マウスにおける乳癌発生と内因性マウス乳癌ウイルス検出の意義

今井俊介 奈良県立医科大学第2病理学教室

DEVELOPMENT OF MAMMARY TUMOR AND THE ROLE OF ENDOGENOUS MAMMARY TUMOR VIRUS IN MICE

Shunsuke Imai Second Department of Pathology, Nara Medical University

Abstract: Occurrence of spontaneous tumor in experimental animals is of great concern in long-term carcinogenic and chronic toxicity studies. Among spontaneous tumors, mammary tumor is one of the most predominant tumor in mice. However, it is well known that mouse mammary tumor virus (MMTV) is widely involved in all cells in the mice in a proviral form. Based on endogenous viral gene patterns, all strains of mice including inbred or non-inbred carried 2-6 such genes, though the incidence of mammary tumor is different depending on the strains. Administration of urethane in the drinking water of breeding mice lead to a higher incidence of mammary tumor at an early age in these strains. Urethane, however, did not induce or enhance endogenous retroviral antigen expression or increase in MMTV-DNA sequences in mammary tumor by radioimmunoassay or molecular hybridization. These results showed that MMTV was not involved in chemical carcinogenesis of the mouse mammary glands. In regard to mammary tumors in carcinogenic or chronic toxicity studies, we must examine further whether endogenous MMTV is activated or not. (J Toxicol Pathol 1: 73~80, 1988)

Key words: Mammary tumor, Mouse mammary tumor virus, Urethane, Mouse

序 文

近年種々の発癌性試験および慢性毒性試験に種々の実験動物が使用されている。統計によれば、日本における1年間の実験動物の使用数は1,000万のマウス、16万のラット、15万のモルモット、3万のハムスター、18万のウサギ、6万のイヌ、1万3,000のネコなどと圧倒的にマウスが多い¹。

マウスの自然発生腫瘍としては乳癌、白血病、肺腺腫、肝腫、その他消化管や雌雄生殖器官から起こる腫瘍がある。このうち乳癌と白血病は最も自然発生が多い²。乳癌発生には遺伝因子およびホルモン因子が複雑に関与しているが、特にマウス乳癌ウイルス(MMTV)が大きく関与していることは1936年 Bittner が乳汁因子を発見して以来明らか

となっている³⁻⁵。乳癌高発系マウスではもちろんのこと、例えば乳癌低発系のBALB/c, C57BL系および野性マウスにおいても宿主DNA中にMMTVがプロウイルスゲノムの状態で組み込まれている。そして、生後1年を過ぎる頃から組み込まれた内因性MMTVの働きにより乳癌が発生する。

一方、マウスを使った各種の発癌性試験や慢性毒性試験のさいに問題になるのは薬物投与により発生した乳癌が内因性MMTVの働きにより発生したものかあるいは薬物そのものに原因があるかどうかである。乳癌の発生時期においては両者では大きな差が認められず、その評価のしかたには、しばしば困難を伴う。化学発癌物質で誘発した乳癌には、内因性MMTVの関与はないとされているが、かならずしも明確にはなっていない⁶⁻⁸。この点を明らかにするために乳癌低発系マウスに化学発癌物質のウレタンを投与し誘発させた乳癌に内因性MMTVが関与するかどうか検討した。

Accepted for publication: December 1, 1987

Mailing address: Shunsuke Imai, Second Department of Pathology, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara-shi, Nara 634, Japan.

材料および方法

マウス

DD/Tbr 系マウス: アルビノドイツマウスに由来し、蝶良により 1956 年より乳癌発生を指標に近交化された。現在 83 代で平均 10.2 カ月で乳癌発生率が 81% の乳癌高発系マウスである。DDf 系マウス: DD/Tbr 系マウスを乳癌嫌発系の C57BL 系で foster-nurse させ MMTV を除去した系である。乳癌発生は全くみられない。

DDD 系マウス: 東大医科研で樹立された系で乳癌発生率は低い。

DDN 系マウス: 1979 年群大より入手した系で乳癌発生率は低い。

ddO 系マウス: ddN マウス由来で阪大で樹立された乳癌低発系マウスである。

ddY 系マウス: 静岡実験動物農協より 1979 年に購入した非近交系マウスである。

KF 系マウス: 1963 年実中研から供与された系で乳癌発生率は低い。

BALB/c 系マウス: 乳癌低発系マウスで 1974 年大正製薬 (株) より入手した。

C57BL 系マウス: 乳癌嫌発系マウスで 1974 年愛知癌センターより供与された。

C3Hf 系マウス: 米国由来で 1978 年に日本チャールズリバー (株) より入手した。

GR 系マウス: オランダで樹立された乳癌高発系マウスで 1977 年関西医大より入手した。

SHN 系マウスおよび SLN 系マウス: スイス由来で長沢により樹立された乳癌高発系マウスである。

NFS 系マウス: スイスマウスの亜系で 1980 年京大ウイルス研より入手した。

これらマウスの系統の由来およびアイソエンザイムマーカーの分析は以前に詳細に記した⁹。用いたすべてのマウスは奈良医大第二病理学教室の空調動物室 (21±1°C) で飼育した。飼料はオリエンタル酵母工業 (株) の繁殖飼料 NMF と水道水を自由に与えた。

ウレタン投与法

生後 3-4 週齢の雌雄 DDf, C3Hf, ddY, C57BL および KF 系マウスに 0.05% ウレタン (ethyl carbamate: 和光純薬 (株)) を水道水に混ぜて生涯自由

に与えた¹⁰。

臓器の抽出

マウスは生涯観察を行い屠殺後、唾液腺、胸腺、脾臓、精囊、前立腺、子宮、乳腺、乳癌を摘出した。取り出した臓器に 10 倍量の Ca^{2+} , Mg^{2+} を含まない Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) を加えホモジナイズした。5 ml のエーテルを加え激しく振った後、850 g で 10 分間遠心を行い蛋白を抽出後実験に供した¹⁰。

腫瘍の観察

乳癌の発生があるかどうかマウスを定期的に観察した。腫瘍は 10% ホルマリンで固定した後薄切包埋して、通常のごとくヘマトキシリン・エオジン染色 (H.E.) を行った。

ラジオイムノアッセイ

MMTV 抗原の発現は純化した envelope の MMTVgp52 (分子量 52,000 dalton) および core の MMTVp27 (27,000 dalton) に ¹²⁵I を Chroline-T 法をラベルして行った。抽出した臓器サンプルを 2-3 段階希釈ののち抗 MMTV 抗体を加え、¹²⁵I MMTVgp52, ¹²⁵I MMTVp27 との競合反応を行い 50% 以上の競合を示すものについて陽性として標準曲線よりその抗原量を測定した¹¹。

DNA 抽出

DDD, DD/Tbr, NFS, SLN, SHN, DDf, GR, ddO, KF および BALB/c 系マウスの雌 12 カ月齢の肝臓およびウレタン投与例については雌 12 カ月齢の DD/Tbr および DDf 系マウスの肝臓、腎臓、脾臓、唾液腺、乳癌を用いた。臓器は TNE (0.02 M Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA) buffer でホモジネイトした。RNase (最終濃度 100 μg/ml) を含む buffer (0.02 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.005 M EDTA, 0.5% SDS) で消化させ 37°C で 1 時間 incubate した。proteinase K (メルク社) を加えて (最終濃度 100-200 μg/ml) 12 時間以上 incubate した。その後フェノール液で DNA 抽出を行った。DNA の 5 μg を適当量の制限酵素で消化した後、0.1% agarose gel で電気泳動して、Southern の方法によりニトロセルロース膜に転写させた¹²。

Nick translation and hybridization

プローブとして MMTV-LTR, MMTVenv を用いた。プローブを ³²P-dCTP (3,000 Ci/mmol,

Fig. 1. Detection of MMTV DNA sequences in the livers of DDD, DD/Tbr, NFS, SLN, SHN, DDN, DDf, GR, ddO, KF, and BALB/c mice. Liv: Liver Kid: Kidney, Sal. gl: Salivary gland, Spl: Spleen, MC: Mammary carcinoma.

Amersham) nick translation によりラベルした。Southern blot は ^{32}P でラベルしたプローブを用いて 65°C で 18 時間 hybridization を行った¹²。

成績

Table 1 はウレタン投与マウスと未処置対照群との腫瘍発生と平均腫瘍発生月齢を示した。ウレタン投与により DDf マウスは約 6 カ月齢で 52.2% の乳癌を発生した。KF マウスは対照群の 8% が 53.8% に増加した。C3Hf マウスは 0% から 16.7% (9.5 カ月齢) に増加した。非近交系 ddY では対照群が 6% (約 14 カ月齢) の乳癌発生率が 25.9% (4.4 カ月齢) に増加した。以上いずれもウレタン投与により乳癌発生頻度が増加すると同時に発癌月齢は一般に短縮する傾向にある。

発生した乳癌の組織型については MMTV による乳癌は大部分が Dunn の分類による Type A あ

Fig. 2. EcoRI restriction pattern of MMTV-specific proviral DNA in genomic DNA isolated from the liver, kidney, salivary gland, spleen, and mammary tumors of DD/Tbr mouse and urethane-induced DDf mouse.

るいは Type B の腺癌であった¹³。しかし、ウレタン誘発乳癌には腺癌を混在するものの大部分は角化傾向の強い腺棘細胞癌であった。

臓器における MMTVgp52 および MMTVp27 の抗原発現のウレタンによる変動は Table 1 に表した。DDf 系の場合、雄マウスの唾液腺は MMTVp27 の強い発現をみた。しかし、MMTVgp52 の発現はない。胸腺および脾臓の抗原発現は陰性であった。検索した乳腺および乳癌での MMTV 抗原は陰性である。いずれもウレタン投与による明らかな MMTV 抗原発現の増加はない。C3Hf 系についても唾液腺で MMTVgp52 より MMTVp27 の強い発現をみた。胸腺および脾臓では抗原の発現はない。精囊および前立腺では陽性である。しかし、ウレタン投与による明らかな抗原発現の増加はみられていない。ddY 系は唾液腺で MMTVgp52, MMTVp27 とも抗原発現を示した。他系と同じく胸腺および脾臓での発現は陰性である。精囊および前立腺での抗原発現は高い。C57BL 系については唾液腺で MMTVgp52 および MMTVp27 とも発現を認めた。乳腺にもわずか

Table 1. MMTV gp 52, p 27 Antigen Expression in Various Organs of Mice by Radioimmunoassay and Incidence of Mammary Tumors in Chemical Carcinogen-treated Mice

Strain	Ag.	Sex	Sal. gland	Thymus	Spleen	Sem. ves.	Prostate Uterus	Mamm. gland	Mamm. tumor	No. mice with tumor No. mice	%T	Av. tumor age (mo.)	Av. age (mo.) without tumor
DDf	gp 52	M	4/9 ¹ (3-7) ²	0/9	0/9	0/8	2/8 (13-17)						
		F	0/8	0/7	0/8		0/9	0/8		0/46	0	—	23.1±2.5
	p 27	M	4/4 (32-135)	0/2	0/6	0/6	0/2						
		F	1/1 (12)	0/4	0/3		0/2	0/3					
DDf (Ure.)	gp 52	M	1/8 (12)	0/8	0/8	0/7	0/7						
		F	0/4	0/4	0/5		0/4	0/3	0/5	12/23	52.2	6.1±1.0	7.7±1.3
	p 27	M	5/6 (29-81)	0/3	0/5	0/3	0/2						
		F	ND	ND	0/2		0/1	0/1	0/3				
CH3f	gp 52	M	1/6 (9)	0/6	2/7 (5-6)	1/5 (5)	1/3 (16)						
		F	0/3	1/3 (17)	0/3		0/3	1/3 (13)		0/31	0	16.0±7.8	
	p 27	M	6/6 (37-304)	1/3 (913)	1/5 (13)	1/3 (27)	1/2 (88)						
		F	1/1 (14)	0/1	0/1		ND	ND					
C3Hf (Ure.)	gp 52	M	0/1	0/2	0/2	0/2	1/3 (51)						
		F	0/4	1/4 (5)	0/4		0/3	3/4 (31-67)	3/3 (33-663)				
	p 27	M	1/1 (34)	0/2	0/1	0/1	0/3						
		F	1/2 (17)	0/2	0/3		0/2	ND	2/2 (612-1959)				
ddY	gp 52	M	7/7 (3-55)	0/6	0/7	5/7 (16-226)	5/5 (13-622)						
		F	2/4 (4-1482)	0/3	0/4		1/4 (103)	4/4 (5-7349)	ND	1/17	5.9	13.8	19.3±3.7

p 27	M	3/3 (6-406)	0/1	0/2	4/5 (12-32)	1/1 (40)	ND	ND				
	F	ND	0/1	ND		ND	ND	ND				
ddY (Ure.)	gp 52	M 5/6 (3-19)	0/4	0/7	6/6 (11-48)	5/5 (21-1037)						
	F	4/6 (3-147)	1/6 (116)	0/6		1/6 (27)	2/5 (92-1336)	2/3 (6-2286)				
	p 27	M 3/3 (6-21)	ND	0/7	3/3 (4-23)		ND					
	F	2/2 (14-51)	1/3 (1521)	1/3 (12)		0/2	1/3 (549)	1/2 (483)				
C57BL	gp 52	M 3/3 (7-64)	0/3	0/3	0/3	0/3						
	F	1/3 (5)	0/3	0/3		0/3	0/3		0/51	0	-	22.9
	p 27	M 1/3 (203)	0/1	0/3	0/3							
	F	ND	ND	ND		0/3	ND					
C57BL	gp 52	M 1/4 (4)	0/4	0/4	0/4	0/4						
(Ure.)	F	0/4	0/4	0/4		0/4	0/4		0/14	0	-	8.0±1.3
	p 27	M 0/4	ND	0/4	0/4	0/4	ND					
	F	1/4 (20)	ND	ND		0/4	ND					
KF	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8/99	8.1	15.3±2.8	19.2±3.6
KF	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7/13	53.8	7.9±1.3	7.9±0.6
(Ure.)												

¹No. of positive/No. of mice tested., ²U : ng/mg protein, ³Not done

な抗原発現を認めたものの他系と同じくウレタン投与による MMTV の抗原発現の増加はみられない。

各系マウスにおけるプロウイルスゲノム

Fig. 1 は各系マウスの正常肝細胞 DNA における MMTV プロウイルスゲノムの変動を表した。いずれの系統もコピー数の変動があるもののプロウイルスゲノムは存在する。例えば、乳癌高発系の DD/Tbr および MMTV を除去した DDf 系は約 2 コピーときわめて少ない。同じく乳癌低発系の BALB/c 系も 2 コピーである。しかし、他系については乳癌発生率の高低にかかわらず 4-6 コピーと幅をもっている。

乳癌高発系 DD/Tbr マウスとウレタン投与の DDf 系に発生した乳癌での MMTV プロウイルスゲノム

Fig. 2 は乳癌高発系 DD/Tbr 系と MMTV を除去した DDf 系マウスとの唾液腺、肝臓および乳癌組織における MMTV プロウイルスゲノムの動態を表したものである。DD/Tbr 系に発生した乳癌(腺癌)でのプロウイルスゲノムは正常肝臓、唾液腺でのそれと比較してかなり増加している。いわゆる宿主 DNA に頻繁に MMTV の再感染が起こっていると思われる。一方、ウレタン誘発乳癌(腺癌)でのプロウイルスゲノムは肝臓および唾液腺でのそれと比較して同じであり、特にプロウイルスの増加はみられない。すなわちウレタン誘発乳癌はウイルス誘発乳癌とは違ってその乳癌発生に内因性 MMTV の直接の関与はないものと考えられる。

考 察

乳腺腫瘍はマウスにおける自然発生腫瘍のうち最も多い腫瘍の一つである²。1936 年 Bittner により乳汁中に見いだされたマウス乳癌ウイルス(MMTV)がその主要な発生原因であることが知られている³⁻⁵。MMTV が親から子へあるいはマウス間同士の水平伝達および垂直伝達を経て各種の近交系マウスをはじめ野性マウスまで広範囲に感染している^{3-5,14}。電子顕微鏡およびラジオイムノアッセイなどの免疫学的手段により MMTV のマウスにおける体内分布を調べた結果、近交系、非近交系および野性マウスを問わず種々の臓器に MMTV 抗原の発現を認めた¹⁵。主として外分泌機

能を有する乳腺、唾液腺、雄の精囊、前立腺、凝固腺等の 2 次生殖器での抗原発現が著明である。それ故、マウスを使用して、毒性実験あるいは発癌試験を行う場合、使用するマウスでの MMTV の動態をあらかじめ把握する必要がある。

3-methylcholanthrene, 7, 12-dimethyl-benzanthracene, Urethane といった化学発癌物質が感受性を持つ近交系マウスに乳腺腫瘍を引き起こすことが知られている^{10,16,17}。病的に化学発癌物質で誘発された乳癌は角化の強い腺癌細胞癌が多いが、MMTV 乳癌の大部分は分化の強い腺癌である。腫瘍の組織発生起源については不明な点が多いが、腺癌細胞癌が主として乳管由来であるのに対し腺癌は小葉由来とされている^{18,19}。今回ウレタン誘発乳癌の大部分は角化の強い腺癌細胞癌であったが、MMTV 誘発乳癌は腺癌であった。実際、自然発生乳癌では腺癌細胞癌の発生頻度は極めて低い¹⁹。この結果はウレタンと MMTV の乳腺上皮での target の違いを明らかに示唆する。しかし、ウレタン投与群でも腺癌の発生がみられるので組織型の違いが必ずしも絶対的な指標には成りえない。

このように化学発癌物質で誘発した乳癌における MMTV および抗原の発現はウイルス誘発乳癌とは相違して、かなり低い全く欠損していると言われている³。Tonelli ら²⁰は 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene と N-2-fluorenyl-acetamide は培養した乳腺で MMTV の発現を誘発しないと報告している。Smith ら¹⁷も 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene が *in vivo* で内因性 MMTV を発現させなかったとしている。このように近年、マウス乳腺における乳癌の発生起源が化学発癌物質とウイルス発癌とは異なっている報告が集まりつつある。

この点で、本論文でウレタン投与により新たな MMTV の構造タンパクの発現は特にみられず、MMTV-DNA もそのタンパク合成に働いていないことは上記の仮説を強く示唆する。

近年、核酸 hybridization の技術が導入され、MMTV の伝達経路の解明に新たな所見が与えられるようになった³。これまで検索された一部の野性マウスを除くすべてのマウス系は MMTV のプロウイルスゲノムのコピーを宿主細胞 DNA 内に

持っていることが molecular hybridization により明らかにされている。結果にも示したように、今回検索した種々のマウスの正常肝では、プロウイルスゲノムのコピー数は系統により異なるものの DDf, BALB/c といった MMTV 抗原の発現のない系統でも明らかに内因性 MMTV を含む。さらに MMTV で発生した乳癌とウレタン誘発乳癌とを制限酵素 EcoRI で切断して MMTVenv による hybridization を行うと、MMTV 誘発乳癌では明らかに内因性 MMTV のプロウイルスゲノムの増加が認められた。しかし、ウレタン誘発乳癌ではプロウイルスゲノムの増加は無く、正常の唾液腺および肝臓と同じで MMTV のプロウイルスゲノムの発現増加は無い。このように分子生物学的な検索によっても化学発癌物質ウレタン誘発による乳癌ではウイルス誘発乳癌とは異なった経路で内因性 MMTV の関与は特にはないと思われる。

長期慢性毒性実験および発癌実験の過程において乳癌発生を見るとき、以上のような手段および方法で腫瘍の性状が明らかになる。すなわち、組織型、乳癌を含む各臓器内の MMTV 発現様式、さらに Southern blot hybridization によるプロウイルスの変動をみることにより発生した乳癌が投与した薬物によるものか否か検討する一助となるものと思われる。

文 献

1. Sher, SP: Tumors in control mice: literature tabulation. *Toxicol Appl Pharmacol* **30**: 337-359, 1974.
2. Tsubura, Y, Imai, S, and Morimoto, J: Incidence and type of spontaneous tumors in rats and mice maintained in Japan. pp.195-206. 8th ICLAS/CALAS Symp. Gustav Fischer, Stuttgart, New York, 1985.
3. Bentvelzen, P and Hilgers, J: Murine mammary tumor virus. pp.311-355. *In: Viral Oncology*. G Klein Ed, New York, Raven Press, 1980.
4. Bittner, JJ: Some possible effects of nursing on the mammary tumor. *Science* **84**: 162, 1936.
5. Hilgers, J and Bentvelzen, P: Interaction between viral and genetic factors in murine mammary cancer. *Adv Cancer Res* **26**: 143-195, 1978.
6. Butel, JS, Dusing-Swartz, SH, Socher, SH, and Medina, D: Partial expression of endogenous mouse mammary tumor virus in mammary tumor induced in BALB/c mice by chemical, hormonal, and physical agents. *J Virol* **38**: 571-580, 1981.
7. Dusing-Schwarz, S, Medina, D, Butel, J, and Socher, SH: Mouse mammary tumor virus genome expression in chemical carcinogen-induced mammary tumors in low-and high-tumor-incidence mouse strains. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 5360-5364, 1979.
8. Medina, D, Butel, JS, Socher, SH, and Miller, FL: Mammary tumorigenesis in 7, 12-dimethylbenzanthracene-treated C57BL×DBA/2F1 mice. *Cancer Res* **40**: 368-373, 1980.
9. Imai, S, Morimoto, J, Tsubura, Y, Esaki, K, Michalides, R, Holmes, RS, Deimling, OV, and Hilgers, J: Genetic marker patterns and endogenous mammary tumor virus genes in inbred mouse strains of Japan. *Exp Anim* **35**: 263-273, 1986.
10. Imai, S, Morimoto, J, Tsubura, Y, and Hilgers, J: Mammary tumor induction in inbred mouse strains with urethane is not accompanied by changes in expression of B- and C-type retroviral structural proteins. *Int J Cancer* **30**: 101-106, 1982.
11. Imai, S and Hilgers, J: Levels of mammary tumor virus proteins (MTVp27 and MTVgp52) in the milk of low and high mammary cancer mouse strains of Japanese origin compared with European and American strains. *Int J Cancer* **24**: 359-364, 1979.
12. Southern, EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **38**: 503-517, 1975.
13. Dunn, T: Morphology of mammary tumor in mice. pp.123-148. *In: The Physiology of Cancer*. F Homburger and WH Fishman Eds, London, Cassel, 1953.
14. Callahan, R, Gallahan, D, D'Hoostelaere, LA, and Potter, M: Endogenous MMTV proviral genomes in feral *Mus musculus domesticus*. pp.362-370. *In: The Wild Mouse Immunology*. M Potter, JH Nadeau, and MP Cancro Eds, Springer, Berlin, Heidelberg, 1986.
15. Imai, S, Morimoto, J, Tsubura, Y, Iwai, Y, Okumoto, M, Takamori, Y, Tsubura, A, and Hilgers, J: Tissue and organ distribution of mammary tumor virus antigen in low and high mammary cancer strain mice. *Eur J Cancer Clin Oncol* **19**: 1011-1019, 1983.
16. Kirshbaum, A, Williams, WI, and Bittner, JJ: Induction of mammary cancer with methylcholanthrene. I. Histogenesis of the induced neoplasm. *Cancer Res* **6**: 354-362, 1946.
17. Smith, GH, Arthur, LA, and Medina, D: Evidence of separate pathways for viral and chemical carcinogenesis in C3H/Stwi mouse mammary tumors or GR mice. *Int J Cancer* **26**: 373-379, 1980.
18. Imai, S, Tsubura, Y, and Hilgers, J: Urethan-induced mammary tumorigenesis in a murine mammary tumor virus (MuMTV)-positive mouse strain: Evidence for a keratinized nodule as an MuMTV-negative precursor lesion for squamous cell tumor. *JNCI* **73**: 935-941, 1984.
19. Squartini, F: Tumors of the mammary gland. pp. 43-90. *In: Pathology of Tumors in Laboratory Animals*. VS Turusov Ed, IARC Sci Publ, Lyon, 1979.

20. Tonelli, QJ, Long, CA, Vaidya, AB, and Sorof, S :
Lack of induction of murine mammary tumor virus
expression in cultured mammary glands treated with
chemical carcinogens. *Int J Cancer* **27**: 811-817,
1981.