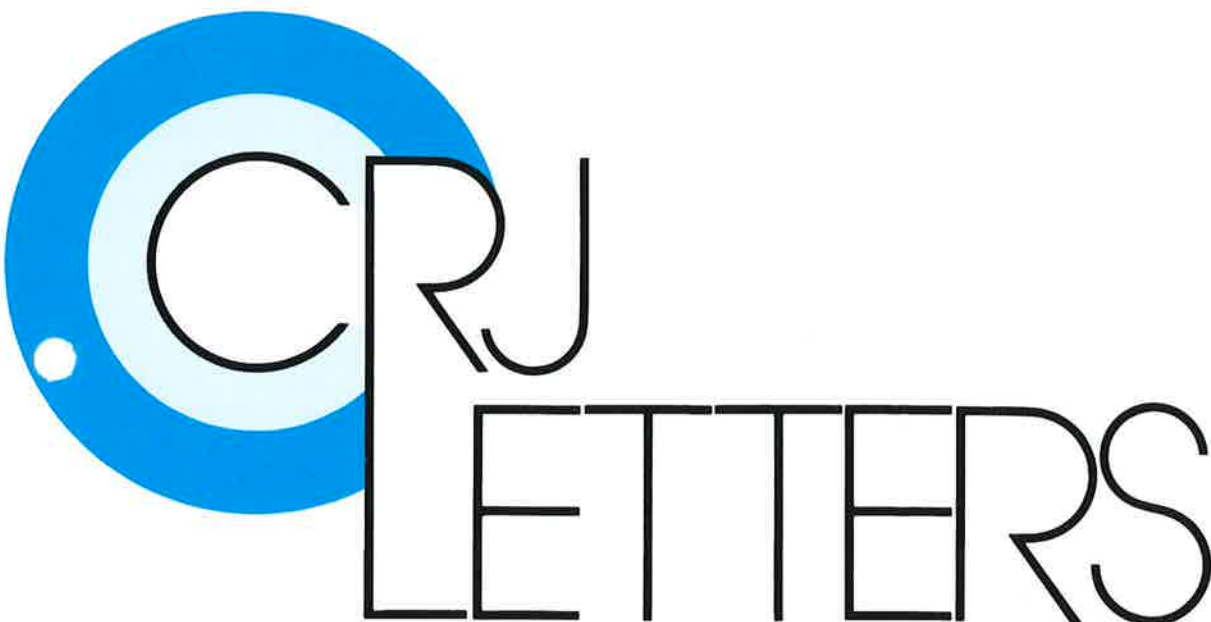


Vol.5 No.1

May 1992



CRJ LETTERS

— 卷頭論文 —

動物発がん実験の現状と将来 — ヒト発がん原因追究
の立場から —

Charles River
Japan Inc.  ® FROM THE
HAND OF THE
VETERINARIAN
TO RESEARCH

動物発がん実験の現状と将来—ヒト発がん原因追究の立場から

国立がんセンター 発がん研究部 長尾 美奈子

はじめに

動物を用いた発がん実験は、1) ヒトのライフスタイルに関連したがんの原因物質を探す、2) 食品添加物、医薬品などの形で参入してくる新しい発がん物質へのヒト曝露をコントロールする、3) 発がん抑制物質の検索、4) 発がんの機構の解明が主な目的である。WHOの機関の1つであるIARC(国際癌研究機構)の報告によれば、疫学的にヒトがんの原因物質と認められたもののほとんどは実験動物で発がん性が証明されている。この事実にもとづいて、実験動物データのヒトへの外挿が行われている。¹⁾

最近、最大耐量を用いた動物実験で発がん性の証明された物質は、はたしてヒト発がんに関与しているのだろうかという事が議論を呼んでいる。²⁻⁵⁾ 発がん物質の用量相関についてはリスク評価の立場から、以前より論議が交わされているが、Amesらが毒性によって誘発される細胞増殖の重要性を指摘したことにより、発がんの機構に1歩踏み込んで議論がされるようになった。個々の環境化学発がん物質に対するヒトの曝露量は、Amesの指摘するように、一般には低濃度である。それでは環境発がん物質はヒト発がんに関係しているのか、関係しているとすればどのような作用機構によるのかということが問題になる。この疑問を解決するためにとられている現在のアプローチを紹介する。

ヒトがんのがん遺伝子研究が急速に進み、がん化に伴う遺伝子変異が明らかにされつつある。動物発がん実験の結果をヒトに外挿するにしても、動物のがんは、どのようながん遺伝子変異からなっているのだろうかという単純な疑問が湧いてくる。

また動物のがんのがん遺伝子変異を掌握することにより、初期に起る遺伝子変異と細胞増殖の関

係、イニシエートされた細胞が選択的に増殖する条件、多段階に起る遺伝子変化の機構を解析できる。さらに発がん感受性の異なる系統の動物を用いることにより、感受性を決定している遺伝子にもアプローチが可能である。最近はがん抑制遺伝子に変異を導入したノックアウトマウスが作られるようになってきているが、それらを活用することにより、高能率に多くの情報が得られることが期待される。

我々が、ライフスタイルに関連した、即ち日常食品に本質的に含まれている発がん物質のヒトへのリスクを解明すべく行っている研究を通して動物実験の現状と将来に思いを馳せてみる。

ヒトのがんの原因物質を探す

がんは遺伝子の病気である。IARCがヒトにがんを誘発する物質(Group I)として登録したものの50化合物のうち、ホルモン、メタル、線維を除くとほとんどの化合物はサルモネラテストで変異原性がみつかるような遺伝毒性物質である。⁶⁾ ヒトがんの原因物質を探す目的で、ヒトがんの原因と最も関係の深い食物に焦点を当て、先ず遺伝毒性物質を調べた。焼肉、焼魚、野菜、コーヒー、紅茶、緑茶など極めて日常的な食品には遺伝毒性物質が含まれている。コーヒー中の遺伝毒性物質は過酸化水素とメチルグリオキサールによるものであり、コーヒー中には過酸化水素産生系がある。⁷⁾ 過酸化水素はカタラーゼ活性の低いC57BL/6Nで高率に十二指腸腺がんを誘発するが、Balb/cマウスでは発生率は低い。⁸⁾ メチルグリオキサールはF344雄ラットに2mg、週2回、10週投与すると20ヶ月後に22%に肉腫が誘発されたが、0.5%の飲料水を同じくF344雄ラットに投与しても、何ら腫瘍は誘発されなかった。⁹⁾ 化学物質の投与法は、ヒトが曝露されるのと同じ経路で行うことがWHOの提唱した規定にかかげられている。

野菜の中の主な遺伝毒性物質はクエルセチンをはじめとするフラボノイドである。クエルセチンに関しては、米国で行われた2つの発がん実験で毒性と報告されている。¹⁰⁾ 4%のクエルセチン投与により、F344雄ラット腎臓に腺腫が誘発されたとい



著者プロフィール
医学博士。千葉大学薬学部卒。国立がんセンター生化学部研究員、同代謝研究室長、発がん抑制研究室長を経て、1985年から発がん研究部長。研究テーマはヒト発がん物質の究明。趣味はハイキング、スキーなど。



うことであるが、日本で行われたマウス、ハムスター、ラットに最高10%のクエルセチンを餌に混ぜて投与した実験では発がん性は認められていない。¹³⁾ この様に遺伝毒性物質は必ずしも、実験動物で発がん性を示さない。また、発がん性の証明された化学物質のうち約40%は非遺伝毒性物質である。³⁾

一方、焼肉や焼魚に存在する遺伝毒性物質、すなわちヘテロサイクリックアミン類はマウスおよびラットに発がん性を示した。今までに発がん性の証明されたヘテロサイクリックアミンの化学構造を図-1に示す。また各化合物のマウスCDF1およびF344ラットにおける標的臓器を表-1に示す。ヘテロサイクリックアミンのほとんどの化合物が肝を標的臓器とする。PhIPは例外的に肝腫瘍を誘発せず、マウスにリンパ腫を、¹²⁾ 雄ラットに大腸がんを^{13, 14)} 雌ラットに乳がんを誘発した。¹⁴⁾

大変興味深いことは、例えばIQを投与したマウスでは肺にも肝と同様またはそれ以上の率で腫瘍が誘発される。さらにこの肝に次ぐ第2の標的臓器は化合物によって異なることである。Glu-P-1お

よびGlu-P-2では第2の標的臓器は、肩甲骨間の褐色脂肪組織の血管肉腫で、MeIQのそれは前胃である。同じ化合物IQでも、F344ラットにおける第2、第3標的臓器はジンバル腺、大腸であり、MeIQではジンバル腺、皮膚であり、Glu-P-1では大腸というように動物の種によって異なることである(表-2)。¹⁵⁾ さらに同じ種でも系統を変えることにより標的臓器が変わる。SD雌ラットに、IQのガストリックチューブによる胃内投与により肝腫瘍、ジンバル腺腫瘍の他に乳がんが高率に誘発された。また脾臓の腺房細胞の異形成増殖巣が高率に誘発された。肝発がんを高感受性のB6C3F1の新生仔マウスにPhIPを腹腔内投与することにより肝がんが誘発されたという報告もある。¹⁶⁾ またICR新生仔マウスにGlu-P-1を皮下投与すると肺腫瘍が誘発される。¹⁷⁾ さらに肝発がんに関し性差を比較してみると、マウスでは自然発がん率は雄の方が高いにもかかわらず雌の方が感受性が高く、ラットでは雄の方が高い。

以上のように発がん標的臓器は、用いる動物の

図-1 発がん性の証明されたヘテロサイクリックアミンの構造

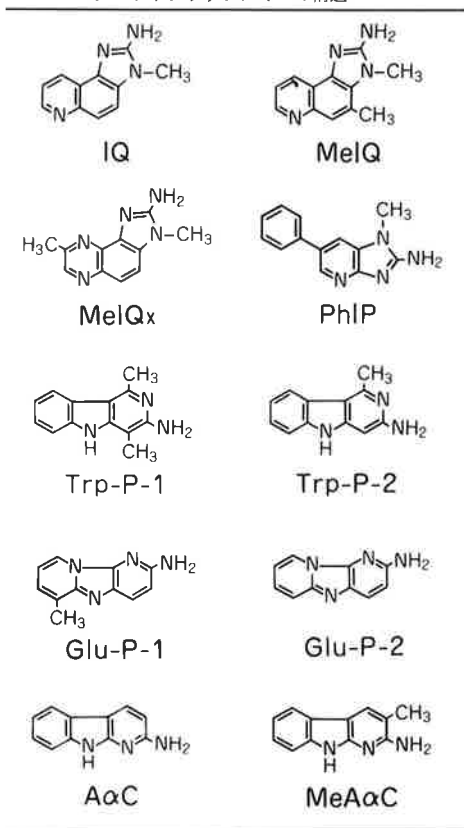


表-1 ヘテロサイクリックアミンによるラットおよびマウスにおける発がんの標的臓器

	Mice (CDF1)	Rats (F344)
IQ	Liver, Forestomach, Lung	Liver, Small and large intestines, Zymbal gland, Clitoral gland, Skin
MeIQ	Liver, Forestomach	Large intestine, Zymbal gland, Skin, Oral cavity, Mammary gland
MeIQx	Liver, Lung, Hematopoietic system	Liver, Zymbal gland, Clitoral gland, Skin
Trp-P-1	Liver	Liver
Trp-P-2	Liver	
Glu-P-1	Liver, Blood vessels	Liver, Small and large intestines, Zymbal gland, Clitoral gland
Glu-P-2	Liver, Blood vessels	Liver, Small and large intestines, Zymbal gland, Clitoral gland
AαC	Liver, Blood vessels	
MeAαC	Liver, Blood vessels	
PhIP	Lymphoma	Large intestine, Mammary gland

表-2 ヘテロサイクリックアミンによる発がんの特徴

		Tumor bearing animals (%)						
		Sex	Liver	Forestomach	Blood vessels	Lung		
Mouse (CDF1)	Glu-P-1	M	12	0	88	18		
		F	97	0	82	11		
	IQ	M	41	41	5	69		
		F	75	31	8	42		
MeIQ	M	18	92	0	39			
	F	71	89	3	16			
Rat (F344)	Glu-P-1	M	83	62	45	12	0	43
		F	57	24	17	0	0	43
	IQ	M	68	63	30	43	0	90
		F	45	23	3	8	0	68
	MeIQ	M	5	35	15	50	0	95
		F	0	25	10	5	25	85

種、系統、性、年齢によって異なる。化合物の投与経路、用量、方法、期間などによっても変動することが考えられる。したがって、ヘテロサイクリックアミンがヒト発がんに関与しているとしても、その標的臓器は推定不可能であるということになる。

CDF1 マウスおよびF344ラットにおける発がん性の強さを、TD₅₀ (mg/kg/day) で表すと表-3のようになる。一般にラットの方がマウスよりTD₅₀値は低く、Trp-P-1の場合ラットの方が90倍感受性が高い。このTD₅₀値の算出法に関しては薬物代謝の観点から体重当りではなく体表面積当りにした方が妥当である。体表面積当り (TD₅₀') で比較しても Glu-P-2 をのぞいてラットの方が高感受性である。この差は何に由来するのか、発がん標的臓器の大きさの概念を導入しなくて良いのか疑問に思われる。

動物発がん実験の結果をヒトへ外挿するに当り、non-human primate における発がん性は貴重な情報である。IQ はカニクイザルに肝がんを誘発する。¹⁸⁾ MeIQx および PhIP についても現在 NCI (米国) と国立がんセンターとの協同で発がん実験が行われている。

発がんの機構

遺伝毒性物質であるヘテロサイクリックアミンは DNA と共有結合する。DNA 付加体の生成が先

ず起り、それらががん遺伝子の活性化、がん抑制遺伝子の不活性化を導いて、発がんさせると考えられる。IQ、Trp-P-2 および Glu-P-1、は主として DNA 中のグアニン塩基と共有結合する。それらの構造を図-2 に示す。これら DNA 付加物の量は、³²P-ポストラベル法を用いることにより極めて感度良く測定することができる。

MeIQx を餌に混ぜて、F344 ラットに与え、各臓器から DNA を抽出し³²P-ポストラベル法で解析した例を図-3 に示す。4つの強いスポットのうち2つは、グアニンとの付加体と同定されている。残りの2つも多分グアニンによるものと思われるが、アデニンとの付加体も同じ位置に来るので同定されていない。MeIQx の標的臓器である肝でも、腫瘍の全く出来ない腎臓でも同じパターンを示す。DNA 付加体の量は餌の投与期間に比例して増加するが、4~8週間でプラトーに達する。¹⁹⁾ プラトーに達するレベルは、餌中の濃度に直線的に比例する。ラット MeIQx の発がん実験に用いた 400ppm の 1/1,000 でも直線関係にある(図-3)。

PhIP は 0.04% の濃度の餌 52 週投与で雄ラット 50% に大腸がんを誘発するが、雌ラットにおける大腸がん誘発率は極めて低い。¹⁹⁾ DNA 付加体生成量は雌雄大腸でほとんど差がない。またラットと同じ濃度の PhIP を 80 週投与しても全く大腸がんの誘発されないマウス大腸における PhIP DNA 付加体レベルはラットの約 1/2 で、発がん性は付加

図-2 Trp-P-2、Glu-P-1 および IQ と DNA 付加体の主なものの構造

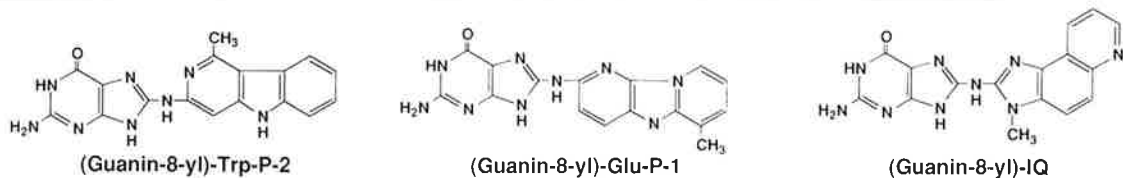
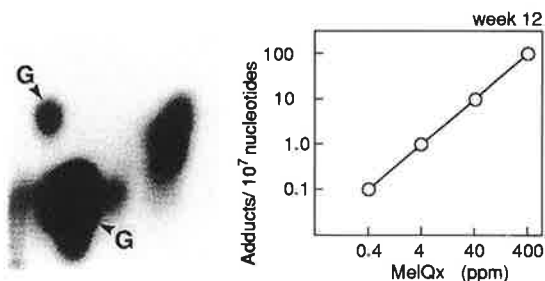


表-3 ヘテロサイクリックアミンの TD₅₀ (mg/kg/day) および TD₅₀' (mg/m²/day)

	TD ₅₀ (mg/kg/day)		TD ₅₀ ' (mg/m ² /day) ^a	
	CDF1 マウス	F344 ラット	CDF1 マウス	F344 ラット
Trp-P-1	8.8	0.1	35.2	0.67
Trp-P-2	2.1	—	10.8	—
Glu-P-1	2.7	0.8	10.8	5.3
Glu-P-2	4.9	5.7	19.6	38.0
AαC	15.8	—	63.2	—
MeAαC	5.8	—	23.2	—
IQ	14.7	0.7	58.8	4.7
MeIQ	8.4	0.2	33.6	1.3
MeIQx	11.0	0.7	44.0	4.7
PhIP	31.3	0.9	125.2	6.0

a: マウスおよびラット体表面積を各々 0.005 m² および 0.03 m² として算出した

図-3 MeIQx を投与したラット肝 DNA 付加体の³²P-ポストラベル法による TLC パターンと付加体レベルと餌中 MeIQx 濃度との相関





体レベルだけでは説明できない。また雄ラットにおけるPhIP DNA付加体のレベルは、大腸、膵臓、腎臓、心臓などでほぼ同じ値である。²⁰⁾ つまり発がん物質は種々の臓器で付加体を生成していること、DNA付加体のレベルと発がんとの間には、一義的には相関はないことがわかった。

発がん量のIQを4週間ラットに投与し、各臓器におけるDNA付加体量を比較すると表-4のようになる。肝の次にDNA付加体量の多い腎臓には腫瘍は出来ないが、それよりレベルの低い大腸に腫瘍ができる。肝および大腸ではIQ投与により、細胞増殖が誘導されていることがBrdUの取り込みから明らかになった。発がんにはDNA付加体の生成と細胞増殖誘発が重要な因子と考えられる。

化学発がん物質の肝における細胞増殖の誘導には、これまでにわかっているものでも必要投与期間が1週間から8週間とひらきがある。その作用機序についても、細胞毒性による細胞死を補償するために誘導されるもの、受容体に結合し細胞増殖に関与する遺伝子の転写活性化を通して作用するもの、細胞間のコミュニケーションを妨害することにより誘導されるもの、などが考えられる。今後発がんにおける細胞増殖の役割、機序、ダイナミクスなどに、かなりの研究の焦点がむけられるのであろう。

低濃度化学物質の発がん性の検出法

焼肉や焼魚中のヘテロサイクリックアミンの定量値にもとづき、ヒト1日のヘテロサイクリックアミンの摂取量は推定できる。ヘテロサイクリックアミンのうち、ラットに肝がんを誘発する化合物、大腸がんを誘発する化合物にわけて、その摂取量を大体計算してみても、肝発がんヘテロサイクリックアミンでTD₅₀の1/10,000、大腸発がんヘテロサイクリックアミンで1/3,000位になる。TD₅₀値で算出すると1/2,000~1/700となり、ヘテロサイクリックアミン単独ではヒト発がんに不

分量であるにしても、多段階発がんのうちの一部に関与している可能性が十分考えられる。

日本人の肝がんを例にとると、C型またはB型肝炎ウイルスによる肝炎から肝硬変に移行し、肝がんが誘発された場合が大部分を占める。自然肝炎発症LECラットを用いて、低濃度のヘテロサイクリックアミンの作用を実際に検討してみた。

LECラットは銅代謝に異常があり、銅が肝細胞に異常に蓄積する。²¹⁾ 生後16~18週で肝炎を発症、18ヶ月で100%に肝がん又は胆管線維症が起る。詳細は武市による総説を参照されたい。²²⁾ 肝炎が慢性期に入った23週から40週間、F344ラットに肝がんを誘発した濃度の1/10量、すなわち40ppmのMeIQxを含む餌を投与することにより、肝がん誘発率が約10倍に増加した(表-5)。

細胞増殖が誘導される様な条件下では低濃度のMeIQxが、多段階発がんにおける重要な遺伝子変化を誘発したと推定される。

以上のように細胞増殖が誘導されているような条件を用いることにより、低濃度の化学物質の発がん性を観察することができる。ここでは肝発がんについてのみ述べたが、他の臓器についても同様な方法を用いることができる。

複数化合物の混合投与

環境発がん物質は複数微量含まれており、実際にはそれらが総合的に作用しているわけである。そこで複数の化合物の発がん性は個々の発がん物質を与えた場合と比較して、異なるか否かが先ず調べられている。

高山らは、5種のヘテロサイクリックアミン、Trp-P-1、Trp-P-2、Glu-P-2、AαCおよびIQを単独投与したときの1/5量を混合し、単独投与のときと同じ期間投与した。肝、皮膚および陰核におけるがんで期待値より2~5倍高い誘発率が観察されている。²³⁾ 大腸、ジンバル腺などでは期待値に近い発がん率が得られている。肝や皮膚ではDNA

表-4 IQ投与ラットにおけるDNA付加体レベル、BrdUラベル率および発がん臓器

臓器	付加体/10'ヌクレオチド ^a	ラベル率		発がん
		対照	IQ ^a	
肝臓	202	0.08	0.2	+
大腸	17	6.6	9.1	+
腎臓	69	0.2	0.2	-
胃	44	5.8	5.6	

^a: 0.03%IQを含む餌をF344雄ラットに4週間投与

表-5 自然肝炎発症LECラットにおけるMeIQxの肝発がん性

実験群	有効匹数	肝細胞がん誘発率(%)	肝細胞がんの数	肝細胞がん/ラット
LECラット対照	8	2	2	0.3 ± 0.5
MeIQx(40ppm)	8	8*	22	2.8 ± 2.0*
LEAラットMeIQx(40ppm)	8	0	0	0

*P < 0.01

付加体レベルあるいは細胞増殖が期待値より増加しているのかどうか興味深い。

中期発がん実験

以上述べてきた実験データは主として1~2年の長期発がん実験によるものである。発がんに定量的解析を導入したり、抑制、促進物質のスクリーニングには長期発がん実験は適さない。また遺伝毒性は重要な因子であるが、前述したようにそれだけでは発がんは説明できない。そこで発がん実験に代替し得る *in vivo* 中期テストの確立が検討されている。

肝発がんに関してはGST-P陽性細胞の出現がかなり肝発がんと同相が高い方法として一般に受け入れられている。ヘテロサイクリックアミンを投与し、end pointを発がんではなくGST-P陽性細胞の出現でみると実験期間はかなり短縮される。さらに化合物を投与開始2週間前にジエチルニトロソアミン200mg/kgを1回腹腔内投与し、化合物投与開始1週間後に部分肝切除することにより感度を上げることができる。F344ラットに肝発がんを誘導しないPhIPでは、いずれの方法を用いてもGST-P陽性細胞は出現しない。この方法に関しては、171の化合物について、その有用性が確認されている。²⁵¹ 肝発がん物質、肝非発がん物質での結果からaccuracyを算出してみると92%になる。長期発がん実験に十分代替できる系と思われる。

特に発がん抑制物質や促進物質のスクリーニングには極めて有効な方法である。しかし発がん性を定量的に扱う場合は、用いるジエチルニトロソアミンの作用、肝切除による細胞増殖作用の取り扱いについては十分な注意を要する。

大腸発がんの中期テスト法としては、陰窩の異常 (aberrant crypt, AC) で見る方法がある。形態の異常なcryptは大腸発がん物質を投与した動物ばかりでなく、ヒト家族性ポリポーシス患者にも観察されている。大腸粘膜をメチレンブルーで染色することによりACが容易に検出できる。Tudekらはジメチルヒドラジンをはじめ、ラット

に大腸がんを誘発するGlu-P-1、IQ、MeIQにAC誘発能のあることを報告している。²⁶¹ 高橋らはPhIPにAC誘発能があるので(表-6)、大腸がんを誘発するのであろうことを予測した。²⁷¹ 現在発がん抑制物質のスクリーニングへの応用も行われている。

もちろんDNA付加体と細胞増殖を指標にしても大腸発がん物質を検出できるであろうが、本来細胞増殖のある臓器なので、細胞増殖を指標とすると、高い精度の解析が要求される。

胃発がん物質の解析法としては幽門腺におけるペプシノゲンの発現低下をマーカーにするもの、DNA修復合成およびDNA複製合成で見る方法 (*in vivo* 短期テスト法) などがある。²⁹¹

膀胱発がんに関しては、レクチンによる凝集反応で見る方法、²⁹¹ 乳頭状過形成を病理組織学的に検索する方法がある。³⁰¹

実験動物がんの遺伝子

がん遺伝子の変異特性の解析から、ヒト発がんの原因についてもいろいろな情報が得られる。アフラトキシン汚染地域の肝がんではp53遺伝子のコドン249に特異的にG→T変異が認められる。一方日本人の肝がんでは、p53変異の検出された8例で変異コドンは全て異なり、A→G、G→A、C→T、C→A、C→G、1塩基対欠損、3塩基対欠損など種々の変化が起っていることが明らかにされている。³¹¹

またヒト皮膚がんにおけるp53遺伝子変異は、紫外線で誘発される突然変異に特徴的なCC→TTおよびC→Tへの変異が非常に多いことが最近報告された。³²¹

一般に化学物質はその物質特有のDNA変異パターンを示す。MeIQで誘発したマウス扁平上皮がんではHa-rasの活性化が4/7例に検出されたが、変異はいずれもコドン13の第2レターのG→T変異であった。³³¹ MeIQで誘発されたラットジンバル腺の扁平上皮がんでもHa-rasの活性化が11/14例にみられたがそのうち9例でマウス前胃扁平上皮がんの場合と同様にコドン13の第2レターのG→T変異が検出されている。

ras遺伝子では、活性化につながる変異部位は、コドン12、13、61の他117、145などである。種々のヒトのがんにおけるp53遺伝子の不活性化に至る変異部位は多岐にわたり、両者を比較するとrasにおける変異部位は限られている。化合物の変異

表-6 ヘテロサイクリックアミンによる大腸異常陰窩(AC)の出現²⁷¹⁾

化合物	実験期間	ACの誘発率	大腸あたりのACを持つfocusの数
PhIP(500ppm)	4週	4/4	1.3 ± 0.8
Glu-P-1(500ppm)	4週	4/4	2.8 ± 2.1
DMH 20mg/kg SC×4	4週	4/4	158.5 ± 46.1
none	4週	0/4	0



特性を知る上でも p53 遺伝子は興味深い。p53 遺伝子におけるヘテロサイクリックアミンの変異特性を知ることは、ヒトがんにおける p53 の変異にヘテロサイクリックアミンが関与しているかを判定できる情報が得られるか否かという意味からも重要である。

IQ で誘発したラットジンバル腺の扁平上皮がんでは、4/13 例に p53 の変異が検出された。変異を表-7 に示す。いずれもグアニンが関与している。IQ がグアニン塩基と付加体を形成することから、これらの変化は IQ により引き起されたものと考えられる。陽性例が 4 例なので、1 つの化合物によって誘発される変異にホットスポットがあるか否かは不明である。1 つの化合物によって誘発された実験動物の primary な腫瘍の p53 の変異特性に関する報告はこれがはじめてである。³⁴⁾

ヒト大腸がんでは Ki-ras の他、がん抑制遺伝子である、APC、MCC、p53、DCC などの関与が明らかにされている。しかし IQ、Glu-P-1 PhIP で誘発されたラット大腸がんでは ras および p53 の変異は極めて稀である。ヒト大腸がんの場合も 5~10% は ras も p53 も関与していない場合がある。ヘテロサイクリックアミンで誘発されたラット大腸がんは、そのようなタイプの大腸がんの良い動物モデルになっている可能性がある。

ジメチルヒドラジンで誘発したラット大腸がんでは約 40% で Ki-ras が活性化していた。Ca⁺⁺ を補充した餌を投与することにより大腸がんの誘発率は抑制されると同時に Ki-ras の変異は全くみつからなかった。Ca⁺⁺ 濃度が比較的低い状態にあると Ki-ras 変異細胞が増殖しやすい状態にあると推定される。ヒトの場合も Ki-ras が変異していた場合には、Ca⁺⁺ が不足していたのかは、大変興味ある問題である。

がん遺伝子の解析が可能になってきて、得られる情報も多い。例えば MNU を含むいろいろな乳がん発がん物質に高感受性の Buf/N と、抵抗性の Copenhagen では、Ha-ras の突然変異は同じ率

で起っているが、Copenhagen ラットでは Ha-ras 変異細胞のクローナルな増殖が起り難いことが明らかにされている。このような系統による感受性の差を遺伝子レベルで明らかにすることは、実験動物系によってこそ明らかにされるものである。

感受性の異なる系統の F1 マウスやラットを用いることにより、がん抑制遺伝子の解析も可能である。マウスやラットの系統によって CA repeat-microsatellite は polymorphic であり、例えば B6/J と DBA/2J など inbred strain 間でもかなりの高頻度で polymorphism をアガロース電気泳動で識別できる。またこれら microsatellite の染色体マッピングも進められており、今後マウスの遺伝子解析は急速に進歩することが期待される。

おわりに

環境中の何がヒト発がん物質かという命題で我々が行っている研究を通して、動物実験について紹介した。IARC でヒト発がん物質として登録された化合物の多くは遺伝毒性があり、動物実験でヘテロサイクリックアミンと同様に複数動物種、複数臓器に腫瘍を誘発するということである。ヘテロサイクリックアミンに限らず発がん性遺伝毒性物質を我々は毎日微量ながら摂取している。それに細胞増殖が誘発される条件、すなわち炎症やホルモン作用などによって、さらに脂肪、ある種の蛋白質、食塩などの多量摂取によって誘発された細胞増殖によって、がんが発生すると考えられる。

ヘテロサイクリックアミンで誘発された動物のがんのがん遺伝子変異に関しては情報が限られている。種々のがん抑制遺伝子、感受性を決定する遺伝子の解析が今後に残されている重要な課題である。これらの研究には、例えば p53 遺伝子をノックアウトした動物、すなわち多段階発がんの一段階を人工的に進めて、より速く腫瘍を得るなどして、研究の高効率化をはかる必要があると考える。

また新化合物の発がん性テストに関しても大幅な省力化ができるようになってきている。NTP の発がん実験の結果から発がん物質の 96% は雄ラットと雌マウスを使うだけで、発がん性が検出できることがわかった。

動物発がん実験の将来は、発がんのメカニズムに基づいた、しかもヒト曝露量を考慮に入れた、省力化されたシステムに置きかえられていくであろう。

表-7 IQ 誘発ラットジンバル腺扁平上皮がんにおける p53 遺伝子変異

Tumor	Mutated codons	Mutations	Expression of normal allele
3	214	GTG → ITG (Val → Leu)	-
5	174	TGC → TIC (Cys → Phe)	-
19	156	CGT → GGT (Arg → Gly)	+
21	256	GAA Deletion (Frameshift)	-

13 例の扁平上皮がんのうち 4 例に変異が検出された

文 献

1. IARC, Suppl. 7, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Overall evaluations of carcinogenicity, an updating of IARC monographs from Vols. 1-42, Int. Agency for Research Cancer, Lyon, 1987.
2. Ames, B.N. and Gold, L.S., Mitogenesis increases mutagenesis, *Science* 249 : 970-971, 1990.
3. Ames, B.N. and gold, L.S. Chemical carcinogenesis: Too many rodent carcinogens, 87 : 7772-7776, 1990.
4. Weinstein, B.I. Toxicity, cell proliferation, and carcinogenesis, *Mol. Carcinogenesis*, 5, 2-3, 1992.
5. Tennant, R.W., Elwell, M.R., Spalding, J.W. Griesemer, R.A. Evidence that injury is not always associated with induction of chemical carcinogenesis, *Mol. Carcinogenesis*, 4, 420-440, 1991.
6. Shelby M.D. and Zeiger, E. Activity of human carcinogens in the Salmonella and rodent bone-marrow cytogenetics tests, *Mutat. Res.*, 234, 257-261, 1990.
7. Nagao, M., Wakabayashi, K., Suwa, Y. and Kobayashi, T. Alteration of mutagenic potentials by peroxidase, catalase, and peroxide dismutase. *Basic Life Sciences* 39, 73-80, 1986.
8. Ito, A., Naito, M., Naito, Y. and Watanabe, H. Induction and characterization of gastro-duodenal lesions in mice given continuous oral administration of hydrogen peroxide. *Gann*, 73, 315-322, 1982.
9. 藤田由紀、若林敬二、長尾美奈子未発表データ
10. NIH Publication No. 91-3140, NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of quereetin in F344/N rats. NTP TR 409, 1991.
11. Ito, N. Is quereetin carcinogenic? *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 312-314, 1992.
12. Esumi, H., Ohgaki, H., Kohzen, E., Takayama, S., and Sugimura, T. Induction of lymphoma in CDF₁ by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenyl imidazo [4,5-b] pyridine, *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 1176-1178, 1989.
13. Ochiai, M., Ogawa, K., Wakabayasi, K., Sugimura, T., Nagase, S., Esumi, H., and Nagao, M. Induction of intestinal adenocarcinomas by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine in Nagase analbuminemic rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 363-366, 1991.
14. Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama, S., and Sugimura, T. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, 12 : 1503-1506, 1991.
15. Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., and Sugimura, T. Food-derived Mutagens and Carcinogens. *Cancer Res. (Suppl.)* 52. 2092s-2098s, 1992.
16. Dooley, K.L., Von Tungeln, L.S., Bucci, T., Fu, P. P. and Kadlubar, F.F. Comparative carcinogenicity of 4-aminobiphenyl and the food pyrolysates, Glu-P-1, IQ, PhIP, and MelQx in the neonatal B6C3F₁ male mouse, *Cancer Lett.*, 62, 205-209, 1992.
17. Fujii, K., Sakai, A., Nomoto, K. I. and Nakamura, K. Tumor induction in mice treated neonatally with 2-amino-6-methyldipyrido [1,2-a : 3,2'-d] imidazole or 2-amino-6-methyldipyrido [1,2-a : 3,2'-d] imidazole. *Cancer Lett.*, 41, 75-80, 1988.
18. Adamson, R.H., Thorgeirsson, U.P., Snyderwine, E.G., Thorgeirsson, S.S., Reeves, J., Dalgard, D.W., Takayama, S., and Sugimura, T. Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline in non-human primates: induction of tumors in three macaques. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 10-14, 1990.
19. Yamashita, K., Adachi, M., Kato, S., Nakagama, H., Ochiai, M., Wakabayashi, K., Sato, S., Nagao, M., and Sugimura, T. DNA adducts formed by 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline in rat liver: dose-response on chronic administration. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81 : 470-476, 1990.
20. Takayama, K., Yamashita, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T., and Nagao, M. DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80 :



- 1145-1148,1989.
21. Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J. H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y., and Uchino, J. Spontaneous hepatic copper accumulation in long-evans cinnamon rats with hereditary hepatitis, *J. Clin. Invest.* 87, 1858-1861, 1991.
 22. Takeichi, N. LECラット-肝炎・肝癌自然発症動物-CRJ Letters, Vol.4 No.1, 1-8, August, 1991.
 23. Takayama, S., Nakatsuru, Y., and Sato, S. Carcinogenic effect of the simultaneous administration of five heterocyclic amines to F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 1068-1072, 1987.
 24. Hasegawa, R., Shirai, T., Hakoi, K., Takabe, K., Iwasaki, S., Hoshiya, T., Ito, N., Nagao, M., and Sugimura, T. Synergistic enhancement of glutathione S-transferase placental form-positive hepatic foci development in diethylnitrosamine-treated rats by combined administration of five heterocyclic amines at low doses. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 1378-1384, 1991.
 25. Ito, N., Imaida, K., Hasegawa, R., and Tsuda, H. Rapid Bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 19, 385-415, 1989.
 26. Tudek, B., Bird, R. P., and Bruce W. R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with food. *Cancer Res.*, 49, 1236-1240, 1989.
 27. Takahashi, S., Ogawa, K., Ohshima, H., Esumi, H., Ito, N., and Sugimura, T. Induction of aberrant crypt foci in the large intestine of F344 rats by oral administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 135-137, 1991.
 28. Furihata, C., Obara, M., and Matsushima, T. : In vivo short-term assay for identification of organspecific carcinogens and tumor-promoters. *JUOEH11, Supplement*, 641 (1989).
 29. Kakizoe, T., Komatsu, H., Nijima, T., Kawachi, T., and Sugimura, T. Maintenance by saccharin of membrane alterations of rat bladder cells induced by subcarcinogenic treatment with bladder carcinogens. *Caner Res.*, 41, 4702-4705 (1981).
 30. Fukushima, S., Hagiwara, A., Ogiso, T., Shibata, M., and Ito, N. Promoting effects of various chemicals in rat urinary bladder carcinogenesis initiated by N-nitroso-N-butyl(4-hydroxybutyl) amine, *Fd Chem. Toxic.*, 21, 59-68, 1983.
 31. Murakami, Y., Hayashi, K., Hirohata, S., and Sekiya, T. Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.*, 51, 5520-5525, 15, 1991.
 32. Brash, D. E., Rudolph, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J., and Ponten, J. A role for sunlight in skin cancer : UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Sci. USA*, 88, 10124-10128, 1991.
 33. Makino, H., Ochiai, M., Caignard, A., Ishizaka, Y., Onda, M., Sugimura, T., and Nagao, M. Detection of a Ha-ras point mutation by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis in 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline-induced mouse forestomach tumors. *Cancer Lett.*, 62, 115-121, 1992.
 34. Makino, H., Ishizaka, Y., Tsujimoto, A., Nakamura, T., Onda, M., Sugimura, T., and Nagao, M. Rat p53 gene mutations in primary Zymbal gland tumors induced by 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992 in press.



日本チャールス・リバーからのお知らせ

◆◆◆ BN/Crj (Brown Norway) ラットの新しい用途 ◆◆◆

昨年8月より販売を開始いたしましたBNラットについては、CRJ LETTERS Vol.3 No.1すでにご案内いたしました。利用分野として老化研究、臓器移植に加えて、最近ご利用の多い分野について簡単にご紹介いたします。

1) 鼻炎モデル

I型アレルギーの中で関連する疾患として、アレルギー鼻炎があげられます。この疾患はアレルゲンとIgE抗体の反応を通じて起こっていると考えられています。この点でBNラットはHigh IgE responder strainとして有用と考えられます。(1)

IgE抗体の産生能力の比較試験を行なったところ、BN/CrjはCrj:Wistarの4~5倍反応性が高いことがわかりました。

2) 腎炎モデル (自己免疫疾患モデル)

ヒト腎障害の発症とその慢性化機構に免疫学的機作が関与するとされています。そこで、単クローン抗体を用いることにより、腎病変の惹起に至る過程を解析し、腎障害機序を分子レベルで解明する研究が進展しています。このなかでBNラットの有用性がうかがえる結果が得られました。

さらに、従来から用いられている間質性腎炎、HgCl₂腎炎のモデルにおいてもBNラットの有用性

が文献上報告されています。(2).(3)

従来は、モデル動物としてWistarラットが使用されてきましたが、病態の発現にバラツキが起こり、最適なモデル動物の出現が望まれていました。今回用いた、MAb5-1-6モノクローナル抗体による腎炎モデルについてSD,Wistar,LEWおよびBNの比較をおこなったところ、BNラットがWistarラットと同程度に感受性が高く、特徴としては、BNはバラツキが小さいことがわかりました。

- (1) Nobuki Takahashi, Yukihiko Aramaki and Seishi Tsuchiya: Allergic rhinitis model with Brown Norway rat and evaluation of antiallergic drugs. J. Pharmacobio Dyn., 13, 414-420, (1990)
- (2) A.Gimenez, F.Leyva-cobian, Celia Fierro, Mercedes Rio, Teresa Bricio and F.Mampaso: Effect of cyclosporin A on autoimmune tubulointerstitial nephritis in the Brown Norway rat. Clin.Exp.Immunol.,69,550-556, (1987)
- (3) S.P.Makker and J.J.Kanalas: Renal antigens in mercuric chloride induced, anti-GBM autoantibody glomerular disease. Kidney Int., 37,64-71, (1990)

◆◆◆ ヌード・マウスの新しい用途 (潰瘍研究モデル) ◆◆◆

BALB/c nude MiceにおけるHelicobacter pylori 感染モデル

胃炎、消化性潰瘍との関連性

数年前からHelicobacter pyloriは胃炎、消化性潰瘍との関連性があるとして注目され、さらに最近では胃がん発生の一因子としても検討されるようになってきました。(1)

消化性潰瘍および急性胃炎にかかったヒトの胃におけるHelicobacter pyloriの検出率は約80%、健康で正常な胃では約6%と、Helicobacter pyloriの関連性が考えられています。

Helicobacter pylori感染が合併すると消化性潰瘍では治癒が遅延し、また潰瘍の治療過程でHelicobacter pyloriの除菌を試みると治癒促進、再発防止効果が得られることがわかってきました。

さらに、Helicobacter pylori感染が長期間持

続すると胃粘膜の慢性炎症が続き、萎縮性胃炎に進展して、ついには胃がん発生への因子になることが推測され、最近のアメリカにおける調査結果にも関連性につき興味ある報告があります。(2).(3)

これまでの研究では、Helicobacter pyloriはサル、ブタでは感染が成立するが、その他の小動物では不可能であるというのが定説とされてきましたが、Dr.KaritaらによりBALB/c nudeの胃内に定着することが報告され、潰瘍研究に新たな方向が示唆されました。(4)

- (1) Warren JR and B.Marshall: Unidentified curved bacill on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1,1273-1275, (1983)

- (2) David Forman: Helicobacter pylori infection: A novel risk factor in the etiology of gastric cancer. Journal of the National Cancer Institute 83,1702-1703,(1991)
- (3) Julie Parsonnet, Gary D. Friedman, Daniel P. Vandersteen, Yuan Chang, Joseph H. Vogelman, Norman Orentreich and Richard K. Sibley: Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. The New

England Journal of Medicine 325,1127-1131, (1991)

- (4) Mikio Karita, Takashi Kouchiyama, Kiwamu Okita and Teruko Nakazawa: New small animal model for human gastric helicobacter pylori infection: Success in both nude and euthmic mice. The American Journal of Gastroenterology, 86,1596-1603, (1991)

◆◆◆ チャールス・リバーグループの実験用サル類の取組み ◆◆◆

医療の高度化に伴う新手技の開発や、バイオ医薬品をはじめとする新タイプ（作用機序、骨格）の医薬品開発の活発化により、医・薬学領域における実験用サル類の重要性はますます増大しています。一方、増加する医薬品開発費に対し、初期段階で薬効、吸収・代謝、安全性につき、予備的な用途のためのサル類の使用も試みられています。

チャールス・リバーグループでは、1989年のEbola様ウイルス問題を契機として、細菌や寄生虫のみならず各種ウイルスにも着目した高品質の捕獲および繁殖ザルを安定的に供給すべく施設の新設やスタッフの充実を米国中心に行っています。

以下、弊社の供給可能な主要品種およびウイルステストサービスにつきご紹介申し上げます。

1) 繁殖ザル

●赤毛ザル

- ・米フロリダ州キーウエスト周辺2島にて繁殖中* / インド原産、B-ウイルスフリー
- ・中国産赤毛ザルを米テキサス州ヒューストンにて検疫 / B-ウイルスネガティブも供給可

●カニクイザル

- ・米フロリダ州マイアミおよびモーリシャス島にて

繁殖中* / モーリシャス原産、B-ウイルスフリー

●マーモセット

- ・英国ケントにて繁殖中 / 中南米原産 (ICI社経由)

* 余裕のある場合を除き、契約繁殖にて供給いたします。

2) 捕獲ザル

●カニクイザル

- ・モーリシャス産カニクイザル (B-ウイルスフリー) を米フロリダ州マイアミにて検疫 (当面はオスのみ)
- ・フィリピン・インドネシア産カニクイザルを米テキサス州ヒューストンにて検疫 / B-ウイルスネガティブも供給可

●その他

- ・シーバス、ミドリザル、リスザル、バブーンなどについてもご要望に応じ、米テキサス州ヒューストンにて検疫し、お届けいたします。

3) ウイルステスト受託サービス

導入時や維持中の各種サル類のヘルスマニタリングとして、B-ウイルスを含むウイルス検査をVRL社 (米テキサス州サンアントニオ) との提携により受託いたします。

《非売品》

CRJ LETTERS Vol.5 No.1 (通巻第8号)

この小冊子に関するご意見、ご要望を下記までお寄せください。

発行日:平成4年5月25日

発行所:日本チャールス・リバー株式会社

〒222 横浜市港北区新横浜2-3-8

東伸24 新横浜ビルB-4階

電話045(474)9340

企画・編集:日本チャールス・リバー株式会社

制作:株式会社ティ・ティ・アイ



日本チャールス・リバー株式会社

● 弊社の英文社名は **Charles River Japan, Inc.** です。

動物についてのお問合せ、ご注文先

国内飼育動物	☎045(474)9350	ファックス045(474)9351
輸入動物	☎045(474)9333	ファックス045(474)9341