

「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

(大阪市立大学大学院医学研究科 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FLSマウスの有用性とマーカーの検討、がん関連遺伝子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) ヘテロサイクリックアミンである2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)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, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10および100ppmのIQ含有飼料を16週間投与した。現在、肝前がん病変の指標である胎盤型glutathione S-transferase (GST-P)陽性細胞巢の発生と8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)の産生レベルを検索中である。
- (2) 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)とニトロソ化合物のdiethylnitrosamine(DEN)との低用量複合投与によるラット肝発がん性を検討中である。この場合、DENの投与量を一定にし、MeIQxの投与量をかえる実験系と、MeIQxとDENの両者の投与量をかえる実験系を実施している。
- (3) 新規に開発した高感度遺伝子変異定量法、Thermosequenase Cycle End Labeling(TCEL)法を用いて、MeIQx投与ラット肝におけるH-ras遺伝子の変異率について検討した。その結果、投与1週目においてはMeIQxの投与に関わらずH-ras遺伝子の変異率に変化は認められなかったが、2および32週目においては0.1ppm以上のMeIQx投与群において変異率の有意な増加が認められた。この結果はGST-P陽性細胞巢の出現頻度と高い相関性があり、MeIQx発がんにおいて前癌病変の出現と遺伝子変異の間に密接な関連性が示された。
- (4) 発がん物質の低用量複合作用を解析する目的で、ラットに3種のヘテロサイ

ク リ ッ ク ア ミ ン の IQ、MeIQx、 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[ 4, 5-b ] pyridine( PhIP )を50ppmの用量で混合投与した結果、肝と大腸の前がん病変の発生はPhIPの投与によってIQとMeIQxを組み合わせた群より減少し、その機序として細胞外でPhIPがIQまたはMeIQxと分子会合体を形成し、水溶性が増大し細胞内への透過性が阻害されたことが一因と考えられた。また、これらの10、1及び0.1ppmの用量の低用量域では相互作用は起こらないことが判明した。

- (5) 脂肪肝自然発症マウス、FLSはDEN投与による肝GST-P陽性細胞巢の発生に対して極めて高感受性であり、肝細胞の増殖活性の亢進がともなって認められた。

## 2) 非遺伝毒性発がん物質の低用量リスク評価

- (1) phenobarbital( PB )はラットへの高用量投与により肝GST-P陽性巢を増加させ、低用量投与は逆に減少させるというホルモンス現象を示す(既報告)。PBの高用量投与は肝にDMPO-OHラジカルを産生させ、それはCYP3A2発現および8-OHdG産生の亢進に随伴していた。さらにPB高用量投与により8-OHdGの形成レベルは上昇したが、低用量投与では無処置対照群のそれ以下であった。
- (2) 有機塩素系化合物であるp,p'-DDTによるラット肝GST-P陽性細胞巢の発生はU字型曲線を示し、PBと同様、その発がん性に閾値の存在が強く示唆される。p,p'-DDT投与による肝CYP3A2の発現はGST-P陽性細胞巢の出現と同様、U字型曲線を示した。しかし、8-OHdGの形成レベルとの相関は認められなかった。さらにCYP3A2の発現を制御するIL-1R1とTNF- $\alpha$ R1mRNAは低用量では逆U字型曲線を示し、かつiNOSmRNAも逆U字型曲線を示した。

## 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深く検討した。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の皮膚塗布は発がんプロモーションを示した。しかし、その飲料水投与ではプロモーション作用は認められなかった。砒素のヒト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) 細胞間連絡能の低下が、発癌と深く結びついている事を示唆する実験結果が数多く存在する。正常の肝細胞間連絡能が低下し発癌感受性が亢進することを期待し、アルブミンプロモーター下にドミナントネガティブ変異(アミノ酸113-124番を欠失)コネクシン32遺伝子を連結した遺伝子を導入したSD由来のトランスジェニックラットを作製した。このトランスジェニックラットにDENを

投与すると、肝GST-P陽性細胞巢の発生は野生型に比較して有意に高く、肝発がん性が高いことが判明した。すなわち、このトランスジェニックラットは肝発がん物質の低用量発がん評価研究に有用である可能性が大である。

- (3) 乳腺発がん高感受性ヒト正常型c-Ha-rasトランスジェニックラットについては、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だし、発がん物質の中期検索法としての有用性を検討している。
- (4) p53ノックアウトマウスの食道発がん高感受性を詳細に検討した。( - / - )ではN-amyl-N-methylnitrosamineの5ppm 8週間投与で実験開始後15週で80%以上の発がん率を示し、最も感受性が高く、次いで( + / - )であった。また、dibutylnitrosamine 食道発がんでも( + / - )は野生型に比し高感受性であった。すなわち低用量食道発がんの早期検索に有効であることが判明した。
- (5) DNA修復に關与するpoly(ADP-ribose) polymeraseを欠損させたマウスの発がん感受性に関する検索を行った。その結果、このマウスは遺伝毒性発癌物質であるN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amineやazoxymethaneに対する発がん感受性の高いことが判明した。したがって、このマウスは、前年度までの成果を基にした、8-OHdGを指標とする環境化学物質の低用量発がんリスク評価にも利用し得るものと示唆された。
- (6) ペプシノーゲン変異幽門腺(PAPG)のバイオマーカーとしての有効性を、ヘリコバクター感染スナネズミの腺胃発がん系において検討したが、強い炎症による再生変化との鑑別が困難であり、屠殺時期等の検討が必要であることが明らかとなった。

#### 4) 発がんリスク関連指標としての遺伝子異常の検出

- (1) p53遺伝子の変異についてTCEL法の適応を検討した。ラットp53遺伝子をクローニングし、コドン246の変異率の定量性を調べたところ、変異率 $10^{-5}$ 以上において定量性が認められた。現在、本法を用いてMeIQx投与ラット肝におけるp53遺伝子の変異率について検索中である。
- (2) 発がん物質誘発ラット前胃腫瘍において、遺伝毒性発がん物質のがんにH-ras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H-ras変異はほとんど認められなかった。また、p53変異が遺伝毒性発がん物質誘発腫瘍で、低率ではあるがみられたのに反し、非遺伝毒性発がん物質の場合には全く認められなかった。

### 3. 主な研究成果の発表(論文発表)

#### 【福島昭治】

Fukushima, S., Wanibuchi, H. Prevention of Urinary Bladder Cancer : The Interface Between Experimental and Human Studies. Asian Pacific Journal of

Cancer Prevention, 1, 15-33, 2000.

Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Kinoshita, A., Kaneko, M., Voizianov, A., Fukushima, S. Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the chernobyl accident. International Journal of Cancer, 86, 790-798, 2000.

Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Hakoi, H., Nakae, D., Konishi, Y., Fukushima, S. Lack of Promoting Potential of Dimethylarsinic Acid in the Kidney of Male NCI-Black. Journal Toxicologic Pathology, 13, 87-91, 2000

Morikawa, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Ogawa, M., Fukushima, S. Promotion of Keratin( K6 )/ODC Transgenic Mice Skin Carcinogenesis by Dimethylarsinic Acid. Japanese Journal of Cancer Research, 91, 579-581, 2000.

Kitano, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Sukata, T., Shizusawa, M., Fukushima, S. Morphological Changes in Silver-stained Nucleolar Organizer Regions ( AgNORs ) Related to Proliferative Activity in Glutathione S-transferase Placental Form( GST-P ) Positive Foci of Rat Liver. Journal Toxicologic Pathology, 13, 261-264, 2000.

Murai, T., Mori, S., Hosono, M., Iwakura, Y., Oohara, T., Makino, S., Takeda, R., Koide, A., Mori, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S. Differences Among Three Sister Strains of NON/Shi Mice in Sensitivity to Urinary Tract Carcinogenesis by *N*-Butyl-*N*-( 4-hydroxybutyl ) nitrosamine. Journal Toxicologic Pathology, 13, 225-229, 2000.

Masuda, C., Wanibuchi, H., Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y., Fukushima, S. Presence of a no-observed effect level for enhancing effects of development of the  $\alpha$ -isomer of benzene hexachloride (  $\alpha$ -BHC ) on diethylnitrosamine-initiated hepatic foci in rats. Cancer Letters, 163, 179-185, 2001.

【小西陽一】

Tsutsumi, M., Nasutani, M., Nozaki, T., Kusuoka, O., Tsujiuchi, T., Nakagama, H., Suzuki, H., Konishi, Y. and Sugimura, T. Increased susceptibility of poly ( ADP-ribose ) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. Carcinogenesis, 22(1), 1-3, 2001.

【白井智之】

Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.M., Imaida, K., Shirai, T. Frequent c-Ha-ras gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-*b*] pyridine. Cancer Lett., 163, 187-190, 2001.

【立松正衛】

Tsukamoto, T., Fukami, H., Yamanaka, S., Yamaguchi, A., Nakanishi, H., Sakai, H., Aoki, I., Tatematsu, M. Hexosaminidase-altered Aberrant Crypts, Carrying Decreased Hexosaminidase  $\alpha$  and  $\beta$  Subunit mRNAs, in Colon of 1, 2-Dimethylhydrazine-treated Rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92 109-118, 2001.

Tsukamoto, T., Tanaka, H., Fukami, H., Inoue, M., Takahashi, M., Wakabayashi, K., Tatematsu, M. More Frequent  $\beta$ -Catenin Gene Mutations in Adenomas than in Aberrant Crypt phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) treated Rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91 792-796, 2000.

Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Yanai, T., Masegi, T., Inada, K., Nakanishi, H., Tatematsu, M. Summation of initiation activities of low doses of the non-hepatocarcinogen 1, 2-dimethylhydrazine in the liver after carbon tetrachloride administration. *Cancer Letters* 148 59-63, 2000.

【津田洋幸】

Ota, T., Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Yamamoto, F., Matsuoka, Y., Ochiya, T., Sekiya, T., Terada, M., Akaza, H., Tsuda, H. Transgenic rats carrying copies of the human *c-Ha-ras* proto-oncogene exhibit enhanced susceptibility to *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(7), 1391-1396, 2000.