

【報文】

遺伝毒性発がん物質の閾値：頂上征服への一途上

Are there thresholds for carcinogenicity on genotoxic carcinogens?

福島昭治、鰐淵英機、森村圭一郎、魏 民

大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学

Shoji FUKUSHIMA, Hideki WANIBUCHI, Keiichirou MORIMURA and Min WEI

Department of Pathology, Osaka City University Medical School, Osaka 545-8585, Japan

要旨：遺伝毒性発がん物質には閾値がないという考え方が定説となっている。このことが正しいかどうかを解決することを意図し、新しい手法による発がん実験を行った。ヘテロサイクリックアミンおよび N-ニトロソ化合物のラット肝あるいは大腸発がんを前がん病変およびがん関連マーカーを指標として検討すると、いずれも発がん物質に反応しない量のあることが判明した。このことから、遺伝毒性発がん物質の発がん性には閾値、少なくとも実際的な閾値が存在すると結論される。

Abstract: Until recently it has been generally considered that genotoxic carcinogens have no threshold in exerting their potential for cancer induction. However, the non-threshold theory can be challenged with regard to assessment of cancer risk to humans. In the present study we show that food-related genotoxic hepatocarcinogens, heterocyclic amines and N-nitroso compounds at low doses do not induce preneoplastic lesions and cancer-related markers in rat medium-term carcinogenicity bioassay. The results imply existence of a threshold, at least practical one, for carcinogenicity of genotoxic carcinogens.

Key words: genotoxic carcinogens, cancer risk assessment, carcinogenicity threshold, heterocyclic amines, N-nitroso compounds

1.はじめに

ある化学物質が発がん性を有するか否かの同定については、ヒトでの疫学調査が重要な情報を提供してきた。しかし無数の化学物質が複雑に存在する現実の環境下においては、ヒトに対する発がん性に関しては大部分の化学物質が未知のままである。そのため実験動物を用いた長期発がん性試験が数多く実施され、事実、大半の発がん物質が動物を用いた発がん性試験によって同定されてきた。

動物試験の結果をもとにヒトでの影響を予測するヒトへの外挿は、毒性評価に携わる研究者にとって最も困難な課題の一つである。確かにこれまでのヒトへの外挿は動物種の違いや個体差を考慮して慎重に行われてきたことは事実である。しかし、これまでのヒトへの外挿に用いられた発がんデータは、その化学物質の発がん性を見出すために実施された高用量域での試験結果である。すなわち、発がんのリスク評価にあたっては、発がん物質の高用量域での用量反応曲線、すなわち S 字状曲線を、ヒトが曝露される可能性のある低用量域へ延ばすことによりヒトへの外挿がなされ、しかもその曲線は 0 にたどると理解されている(図1)。少なくとも遺伝毒性発がん物質についてはそうであり、閾値がないとされている。

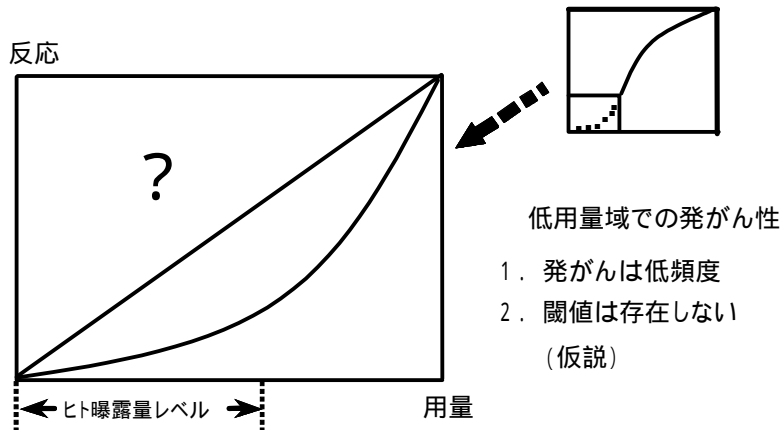


図1 低用量域での発がん性の仮説
-高用量域から低用量域への外挿

これは発がん物質は DNA に損傷を与え、その結果として、不可逆性の変化をもたらすという古典的な理論に基づいている。しかしながら、腫瘍発生を指標とする長期発がん性試験においては、遺伝毒性発がん物質といえども低用量では発がん頻度は低く、自然発生のそれとの間に統計学的に有意差を見出しがたく、低用量域での発がん性の証明は困難である。それゆえ、遺伝毒性発がん物質には閾値がないというこの説が正しいかどうかを科学的に証明することが従来から求められていたが、発がん物質の低用量域での発がん用量反応についてはこれまでほとんどデータがないのが現状である。

発がん物質のリスク評価において大事なことは、ヒトで起こりうる曝露量でどうかということであり、低用量域での発がん性試験は重要な研究課題である。一方、近年がん病変を指標とする中期発がん性試験法が開発され、投与・飼育期間が大幅に短縮されたことにより、多数の動物を用いての実験、多くの用量群設定が可能となり、またバイアスも大幅に軽減したことなどから、新たな視点からの低用量域での用量反応関係の検討が可能となってきた。

我々の教室では“Weights of evidence”の観点から発がん物質の低用量域における発がん性について検討を進めている。ここでは、新しい発がん実験手法による発がん閾値問題に関する研究成果を報告する。

2. ヘテロサイクリックアミンの低用量発がん性

1) 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)のラット肝発がん性

MeIQx は魚や肉などの焼け焦げ中に存在するヘテロサイクリックアミンの一種で、ラットにおける肝がんの発生は 100 から 400 ppm という高用量域で用量相関性が認められている(Kushida H, et al., 1994)。日本人は魚や肉を食べることによって MeIQx を 1 日 0.2~2.6 μg 摂取していると計算されている(Wakabayashi K, et al., 1993)。さらに、剖検例の腎臓や手術症例の結腸から MeIQx-DNA 付加体が検出され、ヒトは確実に MeIQx に曝露され、MeIQx はヒト発がん物質と推察される(Totsuka Y, et al., 1996)。

そこで、MeIQx の低用量域での肝発がん性を検証するために離乳後、肝細胞の増殖能が最も高い 21 日齢の雄性 F344 ラット 1,145 匹を用い、0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 および 100 ppm の低用量域ならびに 100 ppm の MeIQx を最大 32 週間連続混餌投与した(Fukushima S, et al., 2002)。

その結果、図 2 の如く、16 週投与群において肝における前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の発生は MeIQx の 0.001~1 ppm 群では対照群と全く差はないものの、10 ppm では増加傾向が認められ、高用量の 100 ppm では明らかに有意な増加を示した。また、MeIQx 投与の 4 週において肝における MeIQx-DNA 付加体(dG-C8-MeIQx)が MeIQx 投与量との間に直線的な相関が認められた(図 3)。酸化ストレスのマーカーである肝 DNA の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)形成レベルは、MeIQx 投与の 4 週目では 1 ppm 以上で有意に増加した(図 3)。さらに MeIQx 16 週間投与においても MeIQx-DNA 付加体と 8-OHdG 形成レベルは 4 週のデータと同様の傾向を示した。また、MeIQx によるラット肝 GST-P 陽性細胞巢の発生において 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た(図 2)。

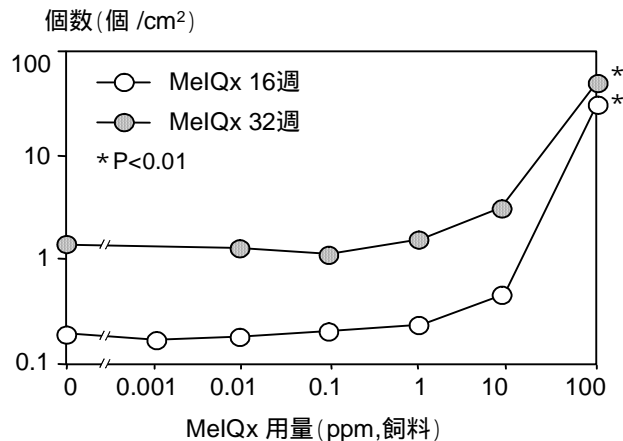


図2 MeIQxの16および32週間投与でのラット肝におけるGST-P陽性細胞巢の発生

また、遺伝子の変異頻度を検出する Big Blue ラット (F344 系) を用いて肝における変異原性と発がん性を比較検討した(Hoshi M, et al., 2004)。MeIQx を 16 週間投与するとマーカー遺伝子である *LacI* 変異が 10 ppm で有意に増加し、100 ppm では著明に増加した(図 4)。一方、GST-P 陽性細胞巢は 100 ppm でのみ有意に増加した。このことは、MeIQx の変異原性にも閾値が存在することを示す一方、無作用量は発がん性のそれより狭いことを強く示唆している。

さらに、発がんの 2 段階説にのっとり、MeIQx のラット肝におけるイニシエーション活性を phenobarbital をプロモーターとする系で GST-P 陽性細胞巢を指標にして検討してみると、図 5 のように 10 と 100 ppm ではそれが有意に増加したが、1 ppm 以下の低用量では対照群と差がみられなかった(Fukushima S, et al., 2003)。すなわち、MeIQx の 1 ppm 以下では肝イニシエーション活性を示さないことが明らかとなった。

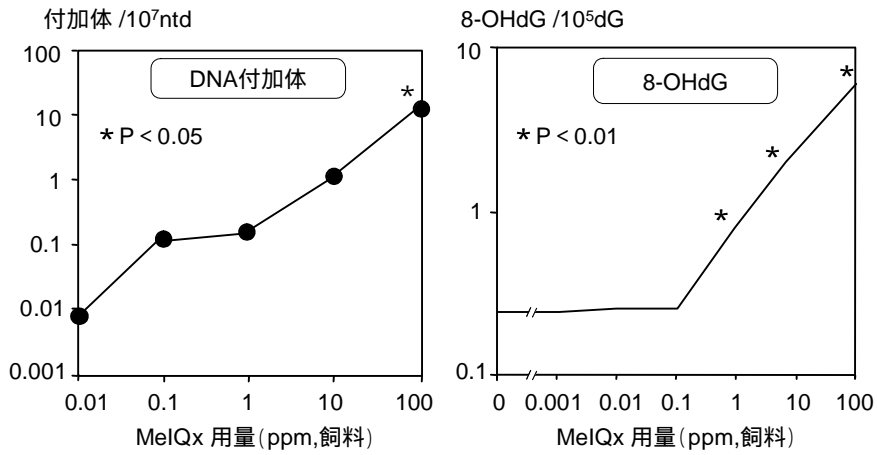


図3 MeIQx 4週投与ラット肝におけるMeIQx-DNA付加体および8-OHdG形成レベル

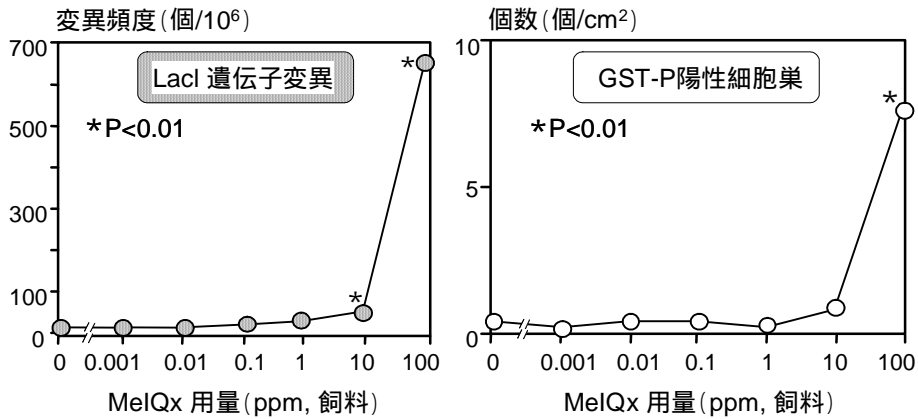
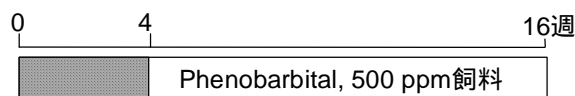


図4 MeIQx 16週投与Big Blueラット肝におけるLacI 遺伝子変異頻度とGST-P陽性細胞巣



動物;雄, F344ラット, 21日齢, 850匹

MeIQx; 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ppm (飼料中用量)

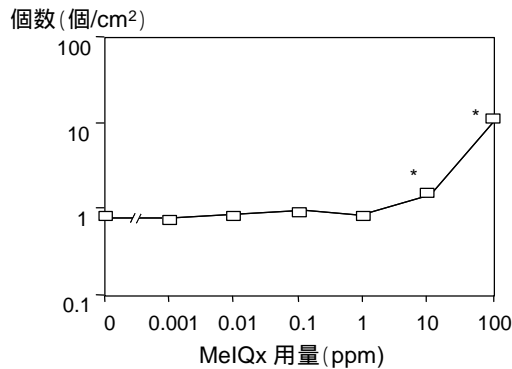


図5 MeIQxの低用量域におけるラット肝のイニシエーション活性

これらの結果をまとめると図6のようになる。MeIQxのラット肝発がん過程には、先ずDNA付加体形成がみられ、その後ある程度の無作用量域があって8-OHdG形成レベルの上昇、*LacI*変異、およびイニシエーション活性の増加、さらにある程度の無作用量域の後、GST-P陽性細胞巢がみられ、そしてさらに幅広い無作用量域を持って肝がん発生の増加に至ることが明らかとなった。このように肝発がんの指標である種々のマーカーにはそれぞれの無作用量域が求められ、マーカーから推察される発がん機序を考えるとMeIQxの発がん性には閾値があると結論することができる。

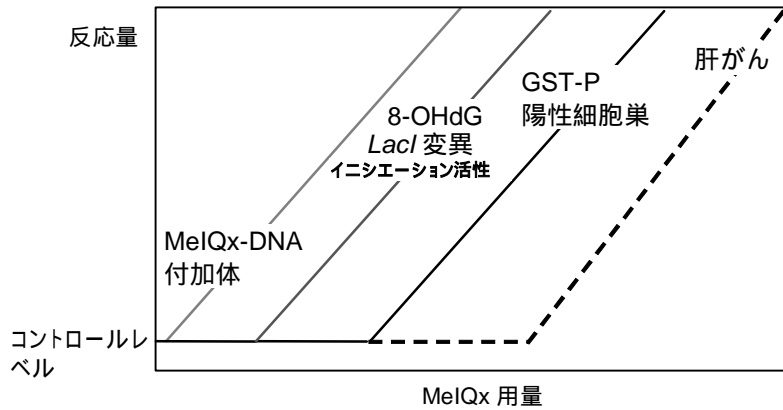


図6 肝発がんリスク：
MeIQx低用量域における各種発がんマーカーの反応

さらに四塩化炭素による肝障害状態におけるMeIQxの低用量域における発がん性をラット肝を用いて検討した。その結果、肝でのGST-P陽性細胞巢の発生にはMeIQx単独投与に比べ、四塩化炭素による肝障害による嵩上げが認められた(Iwai S, et al., 2002)。また、MeIQx投与量による変化は四塩化炭素非投与群では10 ppmまで対照群と有意な差は認めなかったのに対し、四塩化炭素投与群では10 ppmから有意に増加し、無作用量は障害がない状態に比較して低値を示した(図7)が、肝障害状態でもMeIQxの発がん性には閾値があることが判明した。

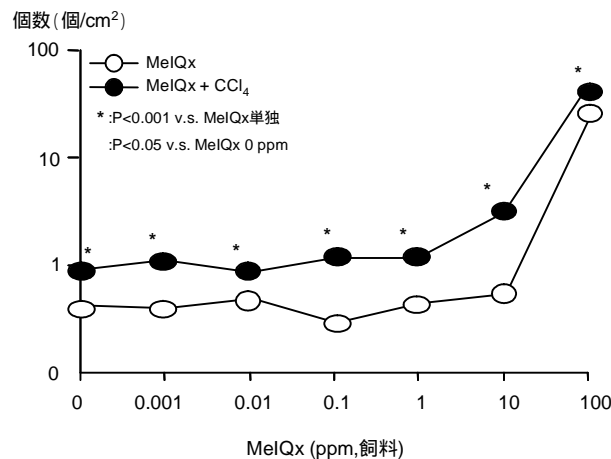


図7 MeIQxと四塩化炭素との低用量複合投与によるラット肝発がん性: GST-P陽性細胞巢の発生

2) 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)のラット大腸発がん性

PhIP はラット大腸に発がん性を発揮する(Ito N, et al., 1991)。そこで、0.001~400 ppm 用量域における種々の用量のPhIP含有飼料を16週間ラットに連続投与した(Fukushima S, et al., 2004)。大腸における前がん病変の指標である変異腺窩巢(ACF)の発生は10 ppmまでは増加せず、50~400 ppmにかけて用量相関をもって有意な増加を示した(図8)。PhIP-DNA付加体形成は0.01 ppm以上で有意な増加を示し(図9)、8-OhdG形成レベルも低用量では上昇しなかった。

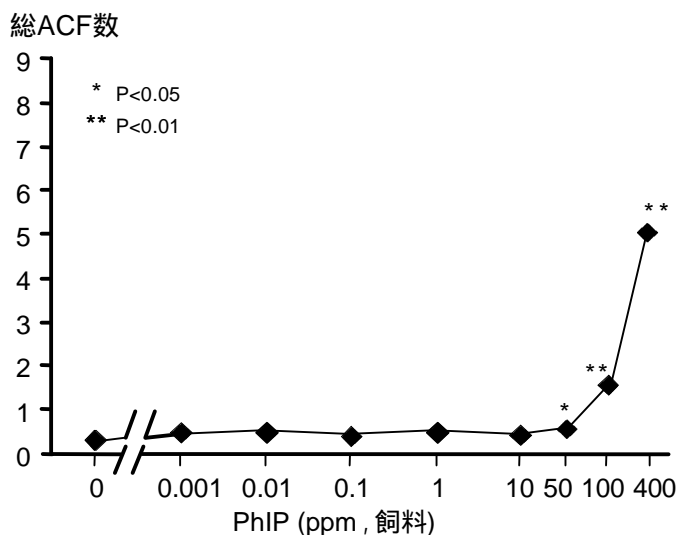


図8 PhIP投与ラット大腸におけるACFの発生

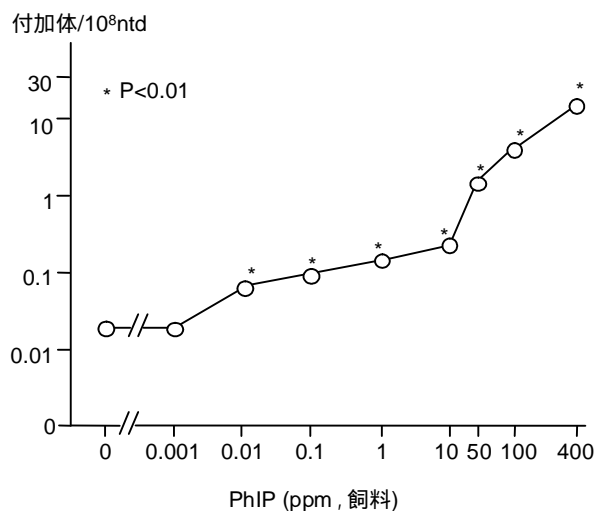


図9 PhIP投与ラット大腸におけるPhIP-DNA付加体形成

3. N-ニトロソ化合物の低用量発がん性

1) Diethylnitrosamine (DEN)のラット肝発がん性

ペトーら(Peto R, et al., 1991)は膨大な数のラット(総数4,080匹)を用いて、DENによる肝腫瘍発生における用量反応関係を検討した。DENを0.033~13.896 ppm(対照群を含め16用量群)の濃度で飲料水に混ぜラットに生涯投与し、肝腫瘍の発生は1 ppm以下ではみられなかったものの、それ以上の用量域

で投与量と肝腫瘍発生には直線的用量反応関係があることより、閾値の存在を否定した。

そこで我々は、ペトーらの実験に用いられた量より、より低用量域における DEN のラット肝発がん性を検討した。21 日齢の雄性 F344 ラット約 2,000 匹に種々の低用量（最低用量、0.0001 ppm）の DEN 含有飲料水を 16 週間投与した(Fukushima S, et al., 2002)。その結果、肝における GST-P 陽性細胞巢の発生は 0.01 ppm までは 0 ppm 群と差がなく、0.1 ppm 以上で有意な増加を示した（図 10）。

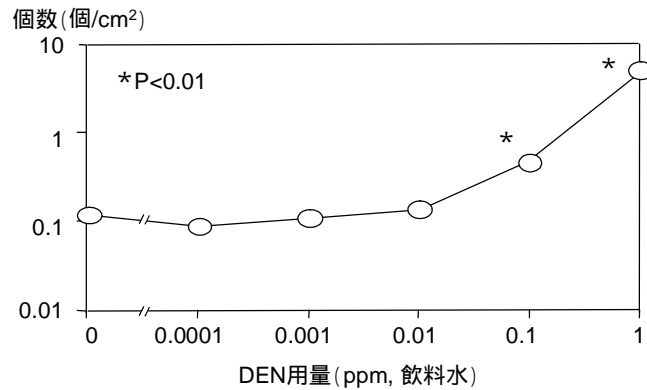


図10 DENの低用量域におけるラット肝発がん性:
GST-P陽性細胞巢の発生

一方、ウィリアムズら(Williams GM, et al., 1993)はラットに DEN を投与し、引き続きプロモーターとしてフェノバルビタールを投与する肝二段階発がん実験により、肝細胞変異巢、および腫瘍の発生と用量との関係を検討した結果、非直線的用量反応関係が認められたとして、高用量からの低用量への外挿に疑義をはさむと共に、DEN の発がん閾値の存在を示唆した。

我々も dimethylnitrosamine (DMN) について同様の手法を用いて検討したところ、DMN の 0.001~0.1 ppm では肝 GST-P 陽性細胞巢の発生は対照群と差がなく、1 および 10 ppm で有意な増加を示した。このことは DEN と同様に、DMN にも発がん閾値の存在を裏付けるものと考えられる(Fukushima S, et al., in press)。

4. おわりに

これらの最新の成果を総合的に判断すると、遺伝毒性発がん物質の発がん性には閾値、少なくとも実際的な閾値があり、無作用量を求め得るといえる。

現在、発がんのメカニズムが急速に解明されてきている。遺伝毒性発がん物質が標的細胞に作用し、DNA に損傷を起こしたとしても種々の修復酵素により損傷が修復されることがわかってきた。さらに、アポトーシスという現象、免疫能、その他吸収、代謝、排泄など、様々な要因が発がんに関与している。これらを総合的に解釈し、発がん物質のリスク評価をすべきであり、その結果、やがては閾値問題に対する答えが得られ、その結論は新しいリスクマネジメントに有用な情報を提供するに違いない。

参照資料

- Fukushima S, et al. (2002), Lack of a dose-response relationship for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethyl imidazo[4,5- f]quinoxaline or *N*-nitrosodiethylamine. Jpn J Cancer Res 93: 1076-1082
- Fukushima S, et al. (2003), Lack of initiation activity in rat liver of low doses of

- 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline. *Cancer Lett* 191: 35-40
- Fukushima S, et al. (2004), Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Toxicol Sci* 80: 109-114
 - Fukushima S, et al. (in press), Lack of potential low dose *N*-nitrosodimethylamine to induce preneoplastic lesion, glutathione *S*-transferase placental form-positive foci, in rat liver. *Cancer Lett*
 - Hoshi M, et al. (2004), No-observed effect levels for carcinogenicity and for *in vivo* mutagenicity of a genotoxic carcinogen. *Toxicol Sci* 80: 1-7
 - Ito N, et al. (1991) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 12: 1503-1506
 - Iwai S, et al. (2002), Role of oxidative DNA damage caused by carbon tetrachloride-induced liver injury – enhancement of MeIQx-induced glutathione *S*-transferase placental form-positive foci in rats. *Cancer Lett* 179: 15-24
 - Kushida H, et al. (1994), Dose-response study of MeIQx carcinogenicity in F344 male rats. *Cancer Lett* 83: 31-35
 - Peto R, et al. (1991), Effects on 4080 rats of chronic injection of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer Res* 51: 6415-6451
 - Totsuka Y, et al. (1996), Presence of *N*²-(deoxyguanosin-8-yl)2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-*f*]quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human tissues. *Carcinogenesis* 17: 1029-1034
 - Wakabayashi K, et al. (1993), Exposure to heterocyclic amines. *Environ Health Perspect* 99: 129-134
 - Williams GM, et al. (1993), Non-linearity of neoplastic conversion induced in rat liver by low exposures to diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 14: 2149-2156