
化学物質の環境における発癌閾値に関する研究

Studies on carcinogenic threshold of chemicals in environment

代表研究者 九州大学医学部教授 遠藤 英也
Prof., Kyushu Univ. Hideya ENDO

協同研究者 国立がんセンター研究所長 杉村 隆
Director, National Cancer Center Res. Inst. Takashi SUGIMURA

東京大学医科学研究所教授 松島 泰次郎
Prof., Dept. of Molecular Oncology, Inst. of Medical Sci., Univ. of Tokyo
Taijiro MATSUSHIMA

国立遺伝学研究所部長 賀田 恒夫
Head, Dept. of Induced Mutation, Natl. Inst. of Genetics Tsuneo KADA

癌研究所部長 高山 昭三
Chief, Dept. of Experimental Pathology, Cancer Inst. Shozo TAKAYAMA

An attempt was made to estimate the carcinogenic threshold of chemicals by measuring their mutagenicity for bacterial systems. For this purpose the correlation between carcinogenicity and mutagenicity of chemicals should be explored quantitatively. From this point of view our efforts have been mainly focussed on the examination of various factors influencing the mutagenicity assay. With these findings, mutagenic activity of various chemicals was plotted against their carcinogenic potency in a coordinate both in logarithmic scale. The results, together with those of similar experiments carried out in the other laboratories, revealed that a majority of carcinogens was distributed on or near a straight line passing through zero point. This means that a quantitative relation exists between both biological phenomena, and that a similar mechanism as mutation may be responsible for chemical carcinogenesis. Based upon this quantitative relation, an experiment is now designed to solve the problem.

1. 研究目的

ひとの癌の90%までは環境中の化学物質によるとされている。したがって、それらを迅速に、効率よく認知し、環境から除くことは癌予防の観点からきわめて重要である。近年、化学物質のバクテリアに対する変異原性を指標として、動物に対する癌原性の有無を認識しようとするアプローチが一つの流行を生んでいることは、その意味でゆえなしとしない。しかし、ものによっては環境から除きえない場合も多々あるので、それらの発癌閾値(安全量)を知り、ひとへの曝露を閾値以下におさえることが癌の予防上、必要である。た

だ、癌原物質の閾値については、放射線発癌の場合の知見をもとに、その有無を含めて種々議論のあるところであるが、ほとんど未知の分野といって過言でない。いずれにしても、その認識にはばう大な数の実験動物と、きわめて長期の観察を必要とすることが予測されるので、それを動物実験以外の何らかの迅速な手段で明らかにすることができれば大変有意義なことと思われる。本研究では以上をふまえ、物質の癌原性と変異原性の相関を利用して、癌原物質の発癌閾値を認識すべく、そのための条件を詳細に検討することを目的とした。

2. 研究経過と成果

上述の目的に接近するためには、物質の癌原性と変異原性の相関を単なる定性的相関から掘り下げ、定量的に明らかにすることがまず要請される。その際、常に問題になるのは、一つには発癌実験のデータである。これまで、ラット、マウスを用いたぼう大な内外のデータはそれぞれ条件が異なり、引用するのに困難が多い。本目的には多くの検体の癌原性が、従来の発癌実験データともよく対応し、しかも同一条件下、定量的に検定できる生物系が望ましい。一方、もう一つの問題点は、変異原性に影響を与える諸々の因子の存在で、その検討なしには目的にせまりえない。従って、まず以上の2点の検討から着手した。

2-1-1 物質の癌原性の検定について

a) 同一条件で簡便、迅速、定量的に、かつ、多数、処理できる系として、メダカ (*orgazias latipes*) をとりあげ、これに diethylnitrosamine (DEN) を投与し、肝癌発生を観察した。その結果、DEN を例えば、45 ppm 含有する水槽で、2, 4, 6 週飼育すると、肝癌発生頻度は 13 週で、33, 44, 100% となり、量的対応がみられた。しかし、1 週、および 3 日処理群、対照群では腫瘍の発生はみられなかった。以上の実験事実、ならびに、組織学的検索、発癌過程のオートラジオグラフィの知見から、メダカの肝癌発生にも、一定期間の発癌刺激が必要であること (発癌閾値)、腫瘍の発生率と増殖性は、処理期間に大略比例するが、時間的因子に加えて、標的細胞の動態 (分裂能) にも左右されることが示唆された。この系は、水溶性で安定な癌原物質の検定には大変有用な系と考える。

b) ハムスターの胎児細胞の形態的トランスフォーメーションの出現と、物質の癌原性の有無との間に 90% の併行がみられている Pienta の系を用いて、約 40 種の化合物を検索した。その結果、alkylating agent (2 種)、nitrosamine (5 種)、aromatic amine と azodye (5 種) には併行性がみられたが、aromatic hydrocarbon 13 種中、anthracene, phenanthrene, pentacene が偽陽性を示し、その他の 14 化合物中、ワラビ粉末

抽出物、AF2 など 4 種が偽陰性であった。

2-1-2 変異原性の検定について

a) 物質の変異原性発現に代謝活性化を必要とする場合、ラット肝の S-9 Mix と検体と検定菌を 25~30°C、20~30 分ブレインキューベートすることにより、従来、偽陰性を示していた nitrosamide 及び、azodye 化合物が陽性になった。

b) S-9 Mix の助酵素として、従来の NADPH の他に同量の NADH を加えることにより、azodye の変異原性を約 2 倍、更に ATP 添加により、より感度をあげることが可能となった。

c) S-9 Mix に riboflavin を添加することにより、従来、変異原性をみとめることが出来なかった benzidine 系 azodye、発癌性の diazo 化合物にも変異原性が検出された。

d) 活性の高い S-9 Mix をうる為、PCB の前処置 (注射) がよく用いられているが、同様の効果が phenobarbital (PB) と β -naphthoflavon の投与でえられることがみとめられた。

e) ウイスター系および SD 系ラット雄雌についてそれぞれの S-9 Mix を調整し、その代謝活性化能を検索したところ、acetylaminofluorene (AA) については、どれも殆ど差がみとめられなかったが、benzo(a)pyrene (BP) については、ウイスター系雄からのもののみが陽性を示し、他は陰性という結果を得た。このことは、BP の *in vitro* の代謝活性化は、かなり特殊な条件を必要としているようにみえる。

f) 一般に、物質の変異原性は除去修復能欠損菌で検定する方が感度が高い。しかし *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) や methylnitrosourea (MNU)、cycasin などは、除去修復能をそなえた検定菌での方がはるかに強い変異原性を示すことが観察された。

g) tryptophan の熱分解物中に強力な変異原である γ -carboline 誘導体が分離同定されたが、その過程で β -carboline 誘導体である harman, norharman が得られた。このものは、それ自体変異原性を示さないが dimethylaminoazobenzene (DAB) や BP のような或種の癌原物質の変異原性を増強するばかりでなく、それ単独では変

異原性を示さない aniline や toluidine に変異原性を誘発する。

h) Ames テストに用いられる検定菌, TA 100, TA 98 にかからないような低濃度領域での相関を検討するために, より感度の高いフェージ誘発系の改良を試み, 特に, BP に高感受性の検定菌を得ることに成功した。すなわち, フェージ SPO2 を溶原化した枯草菌に hcr を導入した株, hcr と dna を導入した株を分離したところ, それらはいずれも, S-9 Mix 存在下 $1\mu\text{g/ml}$ 以上の BP 処理でフェージ誘発が観察された。これらの菌はまた, S-9 Mix 非存在下に, AF2, IRC-170 などを高感度に検知しうる。

2-1-3 “rec-assay” 系について

diethylstilbestrol, dl-ethionine, luteoskirin, patulin, thioacetamid や Cr. Be などの金属塩などにみられるように, 癌原性がある, Ames テストにかかわらず, “rec-assay” 陽性を示すものがかなり存在すること, 換言すると, 物質の癌原性は, 変異原性との相関よりも “rec-assay” 陽性との相関の方が高いことから, “rec-assay” の改良を意図し, 検定菌の胞子を直接シャーレの中に単層に播き, 検体をスポットする方法を開発し, 感度を 10 倍以上にあげることに成功した。

2-2 癌原性と変異原性の定量的相関についての検討

これまでの, ぼう大な内外の, 実験動物を用いたの発癌実験データの中から, 統計的に評価が可能な知見をもとにして, 縦軸に癌原性の強さ (2年間で 50% の動物に腫瘍を生ずる体重 kg 当たりの 1 日量 (mg) で示す) を, 横軸に, 変異原性の強さ (Salmonella 検定菌の 100 復帰変異体を生ずる μg 数で示す) を log-log スケールで同一座標軸にプロットすると, aflatoxin B₁, sterigmatocystin, BP, propansulton, dibenz(a, h)anthracene, benzidine, methylmethansulfonate などが, ほぼ原点をよぎる 45° の直線上にのる。このことは, これらの物質の癌原性と変異原性が一定の量の対応をもつことを意味している。以上は Meselson らの知見であるが, 当班でも同様な検索を試み, 4NQO, AAF, dimethylbenzan-

thracene, o-aminoazotoluene, p-aminoazobenzene などに両生物活性の量的相関がみられたが, AF2 や MNNG, MNU をはじめとする nitroso 化合物, 3'-methyl DAB, 4-acetylamino-biphenyl, 4-dimethylaminostilbene, methyl azoxymethanol acetate などにはみられなかった。

3. 癌原性と変異原性の量的相関より発癌閾値認識への模索

物質の癌原性と変異原性の定量的相関そのものは発癌閾値の問題とは無関係である。しかし, 変異原性を利用して癌原物質の発癌閾値を認識しようとする当班の目的には, この量的相関が大前提となる。ただ, Meselson らの知見の論拠になった発癌の仮定式

$$k = [-\ln(1-I)] / (Dt^{n+1})$$

は, それから導かれる $I = 1 - e^{-kDt^{n+1}}$ の微分値 $dI/dD = k \cdot t^{n+1} \cdot e^{-kDt^{n+1}}$ から明かなように, $D=0$ の時の I の傾き (dI/dD) は k に比例し, 発癌閾値が存在しない式となっているので, それを入れた式に直さねばならない。更に, 変異原性にも閾値があり, その閾値を測定することにより, 発癌閾値の算出が可能になるように, 理論式をかえる必要がある。このための作業が現在進行中である。

4. 今後の課題

過去 3 年間の努力は, そのほとんどが癌原性と変異原性の定量的相関を確立する為の条件吟味に終始した。その結果, 相関がみられなかった物質も, 実験条件を改良することにより (例えば, nitroso 化合物に対する検定菌を, 除去修復能をもつ菌にかえる) 相関づけられる可能性が示唆されるなど, その意義は少なくない。物質の癌原性と変異原性が定量的に相関するという事実は, 発癌という現象が, 突然変異と類似の機構で成立することを強く示唆するもので, 当班の目的にも, 不可欠の基盤が与えられたことになる。したがって, 前項に述べたように, 変異原性の測定を通じて発癌閾値の認識にせまる試みが漸く可能になったと考えられる。

謝 辞

3年間にわたり, 本研究を助成して頂いた日産

科学振興財団に対し、衷心より謝意を表するものである。

発表論文

- 1) T. Yahagi, M. Degawa, Y. Seino, T. Matsushima, M. Nagao, T. Sugimura and Y. Hashimoto: Mutagenicity of carcinogenic azo-dyes and their derivatives. *Cancer Letters* 1, 91 (1975).
- 2) T. Sugimura, S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino, M. Takeuchi and T. Kawachi: Overlapping of carcinogens and mutagens. In P. N. Magee, S. Takayama, T. Sugimura and T. Matsushima (eds.), *Fundamentals in Cancer Prevention*, pp. 191-215, Tokyo: University of Tokyo Press (1975).
- 3) 高山昭三: Diethylnitrosamine (DNA) によるメダカ肝癌 —dose response について, 第65回日本病理学会総会— (1976).
- 4) T. Sugimura, T. Yahagi, M. Nagao, M. Takeuchi, T. Kawachi, K. Hara, M. Okada, E. Yamasaki, T. Matsushima and Y. Hashimoto: Validity of mutagenicity tests using microbes as a rapid screening method for environmental carcinogens. *IARC Scientific Publications*, 12, 81 (1976).
- 5) T. Matsushima, M. Sawamura, K. Hara and T. Sugimura: A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, pp. 85-88 (1976).
- 6) T. Kada: Mutagenicity and carcinogenicity screening of food additives by rec-assay and reversion procedures, in "Screening Tests in Chemical Carcinogenesis" ed. by Montesano, R., Bartsch, H. and Tomatis, L., Lyon. *IARC Scientific Pub.*, No. 12 (1976).
- 7) Y. Sadaie and T. Kada: Recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, 125, 489-500 (1976).
- 8) Y. Sadaie and K. Narui: Repair deficiency, mutator activity, and thermal prophage inducibility in *dna-8132* strains of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 126, 1037-1041 (1976).
- 9) S. Takayama and T. Ishikawa: Comparability of histological alterations during carcinogenesis in animals and man, with special reference to hepatocarcinogenesis in fish. In, U. Mohr, *et al.* *Air Pollution and Cancer in Man*. Lyon. *IARC Scientific Publications* 16 (1977).
- 10) S. Takayama, Y. Katoh, M. Nagao, K. Wakabayashi and T. Sugimura: In vitro transformation of hamster embryo cells with tryptophan pyrolysis products. *Proc. Japan Acad.*, 53, 126-129 (1977).
- 11) K. Umezawa, T. Matsushima, T. Sugimura, T. Hirayama, M. Tanaka, Y. Kato and S. Takayama: In Vitro Transformation of Hamster Embryo Cells by Quercetin. *Toxicology Letters*, 1, 175-178 (1977).
- 12) M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Sugimura and N. Ito: Mutagenicities of Quinoline and Its Derivatives, *Mutation Res.*, 42, 335-342 (1977).
- 13) M. Nagao, E. Suzuki, K. Yasuo, T. Yahagi, Y. Seino, T. Sugimura and M. Okada: Mutagenicity of *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine, a Bladder Carcinogen, and Related Compounds. *Cancer Res.*, 37, 399-407 (1977).
- 14) T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada: Mutagenicities of *N*-Nitrosamines on *Salmonella*. *Mutation Res.*, 48, 121-130 (1977).
- 15) M. Nagao, T. Yahagi, M. Honda, Y. Seino, T. Matsushima and T. Sugimura: Demonstration of Mutagenicity of Aniline and *O*-Toluidine by Norharman. *Proc. Japan Acad.*, 53, 34-37 (1977).
- 16) T. Sugimura, T. Kawachi, M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Okamoto, K. Shudo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, Y. Iitaka and A. Itai: Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products. *Proc. Japan Acad.*, 53, 58 (1977).
- 17) M. Nagao, T. Yahagi, T. Kawachi, T. Sugimura, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, S. Mizusaki and T. Matsumoto: Comutagenic Action of Norharman and Harman. *Proc. Japan Acad.*, 53, 95-98 (1977).
- 18) M. Nagao, T. Yahagi, M. Honda, Y. Seino, T. Kawachi and T. Sugimura: Comutagenic Actions of Norharman Derivatives with 4-Dimethylamino-azobenzene and Related Compounds. *Cancer Letters*, 3, 339-346 (1977).
- 19) K. Hayashi, M. Nagao and T. Sugimura: Interactions of Norharman and Harman with DNA. *Nucleic Acids Res.*, 4, 3679-3685 (1977).
- 20) T. Sugimura, M. Nagao, T. Matsushima, T. Yahagi and K. Hayashi: Recent findings on the relation between mutagenicity and carcinogenicity. *Nucleic Acids Res.*, 3, 41-46 (1977).
- 21) T. Sugimura, M. Nagao, T. Kawachi, M. Honda, T. Yahagi, Y. Seino, S. Sato, N. Matsukura, T. Matsushima, A. Shirai, M. Sawamura and H. Matsumoto: Mutagen-carcinogens in Food, with Special Reference to

- Highly Mutagenic Pyrolytic Products in Broiled Foods. *Origins of Human Cancer: (Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation)* pp. 1561 (1977).
- 22) 浅野泰司, 平野光一, 定家義人, 賀田恒夫: 枯草菌を用いた高感度のプロフェージおよび突然変異誘発試験について, 日本環境変異原研究会, 第6回研究発表会. 1977年, 大阪, 要旨集, p. 49.
- 23) H. Endo, M. Ishizawa, T. Endo, K. Takahashi, T. Utsunomiya, N. Kinoshita, K. Hidaka and T. Baba: A Possible Process of Conversion of Food Components to Gastric Carcinogens. *Origins of Human Cancer: (Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation)* 1591-1607 (1977).
- 24) K. Umezawa, A. Shirai, T. Matsushima and T. Sugimura: Comutagenic effect of norharman and harman with 2-acetylaminofluorene derivatives (*Salmonella typhimurium*/microsomal/enzyme/carcinogens). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 928-930 (1978).
- 25) K. Kanematsu and T. Kada: Mutagenicity of metal compounds. *Mutation Res.*, 53, 207-208 (1978).
- 26) T. Matsushima, H. Matsumoto, A. Shirai, M. Sawamura and T. Sugimura: Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxymethanol Conjugates in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, 39, 3780-3782 (1979).
- 27) M. Ishizawa, T. Utsunomiya, N. Kinoshita and H. Endo: Formation of Methylnitrosocyanamide from Methylguanidine and Sodium Nitrite in Simulated Gastric Juice and in Stomachs of Rats: Quantitative Estimation by a Mutagenicity Assay. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62, 71-77 (1979).