9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene の塗布による歯肉癌の実験的形成

藤田浄秀・賀来 亨・五十嵐稔明・佐々木元賢

Experimental production of gingival carcinomas by local application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene

Kiyohide FUJITA・Tohru KAKU・Toshiaki IGARASHI・Motomasa SASAKI

はじめに

従来、発癌物質の粘膜面塗布による口腔粘膜癌の実験的形成は、ハムスターの頬嚢という特殊な部位以外では困難とされていたが、われわれは雄ハムスターの舌側縁中 1/3 部に 0.5% 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (以下 DMBA と略) のアセトン溶液を塗布することにより、従来の報告にみられない程短期間に、しかもほぼ 100% の発癌率で舌癌を形成しうることを見出した^{1), 2)}。その後われわれは、舌のいろいろの部位にも舌癌の形成を試みたが、その実験過程において口蓋や口唇、歯肉などにもたまたま腫瘍の形成が認められた事実から、ハムスターでは頬嚢以外の口腔粘膜も DMBA に強い感受性を有していると考えられ、したがってハムスターは口腔粘膜癌の実験的形成ならびに口腔粘膜癌に関する研究のためには誠にすぐれた動物と考えられることを指摘した^{3), 4)}。

今回われわれは、ハムスターの下顎唇側歯肉部に粘膜癌の形成を試み、ハムスターの歯肉が DMBA に強い感受性を有することを確認したので、ここにその成績を報告する。

実験材料と方法

実験動物は、生後約 2 カ月の雄ハムスター (*Mesocricetus auratus*) 25 匹で、固型飼料 (オリエンタル NMF) と水を常時与えて飼育した。発癌剤は、DMBA の 0.5% アセトン溶液とした。実験は、毎週 3 回、エーテル麻酔下に、下顎唇側歯肉部で行なった。

実験動物は 2 群に分け、第 I 群 15 匹には発癌剤を、第 II 群 10 匹にはアセトンを、いずれもレジン充填用の小筆を使用して塗布した。

組織学的検索は生検材料で行なった。

実験成績

第 I 群：発癌剤の初回塗布 24 時間後には、すでに下口唇粘膜は充血発赤し、下口唇は軽度に腫脹していたが、約 1 週間から 10 日で消退した。その後、実験開始後第 3 週目から第 10 週目までの間は、肉眼的に著変は認められず、正常よりもやや白色調が強いと思われる程度であった。

第 10 週目頃より、実験動物 15 匹中 3 匹で歯肉の表面が粗糙となり、白斑状となり (写真 1)、さらに第 13 週目頃より、これら 3 匹の動物の歯肉に赤味に乏しく、肉眼的に硬い感じのする小腫瘍の形成が認められた (写真 2)。これらの小腫瘍は、発癌剤の塗布を続けるにしたがって大きさを増すが、それとともに腫瘍の表面に次第に血管の新生が認められ (写真 3)、徐々に赤味を増し、早い例では実験開始後第 19 週目には肉眼的に癌を思わせるに至った (写真 4)。

残りの他の動物においても、順次、白斑、ついで腫瘍の形成が認められた。すなわち、第 20 週目までにはすべての動物の歯肉に小腫瘍の形成が認められ、第 27 週末日までにはすべての動物の歯肉に癌を思わせる腫瘍の形成が認められた。なお、形成された腫瘍は、大別して①歯肉上で外向性に腫瘍を形成する例 (写真 5) と②歯肉、口唇に浸潤性に腫瘍を形成する例 (写真 6) とが観察された。

生検材料の組織学的検索では、白色調の強い腫瘍に血管新生の始まったばかりの時期には未だ悪性変化は認められないが (写真 7)、さらに時期が進み赤色調の強い腫瘍にかわった時期にはすでに悪性変化が認められた (写真 8~10)。第 29 週末日までに、すべての動物に組織学的に歯肉癌の形成が認められた (写真 11, 12)。

第 II 群：腫瘍の形成は全く認められなかった。

考 按

さきにわれわれは、ハムスターでは頬嚢以外の口腔粘

札幌医科大学口腔外科学教室 (主任：佐々木元賢教授)
Department of Oral Surgery, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. Motomasa Sasaki)
受付 昭和 48 年 4 月 17 日

写真 1 実験開始後第12週目。歯肉粘膜は粗糙にみえる。

写真 2 実験開始後第16週目。歯肉に白色調の強い小腫瘍の形成が認められる (矢印)。

写真 3 実験開始後第18週目。腫瘍の表面に血管の新生が認められる。

写真 4 実験開始後第19週目。歯肉に赤色調の強い腫瘍の形成が認められ、肉眼的にはすでに癌を思わせる。

写真 5 実験開始後第21週目。歯肉に外向性に腫瘍が形成されている。写真 4 と同一例。

写真 6 実験開始後第29週目。下口唇は腫瘍組織の浸潤のために腫大している (矢印)。

膜も DMBA に強い感受性を有し、ハムスターは口腔粘膜癌の実験的形成ならびに口腔粘膜癌に関する研究のためには誠にすぐれた動物と考えられることを指摘したが、これを確認するために、ハムスターの下顎唇側歯肉部に、毎週3回、0.5% DMBA アセトン溶液を塗布したところ、実験開始後第29週末日までに100%の発癌率で粘膜癌の形成を認めた。

下顎の口唇ないし唇側歯肉に粘膜癌の形成を試みた実験は、われわれの調べた範囲では文献的に余り多くない。まず Levy⁵⁾, Levy et al.⁶⁾ は、マウスならびにハムスターの唇側歯肉に 20-methylcholanthrene (以下 20-MC と略) を、あるいはマウスの口唇・歯肉に 0.6%, 2.0% または 4.0% の DMBA を塗布したが、粘膜癌の形成は認められなかった。Goldhaber^{7), 8)} は、唾液腺を外科的に

写真 7 組織像。実験開始後第18週目。写真3の生検。H-E染色，×80。

写真 8 組織像。実験開始後第19週目。写真4に類似した，すでに赤色調を呈する腫瘍の生検。H-E染色，×80。

写真 9 組織像。写真8の一部拡大。H-E染色，×200。

写真 10 組織像。写真8の一部拡大。H-E染色，×200。

写真 11 組織像。実験開始後第21週目。写真5の生検。H-E染色，×80。

写真 12 組織像。写真11の一部拡大。H-E染色，×200。

除去したマウスの口唇に0.3% 3-MCアセトン溶液を，あるいは0.5% DMBA ミネラル・オイル溶液を反覆塗布したところ，実験開始後8～9カ月ないし1年まで生存した少数の実験動物に高い発癌率で粘膜癌の形成が認められたと報告している。しかし，伊藤⁹⁾は，マウスの口唇粘膜に火傷あるいは擦過傷を与えて20-MCの0.5%プロピレン・グリコール溶液あるいはアセトン溶液を塗布

したが，腫瘍の形成は認められなかったと述べている。その後千野¹⁰⁾は，マウスの口唇粘膜に0.25% 4-nitro-quinoline N-oxide(以下4NQOと略)プロピレン・グリコール溶液を570日の実験期間にわたり，日曜日を除く毎日塗布し，塗布のみを行なった群では約47%，機械的損傷を併用した群では約77%の発癌率で粘膜癌の形成を認めた。最近，Mesrobian & Shklar¹¹⁾は，ハムスター

の下顎唇側歯肉部に、毎週 1 回、DMBA の粉末を置くと同時に生体接着材である cyanoacrylate を使用して発癌物質を局所に長く保持停滞させるという工夫をしたところ、実験開始後第 20 週目までに高い発癌率で歯肉癌の形成が認められた。しかし、毎週 1 回 DMBA だけを作作用させた群では、歯肉癌の形成は認められなかった。

これらの報告の中で、Goldhaber^{7), 8)} の実験では動物の死亡率も高く、実験期間も長く、また千野¹⁰⁾の実験では毎日の塗布で、570 日と長期間の実験であり、しかも発癌率は必ずしも高くない。最近、服部¹²⁾、古川¹³⁾らは、千野の実験方法を用いて、マウスの下口唇粘膜の発癌過程を観察し、この実験方法では発癌の時期や発生部位を確認するには長期間、少なくとも 190 日以上の実験観察が必要と思われると結論している¹²⁾。

すなわち、マウスを使用した従来の実験では長期間を要し、しかも必ずしも良い成績がえられていない。しかし、ハムスターに DMBA を作用させた Mesrobian & Shklar¹¹⁾の実験では、実験経過中の死亡例はなく、しかも実験開始後第 20 週目までの短期間に、高い発癌率で歯肉癌の形成が認められた。また、同じくハムスターに DMBA を作用させたわれわれの実験でも、実験開始後第 29 週末日までに 100% の発癌率で歯肉癌の形成が認められた。

さきにわれわれは、ハムスターの舌に DMBA を塗布することによって、短期間に、しかもほぼ 100% の発癌率で舌癌が形成され¹⁾⁻⁴⁾、さらに最近、同じくハムスターの口蓋に DMBA を塗布することによって、高い発癌率で粘膜癌が形成されるのを認めた¹⁴⁾。

これらの実験成績^{1)-4), 14)}、さきにあげた Mesrobian & Shklar¹¹⁾ の成績ならびに本論文のわれわれの実験成績など、いずれもハムスターを使用することによって粘膜癌の形成に好成績がえられている。すなわち、歯肉を含めてハムスターの口腔粘膜は DMBA に強い感受性を有していると考えられ、したがってハムスターは口腔粘膜癌の研究のためには非常にすぐれた動物と考えられるというわれわれの指摘は間違いないのではないかと思われる。

なお、Mesrobian & Shklar¹¹⁾ の実験で、毎週 1 回発癌剤の塗布のみを行なった群では、塗布回数と塗布間隔の点を除けばわれわれの実験とほぼ同様の条件でありながら、粘膜癌の形成は認められなかった。これは、発癌物質を作用させて腫瘍を形成するさいには適当な間隔でくり返し発癌物質を作用させることが必要といわれていることから¹⁵⁾⁻²²⁾、毎週 1 回の塗布では塗布回数ならびに塗布間隔が適当でなかったためと解釈するのが妥当であろう。

結 語

さきにわれわれは、ハムスターの口腔粘膜は DMBA に強い感受性を有しており、口腔粘膜癌の実験的形成な

らびに口腔粘膜癌の研究のためにはすぐれた実験動物と思われることを指摘した。今回、ハムスターの下顎唇側歯肉に、毎週 3 回、0.5% DMBA アセトン溶液を塗布することにより、実験開始後第 29 週末日までに 100% の発癌率で歯肉癌の形成を認め、ハムスターの歯肉が DMBA に強い感受性を有することを確認した。

稿を終るに当たり、御校閲をいただきました小野江為則教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Fujita, K., Kaku, T., Sasaki, M. and Onoé, T. : Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. J Dent Res 52 : 327~332 1973.
- 2) 藤田浄秀, 賀来 亨, 佐々木元賢, 小野江為則 : 舌癌の実験的形成に関する研究 第 1 編 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene の塗布による舌癌の実験的形成. 口科誌 21 : 999~1012 1972.
- 3) 藤田浄秀, 賀来 亨, 佐々木元賢, 小野江為則 : 舌癌の実験的形成に関する研究. 北海道歯科医師会誌. 28 : 5~14 1973.
- 4) 藤田浄秀, 賀来 亨, 佐々木元賢 : 舌癌の実験的形成に関する研究 第 4 編 舌癌形成の部位的差異に関する研究. 口科誌 22(3), 1973……掲載予定
- 5) Levy, B.M. : The effect of a chemical carcinogen(20-methylcholanthrene) on oral tissues. A preliminary report. Oral Surg 1 : 582 1948.
- 6) Levy, B.M., Gorlin, R. and Gottsegen, R. : Histology of early reaction of skin and mucous membrane of lip of mouse to a single application of a carcinogen. J Nat Cancer Inst 12 : 275~285 1951.
- 7) Goldhaber, P. : The role of saliva and the local environmental factors in oral carcinogenesis. J Amer Dent Ass 54 : 517~524 1957.
- 8) Goldhaber, P. : Further studies on experimental oral carcinogenesis. J Dent Res 37 : 18~19 1958.
- 9) 伊藤秀夫 : 齧歯類の口腔周囲諸組織における実験的腫瘍形成の研究. 口科誌 9 : 374~376 1960.
- 10) 千野武広 : 4-Nitroquinoline N-oxide の塗布による口腔癌の実験的生成. 福岡医誌 53 : 1053~1070 1962.
- 11) Mesrobian, A. Z. and Shklar, G. : Gingival carcinogenesis in the hamster, using tissue adhesive for carcinogen fixation. J Periodont 40 : 603~606 1969.
- 12) 服部純一 : 4-Nitroquinoline N-oxide の塗布及び機械的刺激によるマウス口腔粘膜の変化の研究. 医学研究 42 : 67~86 1972.
- 13) 古川成義 : 4-Nitroquinoline N-oxide の塗布及び機械的刺激によるマウス口腔粘膜の発癌過程の研究. 医学研究 42 : 110~133 1972.
- 14) 賀来 亨, 藤田浄秀, ほかに 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene の塗布による口蓋粘膜癌の実験的形成, ……口科誌投稿中
- 15) Cramer, W. and Stowell, R.E. : On the quantitative evaluation of experimental skin carcinogenesis by methylcholanthrene. J Nat Cancer Inst 3 : 668~681 1943.
- 16) Salaman, M.H. and Roe, F.J.C. : The development of malignant tumours of mouse skin after "initiating" and "promoting" stimuli. IV. Comparison of the effects of single and divided initiating doses of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene(DMBA). Brit J Cancer 10 : 79~88 1956.

- 17) Saffiotti, U. and Shubik, P. : The effects of low concentrations of carcinogen in epidermal carcinogenesis. A comparison with promoting agents. *J Nat Cancer Inst* 16 : 961~969 1956.
 - 18) Vesselinovitch, S.D. and Gilman, J.P.W. : Factors modifying experimental carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 17 : 52~55 1957.
 - 19) Vesselinovitch, S.D. : The effects of the time interval and sequence of the "initiating" and "promoting" stimuli on the tumor yield. *Cancer Res* 18 : 1314~1318 1958.
 - 20) Morris, A.L. : Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* 40 : 3~15 1961.
 - 21) Iversen, U., Iversen, O.H. and Bjerknes, R. : A comparison of the tumorigenic effect of five graded doses of 3-methylcholanthrene applied to the skin of hairless mice at intervals of 3 or 14 days. *Acta Path Microbiol. Scandinav* 73 : 502~520 1968.
 - 22) 藤田浄秀, 賀来 亨, 佐々木元賢 : 舌癌の実験的形成に関する研究, 第6編 実験動物の性差ならびに発癌剤の塗布頻度の差が舌癌の形成におよぼす影響. *日口外誌* 19 : 259~265 1973.
-