

「生体防御のメカニズム」
平成8年度採択研究代表者

福島 昭治

(大阪市立大学医学部 教授)

「環境発がん物質の低濃度発がんリスクの解明」

1. 研究実施の概要

ラット発がんにおいて、遺伝毒性ならびに非遺伝毒性発がん物質の低用量発がん性には実際上、無作用量があることを "weights of evidence" の観点から実証した。さらに発がん中期検索法としての遺伝子改変動物やSCIDマウスの有用性とマーカーの検討、がん関連遺伝子の変異の高感度検出法の開発、および発がん物質の低用量複合作用などについて検討を実施した。

2. 研究実施内容

1) 遺伝毒性発がん物質の低用量リスク評価

- (1) ニトロソ化合物であるdiethylnitrosamine (DEN) の肝発がん性をラットを用いて検討した。21日齢の雄性F344ラット、約2000匹に0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1および10ppmのDENを飲料水にて16週間投与した。肝前がん病変の指標であるglutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢の発生は0.1ppm以上で有意な増加を示した(平坦 - 立ち上がり曲線)。なお、DEN-DNA付加体であるO⁶-ethyldeoxyguanosineの形成は1ppm以上で増加した。
- (2) CCl₄誘発ラット肝障害モデルを用いて、ヘテロサイクリックアミンである2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) の低用量肝発がん性を検討した。21日齢の雄性F344ラットにCCl₄を皮下投与し、同時に種々の低用量のMeIQx含有飼料を16週間投与した。肝GST-P陽性細胞巢の発生はCCl₄非投与群ではMeIQx 100ppmで有意に増加しているのに対し、CCl₄投与群ではMeIQx 10ppm以上で有意に増加し、肝発がん性が増強することが明らかとなった。

2) 非遺伝毒性発がん物質の低用量リスク評価

- (1) 有機塩素系化合物であるdieldrinのラット肝発がんプロモーション作用を伊東法を用いて検討した。その結果、GST-P陽性細胞巢の発生は低用量域では逆U字型曲線の傾向を示したものの、無作用量の存在が示唆された。
- (2) dieldrinと同時、有機塩素系化合物であるp,p'-DDTの低用量発がん性を21日齢雄性F344ラットを用いて検討した。GST-P陽性細胞巢の発生は0.005 ~ 0.5ppmの範囲内ではU字型曲線を示し、閾値の存在が示唆された。また、CYP3A2は低用

量では対照群に比較し、低値を示した。これらはPhenobarbitalと同様の变化であった。

3) 発がん中期検索法の開発とマーカーの検討

- (1) ornithine decarboxylase (ODC) トランスジェニックマウスの皮膚発がんリスク評価への応用の可能性を検討した。DMBA皮膚発がんにおいて、皮膚発がんプロモーターであるTPAは強いプロモーション作用を発揮した。また、有機砒素化合物であるdimethylarsinic acidも発がんプロモーションを示し、砒素の皮膚発がんにおける作用の一端を明らかにすると共に、ODCトランスジェニックマウスの皮膚発がんプロモーション活性検出系としての有用性が判明した。
- (2) SCIDマウスに2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*] quinoxaline (IQ), 300ppm含有飼料を32週間投与すると、肝腫瘍のみならず、大腸の腺腫が高率に発生し、IQに大腸発がん性があることを始めて明らかにした。
- (3) ヒト正常型*c-Ha-ras*トランスジェニックラットでは、2, 2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine, TPAなど乳腺を標的としない発がん物質でも乳腺腫瘍が発生することを見出した。
- (4) 前立腺に特異的に発現するprobasinをプロモーターとして用い、SV40T抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットの作製に成功した。このラットでは前立腺がんが早期にしかも全例に発生することが判明した。
- (5) p53遺伝子ノックアウトマウスの食道ならびに胃発がん高感受性を検討した。(-/-)にdibutylNitrosamineを投与すると、高率に食道がんが発生した。また、MNU胃がん発生に対して、(-/-) > (+/-) > (+/+) の順で感受性を示し、p53遺伝子ノックアウトマウスは既に報告済みの膀胱に対してのみならず、食道や胃発がんにも高感受性であることが明らかとなった。
- (6) マウス肝の前がん病変のマーカーをみつけることを目的として、種々のがん関連遺伝子の変異巢の出現を免疫組織学的に検討し、c-jun陽性細胞巢がマーカーとして有用であることを確認した。

4) 発がんリスク関連指標の検出法

- (1) がん関連遺伝子変異の高感度検出DNA塩基配列決定法を応用し、新規の微小遺伝子変異定量法, Thermosequenase cycle end labeling (TCEL) 法を開発した。本法のモデルとしてラット*H-ras* 遺伝子のコドン12における変異の検出を試みた結果, 変異率 10^{-5} 以上において定量性が認められた。本法を用いてMeIQxを投与したラット肝臓における*H-ras* 遺伝子の変異率を求めた。その結果, 無処置群に比べ10および100ppmのMeIQxを32週間投与した群において*H-ras* 遺伝子の変異率の有意な増加が認められ, 32週間目のGST-P陽性細胞巢の出現頻度と高い相関性が示された。

(2) 3種のヘテロサイクリックアミンと有機砒素化合物を用い、それらの1回投与または7日間混餌投与後3日における標的・非標的臓器の8-hydroxyguanine (8-OHG) レベルを検索した。その結果、1回投与後3日における8-OHG高レベルを指標とした環境因子の発がんリスク評価の可能性が示されたが、低用量域への応用のためには7日間投与による感受性亢進を要し、さらに、大腸粘膜等一部の臓器については免疫組織化学的手法の併用が必要であることが判明した。

(3) PhIP-DNA付加体に対する抗体を作成し、PhIPを投与したラットにおける付加体の形成の局在を免疫組織化学的に諸臓器で検索した。その結果、標的臓器である雄の大腸、前立腺、雌の乳腺ではPhIPの投与量に相関した陽性率、染色強度を示し、PhIPに対する暴露評価に応用可能であると考えられた。

5) 発がん物質の低用量複合作用

3種の発がん性ヘテロサイクリックアミンのIQ、MeIQx、PhIPを10, 1および0.1ppmの用量にて投与し、低用量域における肝発がん複合作用を検索した。1と0.1ppmでは前がん病変の発生では相互の有意差はなかった。現在10ppm群について計測中である。

6) 発がん物質の種類と発がん関連遺伝子異常

発がん物質誘発ラット膀胱がんでは遺伝毒性発がん物質のがんにp53変異が高頻度に認められたが、非遺伝毒性発がん物質の場合にはp53変異頻度は全く認められず、明らかな差がみられた。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Romanenko, A., Lee, C.C.R., Yamamoto, S., Hori, T., Wanibuchi, H., Zamarin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A., Fukushima, S. Urinary bladder lesions after the chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21^{WAF1/Cip1}. Jpn. J. Cancer Res., 90, 144-153, 1999.

Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R., Fukushima, S. Loss of heterozygosity in (Lewis × F344)F₁ rat urinary bladder tumors induced with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine followed by dimethylarsinic acid or sodium L-ascorbate. Jpn. J. Cancer Res., 90, 818-823, 1999.

Fukushima, S. Low-dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline: relevance to risk assessment. Cancer Lett., 143, 157-159, 1999.

Salim, E.I., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Morimura, K., Mori, S., Makino, S., Nomura, T., Fukushima, S. Low-dose-dependent carcinogenic potential of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the immunodeficient (SCID) mouse colon. Nutrition

and Cancer, 34, 220-228, 1999.

Chen, T., Wanibuchi, H., Wei, M., Morimura, K., Yamamoto, S., Hayashi, S., Fukushima, S. Concentration dependent promoting effects of sodium L-ascorbate with the same total dose in a rat two-stage urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 146, 67-71, 1999.

Sukata, T., Ozaki, K., Uwagawa, S., Seki, T., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Okuno, Y., Fukushima, S. Organ-specific, carcinogen-induced increases in cell proliferation in *p53*-deficient Mice. *Cancer Res.*, 60, 74-79, 2000.

Yamamoto, S., Tada, M., Lee, C.C.R., Masuda, C., Wanibuchi, H., Yoshimura, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T., Fukushima, S. *p53* status in multiple human urothelial cancers: assessment for clonality by the yeast *p53* functional assay in combination with *p53* immunohistochemistry. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 181-189, 2000.

Nakae, D., Akai, H., Kishida, H., Kusuoka, O., Tsutsumi, M., Konishi, Y. Age and organ dependent spontaneous generation of nuclear 8-hydroxydeoxyguanosine in male Fischer 344 rats. *Lab. Invest.*, 80, 249-261, 2000.

Cui, L., Takahashi, S., Tada, M., Kato, K., Yamada, Y., Kohri, K., Shirai, T. Immunohistochemical detection of carcinogen-DNA adducts in normal human prostate tissues transplanted into the subcutis of athymic nude mice: Results with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) and relation to cytochrome *p450s* and *N*-acetyltransferase activity. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 52-58, 2000.

Ogawa, K., Tsuda, H., Shirai, T., Ogiso, T., Wakabayashi, K., Dalgard, D.W., Thorgeirsson, U.P., Thorgeirsson, S.S., Adamson, R.H. Sugimura, T. Lack of carcinogenicity of 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in cynomolgus monkeys. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 622-628, 1999.

Park, C. B., Kim, D.J., Uehara, N., Takasuka, N., Baba-Toriyama, H., Tsuda, H. Heterozygous *p53*-deficient mice are not susceptible to 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) carcinogenicity. *Cancer Lett.*, 139, 177-182, 1999.

Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T., Terada, M., Tsuda, H. Transgenic rats carrying human *c-Ha-ras* proto-oncogenes are highly susceptible to *N*-Methyl-*N*-nitrosourea mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(2), 243-249, 2000.