



Title	Inhibition by d-limonene of experimental hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats does not involve p21ras Plasma membrane association
Author(s)	加地, 到
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43162
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	かじ地 いたる 到
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 6 5 8 2 号
学位授与年月日	平成13年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Inhibition by <i>d</i> -limonene of experimental hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats does not involve p21 ^{ras} Plasma membrane association (ラット実験的肝発癌に対するリモネンの抑制作用と p21 ^{ras} 蛋白の細胞膜結合への関与に関する検討)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 門田 守人 教授 林 紀夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ヒトの肝細胞癌に対し、切除術以外に、動脈塞栓療法、経皮的エタノール注入療法やラジオ波凝固療法などの非侵襲的な新しい治療法が開発され、患者の quality of life の向上に大きく貢献している。しかし、これらの患者では再発の頻度が高いため、治療後の再発予防（二次予防）にインターフェロンなどの投与が試みられている。しかし、インターフェロンのみでは、十分な再発予防効果が期待しがたく、より安全で効果的な予防法の開発が急務である。

リモネンは柑橘類の皮に多く含まれ、farnesyl transferase 活性抑制物質として知られるモノテルペン類物質であり、*in vitro* での細胞増殖抑制効果や動物の発癌モデルでの抗腫瘍効果が報告されている。リモネンの発癌抑制作用として、従来、p21^{ras} 蛋白の細胞膜結合と活性化の阻害などによる細胞増殖抑制、アポトーシスの促進などの機序が推測されているが、その抑制機序の詳細については不明な点が多い。われわれは、リモネンの肝発癌に対する効果と作用機序の解明のために、ラットの肝発癌モデルを用い、以下の実験を行ない、報告する。

【方法】

1) 発癌実験と処置

60匹の雄性 Sprague-Dawley ラットに175mg/1の N-nitrosomorpholine (NNM) を含有する飲料水を8週間投与した。実験開始9週目にラットを無作為に3群に分け、第1群には通常飼料を投与して対照群とし、第2群、第3群それぞれに1%ないし2%のリモネン添加飼料を投与した。実験開始16週に全てのラットを屠殺し、肝臓を摘出し、以下のごとく、病理組織学および免疫組織化学的検索を行うとともに、labeling index (LI)、apoptotic index (AI) および p21^{ras} 蛋白の細胞膜結合分画を測定した。

2) NNM による肝腫瘍の分類と計測

切り出した肝組織を冷アセトンにて固定し、パラフィン包埋した上、連続切片を作成し、glutathione-S-transferase, placental type (GST-P) 染色およびヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。GST-P 染色には、免疫組織学的 PAP 法を用いた。GST-P 染色は、肝腫瘍性病変の検出にすぐれたマーカーであるが、投与薬剤や腫瘍性病変の種類によっては、検出できないことがあるため、HE 染色による腫瘍性病変の検索も同時に施行した。HE 染色による肝腫瘍性病変は、病理学的に次の3型に分類した：1) cellular alteration foci、軽度の細胞異型を有し、周辺正常肝との境界不明瞭な病変、2) neoplastic nodules、細胞・構造異型を有し、細索状配列を呈する境

界明瞭な病変、3) hepatocellular carcinoma、広索状配列を呈する境界明瞭な異型性病変。GST-P 陽性結節および HE 染色性腫瘍性病変の個数などを画像解析装置により測定した。

3) LI および AI の測定法

実験開始16週の各群10匹ずつのラットに、20mg/kg 体重の bromodeoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与し、1時間後に屠殺して肝臓を摘出した。肝の一部を70%冷エタノールで4時間固定後、パラフィン包埋し、切片を ABC 法により BrdU 染色した。LI の測定のため、非腫瘍肝から1000細胞、腫瘍性病変から500細胞での BrdU 染色細胞数を計測した。

アポトーシスの検出には、*in situ* 検出キットを用いた。切除肝の固定切片に対して、アポトーシス細胞の DNA 断片を digoxigenin で標識して、PAP 法で可視化した上、非腫瘍肝、腫瘍性病変のそれぞれ500細胞での digoxigenin 陽性細胞の数を計測した。

4) p21^{ras}蛋白の細胞膜結合分画の検出法

剖検時に肝に肉眼的にみられた白色結節を切り出し、*ras* 蛋白の Western blotting を施行した。ホモゲネート上清を sodium dodecylsulphate-polyacrylamine gel (SDS-PAGE) にて電気泳動の後、semi-dry Western blotting 法により、ニトロセルロース膜に transblot し、モノクローナル pan-*ras* 抗体を用いて標識した。細胞質分画および細胞膜結合分画の p21^{ras}分画を化学ルミネッセンスにより可視化し、画像解析装置にて定量化した。

【成績】

1) 腫瘍性病変への効果

肝の免疫組織化学的、病理学的解析では、第2群(1%リモネン群)および第3群(2%リモネン群)では、第1群(対照群)に比し、GST-P 陽性病変の個数と大きさ(平均面積)が有意に減少し、さらに、cellular alteration foci、neoplastic nodule および hepatocellular carcinoma の個数が有意に減少した。

2) LI および AI への影響

第2群および第3群では、第1群に比し、cellular alteration foci、neoplastic nodule、hepatocellular carcinoma および非腫瘍肝の LI の有意な低下と AI の有意な上昇を認めた。

3) p21^{ras}蛋白の細胞膜移行への影響

リモネン処理によって、腫瘍中の細胞膜結合分画の p21^{ras}蛋白量に変化は認められなかった。

【総括】

以上より、リモネンにより、肝発癌の抑制が認められた。この作用には、細胞増殖の抑制およびアポトーシスの誘導が関連していることが示唆された。しかし、*ras* 蛋白の細胞膜結合との関連は認められなかった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラット実験的肝発癌に対するリモネンの抑制作用と p21^{ras}蛋白の細胞膜結合への関与について検討したものである。ラットに N-nitrosomorpholine を投与し、肝腫瘍性病変の発生を検討すると共に、BrdU-labeling index (LI)、apoptotic index (AI) および細胞膜結合分画の p21^{ras}蛋白量を測定した。リモネンにより肝発癌の抑制が認められたが、この作用には、細胞増殖の抑制およびアポトーシスの誘導が関連していることを明らかにした。しかし、p21^{ras}蛋白の細胞膜結合との関連は認められなかった。本論文は、肝癌の化学予防を考える上で示唆に富む研究であり、学位に値するものと考えられる。