

「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實際上、無作用量があることを実証した。さらに発がん中期検索法の開発とマーカーの検討、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複合作用と代謝活性化酵素の検討を実施した。今後、複数の発がん物質の低用量域における複合による発がん作用についての解析が必要である。また、発がん物質によって誘発される微少な遺伝子変異を検出することが今後の最大課題である。

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 平成9年度に引き続き、ヘテロサイクリックアミンである

2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[5,6-b]pyridine (PhIP)の大腸発がん性をラットにて検討した。種々の用量のPhIP含有飼料を16週間連続投与した。大腸における前がん病変の指標である aberrant crypt foci の発生は10ppmまでは0ppm群と差がなく、50ppmから400ppmにかけて有意な増加を示した(平坦-立ち上がり曲線)。PhIP-DNA付加体形成は0.01ppm以上で有意な増加を示し、8-OHdG形成レベルも低用量域では上昇しなかった。

② MeIQxによるラット肝 glutathione S-transferase(GST-P)陽性細胞巢の発生はMeIQxの投与期間を16週から32週間に延長しても、16週間と同様の曲線が得られ、無作用量の存在が認められた。

③ Brown Norway系ラットの方がF344系ラットより、MeIQx誘発肝GST-P陽性細胞巢の発生が多いものの、両者とも同様の平坦-立ち上がり曲線を示した。したがって、MeIQxによるGST-P陽性細胞巢の発生に対してラットの系統差はみられなかった。

(2) 非遺伝毒性発がん物質の低用量リスク評価

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、dieldrin の低用量域での肝発がん性について、今後さらに検討する必要がある。

(3) 発がん中期検索法の開発とマーカーの検討

- ① p53 遺伝子ノックアウトマウス(TSG-p53 マウス、ヘテロ複合体)の発がんリスク評価への応用の可能性を得るために、TSG-p53 マウスにヘテロサイクリックアミンである 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline を 32 週間投与し、大腸と肝における発がん感受性を検討した。その結果、大腸における ACF の発生は野生型に比較して殆ど差はなく、肝における変異細胞巢も全く認められず、TSG-p53 マウスは大腸および肝発がん到低感受性であることが明らかになった。dimethylnitrosamine の肝発がんに対しても TSG-p53 マウスは低感受性であった。
- ② ラット肝を標的とするイニシエーション活性中期検索法において、イニシエーション活性の加算効果が得られ、低用量の環境物質のイニシエーション活性検出系の基礎が確立された。
- ③ ヒト正常型 H-ras 遺伝子導入トランスジェニックラットは乳腺発がんおよび食道発がん到高感受性を示し、低用量スクリーニングモデルとして有用であることが示唆された。
- ④ 今回作製した抗-PhIP-DNA 付加体抗体はパラフィン切片に染色可能であり、細胞レベルでの付加体の分布および経時的変化を詳細に検討するのに有用であることが判明した。
- ⑤ アセトアミノフェンの投与により F344 系雄ラットの肝 DNA に用量依存性に生成する 8-hydroxyguanine(8-OHG)は、72 時間以内に消失し、セレクション処置後に肝前癌病変の発生のないことより、前年度に行ったジエチルニトロサミンを用いた同様の検索の結果との比較より、被検物質の投与後 72 時間における 8-OHG レベルの高低を指標に、肝発癌リスクを評価し得る可能性が示唆された。
- ⑥ ペプシノーゲン変異幽門腺はマウス腺胃発がん中期検索法において、発がん性判定のマーカーとして有用であることを確認した。

(4) がん関連遺伝子変異の高感度検出法

DNA 塩基配列決定法を応用し新規の微量遺伝子変異定量法、Thermosequenase cycle end labeling (TCEL) 法の開発を行った。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。野生型および変異型 H-ras 遺伝子をクローニングしたプラスミドを任意の割合で混合したものを鋳型 DNA にして PCR を行い、得られた H-ras 遺伝子について TCEL 反応を行った。その結果、野生型に対する変異型の比が 10^{-6} 以上において定量

性をもって認められた。

(5) 発がん物質の複合作用と代謝活性化酵素の検討

ラットにおいて3種の発がん性ヘテロサイクリックアミンのIQ、MeIQx、PhIPを混合投与した結果、組合せによって発がん性の強度が増強、減弱の両方に発現され、必ずしも発がんリスクを増強させるとは限らないことが分かった。さらに、PhIPによるラット大腸発がんの発がん強度はカフェインによって増強され、それにはCYP1A2の強い誘導作用の関与が示された。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- 福島昭治 環境因子の発がんリスクー評価と予防への実験病理学的アプローチ (宿題報告 III)、日病会誌(Proc. Jpn. Soc. Pathol.), 87, 55-77, 1998.
- Fukushima S. Low dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f] quinoxaline: relevance to risk assessment. *Cancer Letters*, 143, 157-159, 1999.
- Lee C.C.R., Ichihara, T., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Sugimura, K., Wada S., Kishimoto, T. and Fukushima, S.: Reduced expression of the CDK inhibitor p27KIP1 in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of p21WAF1/Cip1 and p53. *Carcinogenesis*, 20, 1697-1708, 1999.
- Wei M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W. and Fukushima, S. Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 20, 1873-1876, 1999.
- Yamamoto, S., Min, W., Lee, C.C.R., Salim, E.I., Wanibuchi, H., Sukata, T. and Fukushima, S.: Enhancement of urinary bladder carcinogenesis in nullizygous p53-deficient mice by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Lett.*, 135, 137-144, 1999.
- Morimura, K., Salim, E.I., Yamamoto, S., Wanibuchi, H. and Fukushima, S. Dose-dependent induction of aberrant crypt foci in the colons but no neoplastic lesions in the livers of heterozygous p53-deficient mouse treated with low dose 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Cancer Lett.*, 138, 81-85, 1999.
- Ozaki K., Sukata, T., Yamamoto, S., Uwagawa, S., Seki, T., Kawasaki, H., Yoshitake, A., Wanibuchi, H., Koide, A., Mori, Y. and Fukushima, S. High susceptibility of p53 (+/-) knockout mice in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine urinary bladder carcinogenesis and lack of frequent mutation in residual allele. *Cancer Res.*, 58, 3806-3811, 1998.