な差は認められなかった。PTU群の過形成の発生率は0%であり、対照群との間に有意差が認められた。気管支/肺胞上皮腺腫の発生率については対照群と各投与群との間に有意な差は認められなかった。単位面積あたりの過形成の発生個数がSDM、KSCNおよびPB群で有意に増加した。一方、PTU群では上述の通り過形成は発生しなかった。対照群に比べて腺腫の個数が増加した群はなかった (Table 5)。

考 察

今回DHPNでイニシエーション処置したラットにSDM、KSCNおよびPBを与えた群で、DHPN処置後無処置で飼育した対照群に比べて肺の単位面積あたりの過

形成の発生個数が増加した。すなわち、これらの物質が肺の増殖性病変の発生を増強しており、長期間にわたりこれらの物質をラットに与えた場合に肺腫瘍が発生する可能性が疑われた。肺の腫瘍発生に対する化合物による増強効果としては、いくつかの例が知られている。PCB類のAroclor 1254によりマウスにおいてdimethylnitrosamine誘発肺腫瘍が増加したとの報告がある^{20,21)}。また、脂質過酸化等の酸化的ストレスが実験動物の肺腫瘍の発生を増強したとの報告もある。すなわち、N¹-nitrosonicotine (NNN) または4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) 誘発ラット肺腫瘍の発生がエタノール投与により増強され、その際、肺組織中の脂質過酸化が認められたと報告されている²²⁾。また、酸化的ストレスを惹起するオゾンによってマウスの肺腫瘍の発生が増加し²³⁾、二酸化窒素によってラット肺組織の脂質過酸化が増強されるとともに²⁴⁻²⁶⁾、ラットのDHPN誘発肺腫瘍が増強されたとの報告もある²⁷⁾。更に、肺組織における薬物代謝酵素の誘導と腫瘍プロモーションとの関連も疑われている。P4501Aを誘導することが知られている2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) がdimethylnitrosamine誘発マウス肺腫瘍の発生を増強したほか²⁸⁾、P4501A誘導に関与するAhレセプターのアゴニストである2,2',3,4,4',5'-hexachloro biphenylがマウス肺腫瘍のプロモーターであるとの報告がある²⁹⁾。今回認められた肺の増殖性病変の増強の原因としても上述のようないくつかの可能性が考えられるが、今回の実験ではそれらについて検討していないため、そのメカニズムを明らかにできなかった。その他、甲状腺ホルモンの有する組織の成長作用によって腫瘍プロモーション作用が発現する可能性も疑われる。しかし、今回いずれの投与群においても対照群に比べて血清中の甲状腺ホルモンレベルが低かったことから、その可能性はほとんどないものと考えられた。

今回の実験では、DHPNのもう一つの標的臓器である

Table 5. Incidence and multiplicity of proliferative lesions in the lung of rats treated with goitrogens for 19 weeks after DHPN initiation

Treatment after DHPN initiation	No. of animals	Incidence of lesions(%)		No. of lesions per square centimeter of the lung	
		Hyperplasia of alveolar epithelium	Alveolar/ bronchiolar adenoma	Hyperplasia of alveolar epithelium	Alveolar/ bronchiolar adenoma
0.1%SDM	4	100	0	3.31±0.92*	0
0.1%PTU	5	0*	0	0	0
0.5%KSCN	5	100	60	3.25±0.35**	0.92±1.30
0.05%PB	5	100	20	4.42±1.85**	0.14±0.30
Control	5	80	40	1.19±0.98	0.38±0.55

*,**: Significantly different from the control group at P<0.05 and 0.01, respectively.

肝臓については対照群に比べてPB群で単位面積あたりのGST-P陽性巣の個数が増加したが、3種の抗甲状腺物質のいずれにおいてもGST-P陽性巣の増加は認められなかった。PBは肝臓の腫瘍プロモーションの指標とされているGST-P陽性巣を増加させることが知られており^{18,19)}、今回の結果もそれと一致している。肝臓のHE標本の組織学的検査の結果、PB群のほかにKSCN群でも軽度ながら小葉中心性の肝細胞の肥大が認められ、KSCN群でも薬物代謝酵素が誘導される可能性が示唆された。肝臓の薬物代謝酵素を誘導する化合物は肝腫瘍プロモーション作用を有する可能性があるが、KSCN群ではGST-P陽性巣の増加は認められず、KSCNが肝腫瘍プロモーション作用を有する可能性は低いものと推察された。

PTU群では肺の増殖性病変の発生がまったく認められず、かつ肝臓のGST-P陽性巣の個数も対照群に比べて少なかったが、同群では体重が著しく低値を示していたことから、これらの変動は動物の生長抑制に起因する可能性が強いと考えられた。

以上の成績より、SDM、KSCNやPBは、甲状腺プロモーション作用の他に、肺腫瘍プロモーション作用も有することが示唆された。

文 献

- Hiasa, Y., Kitahori, Y., Enoki, N., Konishi, N. and Shimoyama, T.: 4,4'-Diaminodiphenylmethane: promoting effects on the development of thyroid tumors in rats treated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 471~476 (1984)
- Hiasa, Y., Kitahori, Y., Kato, Y., Ohshima, M., Konishi, N. and Murata, Y.: Potassium perchlorate, potassium iodide, and propylthiouracil: promoting effect on the development of thyroid tumors in rats treated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 1335~1340 (1987)
- Hiasa, Y., Kitahori, Y., Konishi, N. and Ohshima, M.: Chemical carcinogenesis in the thyroid gland. *Toxicol. Lett.*, **64/65**, 389~395 (1992)
- Hiasa, Y., Ohshima, M., Kitahori, Y., Yuasa, T., Fujita, T. and Iwata, C.: Promoting effects of 3-amino-1,2,4-triazole on the development of thyroid tumors in rats treated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Carcinogenesis*, **3**, 381~384 (1982)
- Kanno, J., Matsuoka, C., Furuta, K., Onodera, H., Miyajima, H., Maekawa, A. and Hayashi, Y.: Tumor promoting effect of goitrogens in the rat thyroid. *Toxicol. Pathol.*, **18**, 239~246 (1990)
- Kanno, J., Onodera, H., Furuta, K., Maekawa, A., Kasuga, T. and Hayashi, Y.: Tumor-promoting effect of both iodine deficiency and iodine excess in the rat thyroid. *Toxicol. Pathol.*, **20**, 226~235 (1992)
- Kitahori, Y., Hiasa, Y., Konishi, N., Enoki, N., Shimoyama, T. and Miyashiro, A.: Effect of propylthiourea on the thyroid tumorigenesis induced by *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine in rats. *Carcinogenesis*, **5**, 657~660 (1984)
- Kitahori, Y., Ohshima, M., Matsuki, H., Konishi, N., Hashimoto, H., Minami, S., Thamavit, W. and Hiasa, Y.: Promoting effect of 2,4-diaminoanisole sulfate on rat thyroid carcinogenesis. *Cancer Lett.*, **45**, 115~121 (1989)
- Mitsumori, K., Onodera, H., Shimo, T., Takahashi, M., Yasuhara, K., Kitaura, K., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Effect of thyroid stimulating hormone on the development and progression of rat thyroid follicular cell tumors. *Cancer Lett.*, **92**, 193~202 (1995)
- Onodera, H., Mitsumori, K., Takahashi, M., Shimo, T., Yasuhara, K., Kitaura, K., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Thyroid proliferative lesions induced by anti-thyroid drugs in rats are not always accompanied by sustained increases in serum TSH. *J. Toxicol. Sci.*, **19**, 227~234 (1994)
- Shimo, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Yasuhara, K., Takahashi, M., Takahashi, M., Ueno, Y. and Hayashi, Y.: Time course observation of thyroid proliferative lesions and serum TSH levels in rats treated with thiourea after DHPN initiation. *Cancer Lett.*, **85**, 141~149 (1994)
- Hiasa, Y., Kitahori, Y., Konishi, N., Enoki, N. and Fujita, T.: Effect of varying the duration of exposure to phenobarbital on its enhancement of *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-induced thyroid tumorigenesis in male Wistar rats. *Carcinogenesis*, **4**, 935~937 (1983)
- Hiasa, Y., Kitahori, Y., Konishi, N., Shimoyama, T. and Lin, J.C.: Sex differential and dose dependence of phenobarbital-promoting activity in *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiated thyroid tumorigenesis in rats. *Cancer Res.*, **45**, 4087~4090 (1985)
- Hiasa, Y., Kitahori, Y., Ohshima, M., Fujita, T., Yuasa, T., Konishi, N. and Miyashiro, A.: Promoting effects of phenobarbital and barbital on development of thyroid tumors in rats treated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Carcinogenesis*, **3**, 1187~1190 (1982)
- Shimo, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Yasuhara, K., Kitaura, K., Takahashi, M., Kanno, J. and Hayashi, Y.: Synergistic effects of phenobarbital and thiourea on proliferative lesions in the rat liver. *Cancer Lett.*, **81**, 45~52 (1994)
- Konishi, Y., Denda, A., Kondo, H. and Takahashi, S.: Lung carcinogenesis induced by oral administration of *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine in rats. *Gann*, **67**, 773~780 (1976)
- Konishi, Y., Kondo, H., Ikeda, T., Kawabata, A., Shoji, Y. and Denda, A.: Effect of dose on the carcinogenic activity of orally administered *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine in rats. *Gann*, **69**, 573~577 (1978)
- Milner, L. S., Wei, S. H. and Houser, M. T.: Enhancement of renal and hepatic glutathione metabolism by dimethylthiourea. *Toxicol. Lett.*, **66**, 117~123 (1993)
- Moore, M. A. and Kitagawa, T.: Hepatocarcinogenesis in the rat: the effect of promoters and carcinogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Int. Rev. Cytol.*, **101**, 125~173 (1986)
- Anderson, L. M., Ward, J. M., Fox, S. D., Issaq, H. J. and Riggs, C. W.: Effects of single dose of polychlorinated biphenyls to infant mice on *N*-nitrosodimethylamine-induced lung and liver tumors. *Int. J. Cancer*, **38**, 109 (1986)

- 21) Anderson, L. M., Logsdon, D., Ruskie, S., Fox, S. D., Issaq, H. J., Kovatch, R. M. and Riggs, C. W.: Promotion by polychlorinated biphenyls of lung and liver tumors in mice. *Carcinogenesis*, **15**, 2245~2248 (1994)
- 22) Nachiappan, V., Mufti, S. I., Chakravarti, A., Eskelson, C. D. and Rajasekharan, R.: Lipid peroxidation and ethanol-related tumor promotion in Fischer-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines. *Alcohol-Alcohol*, **29**, 565~574 (1994)
- 23) Last, J. A., Warren, D. L., Goad, E. P. and Witschi, H. P.: Modification of lung tumor development in mice by ozone. *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 149~154 (1987)
- 24) Sagai, M., Ichinose, T. and Kubota, K.: Studies of the biochemical effects of nitrogen dioxide. IV. Relation between the change of lipid peroxidation and anti oxidative protective system in rat lungs upon life span exposure to low levels of NO₂. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 444~456 (1984)
- 25) Sagai, M., Ichinose, T., Oda, H. and Kubota, K.: Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. II. Changes of the protective systems in rat lung and of lipid-peroxidation by acute exposure. *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 153~164 (1982)
- 26) Ichinose, T. and Sagai, M.: Studies on biochemical effects of nitrogen dioxide. III. Changes of the protective systems in rat lung and of lipid peroxidation by chronic exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**, 1~8 (1982)
- 27) Ichinose, T., Fujii, K. and Sagai, M.: Experimental studies on tumor promotion by nitrogen dioxide. *Toxicology*, **67**, 211~225 (1991)
- 28) Beebe, L. E., Anver, M. R., Riggs, C. W., Fornwald, L. W. and Anderson, L. M.: Promotion of *N*-nitrosodimethylamine-initiated mouse lung tumors following single or multiple low dose exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Carcinogenesis*, **16**, 1345~1349 (1995)
- 29) Anderson, L. M., Beebe, L. E., Fox, S. D., Issaq, H. J. and Kovatch, R. M.: Promotion of mouse lung tumors by bioaccumulated polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Exp. Lung Res.*, **17**, 455~471 (1991)