

報 告

ラット肺における発癌物質 DNA 付加体の観察

大 山 謙 一 宮 垣 融 大 野 正 彦
 伊 藤 隆 明 柴 垣 徳 彦 薄 田 康 広
 (横浜市立大学医学部) (筑波大学基礎医学系) (横浜市立大学医学部)
 蟹 沢 成 好
 (横浜市立大学医学部)

1 はじめに

今日、環境中の大気汚染物質が、肺疾患の発生に大いに影響していることは共通の認識となっている。喫煙やアスベスト、ウラン、クロム等の汚染物質が、肺癌の原因であることは、かなり確定的であるが、大気汚染が肺癌の発生にどのように関わっているかは、まだ十分には解明されていないのが現状である。

しかし、大気浮遊粉じん(以下、TSPと記する)中には発癌物質であるベンゾ(a)ピレン(以下、BaPと記する)等が微量ながら含有されており、TSPを吸入した肺の中では細胞中のDNA(デオキシリボ核酸)に何らかの影響を及ぼすことは、十分考えられる。DNAは、細胞の遺伝情報を伝える物質であるが、このDNAにTSPに含有される化学物質が結合した(DNA付加体形成)場合には誤った情報が伝えられることになり、腫瘍発生の原因となり得る。著者らは、平成2年度よりTSPと大気汚染ガス(NO₂, SO₂)による腫瘍発生実験をラットを用いて行っているが、その一環としてTSP又はBaPを気管内に注入したラットの肺を感度の鋭敏な³²P-ポストラベル法と形態的に観察できる免疫組織化学的手法を用いてDNA付加体形成を観察し、TSP中に含有される化学物質による発癌の最初の過程であるイニシエーションについて検索した。また、同時にNO₂・SO₂の暴露によるDNA付加体形成への影響についても検討した。

2 実験方法

SPF(Specific Pathogen Free) Fischer 344ラット(雄)7週齢36匹を以下の7群に分けて実験を行った。① TSP + NO₂ + SO₂群(6匹)；② BaP + NO₂ + SO₂群(6匹)；③ 溶剤 + NO₂ + SO₂群(4匹)；④ TSP群(6匹)；⑤ BaP群(6匹)；⑥ 溶剤群(4匹)；⑦ 無処置群(4匹)。

各々の実験群に応じて、ラットに1週間に1回、連続して10週間TSP(10mg×10回)、BaP(2mg×10回)、又はその溶剤を0.2ml気管内に注入した。

TSPは、ハイポリリュームエアサンプラーにより1990年11月に都内で採取し、ジクロロメタン(残留農薬試験用)で20分間超音波洗浄し、ロータリーエバポレーターで減圧乾固させ、5%のオリーブ油と0.05%のTween 80を加えたりん酸緩衝食塩水で懸濁液にした(10mg/0.2ml)。BaPも同様に懸濁液(2mg/0.2ml)にして用いた。

ガス暴露は、NO₂, SO₂各々2 ppmで1日16時間10週間間欠で行った。

10週間の処置終了後、動物は、1日及び4日目に半数ずつネブタール麻酔下でと殺した。以上の実験期間を図1に示した。なお、これ以降の実験操作は、横浜市立大学で行った。

(1) 発癌物質DNA付加体の³²P-ポストラベル法による観察

³²P-ポストラベル法の原理は、修飾を受けた(化学物質が結合した)DNAを2つの核酸分解酵素によって、3'-モノヌクレオチドに分解し、更に酵素反応により、γ-³²P-ATPから³²Pを5'-OHの位置へ転移させた後、正常ヌクレオチドを除去して薄層クロマトグラフィーに

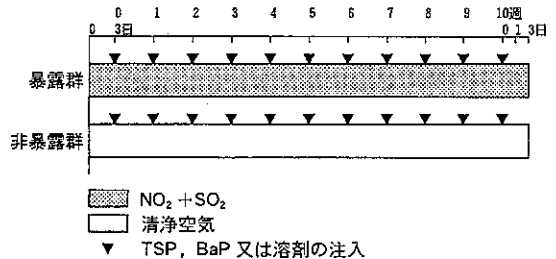


図1 実験期間

より付加体を二次元展開し、オートラジオグラフィーにより検出するものであるが、極めて高感度な手法である。

生理的食塩水をラットの心臓の右心室より灌流した後、左肺と右肺前葉、中葉及び心臓葉を凍結した（右肺後葉は、免疫組織化学的観察に供した）。

DNAの抽出は、ラット個体ごとに行い、プロテインアーゼK（和光）処理とフェノール-クロロフォルム抽出-エタノール沈殿法に沿って行った。最終DNA濃度は、0.1~1mg/mlにした。DNA濃度が希薄であれば、凍結乾燥により調節した。調製したDNAを micrococcal endonuclease（Sigma）、脾臓 phospho-di-esterase（boehringer）で消化し、更にヌクレアーゼ P1（ヤマサ醤油）で処理した。試料をポリヌクレオチドキナーゼ（日本ジーン）及び γ - ^{32}P -ATP（ICN）と反応させた。 ^{32}P で標識された標品を PEI-cellulose plate（Schleicher & Schuell）に載せた。第1回目の展開は、1.1M塩化リチウム中で一晩行い、洗浄乾燥後、2.5Mギ酸アンモニウム中で第2回目の展開を行った。3回目には、3Mギ酸リチウム、7.5M尿素中で行い、更にオートラジオグラフィー（ARG）の背景を清澄するために1.7Mりん酸ナトリウム中で一晩展開した。ARGの暴露は、 -20°C で約一晩行った。

(2) 発癌物質DNA付加体の免疫組織化学的手法による観察

付加体の免疫組織化学的手法は、肺のパラフィン切片にDNA付加体に対する特異抗体を作用させ、後に発色剤で発色させて光学顕微鏡下で観察する手法であり、DNA付加体形成とその部位を確認できる。

上記実験群のラットの右肺後葉を生理的食塩水で灌流し、4%パラフォルム-アルデヒドで固定し、パラフィン包埋した。切片をRNase T1（Worthington）、2N塩酸で処理した。洗浄後、1次抗体（抗BaP-DNA付加体抗体、anti-BP-DE modified DNA antibody²³）と反応させABC法³⁷で検出した。

3 結 果

(1) 発癌物質DNA付加体の ^{32}P -ポストラベル法による観察

TSP + NO₂ + SO₂群では、付加体の形成は注入終了後1日で1個（写真1）、注入終了後4日で4個認められ

た（写真2）。

TSP群でも同じような場所に付加体の形成が注入終了後1日で1個（写真3）、注入終了後4日で4個認められたが（写真4）、NO₂・SO₂暴露による付加体形成に及ぼす影響はなかった。

BaP + NO₂ + SO₂群では、付加体の形成は、注入終了後1日で2~4個（写真5）、注入終了後4日で4カ所形成された（写真6）。

BaP群でも同時期に同様な付加体形成が認められたが（写真7、8）、NO₂・SO₂暴露による付加体形成に及ぼす影響はなかった。

TSPを注入した群とBaPを注入した群を比較すると、一部で共通と思われるスポットを形成した。

なお、TSP、BaPを注入しなかったラットでは、付加体の形成は認められなかった。

(2) 発癌物質DNA付加体の免疫組織化学的手法による観察

BaP注入群でNO₂、SO₂暴露の有無にかかわらず注入終了後1日、4日共に気管支上皮（写真9）、細気管支上皮（写真10）及び肺胞上皮（写真11）の細胞核及び細胞質の一部に陽性反応がみられた。TSP注入群では、NO₂、SO₂暴露の有無にかかわらず注入終了後1日、4日共に気道及び肺胞上皮の細胞質の一部（写真12）に陽性反応がみられたが、細胞核にはみられなかった。溶剤 + NO₂ + SO₂群、溶剤群及び無処置群では、陽性反応はなかった。

4 考 察

TSP抽出物の気管内注入によりDNAの修飾が起こることが ^{32}P -ポストラベル法により明らかになった。このことは、TSP中に含まれる有機物が肺細胞のDNAと付加体を形成することを初めて示したものである。現在、大気中の変異原物質の検索方法としては、ユームステストや姉妹染色体交換等が利用される³³が、 ^{32}P -ポストラベル法は、定性及び定量的検索への発展性も秘めていて、今後、環境中の変異原性、発癌性物質の検索には、欠かせない方法となっていくと思われる。

付加体形成の誘因となったTSP中の物質については、TSPが複雑な複合体から成っていることから、その同定は困難であるが、BaPのクロマトグラム（薄層クロマトグラフィーの模様）と類似した点があることから、



写真 1

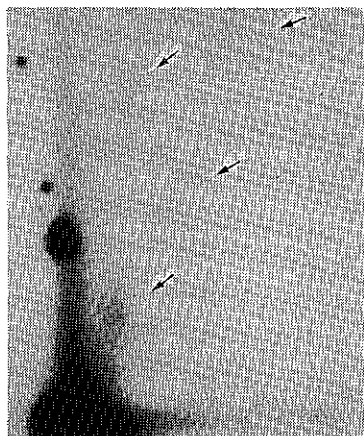


写真 2

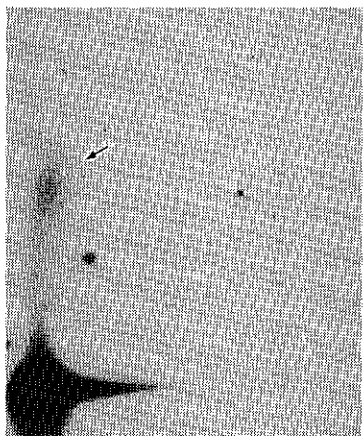


写真 3

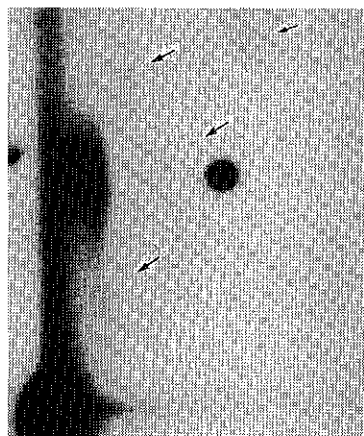


写真 4

写真 1

TSP + NO₂ + SO₂ 群；注入終了後 1 日のラット肺 DNA の ³²P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム。1 個のスポットが形成されている。TSP のみ注入の写真 3 と同様なことに注目。

写真 2

TSP + NO₂ + SO₂ 群；注入終了後 4 日のラット肺 DNA の ³²P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム。4 個のスポットが形成されている。TSP のみ注入の写真 4 と同様なクロマトグラムである。

写真 3

TSP 群；注入終了後 1 日の肺 DNA の付加体のクロマトグラム。写真 1 のクロマトグラムと類似している。

写真 4

TSP 群；注入終了後 4 日の肺 DNA の付加体のクロマトグラム。写真 2 と同様である。

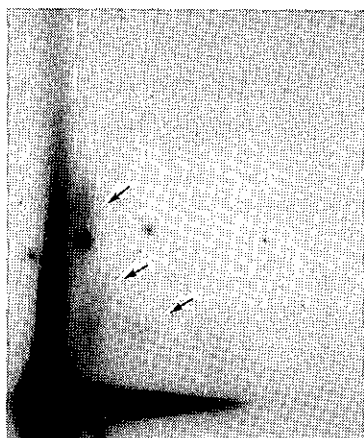


写真 5



写真 6

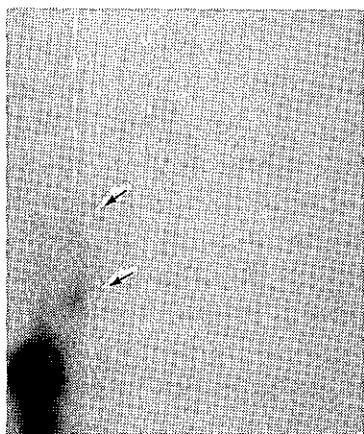


写真 7

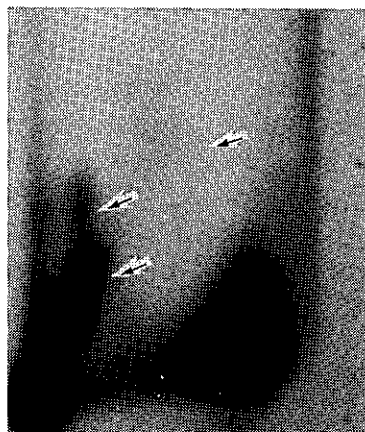


写真 8

写真 5

BaP + NO₂ + SO₂ 群；注入終了後 1 日のラット肺 DNA の ³²P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム。4 個のスポットが形成されている。

写真 6

BaP + NO₂ + SO₂ 群；注入終了後 4 日のラット肺 DNA の ³²P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム。4 個のスポットが形成されているが、写真 5 の 1 日の結果と異なる位置にみられる。

写真 7

BaP 群；注入終了後 1 日のラット肺 DNA の ³²P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム。写真 5 のクロマトグラムと類似している。

写真 8

BaP 群；注入終了後 4 日のラット肺 DNA の ³²P-ポストラベル法による付加体のクロマトグラム。写真 6 のクロマトグラムと類似している。

TSPによる付加体の形成には、TSP中に含まれるBaPが関与していると思われた。

更に、今回の実験より興味あることが2点明らかになった。第一に、TSPあるいはBaP注入終了後の期間が異なるると異なる付加体が形成されるということである。これは、いったん付加体が形成されても代謝が進むにつれ、その付加体に変化していくということであり、つまり、発癌を考える上でそのように変化してしている付加体のうちどれが発癌機構上重要であるかを今後見きわめていく必要がある。

第二に、NO₂、SO₂よりなる複合暴露が付加体の形成に影響がないように見えた点で、このことは高濃度大気汚染ガス暴露による肺発癌誘発促進作用は、発癌物質DNA付加体形成レベルで起こるのではないと考えられる。

今回用いた抗体で免疫組織学的に付加体を観察することは、既に *in vitro*, *in vivo* の実験でBaPを投与した実験系で陽性反応が認められることが報告されている²⁾。この報告によると、マウスにBaPを経口投与すると肺胞上皮細胞が染色され、そこにBaP-DNA付加体が存在していることを示している。今回のBaPの実験でも、投与経路が経気道的である点と動物差がある点が異なるが、肺胞上皮細胞(恐らく肺胞Ⅱ型上皮細胞)が陽性に染色された。マウスの実験では、気道上皮細胞について言及されていないが、今回の実験では、気管支、細気管支及び肺胞の上皮細胞の核も染色されており、経気道的な経路でBaPを暴露したためと思われる。

TSPを投与することにより、核は染色されなかったが細胞質が染色された。これは、この抗体が認識する付加体あるいはそれと交叉反応する代謝産物が細胞室内に現れたものと思われる。

³²P-ポストラベル法では、TSPとBaPは一部一致したスポットを有したことから、TSPによる付加体形成では、BaPの関与があるらしいと上述したが、免疫染色の結果からは、このことを積極的に支持する結果は、得られなかった。

5 まとめ

TSPまたはBaPをラットの気管内に注入し、更に2 ppm NO₂、2 ppm SO₂を1日16時間で10週間暴露して、肺における発癌物質DNA付加体の観察を³²P-ポスト

ラベル法と免疫組織化学的手法を用いて行った結果次のことがわかった。

(1) ³²P-ポストラベル法

- ① TSP中に含まれる有機物が肺細胞のDNAと付加体を形成した。
- ② TSPとBaPのクロマトグラムでは、類似した点が見られた。
- ③ TSPあるいはBaP注入終了後の期間が異なるると異なる付加体が形成された。
- ④ NO₂、SO₂よりなる複合暴露は、付加体の形成に影響がなかった。

(2) 免疫組織化学的手法

BaPを気管内に注入したラットの肺胞上皮細胞が陽性に染色された。

参考文献

- 1) Randerath, K., *et al.* : A new sensitive ³²P-postlabeling assay based on the specific enzymatic conversion of bulky DNA lesions to radiolabeled dinucleotides and nucleoside 5'-monophosphates, *Carcinogenesis*, 10, p 1231-1239 (1989).
- 2) Nemoto, N., *et al.* : Immunohistochemical detection of anti-(±)-trans-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene-bound adduct in nuclei of cultured HeLa cells and mouse lung tissue, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 114, p.225-230 (1988).
- 3) Hsu, S. M., *et al.* : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabelled antibody(PAP)procedures, *J. Histochem. Cytochem.*, 29, p.577-580 (1981).
- 4) 常盤寛 : 大気中の変異原物質とその測定法, 大気汚染学会誌, 26, A111-A123 (1991).
- 5) Hienrich, U., *et al.* : Experimental methods for the detection of carcinogenicity and/or cocarcinogenicity of inhaled polycyclic-aromatic-hydrocarbon containing emissions, In : *Cancer of the respiratory tract, Predisposing factors*, M. J. Mass, *et al.*, p 131 (1985).
- 6) Stinson, S.F., *et al.* : Experimental respiratory

carcinogenesis with polycyclic aromatic - hydro - carbons, In : Comparative respiratory tract carcinogenesis, 2, H. M. Reznik - Schiler, p.75 (1983).

7) 佐藤秩子ら：気管支上皮内自家蛍光顆粒発現様式の形態分析，ヒト肺癌症例とスunks肺での検討，肺癌，29, p.337-342 (1989).



写真9

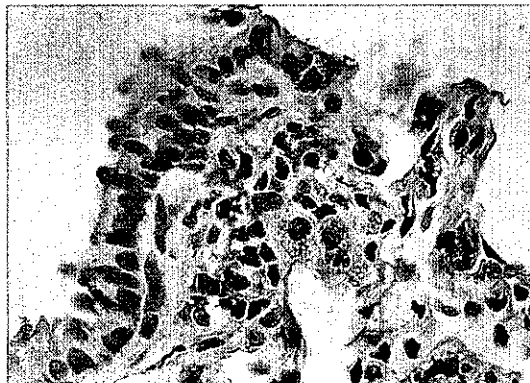


写真10

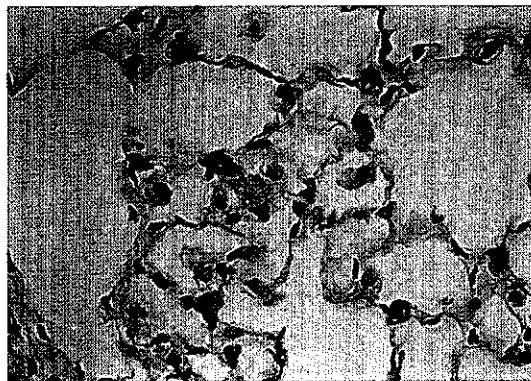


写真11

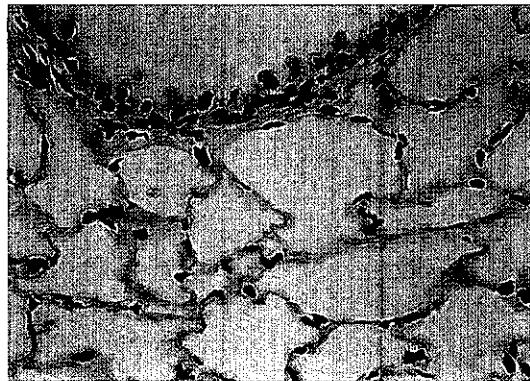


写真12

写真9

BaP + NO₂ + SO₂群；注入終了後4日のラット気管支。気道上皮の核を中心に陽性反応がみられる。BaP-DNA付加体免疫染色。×700。

写真10

BaP + NO₂ + SO₂群；注入終了後4日のラット細気管支。一部の核と細胞質に陽性反応が見られる。BaP-DNA付加体免疫染色。×700。

写真11

BaP群；注入終了後4日のラット肺胞。恐らく反応性のⅡ型上皮細胞の細胞質と核に陽性反応が見られる。BaP-DNA付加体免疫染色。×700。

写真12

TSP + NO₂ + SO₂群；注入終了後1日のラット細気管支及び肺胞。細胞質の一部に陽性反応が見られる。BaP-DNA付加体免疫染色。×560。