

解説

化学物質の発癌性評価

——発癌性試験研究の現状と今後の展開——

宮本 純之, 渡辺 知幸, 奥野 泰由

小木 曾重文, 細川 俊治

住友化学工業株式会社宝塚総合研究所

(昭和 63 年 2 月 20 日受理)

Carcinogenicity Assessment for Chemicals

Present Status and Future Prospect of Carcinogenicity Studies in Relation
to Research and Development of New Chemicals

Junshi MIYAMOTO, Tomoyuki WATANABE, Yasuyoshi OKUNO,
Shigefumi KOGISO and Shunji HOSOKAWA

*Takarazuka Research Center, Sumitomo Chemical Co., Ltd.,
Takatsukasa, Takarazuka 665, Japan*

はじめに

新規の有用な化学物質の研究開発において、その安全性確保は最大の課題のうちの一つであることはいうまでもない。農薬、医薬品等ではその上市までに急性、亜急性、慢性、発癌性試験や、生殖、変異原性、抗原性、依存性、局所刺激性、神経毒性試験等をマウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、サル、ニワトリおよび各種培養細胞等を用いて実施し、その安全性が徹底的に検討、評価される。なかでもとくに発癌性*は不可逆的かつ晩発性の変化であり、またその検出、解明に非常に長い時間と費用を要するため、新規化学物質の研究開発のうえで最も重要な位置を占めている。

化学物質の発癌性を評価するためのアプローチとして、現在最も信頼が置かれているのは実験動物とくにげっ歯類に試験物質を長期間投与して発癌の有無を調べる試験である。このアプローチは現在までに知られているヒトに対する発癌物質が、いずれかの適切な動物システ

ムで発癌性が証明されているという事実に基づいている(表1)。

しかしながら、この事実は動物で発癌性の認められる化学物質のすべてが、ヒトにおいても発癌性を持つということを意味しているわけではない。すなわち、たとえば体内での活性代謝物の生成の相違にみられるごとき動物種属間に存在するさまざまなファクターの違いのために発癌物質が与えられても、すべての動物種、あるいはげっ歯類の中においてもすべての系統の動物に癌を発生させるとは限らず、現実の一つの動物に発癌性があり、別の動物には発癌性がないような物質は多く知られている(表1のⅡ参照)。また、表1に示すようにヒトに発癌性が疑われる物質の標的臓器が動物のそれと一致しない例も多い。

以上の事実から、動物実験データのヒトへの外挿の確度を増加させ、研究開発をより効率的に行なうためには、ヒトを含む動物種間における癌の発現の差異を追求し、その根本をなしている発現機構の異同を明確にする必要がある。それを通じて現状の長期発癌性試験を改良し、新規化合物のよりの確な発癌性のアセスメントが可能になることが望ましい。この観点から、以下に代表例のいくつかについて研究の現状、問題点および今後の課

* 本稿では一般的に用いられている定義¹⁾と同様、広義の意味で用いており、適当な試験系において良性および悪性腫瘍の発生率増加、あるいは腫瘍発生期間の短縮を意味する。

題をまとめた。

発癌機構における基本原則¹⁾

1) 発癌は多段階にわたるものであり、直接的、間接的に遺伝子が関与するものと考えられている。発癌のこれらの段階においては種差、系統差、内分泌環境、曝露年齢、食事要因、全身および臓器器官の生理、病理状態など多くの要因が種々の程度に関与する可能性があり、これらは動物における発癌性のヒトへの外挿に際して考慮すべき点である。

2) *In vivo* および *in vitro* の実験結果から、発癌物質は遺伝子との相互作用、あるいはプロモーションのような作用を示すことが知られている。このような知見は重要であり、発癌のメカニズムを評価するのに有用である。しかし、ヒトに対するリスクの評価に際して、観察された発癌性に関する所見がある特定の生物学的作用によるものであると結論するには、その作用が発癌の原因になるという明らかな証拠に基づくものでなくてはならない。

3) ある物質が癌を発現する場合に、その実験系に生

表 1 ヒトに癌原性が疑われる環境化学物質 20 種のヒトおよび実験動物での標的臓器の比較^{a)}

I. ヒトおよび動物での標的臓器が一致する例 (14/20)

化学物質名	ヒト標的臓器	動 物		
		動物種	標的臓器	曝露経路
Aflatoxins	肝	ラット ラット ラット	肝, 胃, 大腸, 腎 肝, 気管 肝	経 口 気管内 腹腔内
4-Aminobiphenyl	膀胱	マウス	膀胱	経 口
Asbestos	肺, 肋膜, 咽頭, 消化管	マウス, ラット ハムスター	肺, 肋膜	吸入, 気管内
Benzene	造血器系	マウス	造血器系	吸 入
bis (Chloromethyl) ether & technical grade chloromethyl methyl ether	肺	マウス, ラット マウス	肺, 鼻腔 局所, 肺	吸 入 皮 下
Chlorambucil	造血器系	マウス	肺, 造血器系, 卵巣 造血器系	腹腔内 腹腔内
Chromium & certain chromium compounds	肺, 鼻腔	ラット	肺	気管支内
Cyclophosphamide	膀胱, 造血器系	マウス ラット	造血器系, 肺 膀胱, 乳腺	腹腔内, 皮下 腹腔内
Diethylstilbestrol	膣, 子宮	マウス	膣	局 所
Mustard gas	肺, 喉頭	マウス	肺	吸入, 静脈内
2-Naphthylamine	膀胱	ハムスター	膀胱	経 口
Nickel & certain nickel compounds	鼻腔, 咽頭, 肺	ラット	肺	吸 入
Soots, tars & mineral oils	皮膚, 肺, 膀胱, 消化管	マウス	皮膚	塗布, 皮下
Vinyl chloride	肝, 肺, 脳, 造血器系	マウス, ラット	肝, 肺, 血管, 乳腺 腎, Zymbal 腺	吸入, 経口

表 1 (つづき)

II. ヒトおよび動物での標的臓器が一致しない例 (6/20)

化学物質名	ヒト標的臓器	動 物		
		動物種 ^{b)}	標的臓器	曝露経路
Arsenic & certain arsenic compounds	皮膚, 肺 (肝, 血管, 口腔)	マウス, ラット	不十分な実験ながら, ほとんど陰性	経口, 経皮, 吸入 皮下, 静注
Benzidine ^{c)}	膀胱	マウス ラット ハムスター	肝 肝, 乳腺 肝	皮 下 経 口 経 口
<i>N,N</i> -bis(2-Chloroethyl)-2-naphthylamine(chlor-naphazine)	膀胱	マウス ラット	肺 局所	腹腔内 皮 下
Cadmium & certain cadmium compounds	前立腺, 呼吸器系 腎	ラット ラット, マウス	局所 精巣	皮下, 筋肉内 筋肉内
Melphalan	造血器系	マウス ラット	肺, リンパ系 局所	腹腔内 腹腔内
tris(1-Aziridinyl) phosphine sulfide (thio-tepa)	造血器系	マウス, ラット	諸臓器	種々の経路

^{a)} IARC 評価によりヒトへの癌原性が明らかな物質 (ランク 1) およびヒトへの癌原性が強く疑われる物質 (ランク 2 A) として分類されたものから計 20 種を抽出した。

^{b)} 各動物種の系統は省略した。

^{c)} マウス, ラット等のげっ歯類では標的臓器が一致しないが, イヌにおいて経口投与によりヒトと同様に膀胱癌が誘発される。

ずる生理的に非定常な状態 (重度の臓器障害, 内分泌機能の障害, 代謝経路の飽和状態 (saturation), 尿路系の結石形成, DAN 修復能の飽和とこれに伴う機能喪失など) の影響を受けることがある。このような現象を含んだ実験データが得られた時には, その物質がヒトに対してどのように作用するか注意して評価されなければならない。

発癌物質の分類

前項の考え方に基づいて発癌物質を作用機序によって分類してみると, 表 2 または表 3 のようになる。以降, 表 2 の大分類に基づく代表的化学物質を例として説明し, それらの検出法についても触れることとしたい。

1. 一次性発癌物質

癌の一部が体細胞の突然変異によって誘発されることが明らかにされ, 遺伝性物質である DNA あるいは染色体に直接作用して変異を誘発する発癌物質は一次性発癌物質に分類されている。Methyl methanesulfonate (MMS) や *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) などは直接 DNA をアルキル化することによって変異を誘

発する。また生体内で, 酸化反応, エステル化反応などの代謝活性化を受けたのち DNA と反応し, 変異を誘発する発癌物質も多く知られている。2-Acethylaminofluorene (2-AAF) は *N*-水酸化を受けたのち, *N*-acetoxy 誘導体となり, DNA と反応する。また, benzo(α)pyrene (B(α)P) は 7,8-epoxy-B(α)P, 9,10-epoxy-7,8-diol-B(α)P に代謝活性化されたのちに, DNA と反応し, 変異を誘発することが知られている。このような DNA あるいは染色体に直接作用する一次性発癌物質の検出法としていわゆる各種変異原性試験法が開発され, それらが化学物質の発癌性スクリーニングを目的として実施されている。

1) 一次性発癌物質検出法としての各種変異原性試験 (1) Ames 試験

これらの試験法のうちサルモネラ菌を用いる復帰変異試験 (Ames 法) では, ヒスチジン合成遺伝子上での突然変異をマーカーとし, 塩基置換型 (base-exchange type) とフレームシフト型 (frame-shift type) の変異を検出できる。化学物質により, guanine などの塩基がアルキル化されることによって生ずる変異を検出するものである (図 1)²⁾。この試験では, 発癌物質の体内における代謝

表2 発癌物質の作用機序による分類 (林・前川⁶⁸⁾の分類に従い作表)

分 類	機 序	例
一次性発癌物質	遺伝子に作用	ニトロソ化合物 多環芳香族炭化水素 アルキル化剤
二次性発癌物質	ホルモン不均衡, 免疫不全 など癌化しやすい条件をつくる	チオ尿素 (甲状腺ホルモン-甲状腺腫瘍) エストロジェン (プロラクチン-乳腺腫瘍) アザチオプリン
発癌プロモーター	プロモーター作用	サッカリン 有機塩素系農薬

表3 発癌物質の種類^{a)} (梅田⁶⁹⁾)

タ イ プ	作 用 様 式	例
遺伝毒性的		
(1) 直接作用型	求電子性有機化合物, 遺伝毒性を示しDNAに作用する.	ethylene imine
(2) 前駆型発癌物質	宿主による, あるいは試験管内での代謝活性化を通してタイプ1への変換を必要とする.	vinyl chloride, benzo(α)pyrene, 2-naphthylamine, dimethylnitrosamine
(3) 無機発癌物質	直接には遺伝毒性を示さないが, DNA複製の忠実度を選択的な変更が生じ, DNAの変化に導く.	nickel, chromium
発生遺伝性的		
(4) 固形状態発癌物質	正確な機構は不明. 通常は間葉系の細胞と組織にのみ影響する. 物理的な形で活性がある.	polymer: metal foils: asbestos
(5) ホルモン	通常は遺伝毒性を示さない. おもに内分泌系のバランスや分化を変える. しばしばプロモーターとして働く.	estradiol, diethylstilbestrol
(6) 免疫抑制剤	通常は遺伝毒性を示さない. おもに, “ウイルス誘導”の移植あるいは転移腫瘍を刺激する.	azathioprine, antilymphocytic serum
(7) 補発癌物質	遺伝毒性も発癌性も示さないが, タイプ1あるいは2のものと同時投与されるときにその効果を増強する. タイプ2のもののタイプ1への変換を修飾してもよい.	phorbol esters, pyrene, catechol, ethanol, <i>n</i> -dodecane, SO ₂
(8) プロモーター	遺伝毒性も発癌性も示さないが, タイプ1あるいは2のものにひきつづいて投与されるときにその効果を増強する.	phorbol esters, phenol, anthralin, bile acids, tryptophan metabolites, saccharin

^{a)} J. H. Weisburger & G. M. Williams の分類.

活性化を再現する試みの一つとして薬物代謝酵素系の誘導剤である PCB などを投与したラットの肝臓から調製したいわゆる ‘S9mix’ を添加し, 検出感度を高めていることはよく知られたとおりである.

サルモネラ菌を用いた変異原性試験結果と動物での発癌性試験との相関について調べた結果を表4に示した. 哺乳動物で発癌性を示した化合物 (必ずしも今日では一次性発癌物質のみとは限らないが) のうち, この試験で

陽性となる化合物の割合は 53~91% であり、また、発癌性を示さない化合物のうちで、この試験で陰性となる化合物の割合は 57~97% であった。これは、選択した化合物の種類の相違を含む多くの理由—たとえば prokaryote であるがゆえの限界や、動物種差による S9mix の活性の相違など—のために、false positive, false nega-

tive の結果を与えているものと考えられる。

哺乳動物における発癌においても、点突然変異が主要な原因の一つである場合がある。たとえば、*N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU) をラットに 1 回投与し、発生した乳癌を解析した結果、腫瘍遺伝子 (oncogene) の一つである *ras* 遺伝子の活性化が 58 例中 48 例で起こっており、それらは大部分 guanine→adenine への点突然変異であった³⁾。

ヒトの癌においても、*ras* 遺伝子タンパク (189 個のアミノ酸) のうち、12 番目または 61 番目のアミノ酸が変化することによって、活性化している場合が報告されている (表 5)⁴⁾。

(2) 染色体異常試験

癌化した細胞では、その染色体において数的異常および相互転座などの構造異常が起きていることが知られている。したがって、染色体異常試験を癌原性のスクリーニング試験の一つとして用いようとする試みがある (表 6)。この試験系は染色体レベルでの変異を検出できる特徴があるが、発癌性を示す化合物の中で陽性となる化合物の割合は 38~71% であり、発癌性を示さない化合物の中で陽性となる化合物の割合が 41~67% と相関性が低い。染色体異常誘発のメカニズムおよび発癌との関連は詳しく解明されておらず、また、false positive の結果も多いことから、試験結果の評価には慎重を要すると考える。

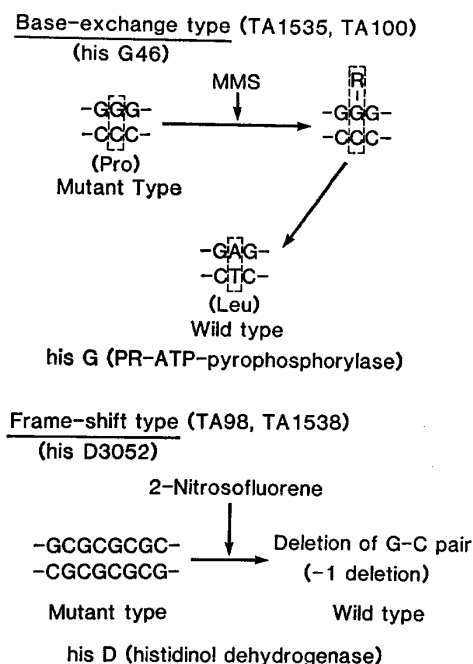


図 1 サルモネラ菌 Ames 株における突然変異の機構 (賀田²⁾)

表 4 発癌性と変異原性 (サルモネラ菌) との相関

発癌性	変異原性	McCann, <i>et al.</i> (1975)	Purchase, <i>et al.</i> (1978)	Nagao, <i>et al.</i> (1978)	Barch, <i>et al.</i> (1980)	Upton, <i>et al.</i> (1984)	Zeiger & Tennant (1986)	Kuroki & Matsushima (1987)
+	+	157	53	136	62	104	69	36
+	-	18	5	24	20	66	61	22
-	+	14	2	21	3	6	23	—
-	-	94	60	60	4	24	57	—
小 計		283	120	241	89	200	210	58

表 5 ヒトの癌と活性化された癌遺伝子の変異点 (関谷⁴⁾)

腫 瘍	癌遺伝子	変 異 点
T24/EJ 膀胱癌	Ha-ras	12Gly (GGC) → Val (GTC)
Hs242 肺 癌	Ha-ras	61Gln (CAG) → Leu (CTG)
SK2 悪性黒色腫	Ha-ras	61Gln (CAG) → Leu (CTG)
Calu-1 肺 癌	Ki-ras	12Gly (GGT) → Cys (TGT)
SW480 大腸癌	Ki-ras	12Gly (GGT) → Val (GTT)
SK-N-SH 神経芽細胞腫	N-ras	61Gln (CAA) → Lys (AAA)

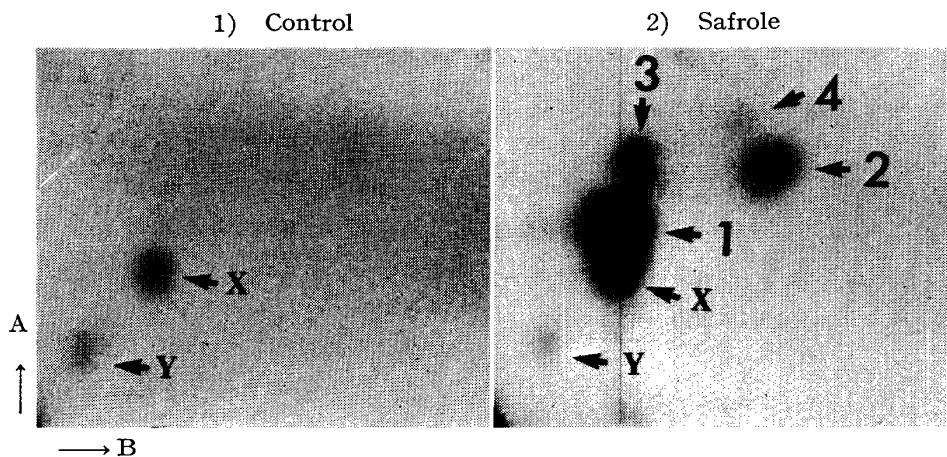


図2 ^{32}P -ポストラベリング法によって検出された Safrole-DNA 付加体

X, Y: 無処理群で検出される DNA 付加体, Safrole 投与群では, 1, 2, 3, 4 の 4 種の DNA 付加体が検出された.

TLC 展開条件: A, 1.8 M ギ酸リチウム-4.25 M 尿素 (pH 3.5); B, 0.35 M Tris HCl-0.57 M 塩化リチウム-5 M 尿素 (pH 8.0).

表6 発癌性と染色体異常誘発性との相関

発癌性	染色体異常誘発性	Zeiger & Tennant (1986)	Kuroki & Matsushima (1987)	Ishidate (1987)
+	+	23	29	62
+	-	38	18	25
-	+	14	—	40
-	-	20	—	20
小計		95	47	147

(3) ポストラベリング法および DNA 鎖切断検出法

比較的近年になって実施されることが多くなったポストラベリング法は, 被験物質を投与後, 動物の各臓器の DNA の異常 (被験物質と DNA 塩基との adduct) を検出しようとするものである⁵⁾. その方法の概略は以下のとおりである.

i) 臓器より DNA を抽出し, micrococcal endonuclease と spleen endonuclease の 2 種の核酸分解酵素によって 3'-mononucleotide に分解する.

ii) ^{32}P -ATP 存在下, T_4 -polynucleotide kinase で処理してリン酸化し, 5'- ^{32}P -deoxyribonucleotide-3', 5'-diphosphate とする.

iii) 正常ヌクレオチドを除去した後, TLC で二次元展開し, オートラジオグラフィーで DNA 付加体を検出する (検出限界は 10^7 nucleotide 当り 1 個).

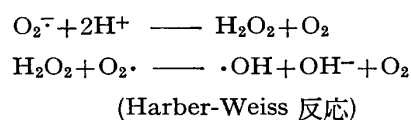
マウスにサフロール 80 mg/kg を経口投与し, 12 時間後に肝 DNA を抽出して, ポストラベリング法で解析し

た結果, 少なくとも 4 種類の付加体が形成されていた (図2).

その後, 検出感度の上昇, 低分子量の化学物質による付加体の検出を目的として, プタノール抽出法⁶⁾, ODS-TLC 法⁷⁾ などの改良法が検討され, $10^9 \sim 10^{10}$ nucleotides 当り 1 個の付加体が検出されるようになった.

放射性同位元素で標識した肝発癌物質を哺乳動物に投与し, 肝での結合量を調べた研究により, 哺乳動物での肝発癌の強さと, DNA への化学物質との結合量との間にはよい相関のあることが明らかにされている⁸⁾. しかしながら, メチル化, エチル化などのアルキル化を受けた DNA 付加体の検出はポストラベリング法ではまだ困難であり, 今後さらに改良が必要と考える.

一方, 最近活性酸素が関与している遺伝子損傷と突然変異あるいは発癌との関連性が注目されている. すなわち, 化学物質は潜在的に酸化還元反応に関与できる物質であれば活性酸素を生成することができる. たとえば, キノン系の物質であれば還元型 (ハイドロキノン) から酸化型 (キノン) に自動酸化される際, 酸素分子は O_2^- (スーパーオキシド) となる. O_2^- は不均化反応で 2H^+ が付加すると H_2O_2 が生成する. H_2O_2 は次の式に従って分離して $\cdot\text{OH}$ (ヒドロキシラジカル) を生じ, これが DNA 鎖切断を引き起こすと考えられる⁹⁾.



現在までいくつかの発癌物質からたしかに活性酸素が生成し, それが DNA に損傷を与えていることがファ-

ジ DNA あるいは培養細胞等を使った *in vitro* 系で報告されているが、生体内で実際に起きているかどうかの問題であった。ニトロソアミン類等強力な発癌物質をラット等哺乳動物に投与すると、発癌部位である各臓器の細胞 DNA の一本鎖切断が速やかに起きることがアルカリ蔗糖密度勾配遠心法等により多数報告されており¹⁰⁻¹²⁾、発癌との密接な相関が証明されているが、活性酸素が関与していると考えられる DNA 損傷に関する報告はなかった。ところが森本らは、ラットに膀胱癌を起こすことが知られている *o*-フェニルフェノール (OPP) またはその Na 塩^{13,14)} の尿中代謝物である 2-フェニル-1,4-ベンゾキノンラット膀胱内に直接注入すると、膀胱 DNA の切断がみられることを明らかにし、OPP 膀胱癌のイニシエーション段階に活性酸素が関与していることを示唆している¹⁵⁾。OPP はバクテリアや哺乳動物培養細胞による遺伝子突然変異試験では陰性であり、遺伝子 DNA との直接作用はないとされてきたが、上記手法により遺伝子損傷と発癌性との相関が証明された意義も大きい。化学発癌物質の多くは薬物代謝酵素によりフリーラジカル活性体を生じ、その生成と前後して活性酸素を派生することがわかってきており、現在まで遺伝子 DNA との直接作用がないとされている他の発癌物質についても、今後活性酸素の関連が明らかにされるものが多いと考えられる。

2) 発癌物質の代謝活性化

代謝活性化を受けて究極発癌物質となる一次性発癌物質の標的臓器には種差があることが知られている。

たとえば、2-ナフチルアミンをイヌに経口投与すると、ヒトの場合と同様に膀胱癌を作るが、マウスの場合には肝臓癌が生じ、膀胱癌はできないことが知られている。また、4-ジメチルアミノアゾベンゼン (DAB) は経口投与によりラットに肝癌を誘発させるが、マウスの肝に対する発癌性は弱く、ハムスター、モルモットでは陰性である。また、イヌに経口投与した場合には膀胱癌を作ることが知られている。こうした発癌性の強さの違いは動物体内における代謝活性化および解毒反応における種差に起因していると推定されている。DAB は 4-メチルアミノアゾベンゼン (MAB) に変換されたのち、*N*-水酸化を受けて代謝活性化され、硫酸抱合体となったのち、グアニンの 8 位と結合することが知られている。また、DAB の発癌性は、飼料中にリボフラビンを混ぜておくと低下することおよび *p*-アミノフェノール、*p*-アミノアセトアニリドに発癌性は認められないことから、アゾ基の断裂は解毒代謝経路と考えられている。

ラット肝細胞での不定期 DNA 合成 (UDS) 試験では

2,7-dinitrofluorene や 3-nitrofluoranthene は陽性の結果を与えたが、ヒト肝細胞では陰性の結果となっている。ラットとヒトとで肝 *P*-450 の関与している酵素に違いのあることが知られていること¹⁶⁾から、代謝活性化酵素の種間における違いを考慮に入れることが重要である。

したがって、ヒトでの癌原性を予測する場合には、実験動物との代謝経路の相違解明が、有益な情報になりうるものと考えられる。

3) DNA 修復¹⁷⁾と発癌

皮膚に紫外線 (UV) が当たるとチミンダイマーが生じるが、ヒト正常細胞は、その DNA の異常を認識して、除去修復 (DNA 修復) し、もとの正常な DNA 鎖にもどす。この過程は先に述べた DNA 鎖切断検出法または ³H-thymidine 存在下での不定期 DNA 合成 (UDS) として検出できる。また、アルキル化を受けた DNA は速やかに DNA 修復を受けることが知られている。2-AAF を 50 mg/kg の割合でラットに 1 回経口投与し、投与後一定時間後の肝臓での不定期 DNA 合成 (UDS) を調べると、UDS の割合は 12 時間後に最高となり、24 時間後は最大値の約 1/4、48 時間後には対照群のレベルに低下することから、DNA 上の傷が速やかに修復されることを示している¹⁸⁾。UDS は損傷を受けた DNA の除去修復によって起こることから、アルキル化により損傷を受けた DNA が、正常な DNA に修復されることを意味する。したがって、DNA 修復能の低下は DNA レベルでの変異の促進につながるものと考えられる。ヒト正常細胞が除去修復能 (*hcr+*) を持っているのに対して、マウス細胞では除去修復能が低い。しかし、マウス細胞は UV に高感受性ではなく、別の修復系 (おそらく複製後修復) がおもに働いていると考えられている¹⁹⁾。

UV 照射後の UDS を比較してみると、ヒトに比べ他の哺乳動物、とくにマウス、ラットなどのげっ歯目ではとくに低いことが知られている²⁰⁾。DNA 修復能の研究は大腸菌とヒトでよく進んでいるがラット、マウスを含めた実験動物についてはまだ十分に解明されていない。発癌の過程が DNA のアルキル化等の修飾あるいは損傷によって始まることが明らかにされつつあることから、そうした傷をもとにもどす DNA 修飾の研究は動物実験データのヒトへの外挿に役立つものと考えられる。

2. 二次性発癌物質

表 2 に示したように、エストロゲンによる乳腺腫瘍誘発等、内分泌系の腫瘍にはホルモン変動を介していると考えられているものが多い。これらのなかにはとくにラットにおいて後述の甲状腺、乳腺のほか、ヒトにはまれな下垂体の増生や腫瘍、副腎の褐色細胞腫、精巣の間

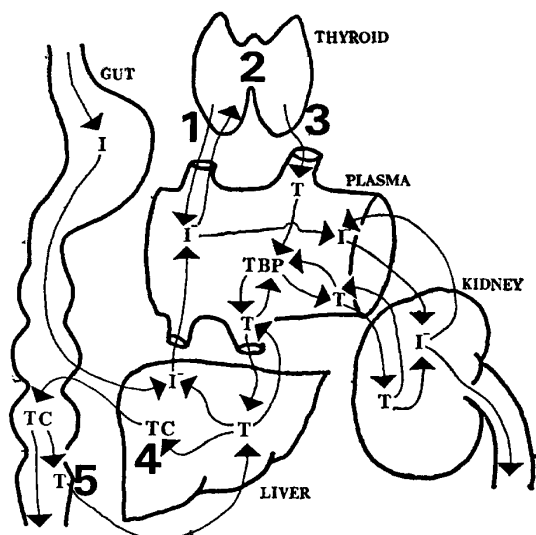


図 3 甲状腺腫を起こす作用機序 (Greer & Solomon⁶⁶⁾ を一部改変)

I: ヨード, T: チロキシン, TC: グルクロン酸抱合型チロキシン, TBP: タンパク結合型チロキシン. 1: 甲状腺ヨード摂取阻害, 2: 甲状腺ホルモン合成阻害, 3: 甲状腺ホルモン放出阻害, 4: 甲状腺ホルモン代謝促進, 5: 甲状腺ホルモン吸収阻害.

細胞腫等が多発することが知られており、ヒトへの外挿の際に重要な問題を提起している。

これらの二次性発癌物質のうち、抗甲状腺剤 (goitrogen) による甲状腺腫 (単純性甲状腺腫: 甲状腺がびまん性に腫大, 腫瘍ではない) 発現作用機作を図3に示した.

いずれも甲状腺ホルモンの血中レベルを下げるもので、最終的には TSH（甲状腺刺激ホルモン）を介した甲状腺刺激を受けて甲状腺腫を起こしているものと考えられている。表 7 に goitrogen と動物種/作用機序について示した。主としてラットにおいて甲状腺腫が多く認められており、ヒトや他の動物では少ない。また、その作用機序は化合物によって異なり、同一化合物においても動物種によって異なることがわかってきている²¹⁾。

動物において甲状腺に発癌が知られている化合物と動物実験における初期にみられる甲状腺腫形成機序とヒトでの甲状腺腫発現の相関を表 8 にまとめた。甲状腺腫がヒトで知られているのは thiocyanate 系化合物と hexachlorobenzene²²⁾ であるが、これが癌に移行する確たる証拠に関する報告はない。動物においては、甲状腺腫を発現する化合物の中で甲状腺への直接作用、とくにヨード摂取障害を起こす化合物に甲状腺腫から甲状腺癌へと移行しているものが多く知られているが、BHT, PCB 等 UDP-グルクロニルトランスフェラーゼの誘導等甲状腺ホルモンの代謝促進を介して初期に甲状腺腫大をきたす化合物^{23,24)}には発癌性は認められていない。

ヒトの甲状腺の発癌にはいまだ未解明の要素が多い。すなわち、ヨード欠乏による地方性甲状腺腫が癌化すると一般に信じられてきたが、近年の疫学的調査ではこの通説は否定され、地方性甲状腺腫地帯とその他の地帯とでは甲状腺癌の発生率に差はないと考えられている²⁵⁾。また、ヒトの甲状腺腫から癌への移行についてはもともとその甲状腺内に微小癌がひそんでおり、TSH の過剰

表 7 甲状腺腫を起こす物質と動物種／作用機序

甲状腺腫を起こす物質	ヒトでの発症／作用機序	ヒト以外の動物種／作用機序
Thiocyanates (ETU, PTU <i>etc.</i>)	+／1	ラット／1
Aminotriazole		ラット, ハムスター／1
Rose bengal B		ラット, マウス／1
Minocycline		ラット／2
Lithium		ラット／3
Hexachlorobenzene	+／?	ラット／4, ハムスター／3
Butylated hydroxytoluene		ラット／4
PCB		ラット／4
TCDD		ラット／4
大豆乳	+／5	ラット／5
セルロース		ラット／5
くるみ		ラット／5
2,4-Diaminoanisole		ラット／?
Griseofluvin		ラット／?

1: 甲状腺ヨード摂取阻害, 2: 甲状腺ホルモン合成阻害, 3: 甲状腺ホルモン放出阻害, 4: 甲状腺ホルモン代謝促進, 5: 甲状腺ホルモン吸収阻害, ?: 機序不明.

表 8 甲状腺発癌性化合物と動物種

化合物	動物種	甲状腺腫形成機序	ヒトでの甲状腺腫
ETU	ラット	甲状腺ヨード摂取阻害	+
Rose bengal B	マウス	甲状腺ヨード摂取阻害	
Aminotriazole	ラット	甲状腺ヨード摂取阻害	
Hexachlorobenzene	ハムスター	甲状腺ホルモン放出阻害	+
2,4-Diaminoanisole	ラット	機序不明	
Griseofluvin	ラット	機序不明	

放出を引き起こす何らかの因子により顕在化したと考えられている²⁵⁾。しかし、微小癌がいつどのようにして発生したかについてはよくわかっておらず、化合物のヒト甲状腺発癌に対する外挿を複雑にしている。

以上のようにラットに認められる甲状腺腫や癌はそのままヒトに適用できないとのデータが多く示されている。すなわち、goitrogen による甲状腺腫発現に関し、ラットは他の動物に比べ感受性が高く、また、甲状腺腫から癌へ移行しやすく、生理的な甲状腺ホルモンの代謝主経路がヒトと異なることがわかってきている。ラット、ヒト以外での甲状腺ホルモンの代謝はいずれも断片的な研究ばかりであるため、ヒトへの外挿に適した動物種を選ぶことは現時点では難しいが、これらの点における種差の追求をさらに行なうとともに、ヒトの甲状腺腫自体に関する発生学的要因の追求等が必要であると考えられる。

3. 発癌プロモーター

1) 有機塩素系化合物

これまで発癌性の証明された有機塩素系化合物では、マウスにのみ肝腫瘍を誘発する例が多いことがわかっていく(表9)²⁶⁾。これらは Ames 法などの変異原性試験で陰性を示す。このことからマウスの肝臓には元来癌化の始まった細胞 (preinitiated cells) があり、遺伝子毒性がなくてもこの群の化合物の発癌プロモーターとしての作用によって発癌現象が容易に起こるのではないかと考えられている²⁷⁾。

これらの化合物群に属するアルドリン、ディルドリン、クロルデンの発癌性のヒトへのリスクの評価に関しては、多くの議論がなされている。WHO/FAO の Joint Meeting on Pesticide Residues では、これらの化合物のマウス肝臓に対する発癌性はマウスに限って起こる種特異的な現象であるとし、ヒトに対する一日許容摂取量は設定できると結論されている²⁸⁾。IARC の評価においても、これらの化合物はヒトに対して発癌性の証拠があるとは認められないもの (ランク3) に分類されてい

表 9 マウスにのみ肝腫瘍を誘発する化学物質 (Newberne ら²⁶⁾)

Aldrin	1,1,2,2-Tetrachloroethane
Captan	Tetrachloroethylene
Chloramben	Tetrachlorvinphos
Chlordane	Toxaphene
Chlordecone	1,1,2-Trichloroethane
Chlorobenzilate	Trichloroethylene
Chloroform	Trifluralin
Chlorothalonil	3'-Nitro- <i>p</i> -acetophenetide
<i>p,p'</i> -DDE	5-Nitro- <i>o</i> -anisidine
Dibromochloropropane	6-Nitro-benzimidazole
1,2-Dibromoethane	Nitrofen
1,2-Dichloroethane	2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine
Dicofol	3-Nitropropionic acid
1,4-Dioxane	<i>N</i> -Nitrosodiphenylamine
Heptachlor	<i>p</i> -Nitrosodiphenylamine
Hexachloroethane	5-Nitro- <i>o</i> -toluidine
Nitrofen	Phenazopyridine HCl
Sulfallate	Piperonyl sulfoxide

表 10 エポキシドヒドラーゼの肝臓ミクロゾーム活性相対値 (Calabrese³⁰⁾)

動物種	数値 ^{a)}
サ ル	31.5
モルモット	13.5
ヒ ト	13.5
ウ サ ギ	6.2
ラ ッ ト	5.8
マ ウ ス	1.0

^{a)} 数値はマウスを 1.0 とした場合の相対数字。

る²⁹⁾。

同じく有機塩素系化合物のトリクロロエチレンは生体内で活性化されてエポキシドとなり、これが発癌性を有するとみなされている。このエポキシドの無毒化はエポキシドヒドラーゼ (EH) が作用することによって起こる

と信じられているがこの酵素活性の種差を調べた結果、マウスで低いことが判明した(表10)³⁰⁾。また、トリクロロエチレンはマウスの肝臓にペルオキシゾーム増殖をきたすのに対し、ラットではそのような現象は起こらないという種差も明らかになりつつある³¹⁾。これらの実験事実にはマウスにおいてトリクロロエチレンに起因する肝腫瘍発生頻度の大きいことを説明する重要なポイントになると考えられる。なお、トリクロロエチレンもヒトに対する発癌の証拠はないといわれている²⁹⁾。

このように有機塩素系化合物には、マウスでは発癌性

を認めてもヒトでは発癌の証拠がないといわれているものが多い。ところで、マウス、とくに B6C3F1 マウスの肝臓腫瘍は自然発生率の高いこと、および変異原性陰性の化学物質による誘発率も高いことから、かねてからその毒性学的意義は疑問視されている。米国の Nutrition Foundation Expert Panel は、マウスにのみ、しかも高用量でのみ発現するような肝腫瘍については、発癌性評価においては意義は低いと結論した³²⁾。また、同じく米国 National Toxicology Program の Ad Hoc Panel は、B6C3F1 マウスについて高率の肝腫瘍のため本系統

表 11 V79 細胞による代謝協同現象を用いての化学物質の細胞間連絡への影響
(Trosko ら³⁸⁾)

Chemical	Maximum concentration used (noncytotoxic)	Relative effect	Chemical	Maximum concentration used (noncytotoxic)	Relative effect
Phorbol	1 $\mu\text{g/ml}$	—	3',4',5',2,4,5-Hexabromo-biphenyl	7.5 $\mu\text{g/ml}$	+
4- α -Phorbol-12,13-didecanoate	1 $\mu\text{g/ml}$	—	3',4',2,4,5-Pentabromo-biphenyl	5 $\mu\text{g/ml}$	+
Phorbol-12,13-diacetate	1 $\mu\text{g/ml}$	+	2',4',5',2,3,4,5-Heptabromobiphenyl	10 $\mu\text{g/ml}$	++
4- <i>o</i> -Methylphorbol-12-myristate-13-acetate	1 $\mu\text{g/ml}$	+	2',3',4',5',2,3,4,5-Octobromobiphenyl	10 $\mu\text{g/ml}$	++
Phorbol-12,13-dibutyrate	1 $\mu\text{g/ml}$	++	Heptochlor epoxide	8 $\mu\text{g/ml}$	++
Phorbol-12,13-didecanoate	1 $\mu\text{g/ml}$	+++	Melittin	1 $\mu\text{g/ml}$	++
Phorbol-12-myristate-13-acetate	1 $\mu\text{g/ml}$	+++	Hydroquinone	1.0 $\mu\text{g/ml}$	++
Phenobarbital	200 $\mu\text{g/ml}$	++	Benzyl peroxide	1.0 $\mu\text{g/ml}$	++
Butylated hydroxytoluene	40 μM	++	Valium	1.25 $\mu\text{g/ml}$	+
Mezerein	.1 $\mu\text{g/ml}$	+++	Methyl clofenopate	0.5 $\mu\text{g/ml}$	—
DDT	5 $\mu\text{g/ml}$	++	Nafenopin	2.5 $\mu\text{g/ml}$	++
Lindane	15 $\mu\text{g/ml}$	++	[4-Chloro-4-(2,3-xylydino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643)	10 $\mu\text{g/ml}$	++
Chlordane	1 $\mu\text{g/ml}$	—	[4-Chloro-6-(2,3-xylydino)-2-pyrimidinylthio(<i>N</i> -B-hydroxyethyl)-acetamide] (BR 931)	1 $\mu\text{g/ml}$	—
Kepone	3 $\mu\text{g/ml}$	+++	Thalidomide	1 $\mu\text{g/ml}$	—
Mirex	10 $\mu\text{g/ml}$	++	Diphenylhydantoin	100 $\mu\text{g/ml}$	++
Antralin	.05 $\mu\text{g/ml}$	++	9-Methylpteroylglutamic acid	50 $\mu\text{g/ml}$	+
Saccharin (pure)	5 mg/ml	+	Formaldehyde	0.3 $\mu\text{g/ml}$	—
Saccharin (impure)	6 mg/ml	+	Mestranol	$2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$	++
Tween 60	.002% v/v	++	Ethinyl estradiol	$2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$	++
Tween 80	.002% v/v	+	Norethynodrel	$2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$	++
Deoxycholic Acid	10 $\mu\text{g/ml}$	++	Ethyl alcohol	1 mg/ml	—
Lithocholic Acid	10 $\mu\text{g/ml}$	++	Retionic acid	1 μM	—
Cholesterol	50 $\mu\text{g/ml}$	—	Dibutyryl cAMP	0.05 μM	—
Taurodeoxycholic acid	100 $\mu\text{g/ml}$	—	Dimethylsulfoxide	0.5% v/v	—
Cytocalasin B	0.1 $\mu\text{g/ml}$	++	Epidermal growth factor	0.05 $\mu\text{g/ml}$	—
Cytocalasin D	0.01 $\mu\text{g/ml}$	—	Fibroblast-derived growth factor	0.01 $\mu\text{g/ml}$	—
Dinitrofluorobenzene	0.1 $\mu\text{g/ml}$	++			
Polybromobiphenyl (Firemasters)	10 $\mu\text{g/ml}$	++			
3',4',5',3,4,5-Hexabromobiphenyl	2.5 $\mu\text{g/ml}$	—			
2',4',5',2,4,5-Hexabromobiphenyl	7.5 $\mu\text{g/ml}$	++			

マウスの継続使用の見直しを行なっている³³⁾。

マウス肝腫瘍に限らず、マウスの肺腫瘍、ラットの精巣腫瘍は一般的に高率の自然発生が起こることが知られている。これらの臓器の発癌については、後述の種差の検討あるいは発生機序の検討を十分行なったうえで、ヒトへのリスク評価を行なうべきであろう。

2) サッカリン

ラット、マウス、ハムスターを用いた通常の発癌性試験の結果、いずれにも明確な発癌性は証明されなかったが、2世代にわたる高投与量（飼料中5%添加）試験で雄ラットの膀胱に癌を起こすことが明らかになった³⁴⁾。それを理由にFDAはソフトドリンク類へのサッカリンの使用禁止を提案したが、ヒトにおける疫学的研究によればサッカリン使用と膀胱発癌との間の相関性は低いデータが多いといわれている³⁵⁾。陽性と結論された疫学データにおいても、サッカリン常用者と非常用者の相対危険度が1.6と小さく男性の場合のみであり、男性でも食事や飲物を同時に摂取した場合には陰性と判断された³⁶⁾。しかしながら（後述の）2段階発癌モデルを用いた実験結果より、本剤はラットに対して明らかな膀胱発癌、プロモーション効果を有することが示された³⁷⁾。また、*in vitro*の系でサッカリンが発癌プロモーション活性の指標と考えられる細胞間代謝協同阻害作用を示すことも観察されている（表11）³⁸⁾。

一般に膀胱癌の主たる発生要因は血行性ではなく、尿原性に膀胱へ到達し膀胱上皮に一定期間作用することにより発癌すると考えられている³⁹⁾。その際尿中Na⁺の増加と尿pHの上昇がプロモーション作用の発現と密接に関連するといわれており、サッカリンでもその可能性が示唆されている（表12）⁴⁰⁾。したがって、今後尿中排泄

物の動物種間での比較同定や初代培養膀胱上皮細胞（可能であればヒト由来の細胞）を用いた *in vitro* のプロモーション作用の検討等によりヒトへ外挿するための実験データを蓄積、補強することが課題であろう。

3) ペルオキシゾーム増殖誘導物質

本剤による肝発癌機序（仮説）を図4に示す。低脂血症剤として知られる clofibrate や可塑剤としての DEHP

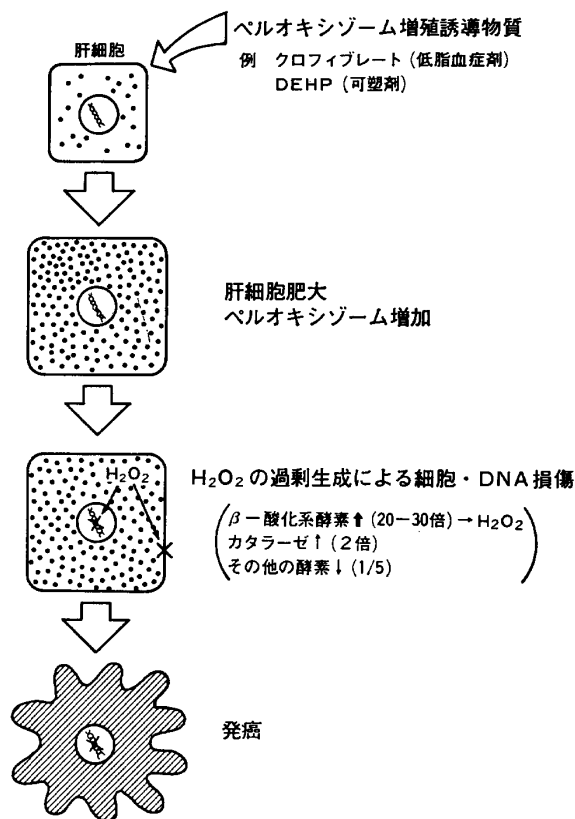


図4 ペルオキシゾーム増殖誘導物質による発癌機構（仮説）

表12 ラット尿路上皮細胞の分裂増殖反応に及ぼす各種サッカリン塩の影響（Cohenら⁴⁰⁾）

Form of saccharin ^{a)}	Labeling index (%)	Urinary saccharin concentration ^{b)} (mmoles/ml)	Urinary concentration ^{b)}		
			pH	Na ⁺ (mEq/l)	Ca ²⁺ (mg/dl)
Sodium saccharin	0.55±0.20 ^{c)}	0.17±0.04	7.2	291±19 ^{d)}	24.8±9.6
Potassium saccharin	0.18±0.09 ^{d,e)}	0.14±0.04	6.8	153±39	23.9±1.8
Calcium saccharin	0.12±0.11	0.14±0.03	5.7	158±24	41.2±0.5 ^{d)}
Acid saccharin	0.07±0.04	0.19±0.02	5.5	139±45	51.6±6.7 ^{d)}
Control	0.06±0.04	0	7.1	158±14	34.5±5.8

a) All forms were administered as 5% of the diet for 10 weeks.

b) Measured after 4 weeks of administration.

c) $p < 0.01$ compared to control by Student's *t* test.

d) $p < 0.05$ compared to control by Student's *t* test.

e) $p < 0.05$ compared to sodium saccharin by Student's *t* test.

表 13 各種低脂血症剤による肝ペルオキシゾーム増殖誘導性に関する種差

化合物	種	系 統	性	処 置 内 容	ペルオキシゾーム増殖誘導
クロフィブレート	ラット	?	雄	500 mg/kg/日, 経口, 14日間	+
		SD	雄/雌	250 mg/kg/日, 混餌, 91日間	+
		F-344	雄	0.25% 以上, 混餌, 3日間以上	+
		F-344	雄	0.1%, 混餌, 3週間以上	-
	マウス	C3H	雄	0.25% 以上, 混餌, 3日間以上	+
		Swiss-Webster	雄	0.25% 以上, 混餌, 3日間以上	+
		無カタラーゼ系	雄	不明	+
		無カタラーゼ系	雌	不明	+
		野生型	雄	不明	+
		野生型	雌	不明	-
	イヌ		雄	25 mg/kg/日, 26日間	+
	ハムスター		雄	0.25%, 混餌, 2週間	+
	モルモット		雄	0.25%, 混餌, 2週間	-
	ニワトリ		雄	0.25%, 混餌, 3週間	-
	ウサギ		雄	0.25%, 混餌, 2週間	-
	リスザル		雄	75 mg/kg/日, 経口, 22日間	-
	サル	Rhesus	雄/雌	200 mg/kg/日, 経口, 1年間	-
	ヒト		?	不明	-
フェノフィブレート	ラット	SD	雄	100 mg/kg/日, 混餌, 28日間	+
		Wistar	雄	300 mg/kg/日以上, 経口, 1週間	+
			雄	10 mg/kg/日以下, 経口, 1週間	-
	サル	Rhesus	雄/雌	12 mg/kg/日以上, 経口, 1年間	-
	ヒト		?	2か月~7年間	-
ナフェノピン	ラット	F-344	雄/雌	125 ppm 以上, 混餌, 1週間以上	+
	マウス	無カタラーゼ系	雄/雌	125 ppm 以上, 混餌, 1週間以上	+
		野生型	雄/雌	125 ppm 以上, 混餌, 1週間以上	+
プロブコール	ラット	SD	雄/雌	500 mg/kg/日, 混餌, 91日間	-
	サル	Rhesus	雄/雌	最大 500 mg/kg/日, 8年間	-

Cohen & Grasso⁴⁴⁾ の表を改変した。

等が代表例であるが、ペルオキシゾームの誘導作用と化学構造との間に相関性はない⁴¹⁾。これらはいずれもげっ歯類に対して投与初期からペルオキシゾームの増殖に関連した肝細胞肥大を起こすことがわかっており、長期間投与を継続することによって肝細胞癌を誘発する⁴²⁾。現在のところ、ペルオキシゾームの異常増殖に由来して過剰生成される過酸化水素（反応性酸素化合物）による細胞あるいはDNAの損傷が肝細胞の癌化要因ではないかと考えられているが詳細は不明である⁴³⁾。ただ、肝細胞におけるペルオキシゾームの異常増殖と肝細胞癌発生との間には何らかの因果関係があると思われるので、ペルオキシゾームの増殖性についての動物種差の検討はヒトへの外挿に役立つと考えられた。検討の結果、ヒトではペルオキシゾームの増殖現象を認めない（表13）ことか

らヒトに対する本剤の肝発癌性リスクはきわめて低いと考えられている⁴⁴⁾。今後、さらに本剤による肝細胞におけるペルオキシゾーム増殖の機序ならびにペルオキシゾーム異常増殖の細胞癌化過程における意義に関する実験データが蓄積されることによって本剤のヒトに対する正確な発癌性危険度評価が実現するものと期待される。

4) Furan, furfural

本化合物は、有機塩素系化合物と同様に長期投与試験でマウス (B6C3F1 系) の肝臓に対して発癌性を示すが、変異原性試験では陰性を示す物質として知られている。最近、米国国立環境衛生研究所 (NIEHS) のグループによって B6C3F1 マウスにおける本化合物に起因する肝腫瘍発生機序の分子レベルでのアプローチとして腫瘍遺伝子活性化の検討がなされ、ヒトの腫瘍でよく調べられ

表 14 B6C3F1 マウス肝腫瘍で検出された H-ras 遺伝子における突然変異パターン (Reynolds ら⁴⁵⁾)

Treatment and tumor type	Activated H-ras	Codon 61				Codon 13			Codon 117		
		Normal		Mutations		Normal		Mutations	Normal		Mutations
		CAA→	AAA	CTA	CGA	GGC→	GTC	CGC	AAG→	AAC	AAT
Vehicle											
Adenoma	3		2	1	0						
Carcinoma	12		7	2	3						
Furan											
Adenoma	7		3	0	1					2	1
Carcinoma	3		1	0	0					0	1
Furfural											
Adenoma	2		0	0	1		0	1		0	0
Carcinoma	7		5	0	0		1	0		0	1

表中の数字は出現例数を示す。

ている *ras* 遺伝子の活性化が高頻度に検出された⁴⁵⁾。興味深いことに自然発生病変では *ras* 遺伝子の点突然変異が 1 種類のアミノ酸コドン (61 番目) に限られていたのに対し, furan, furfural 誘発腫瘍では, それ以外の部位にも検出された (表 14)。発癌過程における腫瘍遺伝子研究の持つ役割をめぐる研究は始まったばかりであり, 現時点で上述のようなデータの持つ意義を十分解析することは困難であるが, このような分子レベルでの解析データを積み重ねることによって, 動物実験データのヒトへの外挿をより確実にするための有用な情報を得ることができる可能性は高いと思われる。

今後の課題

1. 適切な短期試験法の開発と応用

検索すべき化学物質が膨大な数にのぼり, しかも動物による発癌性試験の費用がますます多額になっている事実を考えると, 適切な短期試験による評価法を確立することが急務である。すでに述べたように Ames 法や *in vitro* 染色体異常検出法には簡便であるがゆえの限界もあり, またとくに後者のように発癌性のスクリーニング法としての意義が必ずしも明確でないものもある。現状ではこれらのスクリーニング法を組み合わせることにより“確からしさ”を向上させようとする傾向がみられるが, 化合物の各実験系における作用機構や各試験法の発癌過程との対応の解明を含む現行試験法の洗練化を先行すべきであろう。これと並んで, 新しいよりの確な (屋上屋を重ねるのではなく) 試験法の開発と試験データの蓄積を通じ, 究極的には現行の長期発癌性試験の代替法創出を心がけるべきであろう。このような観点から 2, 3 の試験系について以下に略述する。

表 15 形質転換試験と癌原性との相関 (Kuroki & Sasaki⁴⁶⁾)

	発癌性	形質転換能 ^{a)}	化合物数
A	+	+	31
B	+	—	17
C	—	+	3
D	—	—	4

試験感受性 (Sensitivity) A/A+B 64.2%

予測性 (Predictivity) A/A+C 91.2%

確実性 (Validity) A+D/A+B+C+D 63.6%

^{a)} マウス由来, Balb/c3T3 および C3H10T_{1/2} 細胞。

1) 細胞形質転換 (cell transformation) 試験

細胞形質転換試験は細胞の増殖性や形態の変化を調べ, 細胞の癌化の過程を直接 *in vitro* 条件下で検出しようとする試験である。これまでに供試された 55 件の化合物について発癌性との相関を調べてみると (表 15)⁴⁶⁾ 予測性 (陽性になった場合, 発癌物質である確率) は 91.2% と高いが, 代謝活性化の検討, プロモーターの検出感度上昇などを含め試験感受性, 確実性の点で改良を要する。

2) *In vitro* での発癌プロモーター検出法

近年, 発癌プロモーターの細胞生物学的作用を指標にした種々の検出法が検討されている。すなわち細胞増殖の指標となるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) 活性誘導検出法⁴⁷⁾, マクロファージを用いた酸素ラジカル検出法⁴⁸⁾, *in vitro* の形質転換率増強作用検出法⁴⁹⁾, 細胞間連絡阻害 (発癌物質の分類 3. 2) 参照) を指標にした各種検出法⁵⁰⁾等がよく知られている。それぞれに一長一短はあるが細胞間連絡阻害を指標にした検出法がプロモーター作

用を持つ化学物質を検出するのに最もよく使われる方法である。これは通常では周囲の正常細胞と連絡しているために癌細胞としての形質発現ができないが、発癌イニシエーションを受けた細胞(変異細胞)はプロモーターの作用によって細胞間の連絡が阻害されるために、変異細胞が増殖できるようになるという仮説に基づくものである。測定法には大別して代謝協同法、電気生理的方法および蛍光色素注入法の三つがあるが、細胞の形質転換過程との関連を同じ培養条件下で観察することができ、かつ用いる細胞の制限が少ないのでプロモーターの臓器特異性や種差を比較検討できるというメリットを持つ色素注入法が望ましいと考えられる。最近、細胞間連絡阻害を指標にした検出法を用いて、マウス、ラットの初代培養肝細胞におけるフェノバルビタール、DDT、ディルドリンに対する感受性の差を検討し、動物実験の結果とよく一致したという報告が紹介された⁵¹⁾。

3) *In vivo* での短期試験法

現行の *in vitro* の短期試験法においてはすでに述べたように偽陰性、偽陽性の結果がつきものであることはよく知られているため、化学物質の生体内代謝その他の発癌に至る諸要因を考慮した動物の短期試験法が各方面で検討されている⁵²⁾。その中で長期発癌性試験結果の予測を目的として検討、開発された名市大グループによる検出法 (rapid bioassay for carcinogenesis) は肝臓を標的とする発癌物質に対してはきわめて有効な手段であることが知られている(たとえば Ames 法での結果いかににかかわらず肝発癌性を有する 30 化合物に対しては 27 個が陽性、非発癌物質 25 個に対してはいずれも陰性であり、的中率は実に 94% であった)⁵³⁾。同法は基本的に発癌の二段階説に基づくもので、あらかじめイニシエーション処理されたラットに検索物質を投与し、GST-P (胎盤タイプグルタチオントランスフェラーゼ) 酵素の発現を前癌病変の指標としてプロモーション作用を有する発癌物質を検出しようとするシステムである。最近、同病変に腫瘍遺伝子 (*c-myc*) の発現、増幅を示唆する所見が得られている⁵⁴⁾ところからみると、遺伝子レベルにおけるヒトへの外挿モデルとなりうる可能性もある。名市大グループにおいては、現在肝以外の臓器につき MNU モデルや複合イニシエーターモデルのような多臓器病変を指標にした検索法の開発が精力的に進められている。

2. 遺伝子レベルでの研究

冒頭で述べたように発癌は多段階にわたるものであるが、直接的、間接的すなわち一次性、二次性各発癌物質および発癌プロモーターのいずれについてもその作用発現に遺伝子が関与している証拠が次々と報告されてきて

表 16 腫瘍マーカーの検出法 (佐藤⁶⁰⁾)

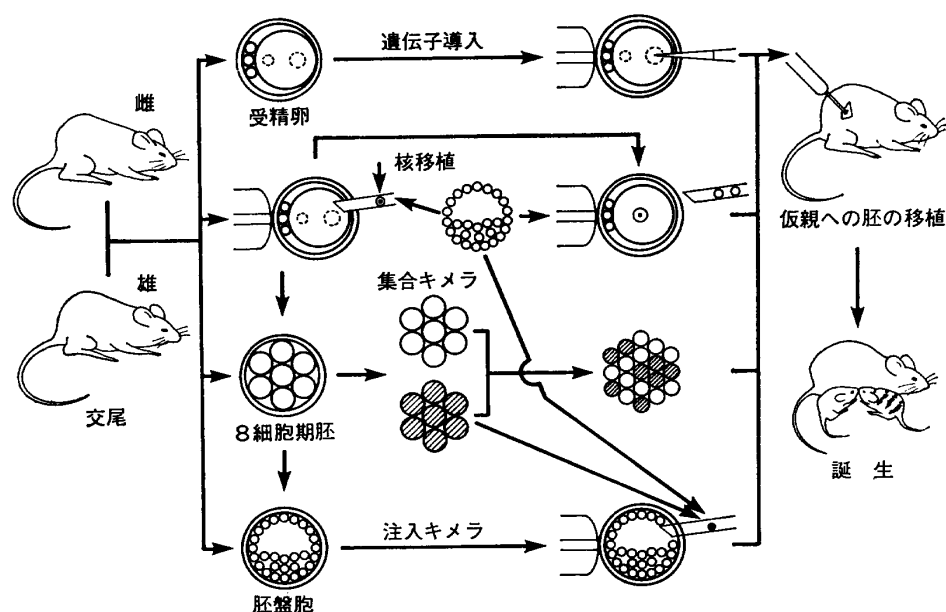
- | |
|--|
| 1) タンパク、糖鎖部分に対するポリまたはモノクローナル抗体を利用する法 |
| 例: RIA, ELISA, 免疫組織化学的 (ABC, PAP) 法, Western blot 法 |
| 2) DNA プローブを利用する方法 |
| 例: DNA 検出の Southern blot 法, mRNA 検出の Northern blot 法, 組織中の mRNA (DNA) 検出の <i>in situ</i> hybridization 法 |

いる。これらの研究の中で実験動物の化学発癌過程においてもヒトと同様に種々の腫瘍遺伝子の活性化が検出されてきており、種を超えた生命の基本単位である遺伝子レベルでの発癌現象の解析は種差の解明に役立つ可能性が大きい。また、遺伝子レベルから個体レベルへの関連を検討するため、以下に述べるようにこれら外来遺伝子を導入したトランスジェニック動物の開発も重要である。

1) 新しい腫瘍マーカーの検討

最近、腫瘍遺伝子とその産物がヒトの腫瘍診断や実験動物における発癌過程の解析などの基礎的研究に活用されるようになった。たとえば、EGF レセプター様産物を産生する *erb B* と関連する *HER-2/neu* 遺伝子の増幅が乳癌の悪性化と相関すること⁵⁵⁾、*K-ras* 遺伝子の 12 番目のアミノ酸コドンの点突然変異 (Gly → Asp, Val, Ser など) の頻度がヒト大腸癌の発生と相関すること⁵⁶⁾、前白血病状態で *N-ras* の活性化が 13 番目のアミノ酸コドンの突然変異 (Gly → Arg) により起こり、このことが白血病細胞への進行と強い相関を示すこと⁵⁷⁾、癌患者と正常人の白血球 DNA について *erb B* の RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素による DNA 切断断片の長さの多型性) を調べた結果、両者の間でバンドの数が有意に異なること⁵⁸⁾などが報告されている。一方、実験動物の化学発癌過程においてもヒトと同様に種々の腫瘍遺伝子の活性化が検出されることがある⁵⁹⁾。活性化腫瘍遺伝子の量的・質的变化の検出はヒト、動物のいずれの場合もまったく同じ原理に基づいて実施される (表 16)⁶⁰⁾。

腫瘍遺伝子の活性化が癌の発生において果たしている役割はまだ判明していないのが現状ではあるが、種を超えた生命の基本単位である遺伝子のレベルでの発癌現象の解析は種差の解明に役立つ可能性を秘めている。また、化学物質のあるものは、その作用の特殊性から現行の方法では検出できないこともあると予想されるので、腫瘍遺伝子の活性化のような分子レベルでのメカニズム

図5 胚工学的手法による実験動物作製法 (西塚⁶⁷⁾)

に対応する試験法の追求は furan, furfural の項で述べたように今後の重要なポイントになると思われる。

2) 新しい実験動物の開発

ヒトへの外挿を容易に行なえるような実験動物が開発されれば発癌性評価に大きく貢献できることになる。また、前項でも述べたように腫瘍遺伝子と癌の発生、進展との関連がしだいに明らかになるとともに、癌化機構の遺伝子レベルから個体レベルへの関連を検討することが必要となっており、最近、遺伝子工学、発生工学的手法を用いた実験動物の開発が検討されている(図5)⁶¹⁾。

一般に、外来遺伝子を導入された動物をトランスジェニック動物と呼ぶ。これはクローニングされた遺伝子(DNA)を動物の受精卵の核に注入して組み込ませ、仮親の子宮に移植することにより新しい形質を獲得した動物である。マウスにラットの成長ホルモン遺伝子を導入して作製された大型マウス(スーパーマウス)はその典型例である⁶²⁾。そのほか、ヒトの腫瘍遺伝子(c-myc)が導入されたマウスで乳癌が生ずることも報告されている⁶³⁾。受精卵への遺伝子導入の系は培養細胞の系と異なっており正常2倍体細胞への遺伝子導入そのものであり、かつ一つの個体レベルで特定の遺伝子の発現、役割を解析できるためその個体をモデル動物として利用できる。たとえば導入した腫瘍遺伝子の組織特異性、発現時期特異性、遺伝子産物の細胞、個体における役割等を解明することができれば、生体にとって真に重要な腫瘍遺伝子の正体が判明するかもしれない。また導入した腫瘍遺伝子によって個体のすべての細胞がイニシエーションのかか

った状態の動物モデルを作り出すことも理論的には可能である。もしこのような実験動物の使用が可能となればプロモーション作用を持つ発癌物質のスクリーニング系としてきわめて信頼度の高い検索法を開発することができるであろう。

3. 種差の検討

すでに述べたような代謝活性化、解毒、臓器移行性等に多かれ少なかれ種差が認められ、また、一次性発癌物質の作用の中心であるDNA損傷、修復等においても実験動物間に種差が存在する。

さらに、二次性発癌物質および発癌プロモーターの中に種差の存在を示すものが多く、ヒトへの外挿の際に考慮すべき点の多いことを示唆しているのはすでに goitrogen について述べたとおりである。すなわち、この場合ラットは他の動物に比し甲状腺腫から癌へ移行しやすく、生理的な甲状腺ホルモン代謝主経路がヒトと異なることがわかっている^{64,65)}。したがって、実験動物との対比において、ヒトの感受性比較ができれば動物データの外挿の際、定量的にもヒトの感受性のファクターを安全係数として考慮することができよう。また、ヒトではホルモン変動が生じない場合や生じても発癌に向かわないことが判明すれば、かりにラットで発癌してもヒトに対する発癌物質ではないと評価することが可能である。このような考え方は発癌プロモーターとして例示したトリクロロエチレン等塩素系化合物のマウス肝腫瘍発現の特殊性、サッカリンの膀胱癌発現における尿中Na⁺の増加と尿pHの上昇および clofibrate, DEHP等のペルオ

キシゾーム増殖のヒトにおける有無，感受性比較においても共通して適用できるものとして考えられる。このように，発癌の各過程に関連した種差をさらに明確にすることにより，定量的リスクアセスメントの面で，さらに現実的で確度の高いヒトへの危険度評価が可能になるものと考えられる。

お わ り に

科学技術の進歩および旺盛な研究開発は，この四半世紀の間に数多くの優れた新規化学物質の創製と供給をもたらし，われわれの生活を豊かなものに行っているが，その一方でこれら化学物質のあるものについては深刻な健康影響を及ぼすことがわかってきた。本稿では，とくに発癌性に関してその評価の現状と今後の課題を紹介したが，研究開発の立場からは，将来一般生活環境下でその安全性に疑問を生ずるような候補化合物をいかに効果的に予知するかが重要であり，発癌性についても，その予知をどのように行なっていけばよいかを明らかにすることが最大の課題と思われる。その意味で予知性を高め，動物実験データのヒトへの外挿をさらに明確に行なっていくためには，各種発癌の機構研究が最も重要であり，次いでこの発癌機構の知見に基づいた各種短期検出法の創出，洗練化に総力を結集してゆくべきであろう。本稿が上記研究開発の立場の方々の理解に少しでも役立てば幸いである。

引 用 文 献

- 1) US Office of Science and Technology Policy, Chemical carcinogens, A review of the science and its associated principles, February 1985
- 2) 賀田恒夫: 変異原と毒性 **5**, 454 (1982)
- 3) H. Zarbl, S. Sukumar, A. V. Arthur, D. Martin-Zanca & M. Barbacid: *Nature* **315**, 382 (1985)
- 4) 関谷剛男: がん遺伝子研究の展望, 現代化学増刊2, 豊島久真男・西村 暹編, 東京化学同人, pp. 28-32, 1985
- 5) R. C. Gupta, M. V. Reddy & K. Randerath: *Carcinogenesis* **3**, 1081 (1982)
- 6) R. C. Gupta: *Cancer Res.* **45**, 5656 (1985)
- 7) M. V. Reddy, T. R. Irvin & K. Randerath: *Mutat. Res.* **152**, 85 (1985)
- 8) W. K. Lutz: *Mutat. Res.* **65**, 289 (1979)
- 9) 駒野 徹: 農化誌 **61**, 233 (1984)
- 10) I. Damjanov, R. Cox, D.S.R. Sarma & E. Farber: *Cancer Res.* **33**, 2122 (1973)
- 11) S. Hosokawa & J. Miyamoto: *Gann* **67**, 819 (1976)
- 12) H. Tsuda, Y. Miyata, A. Hagiwara, R. Hasegawa, T. Shirai & N. Ito: *Gann* **68**, 781 (1977)
- 13) K. Hiraga & T. Fujii: *Food Cosmet. Toxicol.* **19**, 303 (1981)
- 14) K. Hiraga & T. Fujii: *Food Cosmet. Toxicol.* **22**, 865 (1984)
- 15) K. Morimoto, M. Fukuoka, R. Hasegawa, A. Tanaka, A. Takahashi & Y. Hayashi: *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **78**, 1081 (1987)
- 16) O. Pelkonen, E. A. Sotaniemi & J. T. Ahokas: *Br. J. Clin. Pharmacol.* **19**, 59 (1985)
- 17) 武部 啓: DNA 修復, 東京大学出版会, 1983
- 18) J. C. Mirsalis, C. K. Tyson & B. E. Butterworth: *Environ. Mutagen* **4**, 553 (1982)
- 19) T. Yagi: *Mutat. Res.* **96**, 89 (1982)
- 20) H. Kato, M. Harada, K. Tsuchiya & K. Moriwaki: *Jap. J. Genet.* **55**, 99 (1980)
- 21) A. G. Smith, D. Dinsdale, J. R. P. Cabral & A. L. Wright: *Arch. Toxicol.* **60**, 343 (1987)
- 22) I. Dogrmaci: *Adv. Pediatr.* **13**, 11 (1964)
- 23) D. Sordergaard & P. Olsen: *Toxicol. Lett.* **10**, 239 (1982)
- 24) C. H. Bastomsky & P. V. N. Murthy: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 23 (1975)
- 25) 山本蒔子: 甲状腺疾患 診断と治療, 斉藤慎太郎編著, 永井書店, pp. 99-110, 1985
- 26) P. M. Newberne, V. Suphakarn, P. Punyarit & J. D. Camargo: "Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis," ed. by B. E. Butterworth & T. J. Slaga, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 165-178, 1987
- 27) M. A. Pereira: *Toxicol. Indust. Health* **1**, 311 (1985)
- 28) Pesticide Residues in Food—1977, FAO Plant Protection Paper 10 Rev., FAO, Rome, pp. 7-8, 1978
- 29) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, IARC Monographs Suppl. 4, IARC, Lyon, 1982
- 30) E. J. Calabrese: *J. Pharm. Sci.* **75** (11), 1041 (1986)
- 31) C. R. Elcombe: *Arch. Toxicol.* **8** (Suppl.), 6 (1985)
- 32) "The Relevance of Mouse Liver Hepatoma to Human Carcinogenic Risk," Report of the International Expert Advisory Committee, Nutrition Foundation, Washington, D. C., 1983
- 33) Report of the NTP Ad Hoc Panel on Chemical Carcinogenesis Testing and Evaluation, Board of Scientific Counselors, National Toxicology Program, 1984
- 34) D. L. Arnold & D. B. Clayson: "Toxicological Risk Assessment," ed. by D. B. Clayson, D. Krewski & I. Munro, Vol. II, CRC Press, Florida, pp. 232-243, 1985
- 35) 加美山茂利: 新しい発癌のメカニズムと評価, 林裕造・黒木登志夫編, サンエンスフォーラム, pp. 308-330, 1984

- 36) G. R. Howe, J. D. Burch, A. B. Miller, B. Morrison, P. Gordon, L. Weldon, L. W. Chambers, G. Fodor & G. M. Winsor: *Lancet* September 17, 578 (1977)
- 37) N. Ito, S. Fukushima, T. Shirai & K. Nakanishi: *Environ. Health Perspect.* **50**, 61 (1983)
- 38) J. E. Trosko, L. P. Yotti, S. T. Warren, G. Tsushimoto & C-c. Chang: "Carcinogenesis," ed. by E. Hecker, N. E. Fusenig, W. Kunz, F. Marks & H. W. Thielmann, Vol. 7, Raven Press, New York, pp. 565-585, 1982
- 39) 伊東信行: 日病会誌 **75**, 3 (1986)
- 40) S. M. Cohen, L. B. Ellwein & S. L. Johansson: "Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis," ed. by B. E. Butterworth & T. J. Slaga, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 55-67, 1987
- 41) J. K. Reddy & N. D. Lalwai: *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **12** (1), 1 (1983)
- 42) C. Rhodes, T. C. Orton, I. S. Pratt, P. L. Batten, H. Bratt, S. J. Jackson & C. R. Elcombe: *Environ. Health Perspect.* **65**, 299 (1986)
- 43) 中山 勉・児玉昌彦: 化学と生物 **23** (2), 771 (1985)
- 44) A. J. Cohen & P. Grasso: *Food Cosmet. Toxicol.* **19**, 585 (1981)
- 45) S. H. Reynolds, S. J. Stowers, R. M. Patterson, R. R. Maronpot, S. A. Aaronson & M. W. Anderson: *Science* **237**, 1309 (1987)
- 46) T. Kuroki & K. Sasaki: "Transformation Assay of Established Cell Lines: Mechanisms and Application," ed. by T. Kakunaga & H. Yamasaki, IARC Scientific Publications No. 67, IARC, Lyon, pp. 93-118, 1985
- 47) 菅沼雅美: トキシコロジーフォーラム **7** (6), 616 (1984)
- 48) 大河喜彦: トキシコロジーフォーラム **9** (5), 486 (1986)
- 49) 佐々木澄志・黒木登志夫: 組織培養 **11** (3), 95 (1985)
- 50) 山崎 洋: *Oncologia* **20** (5), 57 (1987)
- 51) J. E. Klaunig & R. J. Ruch: *Cancer Lett.* **36**, 161 (1987)
- 52) J. Ashby: *Mutat. Res.* **115**, 177 (1983)
- 53) 伊東信行・井上忠志・田川義章・青木豊彦・香川雅考: トキシコロジーフォーラム **9** (6), 59 (1986)
- 54) S. Ito, T. Watanabe, K. Abe, N. Yanaihara, C. Tatenno, Y. Okuno, A. Yoshitake & J. Miyamoto: *Biomed. Res.* (in press)
- 55) D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich & W. L. McGuire: *Science* **235**, 177 (1987)
- 56) K. Forrester, C. Almoguera, K. Han, W. E. Grizzle & M. Perucho: *Nature* **327**, 298 (1987)
- 57) 平井久丸: 臨床科学 **23** (3), 332 (1987)
- 58) 河島和子・井澤三生・成毛韶夫・岡林謙蔵・西村 暹: 第46回日本癌学会総会記事, p. 119, 1987
- 59) 長尾美奈子: 蛋白質 核酸 酵素 **31** (1), 9 (1986)
- 60) 佐藤清美: 臨床病理 **12**, 1369 (1987)
- 61) 勝木元也: 生化学 **59** (5), 265 (1987)
- 62) R. D. Palmiter, R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Trumbauer, M. G. Rosenfeld, N. C. Brinberg & R. M. Evans: *Nature* **300**, 611 (1982)
- 63) T. A. Stewart, P. K. Pattengale & P. Leder: *Cell* **38**, 627 (1984)
- 64) R. P. Levy, J. S. Marshall & M. G. Sheahan: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **28**, 633 (1968)
- 65) A. Albert & F. R. Keating, Jr.: *Endocrinology* **51**, 427 (1952)
- 66) M. A. Greer & D. H. Solomon: "Handbook of Physiology," ed. by S. R. Geiger, Sect. 7, Endocrinology, Vol. III, Thyroid, 1974
- 67) 西塚泰章: 現代病理学体系, 飯島宗一編, 第9巻C, 中山書店, p. 247, 1984
- 68) 林 裕造・前川昭彦: 新しい発癌のメカニズムと評価, 林 裕造・黒木登志夫編, サイエンスフォーラム, pp. 91-101, 1984
- 69) 梅田 誠: 現代病理学大系, 飯島宗一編, 第9巻B, 中山書店, p. 113, 1984