

学 位 論 文 要 約

氏 名 鈴木 勇

題 目 Studies on Chemomodulatory Action of 4-Methylthio-3-Butenyl Isothiocyanate (MTBITC) on Carcinogenesis in Rats
(MTBITC のラットにおける発がん修飾作用に関する研究)

ワサビ、キャベツ、ダイコンなどのアブラナ科野菜に含まれる辛み成分であるイソチオシアネート類には、発がん抑制作用が期待され、これまでに実験動物において様々な検討がなされている。Phenethyl isothiocyanate (PEITC) について、*N*-nitrosomethylbenzylamine (NMBA) 誘発ラット食道発がん、*N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 誘発ハムスター膵発がんと肺発がんに対する抑制効果等が報告されている一方で、高用量投与では、ラット膀胱粘膜の炎症性変化に引き続いて粘膜上皮の増殖性病変が誘導されるという報告がある。一方、本邦で多く摂取されている野菜の 1 つであるダイコンに含まれる成分として、4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) が単離されているが、その低用量投与による BOP 誘発ハムスター膵発がん抑制作用が認められている他は十分に検討されておらず、高用量投与による毒性影響、発がん性に関する研究はこれまでに報告されていない。そこで私は本研究において、MTBITC の食道における発がん抑制作用の有無、高用量処置時の膀胱への毒性影響の有無、並びに *in vivo* 遺伝毒性に関する検討を行った。

第一章では、食道発がんへの MTBITC の影響を評価する目的で、6 週齢の雄性 F344 ラットに NMBA によるイニシエーション処置を行った上、イニシエーション期、プロモーション期、および全期を通じて MTBITC を 80 ppm の混餌にて併用投与した。その結果、食道の増殖性病変の個体あたりの発生数が NMBA 単独投与群と比較していずれの MTBITC 併用投与群においても有意に減少していたことから、MTBITC はイニシエーション期のみならず、プロモーション期においても NMBA 誘発食道発がん抑制作用を発揮することが示された。免疫組織化学的検索の結果、NMBA 単独群と比較してプロモーション期 MTBITC 併用投与群において、Ki-67 陽性細胞数の有意な減少、cleaved caspase-3 および p21 陽性細胞数の有意な増加が観察された。一方で、NMBA 処置を行っていない MTBITC 単独投与群のラット食道において、これらの修飾作用は観察されなかった。以上より、80 ppm の MTBITC (4-6 mg/kg BW/day に相当) を NMBA 誘発ラット食道発がんモデルに処置すると、増殖性病変が有意に抑制されることが明らかとなった。特にプロモーション期においては、

アポトーシスの誘導, p21 発現誘導による細胞増殖活性の減少が抑制メカニズムに関与していると考えられた。

第二章では, 6 週齢の雄性 F344 ラットに MTBITC を 100, 300, 1000 ppm の用量で, また比較対照として膀胱への毒性およびプロモーション活性が既知の PEITC を 1000 ppm の用量で 14 日間混餌投与を行い, MTBITC の高用量投与による膀胱への早期影響について検討した。その結果, MTBITC および PEITC 1000 ppm 群において膀胱重量の有意な増加と膀胱における病理組織学的変化が観察された。粘膜下織の炎症細胞浸潤, 移行上皮細胞の単細胞壊死, 細胞質空胞化などの退行性病変は 14 日間通じて観察されたのに対し, 核分裂像の増加, 単純過形成, 並びに Ki-67 陽性細胞率の増加といった細胞増殖活性の増加を示唆する変化は, 投与 3 日時点で比較的強い傾向が認められた。一方, 100 および 300 ppm の MTBITC 投与群では, 影響は観察されなかった。以上より, 高用量の MTBITC (95.2 mg/kg BW/day に相当) が投与初期において, ラット膀胱に対して毒性影響を示すことが明らかとなり, PEITC と同様に膀胱へのプロモーション活性を有する可能性が示唆された。

第三章では, MTBITC の発がん作用の有無を検索する目的で, *in vivo* 遺伝毒性試験を実施した。6 週齢の雄性 F344 ラットに MTBITC を 10, 30, 90 mg/kg の用量で 3 日間経口投与し, 膀胱のコメットアッセイと, 骨髄の小核試験を実施した。その結果, いずれの用量においても, コメットアッセイにおける % Tail DNA (テールにおける DNA 含量の割合), 小核試験における MNPCCE% (小核を有する多染性赤血球の出現率) の増加は観察されず, MTBITC 処置が DNA 損傷, 染色体異常等の *in vivo* 遺伝毒性を惹起する可能性は低いことが示唆された。以上の結果から, 高用量の MTBITC 投与で認められたラット膀胱の毒性学的変化は, 非遺伝毒性学的メカニズムにより惹起されることが示唆された。

第一章でラット食道発がんの抑制効果が観察された MTBITC の用量は, ヒトの摂取量に換算すると 1 日当たりおよそ 60 から 160 g の京ダイコンに相当し, 現実的な摂取量であると考えられた。一方で, 第二章でラット膀胱において毒性影響を惹起した MTBITC の用量は, 1 日当たりの京ダイコン摂取量に換算すると, およそ 8 から 15 kg にも上ることとなり, ヒトがダイコンを食事から摂取する際に, 本実験で認められたような膀胱の病変が惹起される危険性は低いと考えられた。

学 位 論 文 要 約

氏 名 SUZUKI, Isamu

題 目 Studies on Chemomodulatory Action of 4-Methylthio-3-Butenyl Isothiocyanate (MTBITC) on Carcinogenesis in Rats
(MTBITC のラットにおける発がん修飾作用に関する研究)

Isothiocyanates (ITCs), a kind of the components in cruciferous vegetables, have been widely investigated for their promising chemopreventive effects. On the other hand, phenethyl isothiocyanate (PEITC) was reported to possibly possess not only promotion activity but also carcinogenic potential in the urinary bladder of rats. For 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC), a novel ITC extracted from daikon (Japanese white radish), there is only limited information about its chemopreventive effect, and there has been no report on its toxicity *in vivo* such as its carcinogenic effect on the urinary bladder. In the present study, I investigated these opposing effects of MTBITC on carcinogenesis; (1) chemopreventive effects on esophageal carcinogenesis model in rats, (2) early cytotoxic effects in the urinary bladder that may be an initial event of urinary bladder carcinogenesis, and (3) *in vivo* genotoxicity.

In Chapter 1, to examine the effects of MTBITC on esophageal carcinogenesis, male 6-week-old F344 rats were subcutaneously injected with 0.5 mg/kg BW *N*-nitrosomethylbenzylamine (NMBA) three times per week for 5 weeks and fed a diet supplemented with 80 ppm MTBITC. Although the incidence of lesions was not affected by MTBITC treatment, the multiplicity of proliferative lesions in the esophagus was significantly decreased in rats treated with MTBITC during the initiation and/or promotion stage as compared with rats treated with NMBA alone. Immunohistochemical analysis showed that MTBITC induced apoptosis, suppressed cell proliferation, and increased p21 expression when treated in the promotion phase. On the other hand, these modifying effects detected by immunohistochemistry were not observed in the rats treated with MTBITC alone. Results in the present study indicated that approximately 4-6 mg/kg BW/day MTBITC may exhibit chemopreventive effects against NMBA-induced esophageal carcinogenesis in rats.

In Chapter 2, to examine early toxicity of MTBITC, 6-week-old F344 rats were fed a diet

supplemented with 100, 300, or 1000 ppm MTBITC for 14 days. Treatment with 1000 ppm MTBITC (equivalent to 95.2 mg/kg BW/day) was shown to cause increased organ weights and histopathological changes in the urinary bladder, producing lesions similar to those of 1000 ppm PEITC. In histopathological analysis, degenerative changes were observed during the experimental period, and cell proliferative changes (*i.e.*, increased mitosis, simple hyperplasia and increased Ki-67-positive indices) were relatively more severe on day 3 than on day 14. Thus, MTBITC may cause remarkable changes in the urinary bladder during the early phase. On the other hand, rats treated with 100 or 300 ppm MTBITC showed no signs of toxicity in the urinary bladder.

Results in the present study suggested that MTBITC may have a potential promotion activity in the rat urinary bladder at high doses, similarly to PEITC.

In Chapter 3, I performed *in vivo* genotoxicity studies to clarify whether MTBITC exhibits carcinogenic potential in rats. Male 6-week-old F344 rats were treated with MTBITC for 3 days at doses of 10, 30, or 90 mg/kg BW by gavage, and comet assays of urinary bladder samples were performed. Micronucleus (MN) assays were also carried out using bone marrow samples.

No significant increases in the % tail DNA (the percentage of DNA in the tail) in the comet assays and MNPCE% (micronucleated polychromatic erythrocytes/polychromatic erythrocytes ratio) in the MN assays were detected for all doses of MTBITC, demonstrating that MTBITC may not induce DNA damage or chromosomal aberration *in vivo*. Overall, results in the present study suggested that MTBITC may exert toxic effects through the non-genotoxic mode of action in the urinary bladder of rats at high doses.

The estimated daily dose of MTBITC suppressing NMBA-induced esophageal carcinogenesis in rats is equal to about 60-160 g heirloom daikon for a 60-kg human. It is feasible to consume a sufficient amount of heirloom daikon. On the other hand, the estimated daily dose of MTBITC causing toxicity in the present study was roughly equivalent to 8-15 kg heirloom daikon in humans. Notably, it is unlikely that the toxicity of MTBITC observed in the present study would also occur in humans because this amount of daikon is much higher than normal dietary consumption. Further studies of the efficacy of MTBITC at lower nontoxic doses should be warranted.