

大阪市立大学大学院医学研究科 教授

福島 昭治

「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

環境中に存在する発がん物質のリスク評価に際しては、単に発がん物質の存在を明らかにするだけでなく、それがどの程度ヒトのがん発生に影響しているかを検討することが重要である。現在、評価にあたって実際には発がん物質の高用量域での反応の用量相関曲線を低用量域に延ばすことにより低用量域での発がん性のヒトへの外挿が行われ、発がん物質、特に遺伝毒性発がん物質には閾値がないとされている。このことが正しいかどうかを科学的に証明することが極めて重要な課題である。

本研究はがんの一次予防を最終目標とし、環境発がん物質のヒトが実際に曝露される低用量域における環境発がん物質の発がん性を検討し、さらにそれと曝露レベルとの相関を明らかにする。また、化学物質の発がん性を容易に検出できる新しい発がん検索法を開発する。これらの成果を基盤にしてヒト発がんリスク評価のための信頼に依る基礎的データを作ることを目的とする。本研究領域では“weights of evidence”が要求されるため出来る限り多くの発がん物質について検討する。

### 1) 環境発がん物質の低用量発がん性

(1) 遺伝毒性発がん物質：2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) は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、ラットに肝がんを発生させる。21日齢の雄性ラットを用いて MeIQx の低用量を 16 あるいは 32 週間経口投与した。肝前がん病変の指標である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の発生は 0.001 ~ 1ppm では全く増加せず、10ppm 以上で増加傾向を、100ppm で増加を示した（平坦－立ち上がり曲線）。また、H-ras 遺伝子の変異率は 10ppm 以上の MeIQx 投与で増加した。さらに MeIQx-DNA 付加体は極めて低用量の曝露で形成され、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)の形成レベルは 0.1ppm 以上で増加した。（共同研究）

CCl<sub>4</sub>による肝障害やアルコール肝においては GST-P 陽性細胞巢は 10ppm 以上で増加したものの、反応曲線は全く同様であった。さらに MeIQx の低用量を 2年間投与しても 1ppm 以下では GST-P 陽性細胞巢は増加しなかった。また、lacI 遺伝子を導入したトランスジェニックラット、すなわち Big Blue ラットに MeIQx を投与すると、10ppm 以上で lacI 遺伝子変異頻度の増加を、100ppm で GST-P 陽性細胞巢の増加を認めた。（福島）

N-ニトロソ化合物である diethylnitrosamine (DEN) と dimethylnitrosamine (DMN)、およびヘテロサイクリックアミンの 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ) においても低用量域では肝 GST-P 陽性巢の発生増加はみられなかった。（共同研究）

ヘテロサイクリックアミンである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [5,6-b] pyridine (PhIP) の低用量大腸発がん性をラットにて検討するため、種々の用量の PhIP 含有飼料を 16 週間連続投与した。大腸における前がん病変の指標である aberrant crypt foci の発生は 10ppm まででは増加せず、50~400ppm にかけて有意な増加を示した（平坦－立ち上がり曲線）。PhIP-DNA 付加体形成は 0.01ppm 以上で有意な増加を示し、8-OHdG 形成レベルも低用量域

では上昇しなかった。(共同研究)

以上、遺伝毒性発がん物質には實際上、無作用量の存在することが明らかとなった。

さらに MeIQx と DEN の複合投与によるラット肝発がん性を検討したところ、低用量域では GST-P 陽性細胞巢の増加は見られず、複合投与においても實際上無作用量の存在することが判明した。

(2) 非遺伝毒性発がん物質：phenobarbital (PB) は変異原性陰性の肝発がん物質、あるいは発がんプロモーターである。6週齢の雄性ラットを用いて、ラット肝中期発がん性検索法(伊東法)にて低用量発がん性を検討した。PB は 60～500ppm では GST-P 陽性細胞巢の発生を用量に相関して増加させたが、1～7.5ppm の低用量域では対照群のそれより減少し(U字型曲線)、PB の発がんには無作用量が存在することが明らかになった。さらに、DEN →PB のラット長期二段階発がん実験において、2ppm PB 群では肝がんの発生が DEN 単独群に比し有意に抑制された。PB の低用量域では肝における CYP3A2 の発現低下、8-OHdG の減少、ならびに OGG1 の増加が認められた。このような GST-P 陽性細胞巢発生に対する反応曲線は他の非遺伝毒性発がん物質である p,p'-DDT や  $\alpha$ -BHC においても認められた。しかし、dieldrin や safrole の発がん曲線はこれと異なり、無作用量を有する通常の S 字状曲線であった。以上、非遺伝毒性発がん物質には無作用量が存在することが証明された。

(福島)

低用量の環境発がん物質に対する生体の反応は高用量とは明らかに異なる。遺伝毒性発がん物質の場合、種々のマーカーの反応曲線から発がん物質には實際上、無作用量が存在することが判明した。また非遺伝毒性発がん物質の低用量では発がんが逆に抑制されるというホルミシス現象の存在が示され、無作用量が明らかに存在することが判明した。

## 2) 中期発がん検索法の確立

新規化学物質の長期発がん性試験の代替法が ICH を中心として国際的に検討されている。我々は主として肝以外の臓器における中期発がん検索法の確立を目的として、遺伝子改変動物の高発がん感受性に着目し、我々が作製したトランスジェニックラットの発がん検索法としての有用性を検討した。

(1) ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットを作製し、その発がん感受性を検討した。その結果、乳線を標的とする発がん物質を 50 日齢時に 1 回投与すると、8～12 週後に全例に乳腺がんが多発した。さらに乳線を標的としない発がん物質の胃内投与でも乳腺腫瘍が多発し、臓器標的性を問わない発がん物質の高感度検索モデルとして有用であることが示された。(津田)

また、probasin の遺伝子プロモーターと SV40T 抗原を用いて、前立腺に 100%腺がんが発生するトランスジェニックラットを作製した。このモデルを利用することにより、がんの顕在化と転移に影響を及ぼす環境化学物質を早期に検索できることを見出した。(白井)

以上、乳腺と前立腺を対象とする低用量発がん性の検討、ならびに環境要因、特に社会的問題となっている内分泌攪乱物質の乳腺と前立腺への発がん影響を容易に検出できることが可能となった。

(2) 個体レベルでの細胞間連絡能と発がん感受性に着目し、アルブミンプロモーター制御下にドミナントネガティブ変異コネクシオン 32 遺伝子を連結したものを導入した、肝の細胞間連絡能が低下した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は DEN 肝発がん極めて高感受性を示し、肝発がん物質をより早期に検出できるモデル動物として有用であることが強く示唆された。(白井)

(3) 既存の *p53* ノックアウトマウスの発がん感受性は膀胱、食道では極めて高く、特にホモ接合体で顕著であった。一方、胃、大腸および肝ではヘテロ、ホモ接合体とも感受性がなく、長期発がん性試験の代替法としては一定の限界があることが判明した。しかし、発がん物質と標的臓器を十分考慮すれば、マウスにおける低用量発がん性リスク検索に有用である。(福島、立松)

(4) 5 週間で化学物質の肝におけるイニシエーション活性が検索可能な中期イニシエーション活性検索法を確立した。この方法では変異原物質である肝発がん物質のみならず、肝を標的としない物質でもイニシエーション活性が検出された。しかも、非変異原物質では陰性であった。したがって、プロモーション活性と組み合わせることにより、新規化学物質の発がん性が、臓器標的性に関わらず、短期間に評価できることが明らかになった(立松)。

### 3) 発がん判定のための各種マーカーの検討

発がんに関する各種マーカーが簡便な方法で計測できれば、それを応用することによりその発がん過程への関与と発がんリスクとの関連を明確にすることができる。

(1) DNA 塩基配列決定法の 1 つであるジデオキシ法を応用し、発がん物質により誘発された希少な遺伝子変異を検出する高感度遺伝子変異定量法 *Thermosequencase Cycle End Labeling* 法を確立した。本法ではラット *H-ras* 遺伝子および *p53* 遺伝子における変異の検出において、変異率  $10^{-2} \sim 10^{-5}$  の範囲で定量が可能であった。(大谷)

(2) 酸化性 DNA 傷害である 8-OHdG の形成レベルは発がん物質 1 回投与 72 時間で高値を示し、8-OHdG を標的として、極めて短期間に発がん物質のリスク評価をし得ることが示唆された。また、無処置ラットにおける 8-OHdG 形成レベルとその局在は臓器ないしその構成細胞に特異的に増加、出現するが、必ずしも加齢に依存しない経年年齢的変動を示すという基礎データを得た。(小西、中江)

(3) 発がん性ヘテロサイクリックアミンの 1 つである PhIP の DNA 付加体に対する抗体を作製し、PhIP-DNA 付加体の臓器内分布を免疫組織化学的に検出することに成功し、付加体が環境中 PhIP 曝露の指標となりうることが明らかとなった。(白井)

(4) ラット膀胱および前胃腫瘍では出現する遺伝子変化が遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性のそれとでは異なった。さらに cDNA アレイ解析は発がん物質を分類するのに有用な手段となりうるということが判明した。(福島)

## 2. 研究構想

本研究では環境発がん化学物質の低用量域での発がん性ならびに新規化学物質の発がん性を従来の長期発がん性試験法ではなく、中期発がん検索法を用いて証明することを意図した。そこで、既に開発された中期発がん検索法を用いて、低用量域発がん性を検討するとともに、既存のそれよりもさらに有用な検索法を確立するという2本立ての目標を掲げて研究を開始した。それは5年間という期間内で発がん物質の低用量作用を一刻も早く検証したいという意図からである。

低用量発がん性の研究、特に遺伝毒性発がん物質のそれについては、多数の動物を必要とするため、研究開始時から1つの研究に対して動物飼育、多方面からの検索などすべての面で、グループ全員が協力して実施する学際的研究とすること、非遺伝毒性発がん物質の低用量発がん性については研究代表者が担当して実施することにした。新規中期発がん検索法についてはその他の研究グループが新しいマーカーの確立を含めてそれぞれの立場から研究することにした。この研究計画では各グループが担当研究領域にとらわれず、研究を進めたこともあり当初の予定通り5年間順調に実施できた。

遺伝毒性発がん物質の低用量発がん性研究推進にあたっては研究代表者の責任の基に、連絡を密にして実施することとした。また、研究グループ検討会を繁茂に開催し、意見の交換をすることとした。

各研究課題の役割分担は下記の如くである。

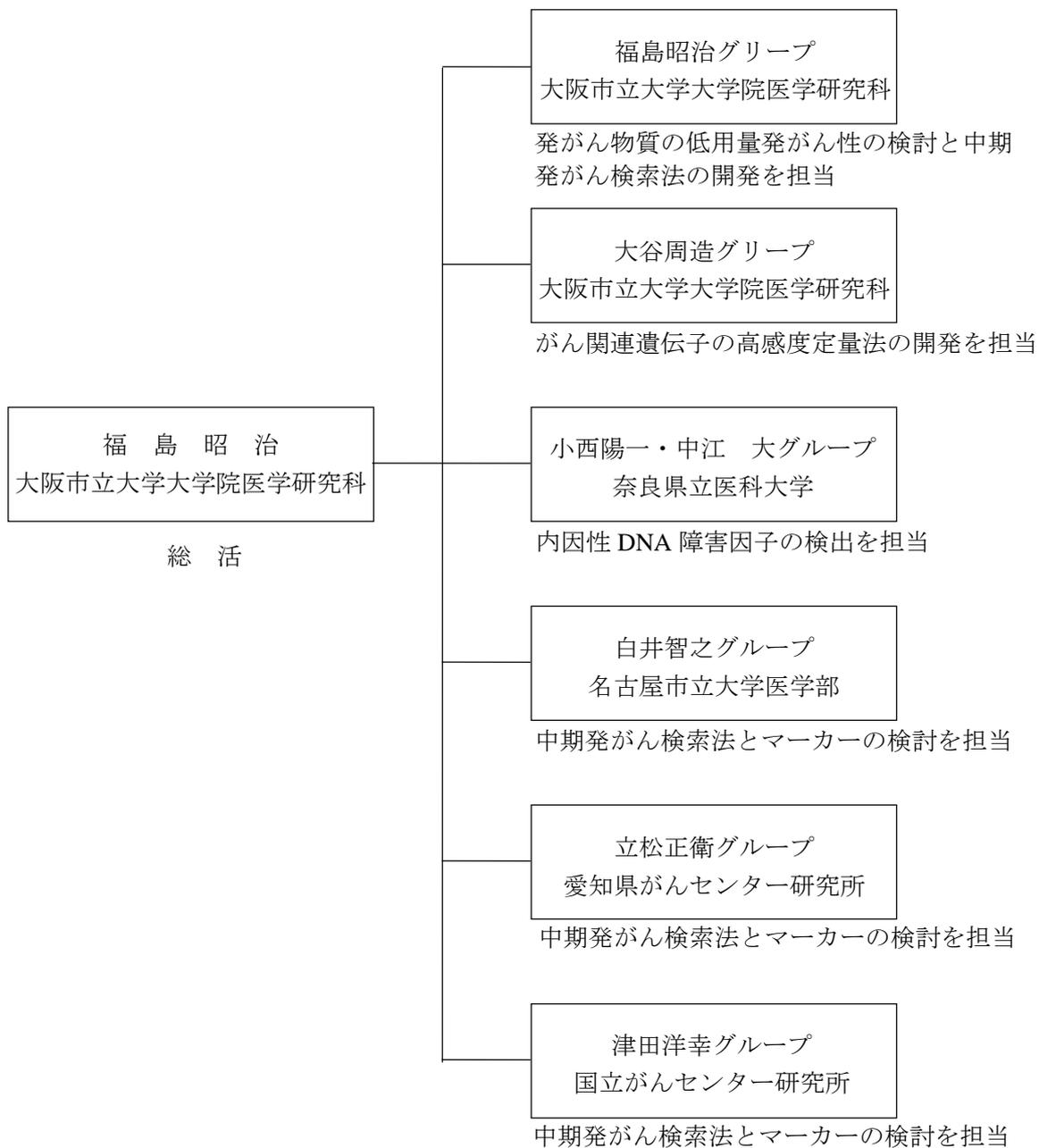
低用量発がん性検索：福島を中心として全員

中期発がん検索法の開発：福島、白井、津田、立松

マーカーの開発：大谷、小西・中江

### 3. 研究実施体制

#### (1) 体制



#### 4. 研究期間中の主な活動

- (1) ワークショップ・シンポジウム等  
なし

#### 5. 主な研究成果

- (1) 論文発表（国内 16 件、海外 33 件）

##### 【福島昭治】

1. Lee, C.C.R., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Wada, S., Sugimura, K., Kishimoto, T. and Fukushima, S.: Cyclin D1 overexpression in rat two-stage bladder carcinogenesis and its relationship with oncogenes, tumor suppressor genes, and cell proliferation. *Cancer Res.*, 57, 4765-4776, 1997.
2. Kitano, M., Matsuda, T., Ichihara, T., Tamano, S., Hagiwara, A., Funae, Y., Shirai, T. and Fukushima, S.: Presence of a threshold for promoting effect of phenobarbital on diethylnitrosamine-induced hepatic foci in the rat. *Carcinogenesis*, 19, 1475-1480, 1998.
3. 福島昭治：環境因子の発がんリスク評価と予防への実験病理学的アプローチ（宿題報告 III）、日病会誌（*Proc. Jpn. Soc. Pathol.*）, 87, 55-77, 1998.
4. Chen, T., Wanibuchi, H., Murai, T., Kitano, M., Yamamoto, S. and Fukushima, S.: Promotion by sodium L-ascorbate in rat two-stage urinary bladder carcinogenesis is dependent on the interval of administration. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 16-22, 1999.
5. Fukushima, S.: Low dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3, 8-dimethylimidazo-[4,5-f] quinoxaline: relevance to risk assessment. *Cancer Lett.*, 143, 157-159, 1999.
6. Yamamoto, S., Wei, M., Lee, C.C., Salim, E.I., Wanibuchi, H., Sukata, T. and Fukushima, S.: Enhancement of urinary bladder carcinogenesis in nullizygous *p53*-deficient mice by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer Lett.*, 13, 137-144, 1999.
7. Lee, C.C.R., Ichihara, T., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Sugimura, K., Wada, S., Kishimoto, T. and Fukushima, S.: Reduced expression of the CDK inhibitor p27KIP1 in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of p21<sup>WAF1/Cip1</sup> and p53. *Carcinogenesis*, 20, 1697-1708, 1999.
8. Morimura, K., Salim, E.I., Yamamoto, S., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Dose-dependent induction of aberrant crypt foci in the colons but no neoplastic lesions in the livers of heterozygous *p53*-deficient mouse treated with low dose 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline. *Cancer Lett.*, 138, 81-85, 1999.
9. Wei, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W. and Fukushima, S.: Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 20, 1873-1876, 1999.
10. Romanenko, A., Lee, C.C.R., Yamamoto, S., Hori, T., Wanibuchi, H., Zaparin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A. and Fukushima, S.: Urinary bladder lesions after the chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21<sup>WAF1/Cip1</sup>. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 144-153, 1999.
11. Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R. and Fukushima, S.: Loss of heterozygosity in (Lewis × F344) F<sub>1</sub> rat urinary bladder tumors induced with

- N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine followed by dimethylarsinic acid or sodium L-ascorbate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 818-823, 1999.
12. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Morimura, K., Mori, S., Makino, S., Nomura, T. and Fukushima, S.: Low-dose-dependent carcinogenic potential of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*] quinoline in the immunodeficient (SCID) mouse colon. *Nutrition and Cancer*, 34, 220-228, 1999.
  13. Chen, T., Wanibuchi, H., Wei, M., Morimura, K., Yamamoto, S., Hayashi, S. and Fukushima, S.: Concentration dependent promoting effects of sodium L-ascorbate with the same total dose in a rat two-stage urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 146, 67-71, 1999.
  14. Sukata, T., Ozaki, K., Uwagawa, S., Seki, T., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Okuno, Y. and Fukushima, S.: Organ-specific, carcinogen-induced increases in cell proliferation in *p53*-deficient Mice. *Cancer Res.*, 60, 74-79, 2000.
  15. Yamamoto, S., Tada, M., Lee, C.C.R., Masuda, C., Wanibuchi, H., Yoshimura, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T. and Fukushima, S.: *p53* status in multiple human urothelial cancers: assessment for clonality by the yeast *p53* functional assay in combination with *p53* immunohistochemistry. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 181-189, 2000.
  16. Romanenko, A. and Morimura, K., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Kinoshita, A., Kaneko, M., Vozianov, A. and Fukushima, S.: Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the chernobyl accident. *Int. J. Cancer*, 86, 790-798, 2000.
  17. Morikawa, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Ogawa, M. and Fukushima, S.: Promotion of *Keratin (K6)/ODC* Transgenic Mice Skin Carcinogenesis by Dimethylarsinic Acid. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 579-581, 2000.
  18. Masuda, C., Wanibuchi, H., Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y. and 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 Lett.*, 163, 179-185, 2001.
  19. Kakuni, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Ogawa, M., Wei, M., Hayashi, S. and Fukushima, S.: Food restriction contributes to inhibit the promotion of intestinal carcinogenesis in multiple intestinal neoplasia mouse. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 2001.
  20. Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Imaoka, S., Ogawa, M., Masuda, C., Morimura, K., Funae, Y. and Fukushima, S.: Formation of 8-hydroxyguanosine and cell cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of  $p21^{WAF1/Cip1}$ , cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis*, 23, 341-349, 2002.
  21. Seike, N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nishikawa, T., Kishida, H., Nakae, D., Hirata, K. and Fukushima, S.: Lack of promoting effect due to oral administration of dimethylarsinic acid on rat lung carcinogenesis initiated with *N*-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine. *Cancer Lett.*, 175, 113-119, 2002.

【中江 大】

22. Nakae, D., Akai, H., Kishida, H., Kusuoka, O., Tsutsumi, M. and Konishi, Y.: Age and organ dependent spontaneous generation of nuclear 8-hydroxydeoxyguanosine in male Fischer 344 rats. *Lab. Invest.*, 80, 249-261, 2000.

23. Kishida, H., Nakae, D., Kobayashi, Y., Kusuoka, O., Kitayama, W., Denda, A., Fukui, H. and Konishi, Y.: Enhancement of hepatocarcinogenesis initiated with diethylnitrosamine or *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet administered prior to the carcinogen exposure in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 52, 405-412, 2000.
24. Tsujiuchi, T., Sasaki, Y., Murata, N., Tsutsumi, M., Nakae, D. and Konishi, Y.: Elevated expression of transforming growth factors and the tumor necrosis factor family in lung adenocarcinomas induced by *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 53, 291-295, 2001.
25. Tujiuchi, T., Sasaki, Y., Murata, N., Tsutsumi, M., Konishi, Y. and Nakae, D.: FHIT alterations in lung adenocarcinomas induced by *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Carcinogenesis*, 22, 2017-2022, 2001.
26. Hatanaka, Y., Nakae, D., Mutai, M., Hashizume, K., Kamihara, Y., Kinoshita, N., Tani, Y., Danno, G., Ohta, S., Konishi, Y. and Ashida, H.: Decreased expression of Bcl-x protein during hepatocarcinogenesis induced exogenously and endogenously in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 1270-1277, 2001.

【白井智之】

27. Takahashi, S., Tamano, S., Hirose, M., Kimoto, N., Ikeda, Y., Sakakibara, M., Tada, M., Kadlubar, F.F., Ito, N. and Shirai, T.: Immunohistochemical demonstration of carcinogen-DNA adducts in tissues of rats given 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP): Detection in paraffin-embedded sections and tissue distribution. *Cancer Res.*, 58, 4307-4313, 1998.
28. Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Yamada, Y., Tada, M., Kadlubar, F.F. and Ito, N.: Use of polyclonal antibodies against carcinogen-DNA adducts in analysis of carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 102/103, 441-446, 1998
29. Ogawa, K., Tsuda, H., Shirai, T., Ogiso, T., Wakabayashi, K., Dalgard, D.W., Thorgeirsson, U.P., Thorgeirsson, S.S., Adamson, R.H. and Sugimura, T.: Lack of Carcinogenicity of 2-Amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in Cynomolgus Monkeys. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 622-628, 1999.
30. Cui, L., Takahashi, S., Tada, M., Kato, K., Yamada, Y., Kohri, K. and Shirai, T.: Immunohistochemical detection of carcinogen-DNA adducts in normal human prostate tissues transplanted into the subcutis of athymic nude mice: Results with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) and relation to cytochrome p450s and *N*-acetyltransferase activity. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 52-58, 2000.
31. Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.-M., Imaida, K. and Shirai, T.: Frequent *c-Ha-ras* gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine. *Cancer Lett.*, 163, 187-190, 2001.
32. Shirai, T., Asamoto, M., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.M., Kato, K. and Imaida, K.: Rat prostate carcinogenesis models and biological characteristics of the induced carcinomas. *Proceedings of the 30th International Symposium of The Princes Takamatsu Cancer Research Foundation* 1999.12.13

【立松正衛】

33. Kobayashi, K., Mutai, M., Goto, K., Inada, K., Tsukamoto, T., Nakanishi, H. and Tatematsu, M.: Effects of carbon tetrachloride administration on initiation of liver cell foci by the non-hepatocarcinogens *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and benzo (a) pyrene (B(a)P). *Cancer Lett.*, 118, 55-60, 1997.
34. Kobayashi, K., Shimizu, N., Tsukamoto, T., Inada, K., Nakanishi, H., Goto, K., Mutai, M. and Tatematsu, M.: Dose-dependent promoting effects of catechol on glandular stomach carcinogenesis in BALB/c mice initiated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 1143-1148, 1997.
35. Tatematsu, M., Yamamoto, M., Shimizu, N., Yoshikawa, A., Fukami, H., Kaminishi, M., Oohara, T., Sugiyama, A. and Ikeno, T.: Induction of glandular stomach cancers in helicobacter pylori-sensitive mongolian gerbils treated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in drinking water. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 97-104, 1998.
36. Sugiyama, A., Maruta, F., Ikeno, T., Ishida, K., Kawasaki, S., Katsuyama, T., Shimizu, N., and Tatematsu, M.: Helicobacter pylori infection enhances *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer Res.*, 58, 2067-2069, 1998
37. Yamachika, T., Nakanishi, H., Inada, K., Tsukamoto, T., Shimizu, N., Kobayashi, K., Fukushima, S. and Tatematsu, M.: *N*-methyl-*N*-nitrosourea concentration-dependent, rather than total intake-dependent, induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 385-391, 1998.
38. Kobayashi, K., Inada, K., Furihata, T., Tsukamoto, T., Ikehara, Y., Yamamoto, M. and Tatematsu, M.: Effects of low dose catechol on glandular stomach carcinogenesis in BALB/c mice initiated with *N*-methyl-*N*-nitrosourea. *Cancer Lett.*, 139, 167-172, 1999.
39. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Yanai, T., Masegi, T., Inada, K., Nakanishi, H. and Tatematsu, M.: Summation of initiation activities of low doses of the non-hepatocarcinogen 1,2-dimethylhydrazine in the liver after carbon tetrachloride administration. *Cancer Lett.*, 148, 59-63, 2000.
40. Tsukamoto, T., Inada, K., Fukami, H., Yamamoto, M., Tanaka, H., Kusakabe, M., C, E., Bishop., M., Tatematsu.: Mouse strain susceptibility to diethylnitrosamine induced hepatocarcinogenesis is cell autonomous whereas sex-susceptibility is due to the micro-environment: analysis with C3H $\leftrightarrow$ BALB/c sexually chimeric mice. *Jpn.J.Cancer Res.*, 91, 665-673, 2000
41. Tsukamoto, T., Tanaka, H., Fukami, H., Inoue, M., Takahashi, M., Wakabayashi, K. and Tatematsu, M.: More frequent b-catenin gene mutations in adenomas than in aberrant crypt foci or adenocarcinomas in the large intestines of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP)-treated rats . *Jpn. J. Cancer. Res.*, 91, 792-796, 2000.
41. Yamamoto, M., Tsukamoto, T., Sakai, H., Shirai, N., Ohgaki, H., Furihata, C., L, A., Donehower., Yoshida, K. and Tatematsu, M.: P53 knockout mice (-/-) are more susceptible than (+/-) or (+/+) mice to *N*-methyl-*N*-nitrosourea stomach carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(10), 1891-1897, 2000.
42. Tsukamoto, T., Fukami, H., Yamanaka, S., Yamaguchi, A., Nakanishi, H., Sakai, H., Aoki, I. and Tatematsu, M.: Hexosaminidase-altered aberrant crypts, carrying decreased

- hexosaminidase  $\alpha$  and  $\beta$  subunit mRNA, in colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. Jpn. J. Cancer Res., 92, 109-118, 2001.
43. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T., and Tatematsu, M.: Differential Effects of Partial Hepatectomy and Carbon Tetrachloride Administration on Induction of Liver Cell Foci in a Model for Detection of Initiation Activity. Jpn. J. Cancer Res., 92, 1018-1025, 2001
44. Sakai, H., Tsukamoto, T., Yamamoto, M., Hirata, A., Inagami, A., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T., Tatematsu, M.: Summation of initiation activities in the liver after partial hepatectomy. Cancer Letters., 176, 1-5, 2002
45. Sakai, H., Inagami, A., Hirata, A., Tsukamoto, T., Kobayashi, K., Degawa, M., Shirai, N., Iidaka, T., Yanai, T., Masegi, T., Tatematsu, N.: The Effects of D-galactosamine- or Carbon Tetrachloride Induced Regeneration on Induction of Rat Liver Cell Foci in a Model for Detection of Initiation Activities of Chemicals. J Toxicol Pathol., 15, 13-18, 2002

【津田洋幸】

46. Tsuda, H., Sekine, K., Uehara, N., Takasuka, N., Moore, M.A., Konno, Y., Nakashita, K. and Degawa, M.: Heterocyclic amine mixture carcinogenesis and its enhancement by caffeine in F344 rats. Cancer Lett., 143,229-234, 1999.
47. Ota, T., Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Yamamoto, F., Matsuoka, Y., Ochiya, T., Sekiya, T., Terada, M., Akaza, H. and 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.
48. Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T., Terada, M. and Tsuda, H.: Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogenes are highly susceptible to N-methyl-N-nitrosourea mammary carcinogenesis. Carcinogenesis, 21(2), 243-249, 2000.
49. Tsuda, H., Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Naito, A., Ota, T., Sekiya, T. and Terada, M.: High susceptibility of transgenic rats carrying the human c-Ha-ras proto-oncogene to chemically-induced mammary carcinogenesis. Mut. Res., 477, 173-182, 2001.

(2) 特許出願（国内 4件、海外 3件）

1. 国内

発明の名称： ヒトプロト型 H-ras 遺伝子トランスジェニックラット

発明者： 津田洋幸、朝元誠人、鳥山弘靖、落谷孝広、関谷剛男

出願番号： 特願平 10-62130

出願日： H10.02.25

出願番号： 特願平 11-046594（優先権主張）

出願日： H11.02.24

発明の名称： 遺伝子変異高感度定量法

発明者： 大谷周造、矢野善久、福島昭治

出願番号 : 特願平 11-243529

出願日 : H11.08.30

発明の名称 : 前立腺癌発生モデルラット

発明者 : 白井智之、朝元誠人、高橋 智

出願番号 : 特願 2000-042491

出願日 : H12.02.21

発明の名称 : 発がん物質高感受性ラット

発明者 : 白井智之、朝元誠人、外岩戸尚美

出願番号 : 特願 2001-253241

出願日 : H13.08.23

## 2. 海外

発明の名称 : ヒトプロト型 H-ras 遺伝子トランスジェニックラット

発明者 : 津田洋幸、朝元誠人、鳥山弘靖、落谷孝広、関谷剛男

外国出願 : 米国 (出願番号 09/140, 197)、カナダ (出願番号 2, 245, 494)

発明の名称 : 遺伝子変異高感度定量法

発明者 : 大谷周造、矢野善久、福島昭治

国際出願 : PCT/JP00/05825

国際出願日 : H12.08.29

発明の名称 : 前立腺癌発生モデルラット

発明者 : 白井智之、朝元誠人、高橋 智

国際出願 : PCT/JP00/03825

国際出願日 : H12.06.13

指定国 : 米国、カナダ、豪州

### (3) 新聞報道等

#### 受賞

望月喜多司記念賞 (平成 10 年)

#### その他

日本病理学会、宿題報告 (平成 11 年)

環境動態研究会、特別講演 (平成 12 年)

第 28 回日本トキシコロジー学会、教育講演 (平成 13 年)

第 30 回日本環境変異学会、特別講演（平成 13 年）

- (4) その他特記事項  
なし