

4-vinyl-1-cyclohexane diepoxideのrasH2マウスを用いた超短期皮膚二段階発がん性試験

○勝呂繭子¹⁾、河部真弓¹⁾、沼野琢旬¹⁾、秋山真弓¹⁾、浦野浩司²⁾、堤 秀樹²⁾、米良幸典¹⁾
¹⁾株式会社DIMS医科学研究所、²⁾公益財団法人 実験動物中央研究所

要約

我々はrasH2マウスを用いた「超短期皮膚二段階発がん性評価法」の開発を進め、評価法として確立した。しかし、過去の検討において、皮膚発がん物質である4VCD (4-vinyl-1-cyclohexane diepoxide) の発がん性を検出することができなかったため、用量及び投与頻度を変えて再検討を実施した。

rasH2マウスの背部皮膚にイニシエーターとしてDMBA (12.5 µg/100 µL) を投与し、その1週後から4VCD (10, 15, 20 mg/mouse) 又は媒体のアセトンを経皮投与し、皮膚腫瘍の発生を検討した。

その結果、4VCD投与群では、20 mg群で実験5週時に、15及び10 mg群では実験6週時に皮膚腫瘍の発生が認められ、剖検 (実験8週) 時の腫瘍発生率はそれぞれ80%、50%及び50%であった。腫瘍の平均発生個数はそれぞれ1.8個、0.9個及び0.6個であり、用量との関連が認められた。実験終了時の病理組織学的検査において、20 mg群での扁平上皮乳頭腫の発生個数は、媒体投与群と比較して有意に高かった。

今回の結果より、「超短期皮膚二段階発がん性評価法」は、皮膚発がん物質あるいは皮膚発がんプロモーターの検出が8週間で可能であり、経皮剤開発におけるスクリーニング評価法として有用なモデルであると考えられた。

目的

遺伝子改変マウスであるrasH2マウスを用いた短期発がん性試験は、マウス長期がん原性試験の代替法として、その有用性が認められている。我々はrasH2マウスの皮膚を用いてより短期に発がん性の有無を評価できる「超短期皮膚二段階発がん性評価法」の開発を進め、評価法として確立した。

このモデルでは、rasH2マウスの皮膚にDMBA (12.5 µg/100 µL) でイニシエーション後、TPA又はBPO (既知の皮膚発がんプロモーター) を経皮投与することにより、8週間で皮膚発がん性評価が可能である (下段参照)。

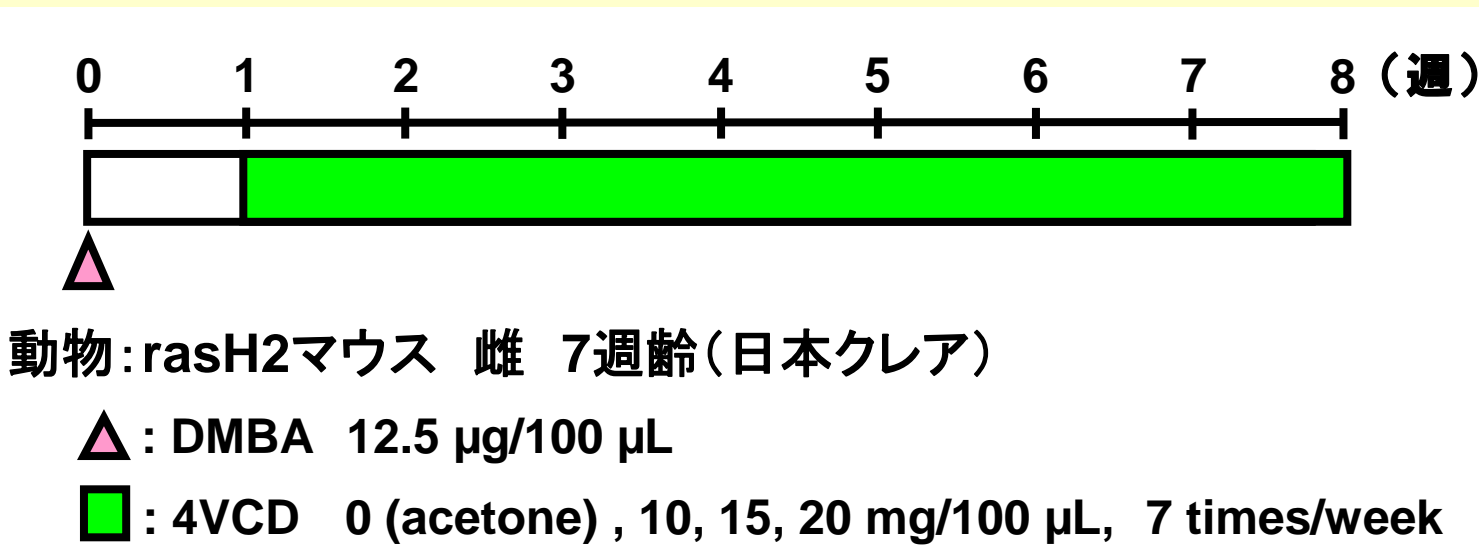
しかし、過去の検討において、皮膚発がん物質である4-vinyl-1-cyclohexane diepoxide (4VCD) について評価したところ、皮膚発がん性を検出することができなかった (下段参照) ことから、今回は用量及び投与頻度を変えて再検討を実施した。

実験方法

雌のrasH2マウス (7週齢、各群10匹) の剃毛した背部皮膚にDMBA (12.5 µg/100 µL) を1回経皮投与し、その1週後より4VCD (10, 15, 20 mg/mouse) 又は媒体のアセトンを経皮投与した。皮膚の外観観察 (腫瘍数のカウント) を週1回行い、実験8週で剖検し、皮膚の病理組織学的検査 (HE染色) を実施した。

使用薬剤

皮膚発がんイニシエーター : 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)
 媒体 : acetone
 被験物質 (皮膚発がん陽性) : 4-vinyl-1-cyclohexane diepoxide (4VCD)
 媒体 : acetone (NTP Tech Rep Ser. 1989 Nov;362:1-249.)



実験デザイン

過去の検討データ

4VCDを用いた検討

文献 (NTP Tech Rep Ser. 1989 Nov;362:1-249.) を参考に用量及び投与頻度を設定した。

DMBA	4VCD (mg/mouse)	No. of mice	皮膚腫瘍発生率							
			0	4	5	6	7	8		
+	0.5	10	0*	2(20)	2(20)	2(20)	2(20)	2(20)	2(20)	
+	2.5	10	0	1(10)	1(10)	1(10)	1(10)	1(10)	1(10)	
+	5	10	0	0	0	0	0	0	0	
+	10	10	0	1(10)	1(10)	1(10)	1(10)	1(10)	1(10)	
-	2.5	5	0	0	0	0	0	0	0	
-	10	5	0	0	0	0	0	0	0	

*: Number of mice bearing nodules (%)

DMBA	4VCD (mg/mouse)	No. of mice	皮膚腫瘍平均発生個数							
			0	4	5	6	7	8		
+	0.5	10	0	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	
+	2.5	10	0	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	
+	5	10	0	0	0	0	0	0	0	
+	10	10	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	
-	2.5	5	0	0	0	0	0	0	0	
-	10	5	0	0	0	0	0	0	0	

DMBA : 50 µg/100 µL
 4VCD : 0.5, 2.5, 5, 10 mg/mouse, 5 times/week

既知の皮膚発がんプロモーターを用いた検討

DMBA	Test Chemical	No. of mice	皮膚腫瘍発生率							
			0	4	5	6	7	8		
+	BPO	5	0*	1(20)	4(80)	5(100)	5(100)	5(100)	5(100)	
+	TPA	10	0	0	1(10)	8(80)	10(100)	10(100)	10(100)	

*: Number of mice bearing nodules (%)

DMBA	Test Chemical	No. of mice	皮膚腫瘍平均発生個数							
			0	4	5	6	7	8		
+	BPO	5	0	0	0.2	3.0	10.4	29.2	29.2	
+	TPA	10	0	0	0.1	1.4	7.4	10.9	10.9	

DMBA : 12.5 µg/100 µL BPO : Benzoyl peroxide 20 mg/200µL acetone
 TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate 4 µg x 1 time/week

結果

- ◆ 4VCD投与群では、20 mg群で実験5週時 (イニシエーションの5週後) に、15及び10 mg群では実験6週時に皮膚腫瘍の発生が認められた。
- ◆ 実験終了時の腫瘍発生率は20、15及び10 mg群でそれぞれ80%、50%及び50%であった。
- ◆ 腫瘍の平均発生個数はそれぞれ1.8個、0.9個及び0.6個であり、用量との関連が認められた。
- ◆ 発生した腫瘍は、扁平上皮過形成、扁平上皮乳頭腫又は扁平上皮癌と診断された。
- ◆ 扁平上皮過形成及び乳頭腫の発生率は、媒体投与群と比較して4VCD投与群で有意に高かった。
- ◆ 扁平上皮乳頭腫の発生個数は、媒体投与群と比較して20 mg群で有意に高かった。
- ◆ 媒体投与群では腫瘍の発生は認められなかった。

皮膚腫瘍発生率

DMBA	Test Chemical	No. of mice	Weeks							
			0	5	6	7	8	8#		
+	Acetone	10	0*	0	0	0	0	0	0	
+	4VCD 10 mg	10	0	0	1(10)	1(10)	3(30)	5(50)*		
+	4VCD 15 mg	10	0	0	2(20)	3(30)	4(40)*	5(50)*		
+	4VCD 20 mg	10	0	1(10)	1(10)	4(40)*	6(60)**	8(80)**		

*, **: P<0.05, 0.01 vs Acetone (Fisher's exact probability test, one-sided)

*: Number of mice bearing nodules (%)
 #: Detailed observation after fixation

皮膚腫瘍平均発生個数

DMBA	Test Chemical	No. of mice	Weeks							
			0	5	6	7	8	8#		
+	Acetone	10	0	0	0	0	0	0	0	
+	4VCD 10 mg	10	0	0	0.1	0.1	0.3	0.6	0.6	
+	4VCD 15 mg	10	0	0	0.2	0.3	0.6	0.9	0.9	
+	4VCD 20 mg	10	0	0.1	0.1	0.5*	0.9*	1.8**	1.8**	

*, **: P<0.05, 0.01 vs Acetone (Dunnett's multiple comparison test, one-sided)

#: Detailed observation after fixation

病理組織学的所見

DMBA	Test Chemical	No. of mice	Squamous cell carcinoma		
			SCH	SCP	SCC
+	Acetone	10	0*	0	0
+	4VCD 10 mg	10	10(100)**	60(60)**	0
+	4VCD 15 mg	10	10(100)**	60(60)**	1(10)
+	4VCD 20 mg	10	10(100)**	80(80)**	0

**, *: P<0.01 vs Acetone (Fisher's exact probability test, one-sided)

*: Number of mice bearing tumor (%)

SCH : Squamous cell hyperplasia
 SCP : Squamous cell papilloma
 SCC : Squamous cell carcinoma

腫瘍性病変の平均発生個数

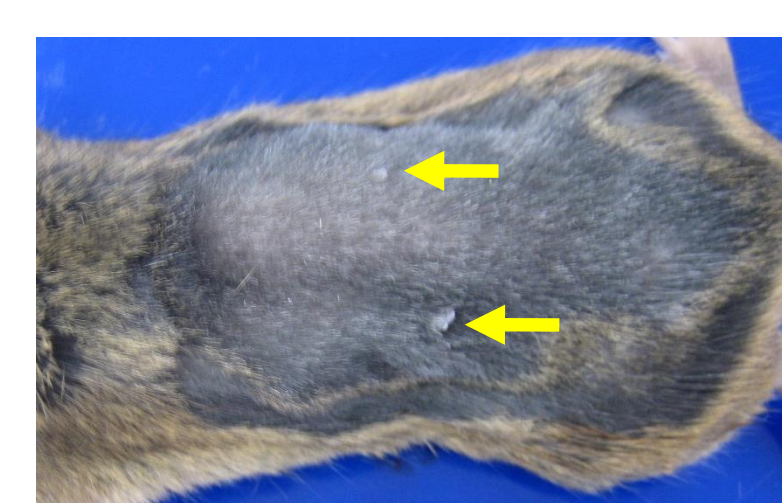
DMBA	Test Chemical	No. of mice	SCP		SCC	
			Total	Average	Total	Average
+	Acetone	10	0	0	0	0
+	4VCD 10 mg	10	7	0.7±0.7	0	0
+	4VCD 15 mg	10	9	0.9±1.0	1	0.1±0.3
+	4VCD 20 mg	10	16	1.6±1.5**	0	0

**, *: P<0.01 vs Acetone (Dunnett's multiple comparison test, one-sided)

SCP : Squamous cell papilloma
 SCC : Squamous cell carcinoma



4VCD 10 mg



4VCD 15 mg



4VCD 20 mg

剖検時の投与部位

結論

rasH2マウスの背部皮膚に12.5 µg/100 µL の用量のDMBAでイニシエーション後、皮膚発がん物質である4VCDの投与により皮膚腫瘍の発生が認められ、その発生個数には用量との関連が認められた。

過去の検討 (過去の検討データ参照) において、4VCDの皮膚発がん性が検出できなかったが、用量及び投与頻度を高くすることにより、検出が可能となった。

以上の結果、「超短期皮膚二段階発がん性評価法」は、皮膚発がん物質あるいは皮膚発がんプロモーターの検出が8週間で可能であり、経皮剤開発におけるスクリーニング評価法として有用なモデルであると考えられた。

超短期皮膚二段階発がん性評価法 まとめ

検索物質	結果
皮膚発がんプロモーター	
TPA*	陽性
Benzoyl peroxide*	陽性
皮膚発がん性陰性	
Oleic acid diethanolamine condensate	陰性
Benzethonium chloride	陰性
媒体	
アセトン	陰性
99.5%エタノール	陰性
無水エタノール	陰性
皮膚発がん物質	
4-vinyl-1-cyclohexane diepoxide*	陽性

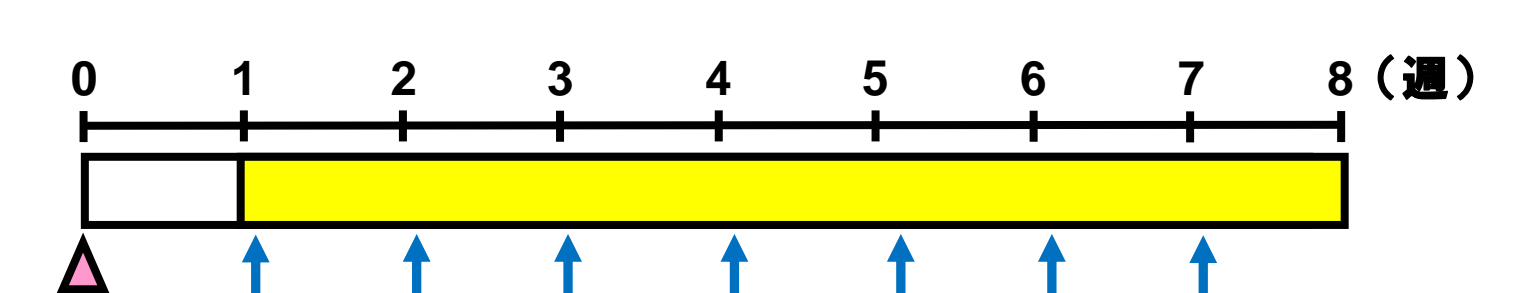
イニシエーター : DMBA 12.5 µg/100 µL acetone

*: 用量との関連が認められた

経皮剤の発がん性の可能性もしくは発がんプロモーション作用の有無を8週間*で検出可能

*: ICRマウスを用いた中期皮膚発がん性試験 (20週間) 及びがん原性試験 (2年間) と比較して非常に短期間

開発初期段階のスクリーニング試験として使用することで、開発期間の短縮・経費の削減が見込まれる



▲ : DMBA 12.5 µg/100 µL acetone

■ : 被験物質 (経皮投与)

↑ : 陽性対照群 TPA 4 µg/200 µL, 1 time/week

標準プロトコール