最近の発がん性評価法について

高橋 道人

Michihito TAKAHASHI : Recent advance on risk assessment of carcinogenicity

種々の物質の発がん性試験は、げっ歯類2種の動物を用いて長期に投与し、腫瘍発生の状況を調べる方法がとられてきた。現在まで多くの知見が蓄積されると共に、変異原性試験の改良、発がんメカニズムの解析、短・中期発がん性試験の開発等、評価のための手法の進歩と相まって発がん性についての理解が深まってきた。その結果、大別して発がん性を示す物質には遺伝子傷害性発がん物質 (genotoxic carcinogen) と非遺伝子傷害性発がん物質 (non-genotoxic carcinogen) が存在することが明らかになった。とくに、非遺伝子傷害性発がん物質の存在は、長期発がん性試験の評価においても問題を提起し、発がん性試験そのものについても再考を求める意見が示されている。

1990年から始まった ICH では、医薬品として開発される非遺伝子傷害性物質については2種の動物を用いた発がん性試験を実施する妥当性は必ずしもないという結論に達した。しかし、長期発がん性試験を1種のみでよいとするには合意が得られず、結局、1種の長期試験と、現在開発中の各種 *in vivo* 短・中期発がん性試験法を組み合わせるという案で合意がなされた。

最近の発がん性評価は、その結果が陽性あるいは擬陽性の物質について遺伝子傷害性か非遺伝子傷害性であるかどうか、同時に直接あるいは間接な作用かを考慮し、動物に腫瘍発生を認めた原因が何か、そのメカニズムを研究することが必要とされている。

しかし非遺伝子傷害性物質については、腫瘍発生が有意に増加した場合、それが自然発生腫瘍の増加であったり、二次的な影響や、高用量投与による細胞毒性に起因するもの、げっ歯類特有の変化に起因する場合が多い。これらのメカニズムによる発がんはいずれも閾値の設定が可能であり、用語本来の「DNA に傷をつけることのないメカニズムによる発がん」という意味では必ずしもなく「閾値の設定が可能な発がん」という意味で用いられている。言い換えると非遺伝子傷害性発がん物質の場合でも、高用量ではその物質の直接的な作用ではなく二次的に DNA に傷をつけたリ adduct を形成することもあり、決して変異原性試験の結果のみによって分類しているのではないことを注意すべきである。勿論、変異原性試験が陰性の場合には、多くの場合、非遺伝子傷害性物質と分類することができるが、変異原性が陽性の場合においても、時には主たる発がんメカニズムがその物質の直接的な DNA 傷害ではなく非遺伝子傷害性メカニズムによる可能があり得るのである。

非遺伝子傷害性物質において発生した発がんが非遺伝子傷害性メカニズムによるものかどうかを証明するのは容易なことではないが、発がんのみられる用量とそれ以下の用量との関連性を見いだすことはそれほど難しいことではない。特にそのメカニズムが想定されるような場合には、それに関連した鋭敏なパラメーターを選択することによってその用量以下では、そのパラメーターに影響がないことを証明でき、それによって閾値の設定が可能となる。閾値が設定できれば発がん性物質としてではなく通常物質として ADI (一日許容摂取量) を求めることも可能となる。例えば、P 450

誘導物質の場合、種々の薬物代謝酵素の誘導と用量相関を証明できれば、無影響量を求めることが可能である。また、ペルオキシソーム増生作用がある物質では、ペルオキシソームの増生をパラメーターにすれば、用量との関連性を明確に認識することができる。メカニズムが明らかでない物質でも、多くの場合、細胞増殖活性をパラメーターにすると発がん性との相関性が高いとされる。発がんの見られる用量で標的臓器（腫瘍部位を除く）に細胞増殖活性がみられ、それよりも低い用量では活性がないことが証明できれば、閾値の設定が可能なが多い。絶対的な確定が出来ないことから、これらの評価には weight-of-evidence (科学的根拠の積み重ね) という考え方が好んで用いられるが、これはその時点で得られるあらゆるデータを科学的に判断して評価するということである。

このように発がん性の評価の方法は変貌しつつあるが、今もって遺伝子傷害性発がん物質の定義が明確でないことから、そのような物質の場合には、閾値がないかもしれないとして発がん性評価を行うという考え方が保守的に続けられている。今後、適切なトランスジェニック動物等や新しい分子生物学的手法を用いることにより、化合物の1分子がDNAに傷をつける確率という考え方から脱皮できる新しい評価法が確立され提案される日が来るかもしれない。

一例として今回、医薬品・食品添加物・化粧品等に広く用いられ、マウスの発がん性試験で甲状腺腫瘍が発生したコウジ酸について、その甲状腺腫瘍発生メカニズムを解析する実験を行ったので紹介する。

コウジ酸は *Aspergillus* 類から生成抽出されたチロシナーゼ阻害作用を有する物質であり、エビ・カニ類等水産物の変色防止目的での品質改良剤としてやバナナ・カット野菜など農産物、品質保持剤として使用されている。変異原性は Ames 試験で弱い陽性所見の報告があるが、他の変異原性試験では陰性である。マウスにおいて甲状腺腫瘍を発生させるがラットでは不明なので、まずラットにおいても甲状腺に対する作用の有無を確認する目的で、ラット甲状腺二段階発癌モデルを用いて、コウジ酸の甲状腺腫瘍プロモーション作用について検討した。

実験方法は6週齢の雄F344ラットにイニシエーション処置として甲状腺発ガン物質である Diisopropanolnitrosamine (DHPN) を生理食塩水に溶解し 2800 mg/kg 量を一回背部皮下に投与した。投与一週間後に第1群には4%、2群には2%および第3群には対照として0%のコウジ酸を含有した粉末飼料を自由に与えた。コウジ酸の投与開始後1, 2, 4, 8 および 12 週目に各群5匹ずつ経時的に屠殺した。第4群は無処置対照群とし同様に経時的に4匹ずつ屠殺した。各解剖時には体重、甲状腺、下垂体、肝臓の重量を測定、麻酔下で腹部大動脈より採血した血清を用い血中甲状腺ホルモン (T3, T4, TSH)、凍結肝組織での UDP-GT 活性 (2 および 4 週目のみ) を測定すると共に病理組織学的検索を行った。

結果はコウジ酸投与群では投与1週目から体重の増加抑制が用量相関性に実験終了時まで見られ、1週目の2%以外の群では DHPN 単独投与に比べ有意の減少だった(図1)。甲状腺の絶対重量では投与2週目から有意に増加した。相対重量では投与1週間から有意に増加し、終了までその傾向は続いた。しかし、1群と2群の間に差はなかった(図2)。肝臓の絶対重量は体重増加抑制が投与群で認められたため、2週以降の4%群で減少したが、相対重量はいずれの時期においても各投与群で増加する傾向が認められた。2週と4週に測定した肝 T4UDP-GT 値はコウジ酸投与群において有意な変動は見られなかった(図3)。血清 T3/T4・TSH 値は投与全期間のコウジ酸投与群で T3/T4 の有意に減少、TSH の有意の増加が認められた(図4)。病理組織学的に甲状腺の増殖性病変はコウジ酸投与群で4週目から誘発され、2%群では全例に発生し腫瘍60%過形成40%、4%群では過形成のみ60%であった。投与8週目では2%群で100%、4%群20%で腫瘍が、4%群の80%で過形成が認められた。12週目では2%群は100%、4%群では60%に腫瘍が、4%群の40%に過形

Fig. 1 体重の推移

Fig. 2 甲状腺重量の推移

成が認められた (図 5)。

以上の結果をまとめると、甲状腺発ガン物質である DHPN をイニシエーション処置後、コウジ酸を 2 あるいは 4% 飼料に添加しラットに 12 週間投与したところ、投与初期より体重の増加抑制が認められ、特に 4% 群で顕著であった。各時期の血中甲状腺ホルモン (T 3/T 4) は減少し、TSH は顕著に増加した。甲状腺の重量は投与 1 週目から増加し、投与期間と共に増加した。投与 4 週目から

Fig. 3 肝重量および T₄UDP-GT 活性

Fig. 4 甲状腺ホルモンの推移

は甲状腺腫瘍の発生が認められた。肝重量は4%群で増加した時期もあったが、T₄ UDP-GT の増加は認められなかった。これらの結果よりコウジ酸はラット甲状腺腫瘍発生に対してプロモーション作用を有することが示された。そのメカニズムとしては血中 T₃/T₄ の低下によるネガティブフィードバックが関与していることが示唆された (図6)。しかし、血中甲状腺ホルモン(T₃/T₄)を減少させる作用メカニズムは不明であり、コウジ酸は結果として血中 TSH を増加させ、その刺激で甲状腺腫瘍を誘発させたと考えられ、真の解析は次の実験にゆだねることになる。コウジ酸単独

Fig. 5 甲状腺増殖性病変の発生頻度

Fig. 6 甲状腺物質の作用部位

投与による甲状腺機能に及ぼす作用メカニズムとその用量相関を検討する目的で、コウジ酸を2, 0.5, 0.125, 0.03, 0.008, 0%飼料に混じ6週齢雄F344ラットに4週間自由に与えた。甲状腺重量は0.125%以上のコウジ酸投与群で絶・相対重量とも有意に増加した。しかし、血中甲状腺ホルモンT3は2%群で減少したものの、0.5%群では増加し、他の群では変動がなかった。T4は2%と0.125%群で減少したが2%群を除き用量相関性はなかった。TSH値も2%群で有意に増加した他は変動は認められなかった(表1)。しかし、甲状腺へのヨード取り込み率は用量相関性を持ってコウジ酸投与群で低下していた。甲状腺組織内でホルモン合成に関与する指標として有機化を測定したが、2%群以外は変動が見られなかった(表2)。病理組織学的には甲状腺濾胞上皮の肥大やコロ

Table 1 甲状腺重量と甲状腺関連ホルモンの推移

コウジ酸濃度 (%)	甲状腺重量		甲状腺ホルモン		
	絶対重量(mg)	相対重量(mg/%)	T 3(mg/ml)	T 4(ug/dl)	TSH (ng/ml)
2	119.4±22.3***	53.6±8.9**	0.364±0.129**	1.71±0.41**	29.08±10.41*
0.5	30.2±2.8**	13.0±1.3**	0.723±0.061*	3.35±0.31	8.80±2.27
0.125	16.8±1.3**	7.1±0.4**	0.582±0.066	3.33±0.12*	7.15±0.44
0.03	13.6±1.1	5.6±0.5	0.618±0.063	3.52±0.26	5.90±1.09
0.008	12.4±1.8	5.3±0.6	0.573±0.117	3.62±0.23	5.84±1.15
0	12.2±1.3	5.2±0.5	0.606±0.085	3.70±0.27	6.82±0.69

* : 平均±S.D; **, *: コウジ酸 0 % に比し有意 : $p < 0.05$, 0.01

Table 2 甲状腺へのヨード¹²⁵I 取り込みと有機化率

コウジ酸濃度 (%)	ヨード取り込み		有機化率 (%)
	kcpm	%Control	
2	3.86±0.18***	15.1±0.7	39.7±10.7**
0.5	7.97±2.64**	31.1±10.3	74.2±4.9
0.125	11.9±1.06**	46.5±4.1	73.2±2.7
0.03	15.6±3.42**	60.9±13.4	76.0±1.3
0.008	20.0±4.73	78.1±18.5	79.5±5.5
0	25.6±3.67	100.0	73.5±5.1

* : 平均±S.D; **, *: コウジ酸 0 % に比し有意 : $p < 0.01$

Table 3 甲状腺の病理組織学的所見

所見	コウジ酸濃度 (%)					
	0	0.008	0.03	0.125	0.5	2
動物数	5	5	5	5	5	5
ろ胞上皮肥大	0	0	4	5	5	5
コロイド減少	0	0	4	5	5	5
被膜の繊維化	0	0	0	0	0	5

イドの減少が 0.03% 以上の投与群で認められた。皮膜の繊維性肥厚は 2% 群のみで認められた。なお、増殖性病変はどの群でも発生しなかった(表 3)。以上の結果のように、コウジ酸単独でラットに投与することにより種々のパラメータで変化が認められるが、各種変化と用量は一致しなかった。そこで、どのパラメータが毒性評価の指標となり得るかは、パラメータの種類と質によって異なり、必ずしも最小容量での変化が的確とは言えない。コウジ酸の今回の実験の場合は、現象として現れた変動値と、それが原因として発現したと思われる病理組織学的変化の合致する用量がコウジ酸の閾値として算出されることになる。このように、コウジ酸は動物発がん性試験で甲状腺腫瘍を誘発したが、その後のメカニズム試験で作用メカニズムが解析され、用量反応が明確に出来れば閾値が設定する事が可能である。

#実験データは

第 24 回日本毒科学会学術年会（東京）

第 56 回日本癌学会総会（京都）で発表。