

環境発がん物質の複合効果と人体に対する危険度の評価

Study on the combined effect of various environmental carcinogens and their risk for humans

代表研究者	富山県衛生研究所所長 Director, Toyama Inst. of Health Shigeaki SATO	佐藤 茂 秋
協同研究者	国立がんセンター研究所部長 Chief, National Cancer Res. Inst. Minako NAGAO	長尾 美奈子
	国立がんセンター研究所室長 Section Head, National Cancer Center Res. Inst. Keiji WAKABAYASHI	若林 敬 二
	国立がんセンター研究所研究員 Research Associate, National Cancer Center Res. Inst. Hiroko OHGAKI	大垣 比呂子
	国立がんセンター研究所所長 Director, National Cancer Center Res. Inst. Shouzo TAKAYAMA	高山 昭 三

Dose-response of induction of tumor by MeIQx was studied by feeding male CDF1 mice with diets containing MeIQx at 0.002, 0.006, 0.02, and 0.06% concentration and liver tumors developed at incidences of 0%, 0%, 3% and 82%, respectively. Liver tumor induction was significantly higher in only in the group fed 0.06% MeIQx, DNA modification detected by ³²P-postlabeling method was studied. The level of DNA adducts was linear to the concentration of the compound from 0.06% to 0.006%. The combination effect of five heterocyclic amines was studied. The result of liver tumor induction clearly showed additive or synergistic effects of those chemicals. The effects of combination of 40 known chemical carcinogens were also studied. The results showed some additive and some possible synergistic effects. Combination effects of IQ and quercetin were studied by simultaneous oral administration. The result showed that although quercetin itself did not show any carcinogenic effect but accelerate tumor formation induced by IQ in large and small intestine. But quercetin inhibit liver tumor induction by IQ. Those data indicate that the effect of combinations of chemical carcinogens are quite complicated. A method for quantification of heterocyclic amines was established. By using this method, various foods were analysed for their contents of heterocyclic amines. Among heterocyclic amines, PhIP was the largest and MeIQx was the second in their content in terms of mass weight. Their contents ranged in the order of 100 ng/g to 100 pg/g of heated food. A system for detecting DNA adducts formation by heterocyclic amines *in vivo* was developed essentially based on ³²P-postlabeling method. By using this method, 12 heterocyclic amines were tested for their DNA adducts formation at the dose of 100 mg/kg. Total adducts formation in the liver were 0.5 to 250 nucleotide per 10 million nucleotides. The highest was obtained by Trp-P-1 and the lowest was PhIP. The same method was applied successfully to human DNA adducts caused by Mitomycin C administration just before operation of hepatic tumors.

研究目的

ヒトの発がんは環境、特に食習慣や喫煙によるところが大きいと考えられている。環境中にヒトの発がんの原因となり得る物質を見いだす努力はこれまでもなされてきたが、特に変異原性を指標とした発がん物質の短期検索法の開発により食物や大気中に存在する物質や農薬などに新たに発がん物質が数多く見いだされるようになった。一方、直接には遺伝子傷害性を示さないが、変異原性物質（イニシエーター）が作用した細胞に働いてそのがん化を促進する種々の物質（プロモーター）も環境中に次々と発見されてきている。しかしながら、環境中のこれらの発がん性を有する物質が実際のヒトの発がんに関与しているか否かについては、職業的な長期大量暴露あるいは事故による大量暴露を除いては、ほとんど解明されていない。これは主に、従来の動物発がん実験が定性的な判断に基づいていたからである。すなわち、ある物質を大量投与し、発がん性あるいは発がん促進作用の有無を検索したもので、ヒトに摂取するような低濃度での作用を検討するものではなかったからである。さらに多くの動物実験が物質の単独投与によるものであり、ヒトの実際の状況を反映するものでなかったことも原因である。また、環境中の発がん性を有する物質のヒトの実際の摂取料、生体内の発がん有効濃度についての正確な情報が少なかった。

本研究はヒトの実際の状態を反映するような実験系で、環境中に存在する発がん物質が低濃度で同時あるいは異時的に複合的に生体に作用した場合の効果を明らかにし、環境中の発がん物質のヒトに対する真の危険度を検討することを目的にする。さらにこれらの物質のヒトへの暴露量を正確に定量し得る方法を開発し、動物実験との比較によりその危険度を推定する助けとする。またこれらの物質によるがん遺伝子の活性化を動物においても調べ、ヒトの発がんの際にみられる結果と比較して、その危険度の検討の手段とする。

研究経過

計画に従い以下の研究を行った。1) まず焼き肉から分離同定された発がん物質、2-アミノ-3,8-ジ

メチルイミダゾ[4,5-f]キノキサリン (MeIQx) の発がん性の用量-反応関係を調べるため、雌の CDF1 マウスに MeIQx を 0.002%, 0.006%, 0.02%, 0.06% の濃度で飼料に混ぜて投与した。2) 発がん性の既に明らかになっているヘテロサイクリックアミンを 5 種類選び、従来の発がん実験に用いた 1/5 量の濃度を投与し、低濃度における相互作用、複合作用について調べた。また経口投与でラットに発がん性を示す化学物質 40 種類をそれぞれ TD50 の 1/50 の濃度で飼料に混ぜて雄の F344 ラットに 102 週間投与した。40 種類の各々の物質は F344 ラットの雄に経口投与によって発がん性を示すことが知られているもので、かつ TD50 が計算できるものを選んだ。3) 野菜や果汁中に含まれているケルセチンはジメチルアミノアゾベンゼンによる肝がんの発生を抑制することが知られている。さらに、加熱食品中に含まれる発がん物質である 2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]キノリン (IQ) の変異原性も抑制される。そこでケルセチンの IQ の発がん性に与える影響について検討した。これらの研究で、低濃度での発がん性、および複合効果について検討した。さらに、4) 各種の加熱食品中に含まれるヘテロサイクリックアミンの正確な定量法につき検討し、この方法を用いて各種の食品中に含まれるヘテロサイクリックアミンの定量を行い、日常生活での暴露量の推定を行った。5) 一方、実際に特定のヘテロサイクリックアミンによりどれだけ生体物質が変化を受けているかを測定する方法として、ヘテロサイクリックアミンに対するモノクローナル抗体の作製と、ヘモグロビンとの結合構造決定を行った。6) また ³²P ポストラベル法を用いて、各種の条件で既知の発がん物質に暴露した動物の各種臓器での DNA 付加体の同定と定量を行った。

研究成果

1. MeIQx の発がん性と、DNA 付加体生成量の解離

MeIQx を、各々 0.002%, 0.006%, 0.02%, 0.06% の濃度で餌に混ぜ、各々 40 頭の CDF1 マウスに経口投与した。83 週間投与した後腫瘍の発生を検索したところ、肝臓がんは各々、0, 0, 3,

Table 1. Numbers of Rats with Tumors after Administration of a Diet Containing Five Heterocyclic Amines and a Control Diet

Group	Sex	Effective number of rats	Number of rats with tumors							
			Liver	Small intestine	Colon	Zymbal gland	Skin	Preputial gland	Clitoral gland	Others
Five heterocyclic amines	M	51	42 ^{a, b)}	4	14	7	21	6	-	35 ^{d)}
	F	51	33	1	9	9	2	-	20	23 ^{d)}
Control	M	50	2	0	0	0	0	2	-	39 ^{e)}
	F	50	0	0	0	0	0	-	0	12 ^{f)}

^{a)} Eight rats had metastasis in the lung.

^{b)} Four rats had peritoneal dissemination with hemorrhagic ascites.

^{c)} Twenty-seven interstitial cell tumors of the testis, one squamous cell carcinoma of the forestomach, one papilloma of the forestomach, one transitional cell tumor of the urinary bladder, one leukemia, two pheochromocytomas, one osteosarcoma of the leg with lung metastasis and one adenocarcinoma of the thyroid with lung metastasis.

^{d)} Eight endometrial polyps, one endometrial sarcoma, four leukemias, one adenocarcinoma of the breast, one fibroadenoma, three adenocarcinomas of the lung, one squamous cell carcinoma of the forestomach, one papilloma of the forestomach, two transitional cell carcinomas of the urinary bladder and one osteosarcoma of the leg with lung metastasis.

^{e)} Two adenomas of the liver, thirty-five interstitial cell tumors of the testis and two pheochromocytomas.

^{f)} Four endometrial polyps, three fibroadenomas of the breast, two pituitary adenomas, two leukemias and one adenoma of the lung.

Table 2. Comparison of Observed and Expected Incidences of Induced Tumors in F344 Rats Given a Diet Containing Five Heterocyclic Amines

	Sex	Incidence ^{a)} (%)						
		Liver	Small intestine	Colon	Zymbal gland	Skin	Preputial gland	Clitoral gland
Observed	M	78*	8	27	14	41*	12	-
	F	65*	2	18	18	4	-	39*
Expected	M	35	14	18	18	9	8	-
	F	34	7	10	18	2	-	18

^{a)} In each experiment and organ, the tumor incidence in the control group was subtracted from that in the experimental group and the incidence of induced tumors is shown. The expected tumor incidence for each organ was calculated as the sum of one-fifth of each of those observed with individual chemicals in previous experiments.

* $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$, compared with the corresponding expected incidences.

82%であった。またリンパ腫の発生は各々 9, 6, 22, 24%であった。非投与群においては各々の腫瘍は 0, 11%だった。したがって、非投与群より有意に腫瘍の発生が上昇していたのは 0.06%投与群だけであった。この実験の限りでは、用量-反応相関は直線関係にはないことが推測された。一方、DNA 付加体の量を ³²P ポストラベル法で調べると、肝臓、腎臓、肺、大腸では明らかに直線

関係にあり、脾臓、脳、胃でも直線関係に近い関係が得られた。今回の実験では必ずしも動物の数が十分でなく、断定的なことは控えるべきであるとしても、DNA 付加体の量は用量-反応相関が直線関係に近いが、腫瘍の発生は数ヒットである可能性が考えられた。最近のヒトの腫瘍の遺伝子の解析によれば、多くの腫瘍の発生は複数の遺伝子変化によることが示されている。今回の結果は、

Table 3.

Treatment	No. of rats	No. of rats with tumor				
		Zymbal gland	Liver	Large intestine	Small intestine	Skin
I 0.03% IQ	26	19	25	3	2	9
II 0.03% IQ+0.5% Quercetin	24	13	20	6	2	10
III 0.03% IQ+5% Quercetin	24	23	12	7	11	12
IV 0.5% Quercetin	20	0	0	0	0	0
V 5% Quercetin	20	0	0	0	0	0
VI Control	20	0	0	0	0	0

Table 4. Amounts of Hetrocyclic Amines in Cooked Foods and Cigarette Smoke Condensate^{a)}

Sample	Amount (ng/g cooked food or cigarette)						
	IQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	AaC	MeAaC
Broiled beef	0.19	2.11		0.21	0.25	1.20	
Fried ground beef		0.64	0.12	0.19	0.21		
Broiled chicken		2.33	0.81	0.12	0.18	0.21	
Broiled mutton		1.01	0.67		0.15	2.50	0.19
Food-grade beef extract		3.10 ^{b)}					
Bacteriological-grade beef extract	41.6 ^{b)}	58.7 ^{b)}	10.0 ^{c)}				
Cigarette smoke	0.26 ^{d)}			0.32	0.23	10.5	1.60

^{a)} Unless otherwise indicated, data represent unpublished results obtained in this laboratory.

^{b)} M. Takahashi *et al.*

^{c)} M. Takahashi *et al.*

^{d)} M. Yamashita *et al.*

ある意味でこれらのこととよく一致すると思われる。

2. 5種類のヘテロサイクリックアミンの同時投与効果

雌雄の F344 ラット各々 50 頭に、5 種類のヘテロサイクリックアミン、Trp-P-1、Trp-P-2、Glu-P-2、AaC、と IQ を各々低濃度で混合し投与した。各発がん物質の濃度は以下のごとくであった。Trp-P-1; 0.003, Trp-P-2; 0.001, Glu-P-2; 0.01, AaC; 0.016, IQ; 0.006%。その結果は Table 1 のごとくであった。これらの結果を、以前に行った各ヘテロサイクリックアミンの発がん実験の結果の単純な比例計算の和と比較すると Table 2 に示すごとく、肝臓、大腸、皮膚、クリトリス腺でのがんではより多く、小腸、ジンバル腺ではほとんど同じであった。さきに述べたごとく MeIQx

では低濃度では期待値より少数のがんができた。このことを考え併せると、低濃度でも標的臓器が同一である場合の複合効果は相加的ないしはそれ以上の効果があり得ることを明らかに示していると考えられる。

40 種類の、各々 TD50 の 1/50 濃度の発がん剤を F344 ラットに同時投与した。その結果、甲状腺の follicular cell tumor と、肝臓の neoplastic nodule が有意に高率に誘発された。投与した 40 種類の物質の中で甲状腺を標的にするのは 5 種類、肝臓を標的にするのは 21 種類あった。今回の研究だけでは相乗的か、相加的か、あるいは相殺的な組合せがあり得るのかは明らかではないが、ヒトの発がん物質への暴露を考えると、極めて示唆に富む結果であった。

3.

F344 ラットにケルセチンと IQ を Table 3 のごとき条件で投与しその相互作用を調べた。Table 3のごとく、小腸、大腸では明らかな増強効果が、肝臓では明らかな抑制効果がみられた。これらの結果は、ヒトの暴露を考えると極めて重要なことを示唆している。すなわち、たった2種類の複合効果でも臓器によって正反対の効果を示し得るということであり、複合効果の評価法そのものを十分に検討する必要があるということである。

4.

加熱食品からのヘテロサイクリックアミンの定量法を開発した。基本的には酸性の溶媒で抽出し、ブルーコットンに吸着させる。さらに SEP-PAK カラムで分離した後、高速液体クロマトグラフィーで分離同定する。この方法で定量した結果の一部を Table 4 に示す。調べた限りでは MeIQx が量的には多かったが、最近の研究では PhIP の量がさらに多いことが明らかになっている。

同様の方法で生体物質、例えば尿の中のヘテロサイクリックアミンも定量できることも最近の研究で明らかになった。

5.

³²Pポストラベル法を用いて、12種類のヘテロサイクリックアミンによる DNA 塩基修飾をラットを用いて行った。その結果、肝臓では1000万塩当たり、0.5-250塩基修飾が認められ、最も高いのは Trp-P-1、最も低いのは PhIP であった。投与したのは、すべて 100 mg/kg であった。その後の研究で、PhIP の場合は、肝臓が標的臓器ではなく膀胱や大腸により多くの修飾塩基が検出されることが分かった。また、MeIQx の場合には、既に述べたように約 10000 万倍の範囲にわたって、用量-反応相関が認められた。一方、塩基修飾の発がんの関係をつぶさに検討すると、同一物質で同一動物種でも必ずしも良い相関が得られるとは限らず、物質ごと、臓器ごとの詳細な検討が必要であることが明らかになった。逆に、動物の発がんを考える上で、³²Pポストラベル法は極めて強力な武器であることが明らかになった。

また一方、肝臓がんの手術前にマイトマイシン C 投与を受けた患者について塩基修飾を検討すると、ヒトの場合にもこの方法が極めて有効な方法であることが分かった。

今後の問題点と展望

今回の研究で、化学発がん物質の複合効果が極めて複雑なものであり、動物における発がんのメカニズムを明らかにしない限り解析が困難である部分があることが明らかとなった。しかしその方法は、がん遺伝子の解析法の開発、³²Pポストラベル法の開発などの研究手段の進歩によって過去には考えられないほど現実的なものになったと考えられる。ヒトの危険度の解析は、基礎生物学の進歩によってたくさんの解析手段を持つようになった。今後は、新たな発がん物質の検索はもちろんのこと、動物発がんの機構、ヒト発がんの機構、薬物動態、遺伝的背景による発がんの修飾、動物種差による発がんの差異、多因子の相互作用の解析などにさらにいっそうの地道な努力を要する。

文 献

- 1) Takayama, S., Nakatsuru, Y. and Sato, S., Carcinogenic effects of the simultaneous administration of five heterocyclic amines to F344 rats, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 1068-1072, 1987.
- 2) Yamashita, K., Umemoto, A., Grivas, S., Kato, S., Sato, S. and Sugimura, T., Heterocyclic amine-DNA adducts analyzed by ³²P-postlabeling method, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser. No. 19*, 111-114, 1988.
- 3) Kato, S., Yamashita, K., Kim, T., Tajiri, T., Onda, M. and Sato, S., Modification of DNA by mitomycin C in cancer patients detected by ³²P-postlabeling analysis, *Mutation Res.*, **202**, 85-91, 1988.
- 4) Umemoto, A., Monden, Y., Tsuda, M., Grivas, S. and Sugimura, T., Oxidation of the 2-hydroxyamino derivative of 2-amino-6-methylidipyrido [1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1) to its 2-nitroso form, an ultimate form reacting with hemoglobin thiol groups, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 1326-1331, 1988.
- 5) Yamashita, K., Umemoto, A., Grivas, S., Kato, S. and Sugimura, T., *In vitro* reaction of hydroxyamino derivatives of MeIQx, Glu-P-1 and Trp-P-1 with DNA: ³²P-postlabeling analysis

- of DNA adducts formed *in vivo* by the parent amines *in vitro* by their hydroxyamino derivatives, *Mutagenesis*, **3**, 515-520, 1988.
- 6) Yamashita, K., Wakabayashi, K., Kitagawa, Y., Nagao, M. and Sugimura, T., ³²P-postlabelling analysis of DNA adducts in rat stomach with 1-nitrosoindole-3-acetonitrile, a direct-acting mutagenic indole compound formed by nitrosation, *Carcinogenesis*, **9**, 1905-1907, 1988.
 - 7) Kato, T., Migita, H., Ohgaki, H., Sato, S., Takayama, S. and Sugimura, T., Induction of tumors in the Zymbal gland, oral cavity, colon, skin and mammary gland of F344 rats by a mutagenic compound, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline, *Carcinogenesis*, **10**, 601-603, 1989.
 - 8) Umemoto, A., Grivas, S., Yamaizumi, Z., Sato, S. and Sugimura, T., Non-enzymatic glutathione conjugation of nitroso-6-methyldipyrido-[1,2-*a*: 3',2'-*d*]imidazole (NO-Glu-P-1) *in vitro*: *N*-Hydroxy-sulfonamide, a new binding form of arylnitroso compounds and thiols, *Chem.-Biol. Interactions*, **68**, 57-69, 1988.
 - 9) Takayama, S., Hasegawa, H. and Ohgaki, H., Combination effects of forty carcinogens administered at low doses to male rats, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **80**, 732-736, 1989.
 - 10) Esumi, H., Ohgaki, H., Kohzen, E., Takayama, S. and Sugimura, T., Formation of lymphoma in CDF₁ mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP), *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, in press.