

氏 名 (本籍)	竹 川 潔 (北 海 道)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博乙第38号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年9月26日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目	Studies on Mechanisms Underlying the Enhancing Effects of Vitamin A observed for Goitrogen-induced Thyroid Tumorigenesis in Rats
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 柵 木 利 昭 副査 帯広畜産大学 教授 西 村 昌 数 副査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助 副査 東京農工大学 教授 岩 崎 利 郎 副査 岐 阜 大 学 教 授 武 脇 義

論 文 の 内 容 の 要 旨

ビタミンA (VA) またはその合成類似化合物は、実験動物において種々の臓器で発癌物質による発癌を抑制したとの報告がある。また、VAはヒトでの臨床応用においても、皮膚腫瘍、消化器系腫瘍、乳癌および白血病に対して抑制効果を有することが示されている。ところが、甲状腺腫瘍に対するVAの修飾作用を、*N*-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) および甲状腺ホルモン合成を抑制するチオウレア (TU) を用いたラット二段階発癌モデルを用いて検討した実験の結果、大量のVA投与によって甲状腺増殖性病変の発生が促進された。また、VAが血清中3.5.3'-トリヨードチロニン (T3) およびチロキシシン (T4) 値を低下させ、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 値を上昇させる傾向を示したことから、ネガティブフィードバックを介した持続的なTSHの甲状腺濾胞上皮への刺激が関与すると考えられた。

今回の研究では、TUとVAの併用投与によって甲状腺増殖性病変発生が促進されたメカニズムを明らかにするための検討を行った。このメカニズムとしては、第一に、肝臓における甲状腺ホルモンの代謝促進が関与すると考えられることから、上述の二段階発癌モデルを用いて、TUとVAを併用投与した場合の血清中T3、T4およびTSH値の動きと、肝臓中のT4-uridine diphosphate glucuronosyltransferase (T4UDP-GT) 活性との関連を調べた。雄

F344ラットにDHPNを2800 mg/kg皮下単回投与し、1週間後より10週間にわたって0.1% VA含有飼料を与える群 (VA群) , 0.2% TU含有飲料水投与群 (TU群) , 0.2% TU飲料水+0.1% VA飼料投与群 (TU+VA群) , さらに対照として蒸留水/基礎飼料のみ与える群を設定した。TU群において血清中T3およびT4値が低下し、TSH値が上昇したが、TU+VA群ではさらにこれらの変動が増強された。甲状腺重量は、TU群に比べVA併用群が高い値を示した。甲状腺濾胞上皮細胞由来の過形成 (限局性) および腫瘍はTU群およびTU+VA群ともに同程度の発生頻度を示したが、それぞれの細胞増殖活性はVA併用群で高い値を示した。次いで、肝臓中のT4-UDP-GT活性は、TU群に比べTU+VA群で有意に高い値を示した。これらのことから、TUとVAの併用投与による甲状腺増殖性病変の発現促進に直接関与する血清中T3およびT4値の減少には、肝臓中のT4-UDP-GT活性の上昇が関与することが強く示唆された。

次いで同様の二段階発癌モデルを用いて、甲状腺関連ホルモンの合成阻害がVA併用投与によって増強されるか否かを調べた。甲状腺へのヨウ素の取り込みおよびヨウ素の有機化では、TU群は対照群に比べ低値を示したが、VAとの併用投与では、さらなる低下は認められなかった。したがって、血中甲状腺関連ホルモン値の低下におけるVA投与の増強は、ホルモン合成を介した影響ではないと考えられた。さらに、電子顕微鏡的観察においても、TU群、TUとVAの併用群ではともに、丈の高い濾胞上皮細胞と、著明なコロイドの取込みが認められたが両者に差はないことから、VA併用投与による血中甲状腺ホルモン値の低下は、コロイドの取込み能を介したものではないと考えられた。

前述の甲状腺の二段階発癌モデルを用いて、VA併用投与による濾胞上皮の増殖促進における、TSH以外の増殖因子の関与を調べた。その結果、TU群およびTUとVAの併用群ではともに濾胞上皮の増殖性病変においてtransforming growth factor α (TGF α)およびcyclin D1の発現が増加していたが、両群の間でTGF α 、その受容体であるepidermal growth factor receptor (EGFR)、およびcyclin D1の発現の程度に、差は認められなかった。したがって、これらの因子は、VA併用投与による甲状腺増殖性病変の増強とは関連しないと考えられた。

以上のことから、大量のVA併用投与によるTU誘発甲状腺増殖性病変の発生の増強効果は、甲状腺ホルモン合成に対するTUの阻害作用に加えて、VAによる肝臓でのT4-UDP-GT活性の増強に起因するものと結論された。ラットでは、ヒトと異なりT4と結合するグロブリンが存在しないため、T4の生物学的半減期が非常に短いなどの理由から、ヒトに比べて甲状腺増殖性病変誘発に対する感受性が高いものの、ヒトにおいても程度の差はあっても同様の反応を示す可能性がある。したがって、ヒトの発癌リスクの観点からも、VAの大量

摂取は避けるべきであると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、ウェルファイド（株）（旧吉富製薬（株））安全性研究所において医薬品の安全性試験の実施および病理学的研究を日常業務としている。申請者が研究生として在籍した国立医薬品食品衛生研究所・病理部において、先に甲状腺腫瘍の発生に対して大量のビタミンA（VA）が促進効果ないし抑制効果のいずれを示すかが検討されていた。その結果、VAが一般に実験動物およびヒトにおいて腫瘍を抑制したとの報告があるのに反して、腫瘍発生を増強するとの結果が得られていた。また、VAは血清中の3,5,3'-トリヨードチロニン（T3）またはチロキシン（T4）値を減少させ、甲状腺刺激ホルモン（TSH）値を増加させる傾向を示したことから、ネガティブフィードバックを介する作用が推察された。そこで申請者は、その増強作用を引き起こしたメカニズムを明らかにする研究を行った。

1. チオウレア（TU）およびVAを同時投与したラットにおける甲状腺増殖性病変の増強に対する肝臓のT4-uridinediphosphate glucuronosyltransferase（T4-UDP-GT）の関与

雄性F344ラットをN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）（2800mg/kg、単回皮下投与）でイニシエーション処置した後、1週間後より蒸留水および基礎飼料（対照群）、0.2% TU含有飲料水（TU群）、0.1% VA含有飼料（VA群）、または0.2% TU飲料水および0.1% VA飼料（TU+VA群）を10週間与えた。VAの同時投与によって、肝臓のT4-UDP-GT活性は有意に増加した。この実験の結果よりVAによる血清T3およびT4値の減少ならびにそれに続く腫瘍発生が増強は、肝臓のT4-UDP-GT活性が増強されるためであると考えられた。

2. ラット甲状腺のヨウ素取り込みおよび有機化に対する大量のVAおよびTU同時投与の影響

雄性F344ラットをDHPNで処置した後、蒸留水および基礎飼料（対照群）、0.1% TU含有飲料水（TU群）、0.1% VA含有飼料（VA群）、または0.1% TU飲料水および0.1% VA飼料（TU+VA群）を4週間与えた。甲状腺へのヨウ素の取り込みおよびヨウ素の有機化は大量のVAによって変動しなかった。したがって、VAの腫瘍増強効果は甲状腺ホルモン合成過程への影響によるものではないと考えられた。さらに、電子顕微鏡を用いて濾胞上皮へのコロイド取込みを比較した結果、VA併用投与による影響は認められず、コロイドの取込みもVAの腫瘍増強効果に関与しないものと考えられた。

3. VAによる甲状腺腫瘍発生増強効果に対する増殖因子の関与に関する検討

雄性F344ラットをDHPNで処置した後、蒸留水および基礎飼料（対照群）、0.1% TU含有飲料水（TU群）、0.1% VA含有飼料（VA群）、または0.1% TU飲料水および0.1% VA飼料（TU+VA群）を10週間与えた。甲状腺の濾胞上皮におけるtransforming growth factor_（TGF_）、epidermal growth factor receptor（EGFR）およびcyclin D1の発現を免疫組織科学的に比較した結果、いずれについてもVAによる影響を認めなかった。したがって、VAによる甲状腺腫瘍増強効果にこれらの因子は関与していないものと考えられた。

本研究により、甲状腺増殖性病変のTUによる誘発がVAにより増強されたメカニズムがほぼ解明された。即ち、肝臓のT4-UDP-GT活性が増強されることに起因するとの結論を得た。また、動物種差が存在するため単純にはヒトに外挿できないが、甲状腺腫瘍の発生リスクを考慮して、VAの大量摂取は避けるべきであることが示唆された。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

1. Takegawa, K., Mitsumori, K., Onodera, H., Mutai, M., Kitaura, K., Takahashi, M., Uneyama, C., Yasuhara, K., Takahashi, M., Yanai, T., Masegi, T. and Hayashi, Y. (1997) UDP-GT involvement in the enhancement of cell proliferation in thyroid follicular cell proliferative lesions in rats treated with thiourea and vitamin A. *Archives of Toxicology* 71:661-667
2. Takegawa, K., Mitsumori, K., Onodera, H., Yasuhara, K., Takahashi, M., Yanai, T., Masegi, T. and Hayashi, Y. (1998) Immunohistochemical studies of TSH-producing cells in the pituitary and expression of growth factors in thyroidal proliferative lesions in rats treated with thiourea and excess vitamin A. *The Journal of Toxicological Sciences* 23:213-221
3. Takegawa, K., Sakamori, M., Koremoto, M., Yamada, T., Takagi, S., Takeuchi, M., Yanai, T., Masegi, T. and Mitsumori, K. (2000) Large amount of vitamin A has no major effects on thyroidal hormone synthesis in two-stage rat thyroid carcinogenesis model using *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and thiourea. *The Journal of Toxicological Sciences* 25:67-75

既発表学術論文

1. Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M., Shimo, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takahashi, M. and Hayashi, Y. (1996) Promoting effect of large amounts of vitamin A on cell proliferation of thyroid proliferative lesions induced by simultaneous treatment with thiourea. *Cancer Letters* 103:19-31
2. Yasuhara, K., Mitsumori, K., Imazawa, T., Yoshimura, H., Onodera, H., Takegawa, K., Takahashi, M., Shirai, W. and Hayashi, Y. (1996) Ultrastructure and cell proliferative activities of karyomegalic alveolar epithelial cells in early pulmonary inflammatory lesions of Syrian golden hamsters induced by *N*-methyl-*N*-nitrosourethane. *Journal of Veterinary Medical Science* 58:825-831
3. Mitsumori, K., Takegawa, K., Shimo, T., Onodera, H., Yasuhara, K. and Takahashi, M. (1996) Morphometric and immunohistochemical studies on atrophic changes in lympho-hematopoietic organs of rats treated with piperonyl butoxide or subjected to dietary restriction. *Archives of Toxicology* 70:809-814
4. Mitsumori, K., Onodera, H., Shoda, T., Uneyama, C., Imazawa, T., Takegawa, K., Yasuhara, K., Watanabe, T. and Takahashi, M. (1997) Liver tumor-promoting effects of oxfendazole in rats. *Food and Chemical Toxicology* 35:799-806
5. Takegawa, K., Mitsumori, K., Onodera, H., Yasuhara, K., Kitaura, K., Shimo, T. and Takahashi, M. (1998) Induction of squamous cell carcinomas in the salivary glands of rats by potassium iodide.

6. Shinoda, K., Mitsumori, K., Yasuhara, K., Uneyama, C., Onodera, H., Takegawa, K., Takahashi, M. and Umemura, T. (1998) Involvement of apoptosis in the rat germ cell degeneration induced by nitrobenzene. *Archives of Toxicology* 72: 296-302
7. Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M., Funakoshi, T., Tamura, T., Yasuhara, K., Takegawa, K. and Takahashi, M. (1999) Promoting effects of kojic acid due to serum TSH elevation resulting from reduced serum thyroid hormone levels on development of thyroid proliferative lesions in rats initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Carcinogenesis* 20:173-176
8. Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K. and Takahashi, M. (1999) Inhibition of thyroid iodine uptake and organification in rats treated with kojic acid. *Toxicological Sciences* 47:170-175
9. Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M., Funakoshi, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takagi, H. and Hirose, M. (1999) Time course observation of thyroid proliferative lesions and serum levels of related hormones in rats treated with kojic acid after DHPN initiation. *The Journal of Toxicological Sciences* 24:145-155
10. Shoda, T., Onodera, H., Takeda, M., Uneyama, C., Imazawa, T., Takegawa, K., Yasuhara, K., Watanabe, T., Hirose, M. and Mitsumori, K. (1999) Liver tumor promoting effects of fenbendazole in rats. *Toxicologic Pathology* 27:553-562
11. Nagaoka, T., Takegawa, K., Takeuchi, M. and Maekawa, A. (2000) Effects of reproduction on spontaneous development of endometrial adenocarcinomas and mammary tumors in Donryu rats. *Japanese Journal of Cancer Research* 91:375-382
12. Takegawa, K., Mitsumori, K., Onodera, H., Shimo, T., Kitaura, K., Yasuhara, K., Hirose, M. and Takahashi, M. (2000) Studies on the carcinogenicity of potassium iodide in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* in press