化学物質の発癌性危険率評価の理論的背景*

吐 山 豊 秋

1. はじめに

この稿では発癌性が疑われている化学物質はどの程度の低濃度になれば安全と考えてよいかといった問題を解説する。私は癌の専門家でも統計学の専門家でもないで素人的な説明になると思うが、逆に専門家でないからこの方面の知識の少ない方にも分かるような説明が可能だとも考えている。

2. 毒性物質の体内処理

人を含めて動物は大昔から各種の毒性物質にさらされている。つまり食物と一緒に多くの毒性物質が入ってくるからである。したがって動物にはこれらの毒性物質を解毒したり排泄したりする能力が高い。

動物の排泄能力は尿が一番高いので、原則的には毒物を尿中へ排泄する。①水溶性の物質はそのまま尿中に排泄する。②水に低溶解性の物質は酸化して水酸基を増やして尿中に排泄する。③脂溶性の高い物質は酸化し、酸化した部位にグルクロン酸を結合させて水溶性物質に変えて尿中に排泄する。④高度脂溶性で酸化の困難な物質は先ず脂肪組織に取り込んで体内への毒作用を弱め、そのあと徐々に放出させて代謝し、排泄する。

一原子酸素添加酵素

ここで問題になるのは代謝における酸化で、肺から赤血球が運んできた分子酸素のうち一原子を毒物に直接結合させるといふ、かなり乱暴な酸化である。普通には毒性物質に水酸基が増えるだけであるが、時にはエポキシ化合物のような化学反応性の高い物質を生ず

る。もちろん、このエポキシ化合物は水酸基になってグルクロン酸が結合するが、一部は近くの細胞成分に共有結合してしまう。もし共有結合が細胞核内のDNAに起こるとDNAは遺伝担体であるから細胞の遺伝的性格が変わり、発癌することもある。

3. 化学発癌の機序

動物の組織細胞が癌細胞(肉腫細胞を含む腫瘍細胞)に変わるの、その細胞核の遺伝子に不活性の型で存在する発癌遺伝子が活性化するためらしい。発癌遺伝子が活性を発揮するためには細胞分裂が必要であるから、細胞寿命の短くて分裂の速い造血細胞、消化管上皮細胞などは癌が発現しやすいし、細胞寿命の長い神経細胞とか筋肉細胞では容易には癌化しない。

化学物質が細胞に働いて癌化させるためには遺伝子担体のDNAに共有結合することが必要だと考えられている。

修復機能

DNAに化学物質が共有結合してDNAが損傷されても、動物細胞にはその損傷を直ちに修復する機能がある。すなわち、その損傷部分を切り取って、元の構造を合成しなおす機構である。したがって、DNAの損傷に対しても重度でない限り修復してしまう。この修復が不十分だとか、修復にミスがあるとその細胞を癌化させる可能性がある。発癌が老令期に多いのは老令期になるとこのDNA修復能が低下するからだと言われている。

修復不全

DNAの修復ミスとか修復不全が起こった場合にはその細胞が死滅してしまうことが多い。しかし稀には遺伝的性格を変えて生存することがあり、突然変異と呼ばれている。高等動物の組織細胞の突然変異には発癌遺伝子の活性化が多く、活性化すれば細胞は周囲の組織とは無関係に増殖して癌になる(図1)。

直接発癌物質と間接発癌物質

β -プロピオラクトンのように化学反応性の強い物質が動物に投与されると、体内細胞に入って細胞核内のDNAと共有結合(アルキル化)し、癌を発生させる。この種の物質を直接発癌物質と呼んでいる。

ベンツピレンなどは体内で酸化されて化学反応性の

Toyoaki Hayama

昭和33年 東京大学大学院博士課程修了

同年 千葉大学腐敗研究所助手

41年 東京農工大学農学部教授
農学博士

* Virtually Safe Level of Carcinogen, 昭和61年6月16日受理

図1 発癌物質の発癌機構予想経過

強いエポキシ化合物などになって DNA と共有結合する。また一部の物質は酸化によってカルボニウム (CH_3^+) を生じ、DNA をメチル化する。これらの物質は体内で変化してから作用するので間接発癌物質と呼ばれる。一般に強い化学反応性物質を作る体内変化では一原子酸素添加酵素が主役を演ずる。

発癌促進物質

サッカリンなどの物質は体内ですでに癌化した細胞の増殖を促進する。この結果、癌による発病を早める。この種の物質も発癌物質に分類されている。

4. 化学物質の発癌性評価

化学物質の発癌性を評価する方法には簡便なスクリーニング法としての変異原性試験とマウス・ラットに対して生涯にわたって投与する発癌性試験がある。

変異原性試験

発癌物質のうち促進物質を除けばいずれも直接的、または間接的に細胞に働いて突然変異を起こす。したがって化学物質が突然変異を起こすか否かだけを調べれば、その物質が発癌物質である可能性をスクリーニングすることができる。細胞が化学物質によって突然変異を起こす機構は全て生物に共通であるから、なるべく単純な生物を用いる方法が簡易である。最も多く用いられる方法は Ames サルモネラ法である。

一般に細菌は糖分とアンモニウム塩などの無機塩があれば分裂増殖する。つまりその最小培地の糖を分解してエネルギーを作り、そのエネルギーで体構成成分の糖、脂質、蛋白、核酸を合成してしまう。しかし Ames サルモネラ菌はさらにヒスチジンがないと増殖できない。もし Ames 菌に化学物質を作用させ、最小培地に

培養した後に増殖したとすればその化学物質によって突然変異してヒスチジンが存在しなくても増殖する菌になったことになる。

例えば3本の試験管に Ames 菌をとり、1本に化学物質を、1本に化学物質と一原子酸素添加酵素を、1本に用いた溶媒だけを加える。一定時間後に3本のそれぞれの菌約100万個を最小培地に植えて培養する。この種の試験では溶媒対照でも100程度の菌は突然変異を起こして最小培地で増殖するので、3日後には平板培地上に100程度の白点が見えてくる。もし化学物質で処理した菌では500/平板が突然変異したとしたら、その物質によって突然変異が起こったことになり、変異原性物質に分類される。この種の物質は直接発癌物質である可能性がある。もし化学物質だけで処理した菌では対照と変わらないが、一原子酸素添加酵素と共に処理した菌だと突然変異した菌が増加したら、この場合も変異原性陽性と判定する。この種の物質は間接発癌物質である可能性がある。

発癌性試験

化学物質の発癌性を調べる試験のうち信頼性の高い試験はマウス・ラットの生涯投与試験だけである。マウスとラットでは感受性が異なるので両方を用いるし、雄と雌では感受性が異なるので両性を用いる。結局は雌雄のマウス50匹ずつに1年半投与し、雌雄のラット50匹ずつに2年間投与する。投与量には投与期間中に死亡率が高くない程度に最も高い用量とその1/3～1/5程度の2用量を与える。この外に投与しない対照群を置く。結局、マウス・ラットをそれぞれ300匹用いた長期試験であり、これだけでも化学物質1つについて1億円程度の経費が必要である。

この試験の結果、対照群にない腫瘍が発生したとか対照群にも発生する腫瘍の発生率が高くなったとかの結果が出れば発癌性物質陽性と判定される。

発癌物質の強度

Ames 法によって変異原性陽性になれば被疑発癌物質になるが、実際にはその強さは物質によって著しく異なる。しかし Ames 陽性になっただけで発癌物質として伝えられることもある。

発癌性試験でも、アフラトキシンのように飼料中に15ppbを混入してラットを飼育すると16カ月後に100%が発癌し、投与総量が0.5mg/kg 体重にしかならないような強烈な発癌物質もあるし、飼料に1%混入してラットを2年以上飼育するとやっと対照群より高い発癌率を示すような物質もある。この場合の投与総量は3～4 kg/kg 体重にもなる。したがって単に発癌物質といってもその強度には著しい相違がある。

5. 化学物質に対する生体反応の個体差

化学物質を動物に投与した時に動物に現れる反応は物質と動物種を特定すれば同じ反応が現れる。しかし一定の反応を起こすのに必要な投与量には個体差がある。つまり化学物質に対する動物の感受性は個体によって異なる。

有閾値反応

例えば100匹のマウスを10匹ずつ10群に分け、それぞれに1, 2……10mg/kg 体重を投与したとする。代表的な結果を図2に示してある。ほとんどの例では図に示すように双曲線のカーブになる。1 mg/kg では1匹も死亡しなかった。1 mg/kg 以下の感受性をもつ動物はいない。2 mg/kg では3/10が死亡しているから、30%の動物の致死感受性は1～2 mgである。3 mg/kg では50%が死亡している。2～3 mgの致死感受性を持つ動物は50-30=20%である。このようにして動物の致死感受性と用量との関係を求めると図3のように指数分布することが分かる。この型の用量反応関係ではある用量以下では反応率が事実上ゼロになるのでその用量を閾値という。例えば上の例では0.1 mg/kg では推定反応率が 10^{-8} 程度になるので無視できる。この型の反応を有閾値反応という。高等動物の化学物質に対する反応のほとんど全てが有閾値反応で

図2 マウスにおける用量死亡率曲線

図3 マウスの致死感受性個体分布

ある。

有閾値反応の成因

化学物質が生体に作用するためには作用部位との結合が必要である。この結合は一般にイオン結合とか水素結合といった弱い結合であり、可逆的である。弱い結合であるから1個の作用部位に対して1個の化学物質があればよいというわけではなく、多数の化学物質分子が必要である。また生体内の特定反応の作用部位の数も比較的少ない。例えば多くの物質が延髄の呼吸中枢を麻痺させて動物を死亡させるが、呼吸中枢には多分百万前後の細胞が共同して働いている。またクロロホルムなどは心筋を麻痺させて心臓を止めるが、心細胞数はそれ程多いわけではない。大雑把には特定の作用部位の数は $10^6 \sim 10^{12}$ 程度だと推定される。

また特定の作用部位の1個に化学物質が結合したからといって麻痺とか死亡といった反応が起こるわけでもない。特定作用部位の1～2%に結合した程度では観察できるような反応は起こらない。逆に特定作用部位の50%以上に結合すれば十分な反応が起こる。したがって、化学物質によって特定の反応を起こすには作用部位の周辺に $10^5 \sim 10^{12}$ 分子程度以上の物質分子の存在が必要であり、この数は個々の化学物質によって一定になる。しかもこの一定値の10倍程度の量があれば最強の反応を生じさせることができる。

生体内の特定の作用部位の数も、体重1 kgあたりで表現すると個体差が小さい。この数も動物の種類と化学物質の作用の種類によって決まるが、個体差は大体1桁以内に収まっており、その個体分布は一般に指数分布する（化学物質を対数にとれば正規分布する）。すなわち、化学物質を動物に投与して痙攣とか死亡といった反応を起こさせるためにはある程度の量が必要であるし、またその10倍を投与すれば全ての個体が反応する。

無閾値反応

細菌に放射線を照射し、二次培養によって細菌の生死を判定するような実験の報告は多い。その成績から放射線の照射量を横軸にとり、細菌の死亡率を縦軸にとってグラフを作ると図2の点線のように原点を通る直線になることが多い。マウスの精巣に放射線を直接照射して精子の生死を調べるような実験でも同じような結果が得られるらしい。

化学物質による発癌でもこのようなことが起こる。図4は1万2千匹のマウスを飼育して発癌物質2-AAF(2-アセチルアミノフルオレン)の発癌性を調べた実験の結果である。この物質による膀胱癌の発生率は飼料中濃度75ppm以下ではゼロになっており、それ以上の濃度の発癌率曲線も双曲線様になっている

図4 マウスにおける2-AAF 発癌の用量反応曲線
(Bruce *et al.*, Fundam Appl Toxicol. 1, 127, 1981)

から有域値反応である。しかし肝癌の発生率曲線は直線的であり、その延長は原点を通るように見える。

少なくとも理屈の上ではこの種の用量反応曲線では用量を1/100にしても反応率が1/100になるだけであり、どんな低用量でもそれ相当の低い発生率が出るはずである。このような用量反応率関係を低濃度直線性 (low dose linearity, LDL) と呼んでおり、“発癌物質は1分子でも危険である”と主張する人達の論拠になっている。

無閾値反応の成因

前述のように、生体反応のほとんどは作用部位の数%に化学物質が結合しないと発現しないし、その反応は可逆的である。しかし生体内の1個の細胞のDNAが共有結合によって損傷され、癌化するような反応では話が違って来る。この場合ではDNAの1カ所が損傷されればよいし、共有結合であるから非可逆的である。1個の癌細胞でも増殖すれば反応になりうるから無閾値反応が起こってもおかしくはない。

実際には直接発癌物質が胃腸管粘膜上皮細胞を癌化させる過程を考えても、消化による損失があり、細胞膜と核膜を通して細胞核内に入る必要があり、DNAをアルキル化してもDNA修復機能によってスクリーニングされる。したがって十分低濃度では無反応になる閾値が存在するはずであるが、それがどの程度の低濃度であるかは予想できない。間接発癌物質ではさらに酵素反応を受けなければならず、さらに化学反応性代謝産物は短命な物質であるから閾値がさらに高くなるはずである。発癌促進物質ではその機序が他の生物反応と類似するので有域値反応だと考えて差し支えない。

低濃度反応率の観察

発癌物質の用量反応率に直線性が観察されるのは高用量でだけである。低用量でどのような反応率になるかを観察することは極めて難しい。

例えば、ある物質を飼料中に100ppm添加して100匹

のラットを2年間飼育して発癌率がゼロであったとする。この0/100の結果から100ppmの発癌率の99%信頼限界上限を求めてみる。

$$(1 - P)^{100} = 0.01$$

$$100 \log(1 - P) = \log 0.01 = -2$$

$$\log(1 - P) = -0.02 = 9.98 - 10$$

$$1 - P = 0.955, P = 0.045$$

すなわち母数の信頼限界上限は4.5%である。換言すれば100匹の動物で1匹も発癌しなくても4.5%の発癌の可能性はある。つまり、低用量での低い反応率を証明しようとすれば膨大な数の動物で試験しなければならないことになる。

化学物質の一般的な発癌試験では1群50匹であり、比較的高い2~3の用量で試験する。したがって、その結果は低濃度の安全性を保証することとはほど遠い。前述した1万2千匹を用いた試験は研究費の潤沢な国でも10年に1度しかできないような実験である。

6. 許容濃度の設定方法

上述したように化学物質の低用量を動物に与えた時の安全性を実験的に証明することは困難であり、このことは有閾値反応でも例外ではない。したがって、はっきり反応の見られる高い用量と、一応反応が見られないくらい低い用量から外挿して安全濃度を求める方法が一般的に用いられている。

有閾値反応の安全濃度

古くから設定されている許容濃度基準としては労働衛生での作業場許容濃度 (TLV, threshold limit value) とか食品衛生での一日摂取許容量 (ADI, acceptable daily intake) などが知られている。これらの基準では発癌性以外の毒性を対象として、その毒性から労働者とか消費者を守る基準になっている。

いずれの基準でも、発癌性が問題にならない物質の許容濃度設定の手順は類似している。先ず対象になる物質の毒性情報を集める。もしラットに対する肝毒性が最も強い毒性で、100mg/kg/日の連続投与で弱い毒性が認められ、50mg/kg/日では毒性が観察されなかったとする。この結果から50mg/kg/日を最大無作用濃度 (NOAEL, no observed adverse effect level) と判定する。

有閾値反応では用量を1桁下げると発生率が 10^{-6} ~ 10^{-8} 以下になるので、5 mg/kg/日なら十分安全である。しかしラットのデータから人への外挿でもあるから、もう1桁安全をとって0.5mg/kg/日を安全濃度とし、これを空气中濃度とか食品中濃度に換算して許容濃度とする。

化学物質によって、毒性情報が不十分であるとか、

催奇形性のような重大な毒性のある場合には安全係数を100から200~1,000に高めて計算する。

発癌物質の実質安全濃度

変異原性や発癌性が陽性だとか疑陽性と判定された化学物質は非常に多くなってきた。その1つの原因は米国連邦政府が国策として化学物質安全性の総点検作業(National Toxicology Program)を進めているからである。ECとか日本でもこの関係の予算が多くなっている。

これらの化学物質を市場とか環境から完全に追放することは極めて困難であるし、また社会的損失も大きい。したがって、特に危険性の高い物質は排除されるべきだとしても、有用性の高い物質とか変異原性・発癌性の弱い物質では食品中や環境中濃度が危険性のない濃度以下に止まるように製造・使用の方が社会的利益が大きい。このためには危険性のある物質がどの程度の濃度であれば十分安全であるといえるのかの推定値が必要になる。この推定値は人が生涯にわたって暴露を受けても危険性がほとんど考えられない食品中、飲水中、空气中濃度で表すので実質安全濃度(VSL, virtually safe level)と呼ばれている。

直線外挿法

法律に発癌物質を使用してもよいと記載されている例は恐らく米国連邦食品医薬品化粧品法の動物用医薬品・飼料添加物の条項だけだと思う。この法律では食料生産用動物(牛, 豚, 鶏など)に発癌物質を用いるときは、その由来食品に残留してはならないと規定している。法の施行規則には由来食品中残留が実質安全濃度以下であることと、その実質安全濃度を直線外挿法で求めることを要求している。

化学物質による発癌反応には閾値が認められないことがあり、低濃度における直線性が予想されることを前節で述べた。またおそらく低濃度では閾値が存在するが実験的に証明することは不可能であることを述べた。法の施行官庁である食品医薬品庁(FDA)はこのような状況を考慮し、実験動物における発癌試験の結果を低濃度へ直線を外挿し、無視できる確率になった濃度を実質安全濃度にするとして規定した。無視できる確率とは 10^{-6} だと記載されている。

10^{-6} の意義: 発癌確率が百万分の1ということは、その物質を用いていれば百万人に1人が発癌するという意味ではない。安全濃度を求めるのに基礎となる数値は実験動物で求めた発癌率から統計的に求めた95~99%信頼限界上限値である(FDAは95%を採用)。実験例数が少ないのでこの値はかなり高目の値になる。第2にどんな低濃度でも閾値はないとの前提で計算しているので、理論上の最も低い値になる。

このことは他の発癌物質で発癌の可能性を百万分の1上げる条件と比較するとよく理解できる。

- ① シガレットを1.4本喫う
- ② 喫煙者と2カ月間同じ屋根の下に住む
- ③ 管理の行き届いた病院でX線写真を1枚撮らせる
- ④ ピーナツバターを大さじ40杯食べる
- ⑤ 塩ビ容器入りのソフトドリンクを1万本飲む
- ⑥ 塩ビ製造工場の近くに20年住む
- ⑦ 原子力発電所の50km以内に15年住む

つまり化学物質の実質安全濃度はその濃度を生涯にわたって毎日摂取し続ければシガレット1本半喫ったのと同じ危険性があるという数字である。

計算の方法: 直線外挿法による計算方法は簡単である。例えば100ppmの投与群で200匹中60匹が発癌し、対照群では同じ癌が200匹中20匹に発生したとする。対照群の分を補正して試験群発生率の99%信頼限界上限を求めると

$$0.3 - 0.1 + 2.327 \left(\frac{0.3 \times 0.7}{200} \times \frac{0.1 \times 0.9}{200} \right)^{1/2} = 0.29$$

ただし、2.327は正規分布で確率が99%になる値

$$S_0 = \frac{10^{-6} \times 100}{0.29} \text{ ppm} = 3.4 \times 10^{-4} \text{ ppm} = 0.34 \text{ ppb}$$

その他のモデル

直線外挿法によって計算されたVSL(実質安全濃度)は極めて低くなるので、実用性に疑問がある。強力な直接発癌物質ならともかく、中程度から弱い発癌物質のVSLの計算にもこのモデルを用いる強い論拠があるわけではない。

図5に直線外挿法と有閾値反応の低濃度外挿に用いるプロビット法を比較してある。直線外挿法より厳格(conservative)な外挿法を主張している研究者はいないし、プロビット法で十分だと考えている研究者もいない。無視できる確率としても、社会的同意が得られる確率は 10^{-6} だと主張する研究者もあるし、 10^{-5} でも説得力があると考えている研究者もある。したがって、図に示したこの間の部分がno-man's-land(両軍陣地の間の土地、または婦人部隊の兵舎)と呼ばれており、統計学者の草刈場になっている。すなわちVSLがこの内の値になり、説得力があり、実用性の高いモデルが多く統計学者によって提案されていて、その数は十指に余る。

この種のモデルのうち有名なモデルだけでもLogitモデル、Mantel-Brayan法、 γ -マルチヒットモデル、Armitage-Dollモデル、ワンヒットモデル、Crumpマルチステージモデル、Weibullモデルなどがある。このうちWeibullモデルは発癌試験で得られた用量反応

図5 直線外挿法とプロビット法で求めた実質安全濃度（実験動物飼料中濃度100ppmでの発癌率の95%信頼限界上限が0.3(30%)のとき）

曲線の傾斜によって外挿する直線を選択する手法であり、実務家の間では評価が高い。

潜伏期モデル

前節に挙げた計算法はいずれも発癌危険率をどの程度に下げたら実質的に安全であるか論じ、安全濃度を計算する方法であるから、一般に悉無モデル（dichotomous model）とか用量反応モデル（dose response model）と呼ばれている。潜伏期モデル（time to response model）と呼ばれる計算法は最初の発想法から悉無型とはまったく異なる。

図6はマウスに2-AAFを飼料添加投与した時の各投与群の発癌の時間経過である。一般に図のように高用量群では早期に発癌し、用量が低くなるほど遅く発癌する。反応率と用量と発症時間との関係を調べてみると次式に適合する。

反応率(NED) = $a + b \log [\text{用量}] + c \log [\text{潜伏期}]$
ただし、a, b, cは被験物質と用量で決まる定数。試験

図6 マウスにおける2-AAF膀胱癌発生率の時間経過 (Bruce *et al*, *ibid*)

で得られた数値を代入して反応率を固定すれば用量と時間の一次式が得られるので、長期間の連続投与を続けても極めて低い反応率になる用量を求めればVSLになる。

このモデルは統計学者には評価の高いモデルであるが、生物の立場から見ると頭をかしげたくなる点の多いモデルでもある。化学物質を製造する企業の人達には評判がよい。それは比較的高いVSLが算出されるためでもあるが、“百万人に1人が癌になるかもしれない”というより、“癌になるには千年以上かかります”という方が説得力が強いと感じているからである。

文 献

- 白須泰彦, 吐山豊秋 (1982) 毒性学概論, 199pp. 朝倉書店.
吐山豊秋 (1983) 残留薬剤・化学物質の許容濃度, 219pp. 栗飯原景昭, 内山充(編)食品の安全性評価, 学会出版センター.

わが国でこの方面の研究に携わっておられる方は比較的少ない。統計学者としては文部省数理統計研究所の柳本武美先生、産業廃棄物安全性関係では国立公衆衛生院の田中護先生、食品衛生関係では国立衛生試験所の内山充先生が指導的な方々である。医学・薬学系の衛生学者・病理学者にも造詣の深い方々がおられる。