

日本財団補助金による

1997年度財団法人日中医学協会助成報告書

—調査並びに研究に対する助成—

平成10年3月27日

財団法人 日中医学協会  
理事長 中島章 殿

研究代表者氏名 藤 盛 裕 成  
所属機関名 東北大学医学部第2外科  
職 名 助手 年齢 40 才  
所 在 地 〒980-8574 仙台市青葉区  
星野町1-1  
電話 022-717-7214 内線 7214

1. 研究課題

中国東北地方王-ド欠食地帯における甲状腺癌の  
発生  
- 王-ド摂取による地域性甲状腺腫の癌化に  
関する研究 -

2. 研究期間 自 1997年 4月 1日 ~ 至 1998年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 藤 盛 裕 成 (43才)  
所属機関 東北大学医学部第2外科 職名 文部教官助手

中国側研究者氏名 張 德 恒 (58才)  
所属機関 白求恩医科大学第臨床学院 職名 教授  
基本外科

## 研究課題

### 中国東北地方ヨード欠乏地帯における甲状腺癌の発生 —ヨード摂取による地域性甲状腺腫の癌化に関する研究—

#### 【目的】

ヨード欠乏性甲状腺腫はWHO疾患分類中、世界で最も罹患数の多い疾患であり、ヨード化食塩が容易に手に入る今日でも世界中には約1億人以上の悩病患者がいるとみられている。吉林省は中国東北地方の地域性甲状腺腫の多発地帯として知られ、特に長白山系では住民の約50%に甲状腺腫が発生し、神経性クレチン症も希ならずみられていた。1960年代よりヨード化食塩が中国の国家事業として導入され、その結果、甲状腺腫の新規発生は激減した。しかし、30才以上のすでに甲状腺腫を有する壮年層において、近年甲状腺癌の発生が増加する傾向にあり、ヨード欠乏性甲状腺腫に対するヨード投与が甲状腺癌の発生を促進している可能性が示唆されている。そこで、吉林省ヨード欠乏地帯の甲状腺腫の実態調査、ヨード欠乏性甲状腺腫の培養細胞の特性の検討およびラット甲状腺腫モデルにおける実験研究からヨード欠乏性甲状腺腫の発がん機構の解明を本研究の目的とした。

#### 【方法】

1991年から1994年までに、ヨード欠乏地帯にある吉林省豊満地域住民1799名とヨード非欠乏地帯にある四井子村住民714名、超音波断層装置を用いて甲状腺検診を行った。これらの調査では、豊満地域30才以上の女性の甲状腺腫は52.4%に認められ、画像診断では2%に悪性が疑われた。一方、ヨード非欠乏地帯にある四井子村住民の30才以上女性では14.9%に甲状腺腫が認められたのみであった。これらの検診を受けた住民をコホートとして検診を行い、5年間の甲状腺腫の変化を検討する予定であったが、現地との交渉が成功せず、調査検診を行うことはできなかった。

そこで、甲状腺癌発生の実態調査として白求恩医科大学の手術症例の臨床病理学的検討ならびに切除標本の癌抑制遺伝子p53の検索を行った。また、甲状腺腫瘍の培養法の開発と細胞株の作成、さらにラットヨード欠乏性甲状腺腫のモデル作成とヨード摂取の影響について検討を加えた。

#### 1) 白求恩医科大学における手術症例の検討

##### (1) 対象

1986年1月より1996年12月白求恩医科大学第三臨床学院基本外科において入院治療を受けた甲状腺癌症例296例中手術を施行した250例を対象とした。内訳は女性186例、男性64例。男女比は1対2.91。平均年齢は38.6才(10-70)であり、40才以下は全症例の54.8%であった。症例のUICCのTNM分類(1987)は、stage I 144例(57.6%)、stage II 40例(16%)、stage III 47例(18.8%)、stage IV 19例(7.6%)であった。癌抑制遺伝子p53異常の検索は同期間の切除標本中組織学的に乳頭癌低分化型と診断された15例を対象とし、パラフィン封埋標本を用いて行った。この対照として東北大学第二外科、および仙台市立病院にて切除された甲状腺低分化癌29例を用いた。組織学的診断はいずれもWHO基準(Hedinger CE, ed. International histological classification of tumours. 1988)に基づいて行った。

## (2) p53遺伝子異常の検索

p53蛋白の検索は免疫組織学的に抗p53モノクローナル抗体(DO7、Novocastra Newcastle, England)を用い、ABC法で行った。p53蛋白の免疫染色性の判定は、腫瘍細胞の核が強く染色された場合を陽性とし、腫瘍の一部の領域で10%以上の腫瘍細胞が染色された場合をp53蛋白陽性と判定した。p53遺伝子異常の検索は、未染標本を顕微鏡下で当該の細胞を採取し、PCRにてDNA増幅した後、exon5-8についてcold-SSCP法で行った。シーケンスはABI 373を用いた。

## 2) 甲状腺腫瘍継代培養法の開発

甲状腺腫瘍組織を1mm角にメスで細切し、デスパーゼ1000U/mlあるいは0.1%コラゲナーゼtypeVIIで37℃、20-30分間インキュベーションした後、Cell Strainer 40 $\mu$ mで濾過し、1000rpmで5分間遠心。沈殿物をウイリアムズE(Life Technologies inc. NY)で洗浄し、48wellの培養皿(Falcon, 0.75cm<sup>2</sup>)で培養した。24時間後にウイリアムズEに10%FBSを加えた培養液を交換した。以後、3日毎にこの培養液を交換し、細胞を維持した。

## 3) ラット甲状腺腫モデルにおけるヨード摂取の影響

Wister系ラット4週令80匹に5週間、抗甲状腺剤propylthiouracil(PTU)を投与し、瀰漫性甲状腺腫ラットを作成した。他にPTUを投与しない10匹を正常対照群とした。PTU投与終了後ラットを無作為に5群に分け、普通食、普通食1gあたり無機ヨードを0.289 $\mu$ g、1.733 $\mu$ g、14.676 $\mu$ gおよび29.178 $\mu$ g添加したヨード添加食を与え、7カ月後屠殺し、血中甲状腺ホルモンおよびTSHの測定と甲状腺腫の病理組織学的検討を加えた。

## 【結果および成果】

### 1) 白求恩医科大学における手術症例の病理学的内訳

手術症例の病理学的分類頻度はそれぞれ乳頭癌156例(62.4%)、濾胞癌65例(26.0%)、髄様癌13例(5.2%)、未分化癌16例(6.4%)であった。予後は平均6.1年の観察期間(1-10年)で死亡例が35例あり、病理組織分類別では乳頭癌9例、濾胞癌5例、髄様癌8例、未分化癌13例であった。死亡原因は肺転移・呼吸不全24例、肝転移3例、骨転移3例、他因死5例であった。

### 2) p53遺伝子異常の検索

p53蛋白染色陽性例は、吉林省では15例中14例(93%)に対し仙台の例では29例中16例(55%)であり、両群に有意差が認められた(P=0.025)。一方、cold-SSCPとシーケンスの結果には有意差は認められなかった。すなわち、ミューテーションは中国では46.7%(15例中5例; exon5-4例、exon7-1例、exon8-2例)に認められ、日本では42.3%(26例中11例; exon5-9例、exon7-2例、exon8-0例)に認められた。

### 3) 甲状腺腫瘍培養法の開発と細胞株の作成

日本において甲状腺未分化癌6例、乳頭癌2例に培養を試みた。コラゲナーゼを用いた未分化癌3例中3例に細胞株が樹立され、免疫染色でサイログロブリン陰性、サイトケラチン陽性、ピメンチン陽性所見となることから甲状腺未分化癌細胞株と判断した。またヌードマウスへの移植により腫瘍形成が認められた2例では組織学的に未分化癌と診断さ

れた。乳頭癌では増殖速度が極めて緩徐であるが、サイログロブリン分泌が確認された細胞が維持されている。一方、デスパーゼを用いた方法では、3例中3例ともに細胞は継代できなかった。この方法を白求恩大学基本外科において試み、甲状腺未分化癌1例が継代に成功した。

#### 4) ラット甲状腺腫モデルにおけるヨード摂取の影響

PTU 5週間の投与でラットでは濾胞上皮が腫大する実質性の甲状腺腫が作成された。普通食、ヨード添加食を摂食させたラットではいずれも甲状腺腫重量は正常群に比して有意に増加していた。血中甲状腺ホルモン値、およびTSH値はいずれも正常範囲であった。組織学的にはどの群も甲状腺全体の濾胞が拡大し、腺腫様甲状腺腫に似た甲状腺腫となったが、濾胞の強い大小不同、濾胞上皮の増生、炎症細胞の浸潤増加などの強度の過形成が認められる例があった。これは、普通食群(n=7)、ヨード添加0.289 $\mu$ g群(n=16)、1.733 $\mu$ g群(n=18)、14.676 $\mu$ g群(n=17)および29.178 $\mu$ g群(n=16)のうち、それぞれ28.6%、56.3%、27.8%、58.8%および12.5%に認められた。濾胞上皮細胞の高さと濾胞腔の面積を画像分析装置にて計測したところ、普通食群では正常群に比して差はなかったが、ヨード添加食群ではヨード量依存性に上皮の扁平化と面積の拡大が認められた。濾胞上皮細胞核内平均AgNOR顆粒数は正常群0.51 $\pm$ 0.08に比していずれも増加していたが、ヨード添加0.289 $\mu$ g群が1.25 $\pm$ 0.20でもっとも多く、ヨード添加量が増加するに従って減少した。また、強度の過形成を示した部位では1.63 $\pm$ 0.27と高値であった。

#### 【考察および今後の展望】

1970年より白求恩医科大学第三臨床学院基本外科での甲状腺手術例を10年毎に区切って、その変遷を見ると甲状腺癌手術のしめる割合は1970年代の5.4%から、90年代には16.1%まで増加し、組織学的分類では70年代が乳頭癌47.4%、濾胞癌20.5%から90年代には乳頭癌58.6%、濾胞癌23.3%で、乳頭癌の比率が上昇しているように思われる。1959年から89年までの長春市5病院（白求恩医科大学第一院、第二院、第三院、吉林省人民医院、長春市中心医院）の手術例608例では乳頭癌51%、濾胞癌31%であり、今回の検討では乳頭癌62.4%、濾胞癌26.0%に比較すると、やはり乳頭癌が増加している印象がある。しかし、今回の検討にはヨード非欠乏地帯の患者も含まれており、ヨード欠乏地帯で増加しているかどうか結論づけることはできない。当初目的としていたヨード欠乏地帯にある吉林省豊満地域住民とヨード非欠乏地帯にある四井子村住民をコホートとして調査研究を行うことが必要であり、平成10年度も引き続き、現地との交渉を行い、実現を図りたい。

p53遺伝子の検索では、中国吉林省の低分化型乳頭癌で高率にp53蛋白の異常集積が認められ、吉林省における特殊性が示唆される結果であった。しかし、採取した標本の固定方法が同一でない可能性があり、標本固定条件等の検討を行ったうえで、標本数をさらに増やし検索を進める予定である。

甲状腺癌の細胞株からの検討は、癌細胞の特性を理解する上で非常に有用な方法と思われる。今回開発した方法で、中国吉林省における未分化癌の細胞株が樹立され、さらにヨード欠乏地帯で発生した乳頭癌、濾胞癌で樹立を試みている。まだ、これらの細胞の特性の検索結果ができていないが、仙台において樹立された細胞株との比較検討が可能となった。

ヨード欠乏性甲状腺腫に対するヨード添加量の影響のモデル研究においては、完成された甲状腺腫に対しては、むしろ少量のヨード添加で上皮細胞の増殖性が増し、甲状腺腫癌化の危険性の増加を示唆する結果であった。吉林省ヨード欠乏地帯においては1960年代から食塩1kgあたりヨード30mg添加された食塩が用いられており、我々の1994年の調査では30才以下の若年層では甲状腺体積がヨード非欠乏地帯と差がないこと、超音波診断で若年層の甲状腺病変頻度に差がないことより、このヨード量は生理的には適正量と思われた。しかし、すでに甲状腺腫を有する年齢層においてはこの量が適切かどうか。この実験結果からあらためて検討を要するものと思われた。

#### 【結論】

甲状腺手術例の検討から、中国吉林省において甲状腺癌とくに乳頭癌の発生頻度が増加している可能性が示唆された。甲状腺癌低分化型のp53遺伝子の検索では、中国吉林省において異常頻度が高い可能性を示唆する結果であったが、さらなる検討が必要である。白求恩大学において甲状腺癌の細胞株が樹立され、今後、日中における癌細胞の比較検討が可能となった。ラットモデル実験においてヨード欠乏性甲状腺腫に対し、少量ヨード添加は癌化を引き起こす可能性が示された。

本研究のp53遺伝子の検索、細胞株樹立の開発およびヨード欠乏性甲状腺腫ラット実験モデルについては、それぞれ白求恩医科大学第三臨床学院基本外科陳瑞新博士、孫輝女史および金田仲氏の協力により行われた。研究成果は甲状腺外科検討会、中国東北外科学会に報告する予定である。