

氏名(本(国)籍)	鈴木 勇(静岡県)
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 西川 秋佳
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第468号
学位授与年月日	平成28年9月16日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	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)
審査委員	主査 岐阜大学 准教授 梅村 隆志 副査 帯広畜産大学 教授 古林 与志安 副査 岩手大学 教授 佐藤 洋 副査 東京農工大学 准教授 吉田 敏則 副査 岐阜大学 教授 柳井 徳磨 副査 岐阜大学 教授 西川 秋佳

### 学位論文の内容の要旨

アブラナ科野菜に含まれ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) 誘発ハムスター膀胱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、ラット膀胱に毒性学的変化とそれに引き続く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。疫学調査にて、ダイコンなどの野菜の摂取量と食道扁平上皮がんのリスクに逆相関が認められたとの報告があるが、MTBITC の作用に関して、その低用量投与による BOP 誘発ハムスター膀胱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いない。本研究では、MTBITC の食道における発がん抑制作用、高用量処置時の膀胱への毒性影響、*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、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、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食道の増殖性病変の発生を抑制し、NMBA 誘発食道発がん抑制作用を有することが示された。免疫組織化学的検索の結果、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、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。

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。

第二章では、雄性 F344 ラットに MTBITC を 100, 300, 1000 ppm で、また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 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増加と、膀胱における病理組織学的変化が観察された。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 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、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、膀胱コメットアッセイと骨髓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 MNPCE% (小核を有する多染性赤血球の出現率) は陰性の結果であり、MTBITC 処置が *in vivo* 遺伝毒性を惹起する可能性は低いと考えられた。以上より、高用量の MTBITC 投与による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。

## 審 査 結 果 の 要 旨

イソチオシアネート類は、低用量にて種々の発がんモデル系に抑制効果を示すが、高用量ではラット膀胱に毒性学的変化と増殖性病変を惹起すると報告されている。一方、疫学調査でダイコン等の野菜の摂取量と食道扁平上皮がんのリスクに逆相関が認められているが、ダイコンに含まれる 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (MTBITC) の作用は十分に検討されていない。本研究では、MTBITC の食道発がん抑制作用、高用量処置の膀胱への毒性影響、*in vivo* 遺伝毒性に関する検討を行った。

第一章では、雄性 F344 ラットに *N*-nitrosomethylbenzylamine (NMBA) によるイニシエーション処置を行い、イニシエーション期、プロモーション期、および全期間 MTBITC を 80 ppm の混餌で併用投与した。その結果、MTBITC はイニシエーション期に加え、プロモーション期にも NMBA 誘発食道発がん抑制作用を示し、免疫組織化学的検索から、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、雄性 F344 ラットに MTBITC を 100, 300, 1000 ppm で、また膀胱毒性が既知の Phenethyl isothiocyanate (PEITC) を 1000 ppm で 14 日間混餌投与したところ、MTBITC および PEITC 1000 ppm 群でのみ、膀胱の重量増加、病理組織学的変化が観察され、高用量の MTBITC は PEITC と同様にラット膀胱に毒性影響を示すことが明らかとなった。

第三章では、雄性 F344 ラットに MTBITC を 10, 30, 90 mg/kg で 3 日間経口投与したところ、膀胱コメットアッセイと骨髓小核試験は陰性を示し、MTBITC は *in vivo* 遺伝毒性を惹起しないと考えられた。以上、高用量の MTBITC によるラット膀胱の毒性学的変化には、非遺伝毒性メカニズムが関与していると推察された。

ラット食道発がん抑制効果が観察された MTBITC の用量は、ヒトの摂取量で 1 日当たり

およそ 60 から 160 g の京ダイコンに相当し、現実的な摂取量と考えられた。一方、ラット膀胱に毒性影響を惹起した MTBITC の用量は、およそ 8 から 15 kg に相当し、ヒトがダイコンを摂取する際に、上記膀胱の病変が惹起される危険性は低いと考えられた。

以上について、審査委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があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (*Raphasatin*) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats
- 著 者 名 : Suzuki, I., Cho, Y. M., Hirata, T., Toyoda, T., Akagi, J., Nakamura, Y., Park, E. Y., Sasaki, A., Nakamura, T., Okamoto, S., Shirota, K., Suetome, N., Nishikawa, A. and Ogawa, K.
- 学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
- 巻・号・頁・発行年 : In Press

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Detection of  $\gamma$ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats
- 著 者 名 : Toyoda, T., Akagi, J., Cho, Y. M., Mizuta, Y., Onami, S., Suzuki, I. and Ogawa, K.
- 学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
- 巻・号・頁・発行年 : 26: 215-221: 2013