発がん物質の同定：新しい発がん試験法の開発と動物から人への外挿†

福 島 昭 治*1

科学の進歩とともに多数の化学物質が作り出され、我々はその恩恵とリスクのはざまで生きている。食物、医薬品、農薬、その他生活するために必要な化学物質等、さらにはこれらを生産する職場環境や一般環境に存在する化学物質が人のがん発生に関与しているのか。そうだとするとどの程度なのかを実験的に予測することはがん予防の面から極めて重要である。現在、化学物質の発がん性検出にあたって従来の長期発がん性試験に加えて、その *in vivo* 代替法として発がん性中期検出法の開発が進められている。本稿では我々が開発し、医薬品の非臨床試験ガイドラインに採用されているラットを用いた肝中期発がん性試験法と多臓器中期発がん性試験法を中心に記述し、さらに遺伝子改変マウスを用いる中期発がん性試験法の現況を述べる。また、労働安全衛生法 57 条の 5 に基づく化学物質の発がん性試験結果の社会での活用度を紹介する。

キーワード: 発がん物質、発がんリスク、発がん性試験代替法、中期発がん性試験法、多臓器中期発がん性試験法

1 はじめに

がんの原因は何か、またがんとはの問いに対して、化学物質、放射線、細菌・ウイルス等がもたらす遺伝子異常による疾患、すなわち遺伝子病であるということが明確となり、がん化の機構が徐々に解明されてきている。しかし本質的なことはまだまだで、その機序解明への道は遠い。とはいうものの、がんの発端である発生要因として化学物質が大きなウエイトを占めていることには異論は無い。イギリスの Pott 卿による煙突掃除夫による陰のうがんの報告を最初として、職業がんが昔から多数見つかっている。これら職業がん発生の原因化学物質が動物にがんを発生させることも周知の事実である。化学発がんの歴史は職業がんとともに歩んできたといっても過言ではない。

科学の進歩とともに環境中には多数の化学物質が存在し、また新たに作り出され、環境へ送り出されている。人はそれらを種々の目的で使用し、その恩恵にあずかっている。一方、それが人々の健康に影響を与えていることも事実である。化学物質の人への健康影響を発がん限定してみると、そのリスク評価は大きく 4 つの段階、すなわち発がん性検出、曝露評価、発がん性・用量反応評価、そして発がんリスク判定に分けられる。この発がん性という有害性確認の大部分は人での発がん性を予知する目的で、動物、主にラットとマウス等げっ歯類を用いる発がん性試験で得られる。

しかし、発がん性を検出すべき化学物質は膨大な数で

あり、それらを通常の長期にわたる発がん性試験で検出することは現実的に不可能である。そのため、短期に発がん性をスクリーニングする方法として、Ames 試験を始め多くの遺伝毒性試験が開発されてきた。しかし、そのみでは化学物質の発がん性を予測することは十分ではなく、その後、がんそのものに注目しつつ従来の発がん性試験にかわりうる *in vivo* における発がん検出法の開発が進められてきた。そこで本稿では従来の発がん性試験（がん原性試験）と発がん性試験代替法としての中期発がん性試験法を中心に述べ、さらに動物データの人への外挿、日本バイオアッセイ研究センターにおける発がん性試験データの活用度等について言及する。

2 通常の発がん性試験

実験動物を用いた発がん性試験は、通常 5～6 週齢の雌雄ラット、ないしマウスを用いて実施される（表 1）¹⁾。一般に 13 週間試験で求めた最大耐量（最小の毒性を示す最高投与量、MTD）を最高用量とし、1.5～2 年間の長期にわたって被験化学物質が投与される。病理学的に無処置対照群に対して有意な腫瘍、特にがんの発生頻度増加によって発がん性が判定される。

発がん性評価にあたり発がん性という有害性確認は、動物間で質的には種差がなく、量的には種差があり、また人は発がん性に対して最も感受性が高いという前提に基づいてなされ、かつ疑陰性という結果を避けるために 2 種の動物を用いて実施される。その評価に際して日本では原則として、薬事法、農薬取締法、化審法、安衛法に基づく優良試験所規範（Good Laboratory Practice : GLP）のもと、国際的な発がん性試験実施基準に従って実施することが求められる。したがって、国際的評価に耐え得る試験を実施するためには多大な労力、莫大な経費および長い年月が必要となる。

† 原稿受理 2008 年 3 月 25 日

*1 中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター。

連絡先：〒257-0015 神奈川県秦野市平沢 2445

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター

福島昭治*1

E-mail: s-fukushima@jisha.or.jp

表 1 通常の発がん性試験法¹

動物	：	2種類以上の雌雄動物（ラット、マウス、ハムスター）注
年齢	：	通常6週齢まで
動物数	：	各群雌雄各50匹以上
投与経路	：	原則としてヒトが曝露される経路
用量	：	最大耐量を最高用量として、三段階以上、別に対照群をおく
投与期間	：	ラットでは24か月以上30か月以内、マウスおよびハムスターでは18か月以上24か月以内

注 医薬品の場合、1種の長期がん原性試験に加えて、新たな短期・中期 *in vivo* げっ歯類試験系をもう一つ実施することが基本となる。なお、1種の長期がん原性試験においては、何らかの明確な根拠がない限り、動物種はラットを選択することが推奨される。

¹ 医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2002, 医薬品非臨床試験研究会監修, 薬事日報社, 東京, 2002.7

ラットやマウスを用いて多数の化学物質の発がん性試験を長年にわたり行っており、かつ国際的によく知られているのは米国国立がん研究所の国家毒性評価計画（National Cancer Institute / National Toxicology Program: NCI / NTP）で、その結果は“NCI / NTP Technical Report Series (Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity)”として刊行されてきている。わが国でも後述の如く労働衛生の観点から日本バイオアッセイ研究センターでは多数の化学物質の発がん性を検討し、厚生労働省に報告して来た。発がん性が判明した化学物質については国の指針として通達され、職業がんの予防対策として大いに役立っている。また、発がん性が認められた重要な化学物質については英文論文として公表し、日本産業衛生学会における許容濃度の設定、環境省での環境目標値の設定等に利用されている。国際的にもWHOの研究機関である国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer: IARC）、経済協力開発機構（OECD）、アメリカ環境保護庁（EPA）等の発がん性評価に利用されている。さらに、最近、過去に実施した発がん性試験の英文報告書を作成し、欧米の諸機関からの詳細なデータの問い合わせにも日本として対応できるようにした。

3 中期発がん性試験法

科学の発達とともに新しい化学物質が次から次へと環境中に送り出されてきている。これにつれて発がん性の検索を要する化学物質の数は増加の一途をたどっているのが現況であり、前述の如く、すべての化学物質について発がん性試験を実施するのは現実的に不可能である。

この課題を解決するために開発されたのが細菌や培養細胞などを用いる遺伝毒性試験、いわゆる変異原性試験であり、発がん性の短期スクリーニング試験として登場した²⁾。しかし、酸化防止剤として重用されてきた *butylated hydroxyanisole* のラットにおける発がん性が報告³⁾されて以降、多数の非遺伝毒性化学物質に発がん性が証明され、遺伝毒性と発がん性との間に乖離がある化学物質が存在することがわかった。このような状況から動物を用いる発がん性試験代替法が求められ、その研究が進められてきた。

IARCにおいてはこの点にいち早く注目し、1985年にラット肝における初期の前がん病変での酵素変異巢の発現、およびイニシエーションとプロモーションからなる発がん二段階説に基づく中期発がん性試験法、特にラット肝におけるその開発についての取組みが討議された⁴⁾。さらに1996年において、第2回とも言うべき中期発がん性試験法に関するシンポジウムが開催され、より詳細な、しかもより精度の高い方法が紹介、討議されている⁵⁾。

筆者の恩師伊東信行（名古屋市立大学名誉教授）はこの点にいち早く注目し、研究グループあげて *in vivo* 発がん代替法の確立に向けて研究を実施し、ラットを用いた中期発がん性試験法を確立した⁶⁻⁹⁾。この方法は医薬品開発についての第4回（1997年）日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）において、発がん性試験代替法の一つとして推奨され、さらに改正された医薬品非臨床試験ガイドライン（1999年）、医薬審第1607号において、発がん性検出のための *in vivo* 追加試験の1つとして挙げられている¹⁾。実際に厚生労働省において既存食品添加物等の発がんに関する安全性の見直しに利用され、天然食品添加物であるアカネ色素に発がん性があることがわかり使用禁止になった。また、医薬品、農薬等の開発にあたっての発がん性の有無確認、さらに発がん機序解明等に用いられており、高い評価を得ている。

本稿では我々が開発したラット中期発がん性試験法を紹介するとともに、同じく医薬品非臨床試験ガイドラインで挙げられている遺伝子改変動物を用いた発がん性試験代替法についても述べる。

1) ラット肝中期発がん性試験法

IARCの評価では発がん物質のうち約60%が肝に発がん性を示す。日本バイオアッセイ研究センターのデータでも66%の発がん物質が肝に標的性を示す。このことは肝を標的とする発がん検索法を確立すれば、早期に相当数の発がん物質を検出できるということを意味する。また、ラット肝がんの実験的組織発生が非常に詳細に研究されており、病理組織学的に前腫瘍性病変である肝細胞の過形成巣→腺腫→肝細胞がんに移行する変化が明らかにされている。従って肝がんの発生をもって発がん性を決定するのではなく、肝細胞の過形成巣の発生の段階で

発がん性を判定できれば実験期間を相当期間短縮できることになる。

一方、肝では発がんの二段階説による方法論が十分に研究され、比較的短期間に前腫瘍性病変を発生させる素地があった⁴⁾。その間、カナダの Farber が 4 週間の発がんモデルを 1967 年に Solt とともに発表した¹⁰⁾。もっとも、この論文はラット肝がんの前腫瘍性病変の生物学的特徴を明らかにしたものであった。我々はこの論文に着目し研究に研究を積み重ね、ラットの肝を標的とする発がん物質を検出するための中期発がん性試験法を確立した(図1)。DEN-PH 法、いわゆる伊東法といわれるものである^{6~9)}。

図1 ラット肝中期発がん性試験法
(DEN-PH 法、いわゆる伊東法)

この方法はラット雄を用い、肝発がんの二段階説に基づき、肝発がん物質である diethylnitrosamine(DEN)をイニシエーターとし、プロモーションの段階で被験物質を投与する方法である。動物の飼育期間はわずか8週間で第3週目に3分の2肝部分切除を行い、肝細胞の増殖を急速にもたらしの特長とする。この方法の確立当初は肝細胞の過形成巣を判定マーカーとして採用し、顕微鏡下で計測していたため、多大な労力を要した。しかし、その後イメージアナライザーを用い、自動的に前腫瘍性病変を定量測定することを意図し、佐藤清美教授(東北大学医学部)¹¹⁾らと共同で見いだしたラット肝の酵素変異巣である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巣(図2)が各種酵素変異巣のうちで試験法で利用する最適の変異巣であることが判明し、GST-P 陽性細胞巣を発がん性の判定マーカーとして用い、今日に至っている^{6~9)}。

本法による 313 化学物質の検索結果を表2に示す⁹⁾。肝発がん物質は遺伝毒性の有無にかかわらず92%が陽性を示す。肝発がん物質でありながら本法で陰性の結果を示したのはペルオキシジウム増生作用をもつ化学物質で、このような物質を除外すればほぼ100%の確率で被験物質の発がん性を検出することができる。伊東法は現在、産業界では医薬品、農薬メーカー等で開発品の安全性を確認するのに有用な試験法として用いられている。

図2 ラット肝臓の GST-P 陽性細胞巣

また、この方法は前述する ICH、さらに医薬品開発の非臨床試験ガイドラインにおいても発がん性試験代替法の1つとして挙げられており、毒性学のバイブルとも言うべき Caserett and Doull の Toxicology: The Basic Science of Poisons においても詳しく紹介されている¹²⁾。ただ残念なのは肝部分切除をとまなうためか、欧米での普及が進んでいないことである。

2) ラット多臓器中期発がん性試験法

前述の肝を標的とする中期発がん性試験法以外に、胃、大腸、腎、膀胱、皮膚、乳腺等を標的とする発がん性検索法が開発されている。それぞれ目的とする臓器における発がん性を証明するには適しているが、それ以外の臓器の発がん性を検出することは不可能である。本法はこの欠点を補うために発がん性の臓器標的性が未知の化学物質の発がん性を一つの実験系で総合的に検出できることを目的とした試験法で、医薬品非臨床試験ガイドラインにおいて推奨されている¹⁾。基本的に発がんの二段階説に基づくものである。動物としてラットを用い、実験期間をできる限り短くする為に腫瘍性病変のみならず、それ以前に出現する前がん病変をも判定のマーカーとする。また、一頭体のできる限り多くの主要臓器にイニシエーションをかける必要がある。

N-methyl-*N*-nitrosourea(MNU)は代謝活性化を必要としない発がん物質で、しかも、ラットの舌、前胃、腺胃、小腸、肝、肺、造血器、膀胱、乳腺、甲状腺など広範囲に発がん性を発揮する。最初に考えた MNU 法は MNU をイニシエーターとし、被験物質をプロモーションの段階に投与する系である^{5,8)}。この試験法では試験に用いた被験物質の発がん性とその臓器標的性を一応それなりに確認できたが、残念なことに早期にリンパ性白血病が発生したり、イニシエーションの強さが各臓器で均一でないことが判明し、複数の発がん物質を組み合わせた複合処理による多臓器のイニシエーションがより望ましいことになった。そこで、3種の発がん物質、すなわち MNU に加え DEN、*N*-bis(2-hydroxypropyl)-nitrosamine(DHPN)を組み合わせるイニシエーション

表2 313種類の化学物質のラット肝中期発がん性試験における陽性率(%)

被験物質の発がん性	変異原性 (Ames 試験)			
	陽性	陰性	未知	合計
肝発がん物質	30/31 (97) ¹⁾	29/33 (88) ²⁾	1/1 (100)	60/65 (92)
非肝発がん物質 ³⁾	7/26 (27)	2/15 (13)	1/2 (50)	10/43 (23)
非発がん物質	0/6 (0)	1/40 (3) ⁴⁾	0/2 (0)	1/48 (2)
未知	4/14 (29)	30/86 (35)	14/57 (25)	48/157 (31)
合計	41/77 (53)	62/174 (36)	16/62 (26)	119/313 (38)

¹⁾中期発がん性試験の結果が陰性の1物質: 4,4'-diaminodiphenylmethane

²⁾中期発がん性試験の結果が陰性の4物質: ペルオキシゼム増生作用を持つ clofibrate, di(2-ethylhexyl)adipate, di(2-ethylhexyl)phthalate, trichloroacetic acid

³⁾肝以外の臓器を標的とする発がん物質

⁴⁾中期発がん性試験の結果が陽性の1物質: malathione

させる方法を見出し^{5,8)}, さらにそれを改良し, *N*-butyl - *N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN), 1,2-dimethylhydrazine をイニシエーターとして追加するDMBDDモデルという雄性ラットを用いる多臓器中期発がん性試験法を完成させた⁵⁾(図3)。現在, 多用されている方法である。

図3 ラット多臓器中期発がん性試験法

多臓器中期発がん性試験法の基本概念ではできる限り多くの臓器で発がん性を検出できるようにしなければならない。そのためには一個体レベルでできる限り多くの臓器を均一にイニシエーションさせ, 好発がん状態にさせる必要がある。DMBDDモデルは各々の発がん物質が持つ臓器標的性, 毒性, 相互作用等から考えると複数の発がん物質の組み合わせでヒトへの外挿にあたって重要である主要な臓器を検索できる最適の方法であると考えられる。しかも, 動物の飼育期間の基本は約7ヶ月と中期検索法として妥協できる範囲内である。

以上, 肝を標的とする中期発がん性試験法(伊東法)と多臓器中期発がん性試験法について述べた。発がん物質を発がんの二段階説に基づいて分類すると, 遺伝毒性発がん物質はイニシエーション活性とプロモーション活性の両者を持ち, 非遺伝毒性発がん物質はイニシエーション活性はなく, プロモーション活性のみを有すると解釈できる。イニシエーション活性の有無はAmes等の従来の遺伝毒性試験から判断する。本中期発がん性試験法はプロモーション活性を検出する試験法である。遺伝毒

性試験と本法の結果を組み合わせることにより, 化学物質の発がん性, さらにそのリスク評価を比較的短期に行うことができる。そこで, 我々が提案している医薬品, 農薬等の新規化学物質に対する発がん性検出の判定手順を述べる。前述の如く従来の発癌物質の約60%は肝を標的とすることから, 新規化学物質の場合, 非常に検出感度のよい伊東法でスクリーニングを行い, 陽性物質は肝の発がん物質あるいはプロモーター(発がんを促進する物質)と判定し, 陰性物質についてはさらに多臓器中期発がん性試験法で検討する。あるいは直接に多臓器中期発がん性試験法を試みることもあり得る。いずれにしても陰性となった化学物質についてのみ, 従来の長期発がん性試験法を実施し, 発がん性のないことを確認する。このことによって, 開発医薬品の臨床試験等を含め, 開発の手立てを順調に企画することができる。

一方, 労働衛生の面からみても, 大量に生産され, またそれによって人が大量に曝露される化学物質は相当数に達する。それらのうち発がん性が疑われる化学物質について, 日本においては国の施策として日本バイオアッセイ研究センターで長期の発がん性試験を実施しており, 発がん性陽性と判定された化学物質に対して行政面から対策がとられている。

しかし, 前述したように検索すべき化学物質は多数ある。従って, 従来の発がん性試験を行うとともに, 中期発がん性試験を取り入れ, 発がん性を評価する新しい判断樹を提案したい(図4)。すなわち, 検討すべき化学物質に対して, 伊藤法を実施し, 陰性の場合には, さらに多臓器中期発がん性試験を実施する。この中期発がん性試験の陽性結果と遺伝毒性の有無を組み合わせ, 遺伝毒性がある場合には従来の発がん性試験を実施しないで, この時点で発がん性ありと同定する。すなわち, 遺伝毒性発がん物質と判断する。遺伝毒性陽性で中期発がん性試験が陰性の場合には, 全身全ての臓器における発がん性を決定するために, さらに従来の発がん性試験を実施し, 最終的な結論を出す。これは, 遺伝毒性物質の人への有害影響の重要性を考慮しての対応である。また, 非

図4 労働衛生における発がん物質の評価と管理に対する判断樹

遺伝毒性の場合には中期発がん性試験の結果で発がんリスクを評価し、さらに曝露評価における安全マージンを考慮し、リスク評価、リスク管理を行う。それは、閾値のある非遺伝毒性発がん物質の発がん性は一般に高用量域でみられるからである。さらに、発がん性が認められても作用モードの面から人に外挿できない場合がしばしばあるという理由による。中期発がん性試験で陰性となった非遺伝毒性物質についてはこの段階で発がん物質ではないと判定し、長期発がん性試験を実施しない。この手順を踏むことによって、早期に化学物質の発がん性をスクリーニングすることができ、より多数の化学物質の発がん性を検証することができる。

ただし、現在の多臓器中期発がん試験法では鼻腔をイニシエーションさせることができない。主として吸入試験により鼻腔に発がん性を示す化学物質を日本バイオアッセイ研究センターでは経験しており、この点を考慮した発がん検索法の追加検討が必要である。さらに雄を用いるため乳腺、子宮等の発がん性を検索できないという欠点を持っている。この点に関しては女性臓器を標的とする発がん検索法が開発されつつあり、それを併用することにより解決されうと考える。さらに二段階発がんに基づくマウスにおける中期発がん性試験を検討することも重要な課題である。これらの点に関する検証が詳細になされることが望まれる。一方、既存のデータから構造活性相関を考慮して、臓器における発がん性を推測し対処する手法も必要であろう。

最後に図4に示した労働衛生における発がん物質の評価と管理に対する判断樹は筆者の私見であることを追記する。これを採用するには国際的なハーモナイゼーションが必要かもしれない。従来の発がん性試験を実施し、化学物質の発がん性を決定することは労働衛生の面から見ても勿論必須の方法である。但し、筆者が強調したいのは多数の化学物質の発がん性を検討することが重要であり、それに対応できる方策を立てること、また、その方向性を目指すことが今後の大きな課題である。科学の

進歩とともにリスク評価の手法がかわるのは、当然である。

4 ICHにおける中期発がん性試験法の推奨

開発医薬品に関する国際会議、いわゆる ICH における合意に基づいた発がん性試験ガイドラインが作成され、中期発がん性試験法が導入された¹⁾。その内容は中期発がん性試験法として、遺伝子改変動物（トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス）を用いる発がん試験モデル、イニシエーション・プロモーション説に基づく試験モデル（前述の肝中期発がん試験法、多臓器中期発がん試験法など）、新生児動物を用いる発がん試験モデルなどである。

これを契機としてマウスの発がん性試験の代替法としての遺伝子改変マウスモデルの有用性を検証する研究が、国際的に国際生命科学協会（ILSI）の一部門である Health and Environmental Science Institute (HESI) を中心として、日本では実験動物中央研究所と製薬メーカーが共同参加して行われた。何故マウスの研究が検証されたかは、げっ歯類を用いる発がん性試験が従来はラットとマウスを用いるとするガイドラインであったが、一種の動物を用いる発がん性試験を基本とし、他の一種は中期発がん性試験でよしとなったことによる。また、マウスの発がん性試験の結果に種々の解釈がなされ、ヒトへの外挿を考えると発がん性試験としてはマウスより感受性の高いラットを中心に行うべきであろうという理由による。さらにマウスを中心に遺伝子改変動物が開発されていることも一つの理由と推測する。この項ではこれまでにおおがかりに検証されている *p53* ヘテロノックアウトマウス (*p53*^{+/-}マウス) や *rasH2* マウス等におけるこれまでの検証結果について簡単に述べる。

1) *p53*^{+/-}マウス

p53 はがん抑制遺伝子で、細胞回転の停止と細胞増殖、アポトーシス、血管新生阻害など多機能の働きをする遺伝子としてよく知られている。この *p53* の片側のアレルを人工的に欠損させた C57BL 系 *p53*^{+/-}マウスが遺伝毒性発がん物質に対して感受性が高いことがアメリカの Tennant¹³⁾ らにより報告された。我々も BBN 膀胱発がんに対して検討したところ、*p53*^{+/-}マウスは野生型の *p53*^{+/+}マウスに比較して、膀胱がんの発生が極めて高く、また病理学的に悪性度のより高い扁平上皮がんの発生が好発したことを見出した¹⁴⁾。しかし、肝発がん、大腸発がんを検索したが、それには感受性を示さなかった。ILSI-HESI での検証では例えばヒト発がん物質である Cyclophosphamide では陽性を示したものの、Phenacetin では陰性であり、従来の結果と必ずしも一致するものではなかった^{15,16)}。また、非遺伝毒性発がん物質に対しては陰性との結果が報告されている¹⁶⁾。したがって、検索モデルマウスとしては必ずしも十分ではないと思われる。しかし、その後の研究で遺伝毒性発がん物質に対する有用性を示すデータも得られており、遺伝毒

性化学物質の発がん性検出に対して用いられる可能性が残されている。

2) *ras* H2 マウス

ヒトプロト型 c-Ha-*ras* がん遺伝子を導入した遺伝子改変マウスである。Yamamoto らは遺伝毒性発がん物質での発がん感受性をいち早く報告している¹⁷⁾。ILSI-HESI の検証では Cyclophosphamide や Phenacetin は陽性結果を示した。非遺伝毒性毒物質では Diethylstilbestrol は陽性であるが、17- β -Estradiol は陰性、鎮静剤の Phenobarbital も陰性と必ずしも従来の結果と一致するものでない¹⁶⁾。現在までのところ、非遺伝毒性発がん物質では陰性の結果となっている。しかし、*ras* 遺伝子の変異はヒトのがんで比較的高率に認められており、今後も、種々の発癌物質について検証していく必要がある。

3) Tg.AC マウス, XPA^{-/-}マウス

Tg.AC マウスは v-Ha-*ras* 遺伝子を導入した遺伝子改変マウスで、特に化学物質の皮膚塗布による皮膚発がんモデルとしての有用性が指摘されている。しかし、皮膚を除く全身諸臓器の発がん性検出の検証ではよい結果が得られていない¹⁶⁾。

また、色素性乾皮症では皮膚上皮細胞の DNA 損傷修復遺伝子が欠如しており、紫外線曝露により皮膚がんが発症する。この遺伝子をノックアウトした XPA^{-/-}マウスでは遺伝毒性発がん物質に対する高感受性が期待されているが、Phenacetin では陰性であり¹⁶⁾、今後、さらに検討する必要がある。

5 動物から人への外挿

「1. はじめに」の項で、発がん性という有害性確認に関し、質的には動物間で種差がなく、量的には種差があり、また人は発がん性に対して最も感受性が高いという前提で発がん性試験を実施するということを述べた。それでは得られた動物のデータを如何に人へ外挿するかが発がん性評価で求められる。

化学物質による発がん性は他の毒性与同様、化学物質の吸収、代謝、それによる究極発がん物質の生成、分布（標的臓器）、および排泄などについて、動物と人との種差があるか否かをしっかりと理解しなければならない。発がんという現象が動物と人で質的、量的に同様におこるのか、質的には同じでも量的には差があるのか、質的に異なるのか、質的および量的にも異なるのかなどをしっかりと検証しなければならない。

すなわち、吸収、代謝等の体内動態、特に遺伝毒性という質的評価が重要となってくる。IARC の発がんクラス分類において、現在では人で発がん性が証明されていなくても、動物での発がん性が明確で、かつ、作用形式が人で十分に考えられる場合にはクラス 1 とするという定義が加わっている。すなわち、体内動態とともに質的にその発がん物質が遺伝毒性をもっているかどうか重要な判断材料となっている。ただし、ここで注意を要す

るのは発がん性を有する化学物質が遺伝毒性を示すものの、そのメカニズムが遺伝毒性によるものではなく、細胞毒性など非遺伝毒性のメカニズムを考えるべきであるという場合がある。特に高用量による発がんの場合はその可能性が高い。

動物で認められた発がん性はどのような量で発生したか、すなわち量的評価も外挿にとって重要な事項である。発がん物質といえどもアフトラキシンのように ppm レベルで発がんさせるものからパーセントレベル、サッカリン・ナトリウム塩のように 5% という高用量まで千差万別である。リスク評価、リスク管理の面では遺伝毒性発がん物質には閾値がなく（筆者は閾値があると主張する。）、非遺伝毒性発がん物質には閾値があるとして対応されている¹⁸⁾。この賛否は別にして、ここで強調したいのは非遺伝毒性発がん物質は一部を除いて一般的に高用量域でみられるという事実である。また、遺伝毒性発がん物質においても動物発がんが高用量の場合がある。

このことは人への外挿にあたってその質的評価とともに量的評価を十分に考慮すべき点である。

6 労働安全衛生法 57 条の 5 に基づく発がん性試験の結果とその活用度

労働安全衛生法は化学物質による労働者の健康障害を防止するために、事業者が化学物質の有害性調査を行うことを定めている。また、国自ら有害性の調査を実施するよう努めるとしている。労働者が曝露される化学物質の発がん性を検討するために、日本バイオアッセイ研究センターではラットとマウスを用いた発がん性試験を厚生労働省（旧労働省）の委託事業として実施し、これまでに 40 物質（吸入試験 20 物質、経口試験 20 物質）の結果を厚生労働省に報告した。これらの化学物質のうち 34 物質（吸入試験 17 物質、経口試験 17 物質）は、ラットまたはマウスに腫瘍を発生させることが判明した。驚くべきことに 85% が発がん物質である。しかし、このことはあらゆる労働環境に発がん物質があるということの意味するものではない。むしろ、発がん性試験を実施するにあたっての被験物質の選定が適切であったことを強調したい。物質選定委員の方々の見識の高さを大いに評価すべきであろう。当センターでの試験データの信頼性に関しては国内、特に国際的に高い評価を得ており、その結果は下記のように厚生労働省における労働衛生施策に活用されるとともに、国内および国外の諸機関で一般住民のがん予防のためにも利用されている。

1) 行政施策への反映

(1) 厚生労働省における労働衛生施策

厚生労働省は労働安全衛生法第 28 条第 3 項の規定に基づき「健康障害を防止するための指針」を公表し、当該化学物質の職業的曝露によるがん発生を予防するための処置を講じている。

これまでに四塩化炭素¹⁹⁾、1,2-ジクロロエタン²⁰⁾、テトラクロロエチレン、クロロホルム²¹⁾、パラ-ジクロロベンゼン²²⁾、1,1,1-トリクロロエタン、ジクロロメタン、

N,N-ジメチルホルムアミド²³⁾, 2,3-エポキシ-1-プロパノール (グリシドール), 2-ブテナール (クロトンアルデヒド), 1,4-ジオキサン, パラ-ニトロクロルベンゼン²⁴⁾, 酢酸ビニル²⁵⁾, ビフェニル^{26,27)}, アントラセン, ヒドラジーン水和物, キノリン, 1,4-ジクロロ-2-ニトロベンゼン²⁸⁾の18物質 (吸入試験10物質, 経口試験8物質) について, 指針が公表された。

(2) 環境省における有害大気汚染物質の環境目標値の設定

環境省は平成18年度に有害大気汚染物質 (4物質) の健康リスク評価を実施し, 環境目標値を提案した。このうち, クロロホルムと1,2-ジクロロエタンについては, 曝露濃度と健康影響の関係を示す報告の中で当センターで実施した試験のデータが最も科学的信頼性を有すると判断し, 当センターの試験結果を基礎にして指針値 (年平均値としてクロロホルム, 18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下; 1,2-ジクロロエタン, 1.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下) の設定を行った。

(3) 日本産業衛生学会の許容濃度等の勧告

メチルブロミドとクロロホルムの許容濃度の設定のためのデータとして利用された。

2) 国際的利用

(1) IARCにおける発がん分類

IARCは, 文献情報を収集し, 化学物質等の発がん分類を行っている。この発がん分類は世界中に公開され, 各国のがん予防に対する行政施策に用いられている。

当センターで実施した試験の中で, 四塩化炭素, 1,2-ジクロロエタン, 1,4-ジオキサン, 臭化メチルおよびクロロホルムの結果が発がん分類のために利用されている。IARCは当センターでの結果を基に, 四塩化炭素, 1,2-ジクロロエタン, 1,4-ジオキサンおよびクロロホルムは動物実験による発がん性の証拠が十分に有ると評価している。

(2) OECDにおける化学物質のリスク評価

OECDは, 高生産量物質について加盟各国の政府と企業で分担してハザードデータ, ばく露データを収集し, 初期リスク評価のためのスクリーニング用情報データセット (SIDS) を作成してきた。当センターで実施した試験の中で, パラ-ジクロルベンゼン, 1,4-ジオキサンの試験結果がこの評価に利用されている。

(3) 化学物質の安全性に関する国際計画

(International Programme on Chemical Safety : IPCS) IPCSとはWHO, 国際労働機構 (ILO) および国連環境計画 (United Nations Environmental Programme : UNEP) が共同で行っている化学物質の曝露による健康影響の評価であり, その評価資料はEnvironmental Health Criteriaとして公開されている。当センターで実施した四塩化炭素の試験結果がこの評価に利用されている。

(4) ドイツにおける職域での許容濃度の設定

ドイツでは, ドイツ学術振興協会 (Deutsche Forschungsgemeinschaft : DFG) が化学物質の健康影響に関する文献を収集, 評価することによって, 職場で

使用する化学物質の許容濃度を設定している。当センターで実施したクロロホルム, 四塩化炭素, 1,4-ジオキサンおよびパラ-ジクロルベンゼンの発がん結果が発がん性と許容濃度設定の評価のために利用されている。

(5) 米国環境保護庁 (EPA)

EPAは環境中に排出される化学物質の人に対する健康影響のリスク評価を行っており, 四塩化炭素, パラ-ジクロルベンゼンの結果についてリスク評価に使用する予定をしている。

7 終わりに

化学物質への依存度は今後, 益々高まることは確実である。それとともに化学物質への曝露とそれによる健康影響, 特になんぞ患への懸念を人々は大きく抱くであろう。したがって, より多くの化学物質の発がん性を見出し, それに対するリスク低減策をより早くとることが望まれる。そのためには中期発がん試験法の確立とその普及が必要である。一方, 人々に環境中の化学物質への曝露に対し, 過大なリスク懸念を与えないことである。ここにリスクコミュニケーションの重要性がある。

また, 今後, 単一の発がん物質への曝露による発がん影響のみでなく, それらの複合曝露による影響を知ることが重要な研究課題と考えられる。きわめて困難な作業であるが, 動物発がんの人への外挿に当たって, 複合作用の本態を解明し, さらにその作用メカニズムを理解することががん予防の進歩につながり, 結果としてそのことが社会の進歩に果たす役割は大きいと考える。

日本バイオアッセイ研究センターは, これまでに数多くの化学物質に発がん性があることを見出し, 職業がん発生の予防対策に大いに貢献してきた。しかも, データの信頼性に関しては国内・国外を問わず高い評価を得ている。発がん性試験, 特に吸入曝露によるそれをできる国内で唯一の研究機関である。今後はこれまで培った研究実績を基礎としてさらなる発がん研究の発展を期すことが望まれる。

謝 辞

本稿の作成にあたり, 日本バイオアッセイ研究センターの諸氏の協力を得たことを感謝する。

文 献

- 1) 医薬品非臨床試験研究会 監修. 医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2002. 薬事日報社; 2002.
- 2) International Agency for Research on Cancer (IARC). Long-term and Short-term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal, IARC Monographs, Suppl. 2, Lyon, France: IARC; 1980.
- 3) Ito N, Fukushima S, Hagiwara A, Shibata M, Ogiso T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. J. Natl. Cancer Inst. 1983; 70: 343-352.
- 4) International Agency for Research on Cancer (IARC). Long-term and Short-term Assays for Carcinogens: A

- Critical Appraisal. IARC Scientific publications No. 93. Lyon, France: IARC; 1986.
- 5) Shirai T, Hirose M, Ito N. Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. The Use of Short-and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation. IARC Scientific publications No. 146. Lyon, France: IARC; 1999: 251-271.
 - 6) Ito N, Tsuda H, Tatematsu M, Inoue T, Tagawa Y, Aoki T, Uwagawa S, Kagawa M, Ogiso T, Masui T, Imaida K, Fukushima S, Asamoto M. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats—An approach for a new medium-term bioassay system. *Carcinogenesis*. 1988; 9: 387-394.
 - 7) Ito N, Tatematsu M, Hasegawa R, Tsuda H. Medium-term bioassay system for detection of carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis utilizing the GST-P positive liver cell focus as an endpoint maker. *Toxicol. Pathol.* 1989; 17: 630-641.
 - 8) Ito N, Shirai T, Hasegawa R. Medium-term bioassays for carcinogens. Mechanism of Carcinogenesis in Risk Identification. IARC Scientific publications No. 116. Lyon, France: IARC; 1992: 353-388.
 - 9) Ito N, Tamano S, Shirai T. A medium-term rat liver bioassay for rapid *in vivo* detection of carcinogenic potential of chemicals. *Cancer Sci.* 2003; 94: 3-8.
 - 10) Solt D, Farber E. A new principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*. 1976; 263: 701-703.
 - 11) Sato K, Kitahara A, Satoh K, Ishikawa T, Tatematsu M, Ito N. The placental form of glutathione S-transferase as a new maker protein for preneoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Gann*. 1984; 75: 199-202.
 - 12) Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2001: 295-296.
 - 13) Tennant RW, French JE, Spalding JW. Identifying chemical carcinogens and assessing potential risk in short-term bioassays using transgenic mouse models. *Environ. Health Perspect.* 1995; 103: 942-950.
 - 14) Ozaki K, Sukata T, Yamamoto S, Uwagawa S, Seki T, Kawasaki H, Yoshitake A, Wanibuchi H, Koide A, Mori Y, Fukushima S. High susceptibility of *p53*(+/-) knockout mice in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine urinary bladder carcinogenesis and lack of frequent mutation in residual allele. *Cancer Res.* 1998; 58: 3806-3811.
 - 15) 三森国敏, 渡邊隆夫, 樫田陽子. 遺伝子改変マウスを用いた医薬品のがん原性試験. *医薬品研究*. 2001; 32: 775-786.
 - 16) Cohen SM. Alternative models for carcinogenicity testing: weight of evidence evaluations across models. *Toxicol. Pathol.* 2001; 29(Suppl): 183-190.
 - 17) Yamamoto S, Urano K, Nomura T. Validation of transgenic mice harboring the human prototype *c-Ha-ras* gene as a bioassay model for rapid carcinogenicity testing. *Toxicol. Letters*. 1998; 102-103: 473-478.
 - 18) 福島昭治, 前川昭彦. 放射線および環境化学物質による発がん, 本当に微量でも危険なのか? 佐渡俊彦, 福島昭治, 甲斐倫明 編. 医療科学社; 2005: 43-80.
 - 19) Nagano K, Sasaki T, Umeda Y, Nishizawa T, Ikawa N, Ohbayashi H, Arito H, Yamamoto S, Fukushima S. Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *Inhalation Toxicol.* 2007; 19: 1089-1103.
 - 20) Nagano K, Umeda Y, Senoh H, Gotoh K, Arito H, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity in rats and mice exposed by inhalation to 1,2-dichloroethane for two years. *J. Occup. Health.* 2006; 48: 424-436.
 - 21) Yamamoto S, Kasai T, Matsumoto M, Nishizawa T, Arito H, Nagano K, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity in rats and mice exposed to chloroform by inhalation. *J. Occup. Health.* 2002; 44: 283-293.
 - 22) Aiso S, Takeuchi T, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity in mice and rats exposed by inhalation to *para*-dichlorobenzene for two years. *J. Vet. Med, Sci.* 2005; 67: 1019-1029.
 - 23) Senoh H, Aiso S, Arito H, Nishizawa T, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity after inhalation exposure of rats and mice to *N,N*-dimethylformamide. *J. Occup. Health.* 2004; 46: 429-439.
 - 24) Matsumoto M, Aiso S, Senoh H, Yamazaki K, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity of *para*-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2006; 25: 571-584.
 - 25) Umeda Y, Matsumoto M, Yamazaki K, Ohnishi M, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity in mice and rats administered vinyl acetate monomer in drinking water. *J. Occup. Health.* 2004; 46: 87-99.
 - 26) Umeda Y, Arito H, Kano H, Ohnishi M, Matsumoto M, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Two-year study of carcinogenicity and chronic toxicity of biphenyl in rats. *J. Occup. Health.* 2002; 44: 176-183.

- 27) Umeda Y, Aiso S, Yamazaki K, Ohnishi M, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity of biphenyl in mice by two years feeding. J. Vet. Med. Sci. 2005; 67: 417-424.
- 28) Yamazaki K, Aiso S, Matsumoto M, Kano H, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T. Carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dichloro-2-nitrobenzene in rats and mice by two years feedings. Ind. Health. 2006; 44: 230-243.

Medium-term Tests for Carcinogens and Carcinogenic Hazard Evaluation for Humans

by

Shoji FUKUSHIMA^{*1}

Two-year carcinogenicity tests in rodents are known to have the disadvantages of being expensive and time-consuming. Nowadays, carcinogenicity test models called medium-term tests exist for carcinogens. One of them is based on the concept of initiation-promotion. We have established a rat liver medium-term bioassay and rat multi-organ medium-term assay, the models showing a strong indication of potential carcinogenicity. Another is a transgenic or knock-out mice carcinogenicity model. These medium-term tests are used in addition to traditional carcinogenicity studies.

Key Words: carcinogen, carcinogenic risk, Ito-method, medium-term tests for carcinogens.

^{*1} Japan Bioassay Research Center, Japan Industrial Safety and Health Association