

#### A-4 紫外線の増加が人に及ぼす影響に関する疫学的視点を中心とした研究

##### (5) 人の紫外線曝露に対する遺伝的感受性決定要因の解明に関する研究

##### ② 有害化学物質との複合曝露による発がん過程に及ぼす酸化ストレスの寄与に関する研究

研究代表者

国立環境研究所環境健康部

遠山千春

国立環境研究所

環境健康部

病態機構研究室

張 宝旭

佐藤雅彦

青木康展

【要旨】 酸化ストレスに対して感受性であるメタロチオネイン遺伝子欠損 [MT (-/-)] マウスを用いて、典型的な環境発がん物質である7,12-ジメチルベンズ [a] アントラセン (DMBA) および紫外線の複合曝露による発がん影響を検討した。DMBA (100, 250, 500  $\mu\text{g}$ /マウス) をマウス背部皮膚に1回塗布し、1週間後から紫外線 (UVB, 5 KJ/m<sup>2</sup>) を3回/週、連続13週間照射した。その結果、DMBAによる皮膚での急性および慢性の炎症性損傷並びに発がん作用が両マウス共に紫外線 B の曝露によって増強されることが認められた。また、様々な投与量のDMBAと紫外線 B を複合曝露したMT (-/-) マウスでは、皮膚の腫瘍発現が投与量依存的に認められ、しかも、野生型 [MT (+/+)] マウスに比べて高い感受性を示すことが明らかとなった。以上の結果より、酸化ストレスが深く関与して生じる皮膚での急性および慢性の炎症性損傷が複合曝露による皮膚がんを促進することが示された。

【キーワード】 紫外線, 7, 12-ジメチルベンズ [a] アントラセン, 皮膚発がん, 酸化ストレス, メタロチオネイン

## 1. 序

ヒトは、紫外線のみならず様々な環境有害因子に曝露されており、複合曝露による環境発がんが重要な問題であるが、疫学的調査研究のみからその証拠を得ることは困難である。<sup>1, 2)</sup> 紫外線によって生じる皮膚がん発症過程の様々な反応において、紫外線への曝露によって発生する活性酸素の関与については不明な点も多い。さらに、人間集団の感受性の違いが発がん過程に及ぼす影響の違いについての検討は、リスク評価の際に不可欠である。本研究においては、酸化ストレスに対する感受性が異なる動物に対して、発がん物質と紫外線の複合曝露実験を行うことにより、実際に紫外線とその他の環境有害因子による発がんへの影響を評価するためのベースとなる実験データを提供することを目的とする。

## 2. 研究目的

紫外線の影響は、様々な環境有害物質の複合曝露によって、増強する可能性があり、有害化学物質との複合曝露による発がん過程の変化を解明することは、ヒト社会における紫外線の健康影響を正確に把握する際に極めて重要な要因である。そこで、酸化ストレスに感受性の高いメタロチオネイン遺伝子欠損 [MT (-/-)] マウスを用いて、7, 12-ジメチルベンズ [a] アントラ

セン (DMBA) および紫外線の複合曝露による生体影響を検討した。

### 3. 研究方法

#### 実験材料

DMBA は Sigma 社より購入した。DMBA は四環式芳香族炭化水素に属する強力な発癌物質であり、皮膚、乳腺、卵巣等の発癌実験に多用されている。

#### 実験動物

MT (-/-) マウスおよびその対照マウスである MT (+/+) マウスは、オーストラリアの A. Choo 博士から供与を受け、国立環境研究所動物施設で繁殖・飼育している。実験は、温度  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、常時換気、照明 12 時間 (7 - 19 時) に設定したバリヤ方式の動物飼育室で実施した。動物はステンレススチール金網ケージで飼育し、固形飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社) および水道水を自由に摂取させた。ペントバルビタール麻酔下で 10 週齢雌の両マウス背部の体毛をそれぞれ電気バリカン (大東電気工業) を用いて刈った。

#### 発がん物質の曝露および紫外線照射

DMBA (100, 250, 500  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  アセトン/マウス) を両マウス背部皮膚にそれぞれ 1 回塗布し、1 週間後から紫外線 (UVB, 5  $\text{KJ}/\text{m}^2$ ) を 3 回/週、連続 13 週間 (40 回) 照射した。紫外線照射は照射箱を用いて、紫外線灯 (FL15E, 280-400 nm, 最大波長 312nm; NIS Com, 日本) を使用した。

#### 検査項目

マウスの外観変化 (糜爛、潰瘍および腫瘍など) および死亡の有無は毎日観察した。紫外線照射 14 週目に、エーテル麻酔下で心臓より採血した後に、照射部位 (背部) の皮膚を採取した。皮膚の一部は組織固定液 (10% 中性緩衝ホルマリン溶液) で固定し、常法に従いパラフィン切片 (5  $\mu\text{m}$ ) を作成し、H-E 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

### 4. 結果

#### UVB 単独短期曝露の影響

UVB 単独照射したマウスの表皮の肥厚を Fig. 1 に示した。その結果、UVB を単独照射した MT (-/-) マウスおよび MT (+/+) マウスは、共に UVB の照射量並びに照射回数に依存して、皮膚の肥厚の増加が観察された。また、2.5 および 5.0  $\text{KJ}/\text{m}^2$  の UVB 照射では、両マウス間で皮膚の肥厚に有意な差は認められなかったが、5.0  $\text{KJ}/\text{m}^2$  の UVB 照射した MT (-/-) マウスでは、MT (+/+) マウスに比べて皮膚の肥厚が顕著であった。

#### DMBA/UVB 短期複合曝露の影響

DMBA をマウス背部皮膚に 1 回塗布し、その 1 週間後から UVB の照射を開始して、3 回照射 24 時間後のマウス皮膚の外観変化の観察結果を Table 1 に示した。MT (-/-) マウスでは DMBA + UVB 群および DMBA 単独群共に投与量に依存して潰瘍が認められた。一方、MT (+/+) マウスでは DMBA + UVB 群で投与量依存的に潰瘍が認められたが、DMBA 単独群ではこのような変化は観察されなかった。また、DMBA と UVB を複合曝露した MT (-/-) マウスは MT (+/+) マウスに比べて、潰瘍の発生頻度が高かった。

さらに、DMBA (500  $\mu\text{g}/\text{マウス}$ ) と UVB を複合曝露したマウス皮膚の病理組織学的形態変

化を Fig. 2 に示した。DMBA を単独塗布して、8 日後の MT (-/-) マウスおよび MT (+/+) マウスは、共に表皮の細胞増殖が観察された (Fig. 2A,E)。さらに、12 日後では、すべての MT (-/-) マウスに表皮の細胞増殖が認められたが、MT (+/+) マウスの表皮はコントロールレベルまで回復した (Fig. 2C,G)。また、MT (-/-) マウスおよび MT (+/+) マウス共に DMBA による皮膚の潰瘍が UVB の照射によって増強され、その程度は MT (-/-) マウスの方が重度であった (Fig. 2B,D,F,H)。

#### DMBA/UVB 長期複合曝露の影響

DMBA と UVB との長期複合曝露によるマウス皮膚での腫瘍並びに潰瘍の発生頻度を Table 2 および Table 3 に示した。UVB 連続照射 1 3 週間後の亜慢性期変化には、主な皮膚病理学的所見として、MT (-/-) マウスでは、DMBA 単独群および DMBA+UVB 群共に投与量依存的に腫瘍を発生した。UVB 単独群では表皮の肥厚が認められた。腫瘍の発生率は、DMBA+UVB 群の方が DMBA 単独群より高い傾向を示した。一方、MT (+/+) マウスにおいて、DMBA 単独群では腫瘍の発生および潰瘍が全く認められなかった。また、DMBA+UVB 群では 500  $\mu$ g DMBA 群で 20 % のマウスに腫瘍が発生し、他の変化は MT (-/-) マウスより軽度であった。UVB 単独群で皮膚表皮の肥厚が見られたが、その程度は MT (-/-) マウスより軽かった。

#### 5. 考察

MT はシステイン含量が極めて高い金属結合蛋白質で、多数の生物種に存在し組織の再生や成長時に合成され、重金属など様々な化学物質やストレス条件下でも誘導合成される。MT は重金属解毒作用、亜鉛と銅の代謝調節、ラジカル消去作用などを示し、最近、特に生体内での抗酸化作用が注目されている<sup>3)</sup>。MT (-/-) マウスは、抗酸化因子の一つである MT の遺伝子の発現を人工的に抑えたため、生体内の抗酸化能が低下された状態になっている。

本研究結果から、紫外線のみを処置した MT (-/-) マウスでは強い日焼け症状は認められなかったが、表皮の肥厚という細胞増殖反応は MT (+/+) マウスより激しく、紫外線に対する感受性が高い傾向を示した。また、DMBA を単独投与した MT (+/+) マウスでは急性および発癌などの慢性反応は認められなかったが、MT (-/-) マウスでは潰瘍などの急性反応および乳頭腫並びに潰瘍などの慢性反応が観察された。このように、紫外線あるいは DMBA による皮膚への傷害に酸化的ストレスが深く関与することが明らかとなった。

紫外線は表皮の不飽和脂肪酸を酸化し、酵素失活など細胞機能に障害を与え、癌化過程でプロモーションとして働くことが知られている。本研究において、亜慢性の紫外線曝露により、DMBA の作用が増強することが明らかとなった。とくに MT (-/-) マウスでは MT (+/+) マウスよりも腫瘍の発生頻度が高かった。

皮膚は諸臓器の中でもとりわけ環境因子による酸化ストレスを多く受けやすい臓器である。紫外線の曝露により活性酸素種が生体内で発生し、遺伝子損傷、免疫抑制などを通じて皮膚がん発症等慢性変化にいたると考えられる。一方、酸化的ストレスに対する感受性の異なるマウスを用いて今回の複合曝露条件における実験結果より、紫外線のプロモーション作用は重要視しなければならない。人間集団における皮膚への感受性の差は、MT など抗酸化因子能力の差によるかもしれない。

## 6. まとめ

- 1) DMBAのみを処置した MT (+/+) マウスでは腫瘍の発生が全く認められなかったが、酸化ストレス高感受性 MT (-/-) マウスでは投与量依存的に腫瘍が発生した。
- 2) MT (-/-) マウスおよび MT (+/+) マウス共に、紫外線の曝露により、DMBA の作用が増強し、その感受性は MT (-/-) マウスの方は MT (+/+) マウスより高かった。しかも、DMBA と UVB の複合曝露の作用は表皮肥厚、潰瘍、腫瘍など多様であった。
- 3) 以上の結果より、DMBA および紫外線の複合曝露による皮膚細胞損傷には遺伝子の損傷作用が関与することが示唆された。

## 7. 参考文献

- 1) 環境庁地球環境部監修 (1995) オゾン層破壊紫外線による健康影響, 植物・生態系への影響, 中央法規出版, 東京, pp37-121.
- 2) Gallagher, R.P., Bajdik, C.D., Fincham, S., Hill, G. B., Keefe, A, R., Coldman, A. and Mclan, D.L. (1996) Chemical exposure, medical history, and risk of squamous and basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Epi. Biomar. Pre.*, 5, 419-424.
- 3) 佐藤政男 (1994) メタロチオネイン-多機能性金属結合蛋白質-, *Toxicology Today*, 佐藤洋編集, 金芳堂, 東京, pp275-272.

### 〔国際共同研究等の状況〕

張宝旭氏は中国北京医科大学から FE-Fellow としてこの共同研究課題に参加している。北京医科大学では 2 年前から紫外線による健康影響に関する研究が始まり、両国間に頻りに情報交換を行っている。張氏は中国に帰した後、この課題の共同研究、特に日中間の比較的疫学調査を開始する予定である。

### 〔研究成果発表状況〕

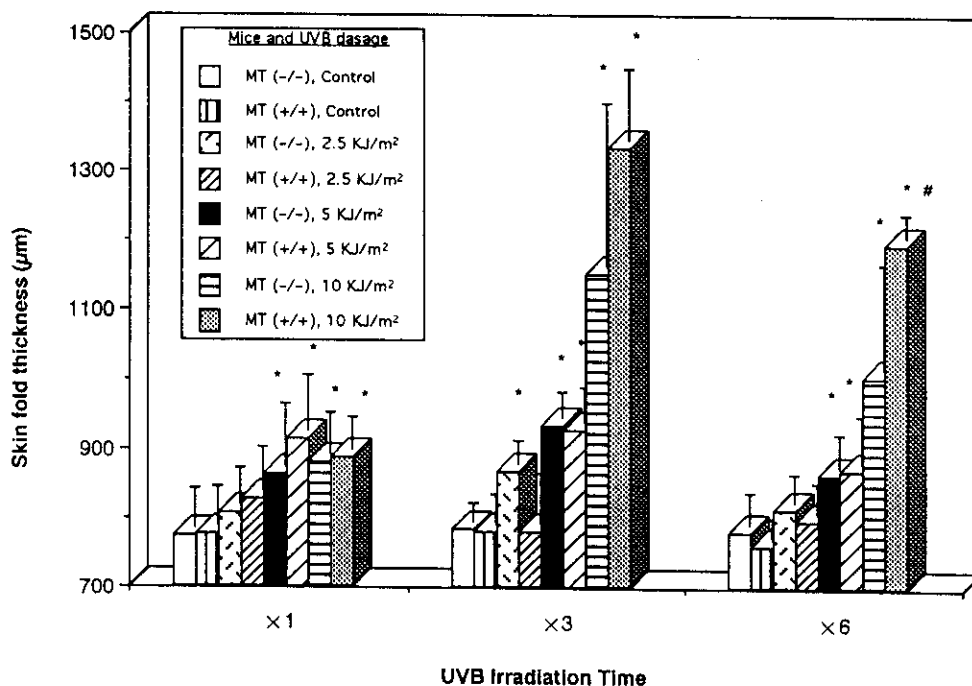
#### (1) 口頭発表

- ①張宝旭、佐藤雅彦、西村典子、曾根秀子、遠山千春、DMBA に対するメタロチオネインの抗発癌作用—メタロチオネイン遺伝子欠損マウスによる検討、第 24 回日本毒学会学術年会 (1997)。
- ②張宝旭、佐藤雅彦、曾根秀子、青木康展、遠山千春、メタロチオネイン遺伝子欠損マウスにおける DMBA および紫外線の複合曝露に対する皮膚発癌の増大、第 56 回日本癌学会総会 (1997)。
- ③Baoxu Zhang, Masahiko Satoh, Hideko Sone, Yasunobu Aoki, Chiharu Tohyama. Enhanced sensitivity to DMBA in metallothionein null mice. *The Fourth International Metallothionein Meeting (1997)*.
- ④佐藤雅彦、張 宝旭、曾根秀子、遠山千春、DMBA による皮膚発がんに対するメタロチオネインの抑制効果、第 57 回日本癌学会総会 (1998)。
- ⑤西村典子、張 宝旭、鈴木純子、佐藤雅彦、遠山千春、メタロチオネイン遺伝子欠損マウスにおける化学皮膚発がんの増強、第 24 回環境トキシコロジーシンポジウム (1998)。

- ⑥張 宝旭、佐藤雅彦、遠山千春、化学発がん物質による皮膚での炎症作用に対するメタロチオネインの防御的役割、第119回日本薬学会総会（1999）。
- ⑦鈴木純子、張 宝旭、西村典子、佐藤雅彦、遠山千春、高橋幸久、武田 健、二段階化学皮膚発がんに対するメタロチオネインの防御効果、第119回日本薬学会総会（1999）。
- ⑧Baxou Zhang, Masahiko Satoh, Junko S. Suzuki, Noriko Nishimura, Chiharu Tohyama, Deficiency of metallothionein promotes skin carcinogenesis caused by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. The 38th Annual Meeting of Society of Toxicology (1999).

（2）論文発表

- ①Zhang, B., Satoh, M., Nishimura, N., Suzuki, J. S., Sone, H., Aoki, Y. and Tohyama, C. Metallothionein deficiency promotes mouse skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res.*, 58, 4044-4046 1998.
- ②Satoh, M., Tohyama, C., Susceptibility to Metals and Radical Inducing Chemicals in Metallothionein-null Mice. In *Metallothionein IV*, ed by C. Klaassen, pp. 541-546, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, 1999.



**Fig. 1. Skin Inflammatory Response after Short-term UVB Irradiation in MT (-/-) mice and MT (+/+) Mice.**

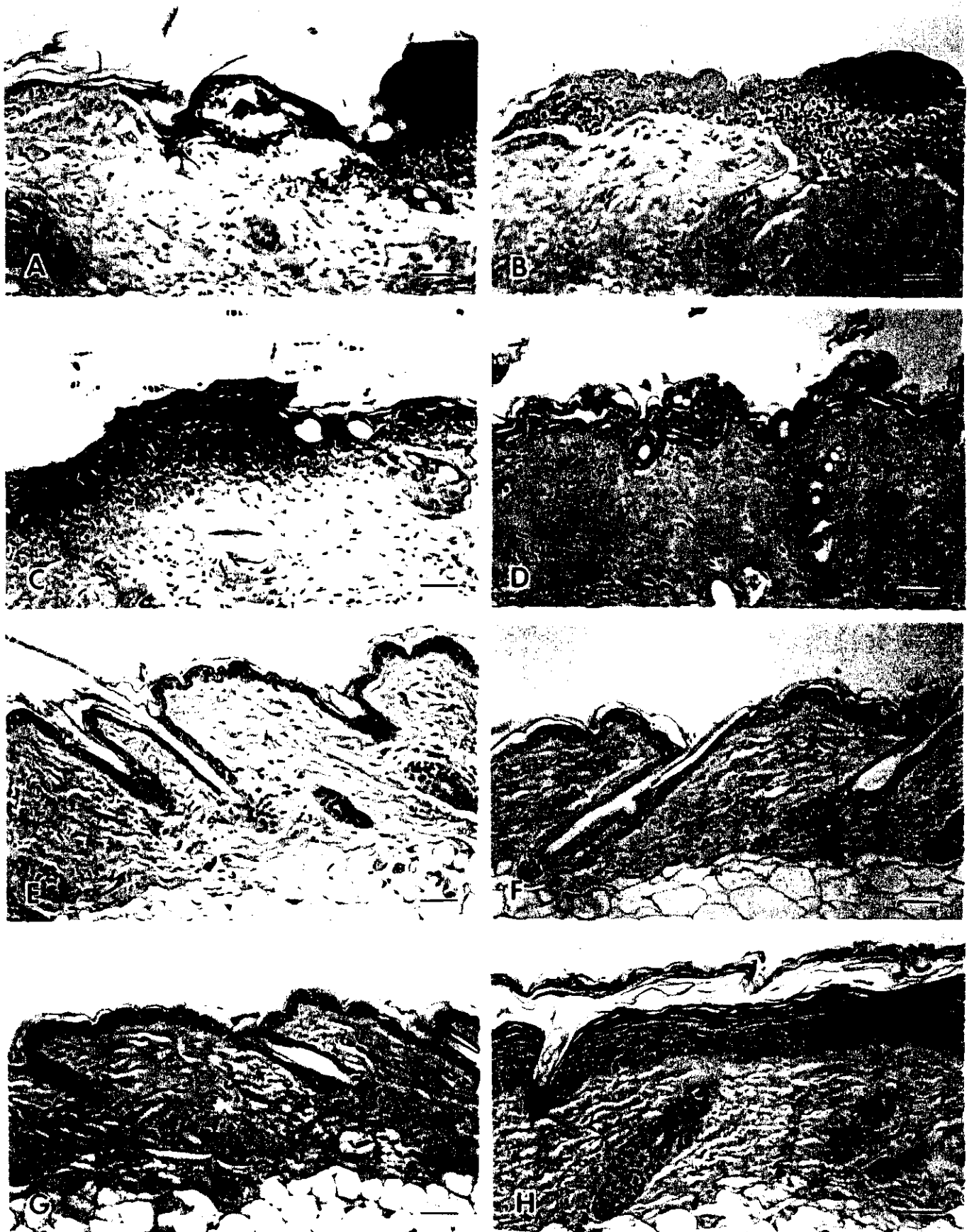
\* Significantly different from the corresponding control mice ( $P < 0.05$ ,  $n = 5$ , mean  $\pm$  SD).

# Significantly different from the corresponding MT (-/-) mice ( $P < 0.05$ ,  $n = 5$ , mean  $\pm$  SD).

**Table 1 Mouse Skin Acute Inflammatory Response Caused by a Single Application of Different Doses of DMBA or DMBA Followed Three Times of UVB Irradiation**

Treatment	Ulceration (%)*	
	MT(-/-)	MT(+/+)
Control	0	0
DMBA(100 $\mu$ g)	0	0
DMBA(250 $\mu$ g)	50	0
DMBA(500 $\mu$ g)	91	0
UVB	0	0
DMBA(100 $\mu$ g) + UVB	0	0
DMBA(250 $\mu$ g) + UVB	50	17
DMBA(500 $\mu$ g) + UVB	100	30

\* The skin ulceration was observed at 24 hr after the third UVB irradiation.



**Fig. 2. Histopathological Changes in the Skin of Mice Treated with Combined Exposure of 500 µg of DMBA and 5 KJ/m<sup>2</sup> of UVB with Hematoxylin and Eosin Staining.** A, B, C and D show MT (-/-) mice. E, F, G and H exhibit MT (+/+) mice. A, C, E and G, DMBA alone treatment. B, D, F and H, combined exposure. A, B, E and F show 24 hr after 1st UVB irradiation. C, D, G and H show 24 hr after 3rd UVB irradiation. Bar, 100 µm.

Table 2 Mouse Skin Tumor and Skin Chronic Inflammatory Response caused by a Single Application of Different Doses of DMBA or DMBA Followed by Repeated UVB Irradiation for 13 Weeks

Treatment	Tumor incidence (%)		Ulceration (%)	
	MT(-/-)	MT(+/+)	MT(-/-)	MT(+/+)
Control	0	0	0	0
DMBA(100 $\mu$ g)	0	0	0	0
DMBA(250 $\mu$ g)	20	0	20	0
DMBA(500 $\mu$ g)	33 <sup>a,b</sup>	0	24 <sup>a,b</sup>	0
UVB	0	0	0	0
DMBA(100 $\mu$ g) + UVB	0	0	0	0
DMBA(250 $\mu$ g) + UVB	30 <sup>a</sup>	0	20	17
DMBA(500 $\mu$ g) + UVB	54 <sup>a</sup>	20 <sup>c</sup>	64 <sup>a,b,c</sup>	10

a-c: Different analysis by chi-square test (n=11 to 20).

a: P<0.05 compared with control or UVB treated mice.

b: P<0.05 compared with corresponding MT (+/+) mice.

c: P<0.05 compared with corresponding DMBA treated mice.





Fig. 3. Skin Tumor in MT (-/-) and MT (+/+) Mice after Long-term Combined Exposure. *A*: MT (-/-) mice treated with DMBA. *B*: MT (-/-) mice treated with DMBA plus UVB. *C*: MT (+/+) mice treated with DMBA plus UVB. Bar, 200  $\mu$ m.