

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol.13 No.3 1991

環境変異原研究

第 13 卷 第 3 号 1991年

目 次

日本環境変異原学会主催第 3 回公開シンポジウム

「発がん物質の検索法」

第 3 回公開シンポジウム特集号の発刊によせて	若林 敬二……………	277
短期検索法の有用性と問題点		
1. 微生物変異原性試験	松島泰次郎……………	279
2. 染色体異常試験	石館 基……………	285
中期検索法の有用性と問題点		
1. 肝発がん物質試験法	伊東信行, 長谷川良平, 増井恒夫……………	295
2. 胃および膀胱発がん物質試験法	福島 昭治……………	301
新しい試験法		
1. ミュータント (NAR, LEC) ラット	長尾美奈子, 落合雅子, 曾根秀子……………	309
2. トランスジェニックマウス	勝木元也, 木村 稔, 斎藤温彦……………	315
長期検索法		
1. 単一物質の発がん実験結果の意味するもの	若林 敬二……………	323
2. 複数物質の組み合わせによる発がん性の変化	白井智之, 玉野静光, 萩原昭裕, 増井恒夫, 伊東信行……………	329
3. 発がん物質のリスク評価	林 裕造……………	339

日本学術会議だより……………	345
----------------	-----

付 記

日本環境変異原学会 会 則……………	349
” 役 員 名 簿……………	350
” 評 議 員 名 簿……………	351
” 入会申し込み書……………	352
” 住所・所属等変更届……………	354

第3回公開シンポジウム特集号の発刊によせて

シンポジウム世話人 国立がんセンター研究所 若林 敬二

平成3年5月31日(金)に、日本環境変異原学会主催による第3回公開シンポジウム「発がん物質の検索法」がヤクルトホール(東京・新橋)にて開催されました。参加者数は400名を越え、盛会かつ有意義なシンポジウムであったと考えます。環境中の発がん物質を検索し、ヒト発がんへのリスクを評価することは、がん予防の見地から非常に重要な事であります。しかし、発がん物質のリスク評価には多くの難題、また未解決な問題があります。シンポジウムでは、発がん物質の検索法の現況と今後の課題について数多くの意見が発表されるとともに、活発な討論が繰り広げられました。ここに、シンポジウムの内容が「環境変異原研究」の特集号に掲載されることは、本学会員の有益な資料になるものと確信致します。

本特集号の発刊にあたり、御助力、御協力いただきましたシンポジストの先生方、編集委員の方々、又、シンポジウムの運営に携わった関係諸氏に深謝致します。

短期検索法の有用性と問題点

——微生物変異原性試験——

日本バイオアッセイ研究センター 松 島 泰次郎

微生物変異原性試験は、環境中の変異原物質の検索や遺伝子毒性癌原物質 (Genotoxic Carcinogen) の予測に用いられているだけでなく、化学物質の安全性・有害性の調査、変異原・癌原物質の分離精製、変異原・癌原物質の代謝や代謝物の分離同定、環境汚染物質のモニタリング、変異原・癌原物質へのヒト曝露のモニタリング等に用いられている。特にサルモネラを用いるエームス試験は世界中で2,000以上の研究室で広く用いられていると云われている。

この方法が紹介されたときには、エームス試験法は典型的な発癌物質に対して高い精度で陽性の結果を示し、また非発癌物質の数多くには陰性の結果を示し、癌原物質の可能性のある物質を予測するには簡便で経済的で、3日という短い日数で再現性良く結果を出せるので、有効な手段として広く用いられるようになった。事実この試験法を用いて、アミノ酸、蛋白質、蛋白性食品の加熱物より新しい変異原物質が分離同定された。これらの変異原物質は動物発癌実験で発癌性が証明されており、変異原性試験で遺伝子毒性癌原物質が予測出来ることが示された。

一方アメリカで National Toxicology Program (NTP) により化学物質の発癌性をラット、マウスを用いた2年間の試験で調べた結果が累積してくると、発癌物質のなかに変異原性を示さない物質が数多く見つかって来た。特にサルモネラ試験では陰性であるが、発癌性を示す物質が種々みつかって来て、微生物変異原性試験の癌原性予測に疑問がなげられて来た。Ashby と Tennant は

NTP が報告した 301 種類の化学物質の結果を解析して、発癌物質 162 種類のうちサルモネラ試験で陽性の結果を示した物質が 56% に過ぎないことを明らかにした (Ashby and Tennant, 1991)。ラット、マウスの両方に発癌性を示した 82 種の発癌物質ではサルモネラ試験の陽性率は 70% とよくなるが、ラットまたはマウスだけに発癌性を示した 80 種の発癌物質ではサルモネラ試験の陽性率は 43% と低くなる。サルモネラ試験による発癌物質の予測は単なる偶然ということになる。然し個々の発癌物質の構造を分析して、その化学構造に DNA 損傷性の反応基(そのまま、又は代謝活性化を受けて DNA に損傷を与える)の有無と発癌性との間の関係を調べてみると、サルモネラ試験と同様の傾向が認められた。発癌物質はその発癌機構からも DNA に損傷を与える遺伝子毒性発癌物質と、それ以外の非遺伝子毒性発癌物質に大別される。DNA 損傷性の化学構造を持つ 105 種の発癌物質は 84% がサルモネラ試験に陽性で、そのうちラットとマウスの両方に発癌性を示す 58 種の発癌物質は 93% がサルモネラ試験で陽性を示すことを明らかにしている。DNA 損傷性の化学構造を持たない 57 種の発癌物質は 4% だけがサルモネラ試験に陽性の結果を示すに過ぎなかった。サルモネラ試験は遺伝子毒性発癌物質を予測するには有効な手段と云える。

我が国では労働安全衛生法を改正して 1979 年 7 月より、労働環境で取扱われる総ての新規化学物質は、その名称、物理化学的諸性質等を労働省に届出するときに、その新規化学物質の有害性を

〒257 神奈川県秦野市平沢 2445

Utility and problems of short-term assay—Microbial mutation assay—

Taijiro Matsushima

Japan Bioassay Laboratory, 2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257, Japan

Table 1. 精度管理調査 (1987-1990) で各試験機関でのサルモネラ TA100 と TA98 の 4NQO に対する比変異原性の値の範囲

		No.	His ⁺ /μg 4NQO	
			TA100	TA98
Preincubation	1987	20	15700 - 2640	2500 - 616
	1988	27	18600 - 3400	2780 - 400
	1989	23	19200 - 3700	2680 - 220
	1990	22	15500 - 1390	1780 - 720
Plate	1987	9	23600 - 880	1570 - 313
	1988	6	10300 - 2430	1600 - 464
	1989	8	18500 - 2810	1630 - 340
	1990	13	19200 - 3520	2050 - 160

微生物変異原性試験で調べた結果を同時に届出ることになっている。既に 4,000 種以上の化学物質について微生物変異原性試験が実施されている。その試験結果を分析すると、新規化学物質（化学合成過程で使用する原材料、中間物、最終産物、副生物、廃棄物等の総ての化学物質）の約 13% が変異原性の強弱はあるが、陽性の結果を示している (Matsushima, 1990)。総数の約 3% (変異原物質全体の約 1/4) が 1 mg 当り 1,000 以上の復帰変異株を誘発する比変異原性を示した。昔は単に定性的な変異原性の有無が問題となったが、現在では変異原性の強さが問題となり定量的に取扱われる様になっている。

微生物変異原性試験を実施する機関毎に同じ物質の変異原性の強さが異なってくると、変異原性の強弱により化学物質の取扱いについて規制を設けようとした場合に問題になる。労働省は変異原性試験の精度管理という委託試験を 1986 年以来実施して来た。同一 lot の検体を配布してガイドラインで示されている 5 種類の菌株で試験で実施してもらって来た。代謝活性化を必要としない検体 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) についても、サルモネラ TA1535 と 1537 で変異原性を示さない試験機関が 2, 3 存在した。また TA100 と

TA98 に対する比変異原性の強さを比較すると、Table 1 に示す様に一番低いところと一番高いところとの間には大きな差があることが判明した。毎年 30 前後の試験機関が参加し、毎年異なった試験機関が参加して試験を実施した結果を比較検討すると、実験を実施した年によって異なるが、Plate 法では TA100 で 4.2 倍から 27 倍迄の開きが、TA98 で 3.4 倍から 13 倍の開きがあった。Preincubation 法では TA100 で 5.2 倍から 11 倍、TA98 で 2.5 倍から 12 倍と大きな差が認められた。極端な例を除外しても約 3~6 倍の差があることになる。なにがこの差の原因なのか。テストに用いた試験菌株に問題があるのだろうか。前培養条件に問題があるのだろうか。試験条件に問題があるのだろうか。結果を定量的に取扱う上で、試験機関毎に大きな差があるのでは問題である。

微生物変異原試験を受託している試験機関の連絡協議会では協同研究を実施した。東大医科研で前培養したサルモネラ TA98 と TA100 の菌培養液を分注凍結して各試験機関に送付した。各試験機関では送られて来た対照菌株と各々の試験機関で保有している自社菌株とを、同じ日に同一条件で前培養する。各試験機関に配布した同一 lot

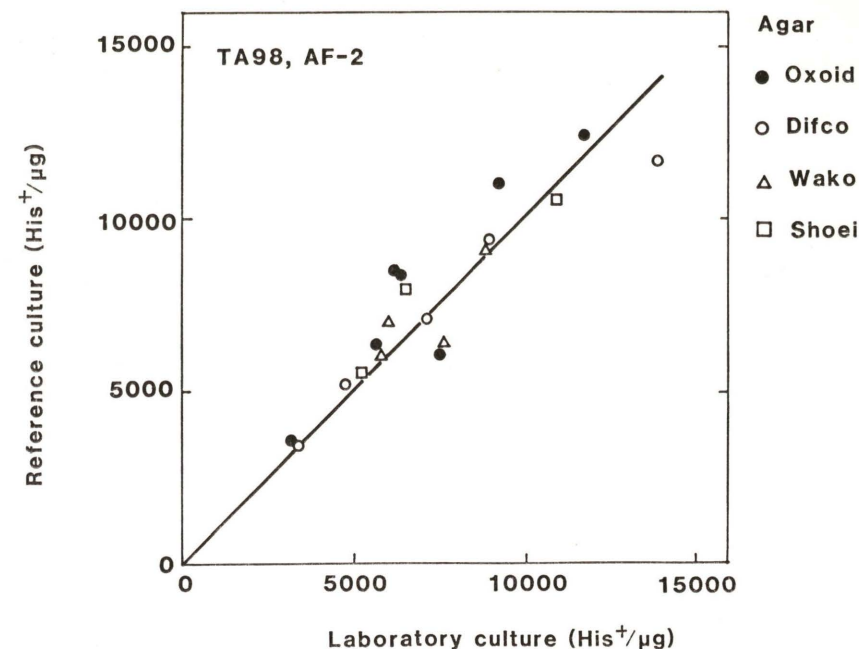


Fig. 1. 委託試験機関の協同研究で TA98 の自社菌株と対照菌株を用いて AF-2 の変異原性を比較した値。(印は用いたプレートの種類で分けてある)

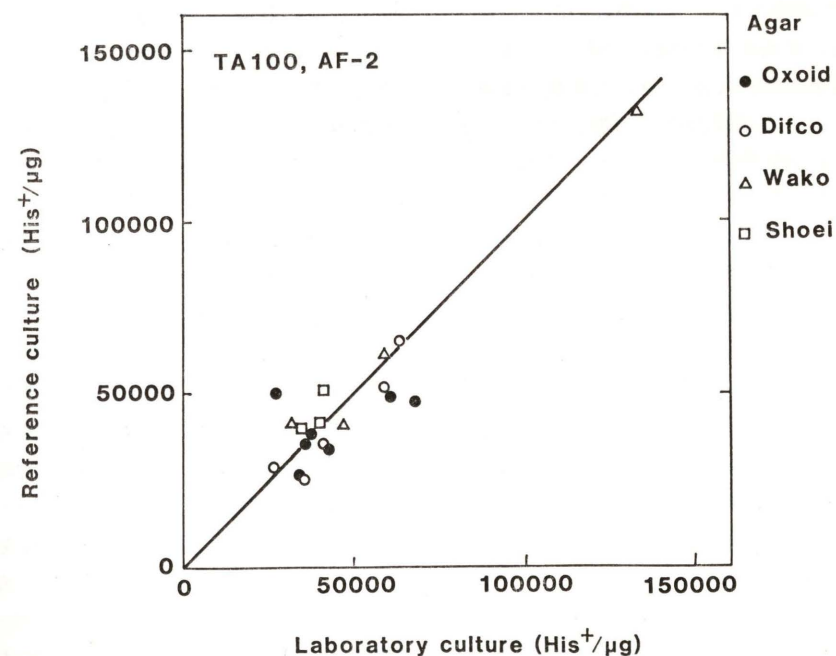


Fig. 2. 委託試験機関の協同研究で TA100 の自社菌株と対照菌株を用いて AF-2 の変異原性を比較した値。

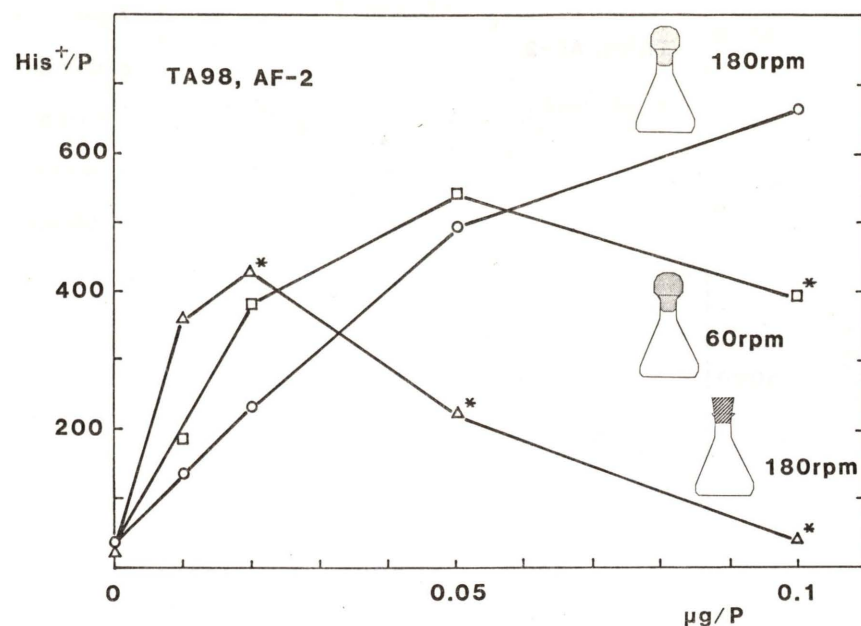


Fig. 3. TA98 を用いた AF-2 の変異原性試験に対する前培養条件の影響。
* 印は生育阻害の発現を示す。

の AF-2 を用いて決められた濃度で試験を実施して結果の比較を行った。TA100 も TA 98 も共に、2, 3 の例外を除いて大多数の試験機関では、自社菌株と対照菌株の間に AF-2 の変異原性を調べた結果に差はなかった。大多数の受託試験機関で用いている試験菌株に問題がないことが判明した。然し試験機関の間には大きな差があることが判明した。用いている試験方法の若干の差異や使用している寒天の種類が異なるが、一応は定められた共通の方法で同一 lot の対照菌株を用いての試験結果の間に TA98 で約 3~4 倍の差が、TA100 で 1 社の例外的な値を除外しても約 2~3 倍の差があることが判明した (Fig. 1, 2)。何がこの差異の原因なのか。

Fig. 3 に極端な実験を前培養条件で作って AF-2 に対する試験を実施してみた。前培養条件で三角コルペンを廻転培養する条件を 60 rpm と 180 rpm にしてみると、エアレーションの悪い回転数の低い方が AF-2 の様なニトロ化合物に対しては感度が高いが毒性が出易くなる。もっと極端に綿栓の代りにゴム栓をしてエアレーションを悪くした前培養を行った菌株では、更に感度は高くなっているが、毒性の発現も強く、より低

濃度で生育阻害が起って、変異原性を検出できる濃度範囲が狭くなっている。前培養条件 (エアレーションの状態, 振盪方法, 振盪回数, 前培養時間等々) によって変異原性試験の感度, 精度が大きく影響を受けている可能性が判って来た。前培養の容器の大きさと培地の量との関係, 容器の形状と振盪方法との関係等々で前培養する菌が静止期に入る迄の培養時間が異なってくる。前培養の条件をきちんと最適条件に決めておくことが重要と考えられる。

試験機関同志の差を小さくするためには、1) 試験菌株の管理をきちんと実施して特性を持った菌株を用いる、2) 前培養の条件を管理して菌株がきちんとした感度を示す最適条件を求めて前培養を実施する。微生物変異原性試験を実施していくうえで、当初試験方法が簡便であると云っていたが、前培養条件を含めて全試験条件を十分に検討して (各試験機関毎に用いる器具, 装置が異なるので、それぞれ最適条件は異なってくる)、常に試験条件を一定にコントロールして実施していくことが必要である。前培養条件でなにか重要であるかを今後検討していく必要がある。

参考文献

- 1) J. Ashby and R. W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutation Res.*, 257: 229-306.
- 2) Matsushima, T. (1990) Genotoxicity of new Japanese chemicals, In: M. L. Mendelsohn (Ed.), *Mutation and the Environment*, Wiley-Liss, Inc., Part E, pp. 251-255.

短期検索法の有用性と問題点

——染色体異常試験——

オリンパス光学工業株式会社染色体研究センター 石 館 基

1. 染色体異常試験の有用性

染色体に損傷をおよぼす物質は広く clastogen と呼ばれ, Ames テストなどの遺伝子突然変異試験で検出される変異原 (mutagen) と区別される。従来の検索によれば発がん性を示す化学物質の大半のものは, この両者の性質を兼ねそなえているばかりではなく, 両者の試験で得られた活性値の間に良い相関が見られる。OECDの遺伝毒性に関する基本的な考え方によれば, 化学物質の安全性を評価するためには, 遺伝子レベルの変化と, 染色体レベルの変化と, 少なくとも2種類の遺伝学的指標を持つ試験系を用いるべきであるという。事実, IPCS/WHO の発がん物質の短期試験法に関する国際協力事業の結果を見ても, Ames テストで検出されにくい発がん物質が, 染色体異常試験ではじめて検出される可能性が示唆されている。参考までに, 従来の検索によって, Ames テストでは検出されにくい, あるいは検出されない化学物質の例を Table 1 にリストアップする。このなかにはいくつかの既知発がん性物質も含まれている。

染色体異常を生じた細胞は, 細胞分裂に支障を来すため, その大部分は死んでしまう。しかしながら, 生き残った細胞を観察すると, 染色体の構成は最早以前のものとは異なり, 新しい核型を示すようになる。すなわち, 染色体変異を伴った新しい細胞群として増殖する。染色体の構成が異なれば, 当然のことながら, そこに内在している種々の遺伝子の配列や機能の発現に支障を来す結果

となる。

近年, 染色体異常とがん関連遺伝子との関連が明らかになりつつある。染色体の転座によって, プロトがん遺伝子が他の遺伝子と融合し, その結果活性化されたり, また, ダウン症候群などのように, 性染色体上の遺伝子の発現と性ホルモンのアンバランスによって, 組胞に異常増殖が起る場合も知られている。さらに最近では, がん抑制遺伝子が特定な染色体上に分布し, 染色体の欠失によって, 遺伝子の発現が失活し, その結果, がんの発生過程に重要な役割を演じていることも解ってきた。

2. 染色体異常の誘発

エジンバラ大学の Evans 教授は, 以前, 「染色体異常は放射線が作るものではなく, 細胞が作るものである」と言った。化学物質によって直接あるいは間接的に誘発された DNA 傷害は, DNA の基本的な代謝機構, すなわち, 複製, 修復あるいは組み換えによって生ずるものであり, 細胞側の応答の現れである。

染色体異常は Table 2 のように分類される。その生成機構については, 切断・再結合 (breakage and reunion) 説および交換 (exchange) 説などが知られているが, その詳細についてはなお不明な点が多い。変異原の種類によって DNA に対する初期損傷の様相は異なっている。主な変異原について, 従来までに予測されている作用機序の要約を Table 3 に示す (紙面の都合上その詳細につい

〒192 東京都八王子市久保山町 2-3

Chromosome aberration tests in mammalian cells—Current status

Motoi Ishidate, Jr.

Director, Chromosome Research Center, Olympus Optical Co., Ltd., 2-3 Kuboyama-cho, Hachioji, Tokyo 192, Japan

Table 1. Ames テストで陰性となり、培養細胞の染色体異常試験で陽性となった化合物の例 (Ishidate *et al.*, 1980 より)

Acetaldehyde	Diethylnitrosamine	Diethylstilbestrol	Mono(2-ethylhexyl)phthalate
Acetaminophen	Diethylstilbestrol	Diethylstilbestrol	Nickel chloride
Acetohexamide	Disodium glycyrrhizinate	Disodium glycyrrhizinate	Nitroguanidine*
Acetone*	Erythrosine	Erythrosine	Noscapine hydrochloride
Acetylsalicylic acid	Ethionamide*	Ethionamide*	Orange G
Acridine	Ethyl acetate*	Ethyl acetate*	Papaverine hydrochloride
Acrylic acid*	Ethylene glycol*	Ethylene glycol*	Patulin
Actinomycin D	Eugenol	Eugenol	Perillaldehyde
Aldrin	Eulan U-33	Eulan U-33	L-Phenylalanine*
Amaranth	Fast green FCF	Fast green FCF	Phenylbutazone
Ammonium chloride	5-Fluorodeoxyuridine	5-Fluorodeoxyuridine	Potassium sorbate*
Aniline	Furosemide	Furosemide	Propylene glycol*
p-Anisaldehyde	Griseofulvin	Griseofulvin	Propyl gallate
p-Anisidine	HMPA	HMPA	Riboflavin
1-D-Arabinofuranosyleytosine	N-Hexane*	N-Hexane*	Rose bengal
Arsenic pentaoxide	Hydroxylamine	Hydroxylamine	Saccharin sodium*
Arsenic trioxide	Hydroxyurea	Hydroxyurea	Salicylic acid
Auramine O	Indigo carmine	Indigo carmine	Sodium benzoate
Barbital*	Ion and sodium succinate citrate	Ion and sodium succinate citrate	Sodium 5'-cytidilate*
Bendroflumethiazide	Lacchaic acid	Lacchaic acid	Sodium dehydroacetate
Benzene	Lead acetate	Lead acetate	Sodium D-tartrate*
Benzoin	Lithocholic acid	Lithocholic acid	Sodium fluoride
Bleomycin	LSD	LSD	Sodium 5'-ribonucleotide
Brilliant blue FCF	Malathion	Malathion	Sodium 5'-uridilate*
Cadmium sulphate	Maleic anhydride	Maleic anhydride	Sudan III
Caffeine*	Malonaldehyde	Malonaldehyde	Sulpyrine
Caprolactam	Manganese ethylenebisthiocarbamate	Manganese ethylenebisthiocarbamate	Sunset yellow FCF
N-Carboxymethyl-N-nitrosourea	Metformin hydrochloride*	Metformin hydrochloride*	Tartrazine
Cellulase	Methotrexate	Methotrexate	12-o-Tetradecanoyl-phorbol-13 acetate
Chlorpropamide	Methyloctothiazide	Methyloctothiazide	Theophylline
Chlorpyrifos	Methyl acrylate	Methyl acrylate	Triamterene
Clofibrate	Methylanthranilate	Methylanthranilate	Tris-dichloropropyl phosphate
Cocaine hydrochloride	α -Methyl dopa	α -Methyl dopa	Urea*
Cynabarinnic acid	Methylene chloride	Methylene chloride	Urethane*
DDE	N-Methyl-N'-nitroguanidine*	N-Methyl-N'-nitroguanidine*	Vinblastine
DDT	Mitomycin C	Mitomycin C	Vinyltoluene, m-, p-
Diazinon	Monocrotaline	Monocrotaline	Xylitol*

アンダーライン: 発がん性が疑われるもの, *印: 10 mM 以上の濃度で陽性となるもの

Table 2. 主な染色体異常の種類

数的異常	(Numerical aberration)
倍体	(3 倍体, 4 倍体など)
異数体	(モノソミー, トリソミーなど)
構造的異常	
ギャップ	染色体分体ギャップ (ctg) 染色体ギャップ (csg)
切断	染色体分体型切断 (ctb) 染色体型切断 (csb) 部分的欠失, 断片
交換	染色体分体型交換 (cte) 相互交換 (3 放射線状, 4 放射線状転座) 内部交換 (環状形成) 染色体型交換 (cse) 相互交換 (2 動原体形成, 非定形型ロバートソニア型転座) 内部交換 (非定形型, 逆位, 環状形成) 非特定型 (染色体の粘着, スキーベア, 細粉化など)

ては割愛する)。

染色体異常の種類は、変異原の種類にもよるが、細胞の暴露時期、すなわち、細胞周期によっても左右される。放射線の場合には、G₁ 期に暴露すると染色体型が出現し、S 期では染色体型と染色体分体型の両者が、また G₂ 期では、染色体分体型が出現する。化学物質の場合には、通常、細胞 DNA 合成期を通過してはじめて異常が発現するため、その多くは染色体分体型異常 (chromatid-type aberration) として観察される。

前述したように、変異原で処理した後、早期に出現してくる異常は、不安定な異常像 (unstable

aberration) であり、これらの細胞の多くは死滅するが、分裂、生存した場合には、安定型の染色体型異常 (stable aberration) を持つ変異細胞として増殖してくる。ヒトを含む動物の腫瘍の多くが、数的あるいは構造的染色体異常を伴っているのはこのためであると思われる。

3. 染色体異常と発がん

染色体異常の研究は従来の光学顕微鏡による形態学的研究の時代から、遺伝子あるいは分子レベルの研究へ移行しつつある。ヒト慢性骨髄性白血病 (CML) に特異的に (約 90%) 出現する Ph¹ 染色体は、発症初期から認められるが、染色体分染法によって、第 9 と第 22 番目の染色体との相互転座、t (9; 22) (q34; q11) であることは良く知られている (Fig. 1)。この変化は慢性時に特異的であるが、その後、急性化した場合には、75-80% の細胞に二次的变化として新しい染色体マーカー

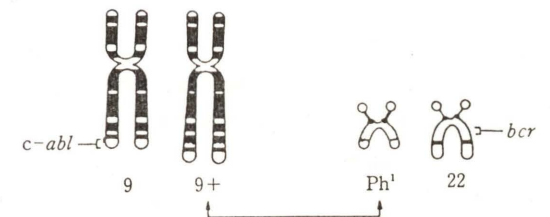


Fig. 1. ヒト慢性骨髄性白血病における Ph¹ 染色体、(第 9, 第 22 染色体の相互転座) と c-abl および bcr 遺伝子の所在 (渋谷, 1991 より)

Table 3. 染色体異常に関連する DNA 初期損傷

変異原の種類	DNA 初期損傷
放射線	DNA 2 本鎖切断, 塩基傷害 DNA-蛋白クロスリンク, 活性酵素
紫外線	ピリミジンダイマー, 1 本鎖切断, DNA-蛋白クロスリンク
アルキル剤 (単)	グアニン 0-6, N-7 位のアルキル化
(復)	DNA 鎖間および DNA-蛋白クロスリンク
ベンツ (a) バイレン	グアニン N-2 結合 セキノノンラジカル-0-6 位結合 活性酵素による DNA 鎖切断
ブレオマイシン	DNA 1, 2 本鎖切断
アクリジン	挿入
5-FU	DNA 合成阻害
Ara-C	DNA ポリメラーゼ α の阻害
DNA 塩基, スクレオンド	DNA 前駆物質の攪乱

(Natarajan, A. T., 1984 より)

(+8, i (17q), +19) が出現したり、さらにもう 1 本の Ph⁺ 染色体が別の形で加わる場合が多いという。現在まで、染色体上の特異的な変異は、リンパ系腫瘍で 28 種類、急性の非リンパ系白血病で 29 種類、固型腫瘍では 24 種類以上も観察されている (Mitelman, 1990)。これらの変化はいずれも、腫瘍の発症の原因に密接に関連しているものであり、臨床的がん診断に大きな貢献をしてきた。

最近の分子レベルの解析によると、上記の Ph⁺ 染色体に関連する第 9 番目の染色体切断部位には、チロシンキナーゼ型のプロトがん遺伝子 *C-abl* が局在し、一方、第 22 番目の染色体の切断部位には *bcr* 遺伝子が存在することが解った (Heisterkamp *et al.*, 1983)。

正常細胞に存在するがん遺伝子が、染色体の転座によって活性化される事実は極めて興味深い。最近の所見によれば、適切なプローブを用いて分離されたヒトの融合遺伝子 *bcr-abl* DNA をマウスの骨髄細胞に導入したところ、ヒト CML に類似した疾患が発症したという (Daley *et al.*, 1990)。一方、実験的には、正常細胞と腫瘍細胞を人工的に融合させると、正常細胞に存在するがん抑制遺伝子が働いて腫瘍性が低下あるいは消失することが知られている。培養細胞レベルではあるが、特定な染色体あるいはその断片を腫瘍細胞内に導入することも可能となってきた。今後、染色体を基盤とする細胞ゲノムの解析によって、細胞のがん化はもとより、増殖、分化さらに進化に関する新しい所見が生れることであろう。米国では 15 年間で 10 億ドルの予算を計上し、ヒトゲノムを解析する計画をスタートしたところである (Edelson, 1991)。

4. 染色体異常試験

化学物質の安全性を評価するため、OECD をはじめ、諸外国の遺伝毒性試験法ガイドラインの中には、培養細胞を用いる染色体異常試験が採用されている (石館, 1990)。米国では、1980 年以来、NTP 計画に基づき、数 100 種類の既存化学物質について CHO 細胞を用いる染色体試験を実施してきた。

我が国においては、国立衛生試験所で開発された CHL/IU 細胞を用いる手法が広く用いられてきた。1988 年以来、日米協力事業の一貫として、CHO を用いる手法と CHL/IU を用いる手法との比較研究がスタートした。米国 NTP と同じ被験物質を追試したところ、必ずしも同じ結果が得られなかったためである (祖父尼ら, 1991)。CHO を用いる NTP プロトコルでは、代謝活性化を行わない場合 (直接法)、被験物質を 8-12 時間処理した後に培養液を交換し、20 時間目に染色体標本作製する。代謝活性化 (S9 法) の場合は 2 時間のみ作用させて、20 時間目に標本作製する。しかも、ラット肝 S9 の濃度は、我が国の場合 (5%) と比べてかなり低い (2%)。Fig. 2 は N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPP) の結果である。CHO を用いた直接法の場合、12.5 時間処理ではいずれの濃度でも活性を示さないが、我が国のプロトコルに従って処理時間を延長 (24 時間) すると活性が現れてくる。一方、CHL/IU 細胞を用いた場合にはかなり低濃度で陽性となっている。Fig. 3 は, triallylisocyanurate の場合である。S9mix を加えた場合、CHO, 2 時間処理では陰性となるが、6 時間処理によって概

N, N'-Diphenyl-p-phenylenediamine

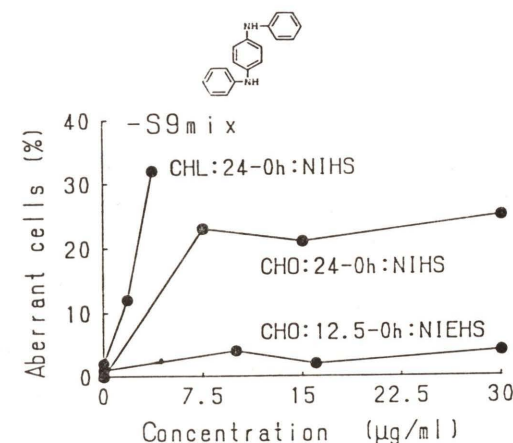


Fig. 2. N, N'-ジフェニール-p-フェニレンジアミンの染色体異常誘発性 (代謝活性化を行わない場合), CHL: 24-0h: CHL 細胞を用い、24 時間処理後直ちに標本作製した場合。NIHS: 国立衛生試験所, NIEHS: 米国 NTP のデータ

Triallyl isocyanurate

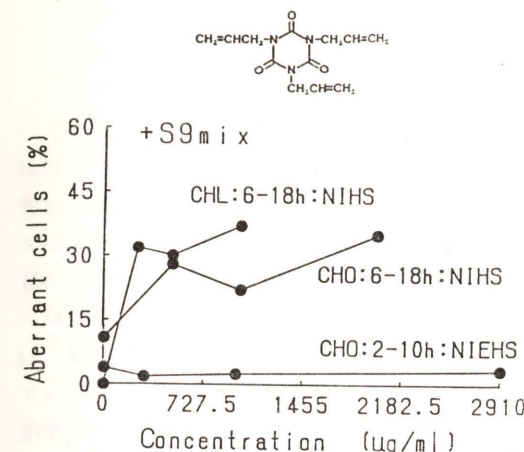


Fig. 3. トリアルリルイソシアヌレートの染色体異常誘発性 (代謝活性化を併用した場合)。その他の記号は Fig. 2 と同様。

略 CHL 細胞の場合に近い活性が出現している。Fig. 4 は、日米協力のもとに、上記 DPP について行われた試験結果 (直接法) を研究機関別に示したものである。図の中で、CHO-NTP, CHO-JPN はそれぞれ CHO 細胞を用いて、NTP あるいは日本のプロトコルによって試験されたことを示している。国立衛試 (ORIGINAL, NIHS),

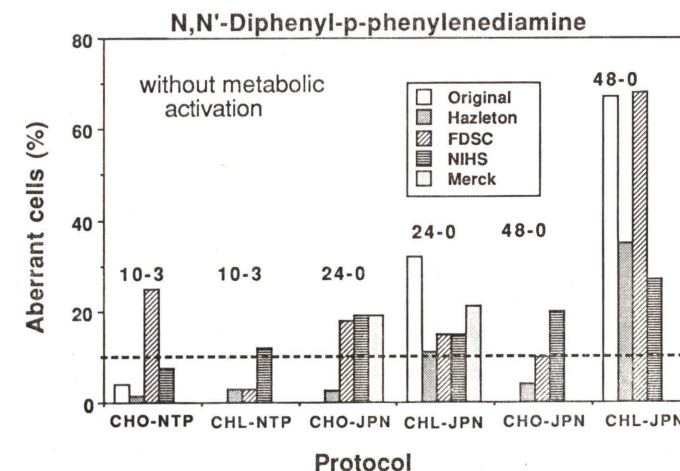


Fig. 4. 日米協力研究のもとに各研究機関で行われた CHO および CHL 細胞を用いる染色体異常試験結果の比較—N, N'-ジフェニール-p-フェニレンジアミンの効果 (直接法)。CHO-NTP: CHO 細胞を用いて、NTP プロトコルで行ったもの。CHO-JPN: CHO 細胞を用いて日本のプロトコルで行ったもの。Original および NIEHS: 国立衛生試験所で繰り返し行ったもの; FDSC: (財) 食品安全センター研究所; 10-3: 10 時間処理した後に 3 時間培養して標本作製したことを示す。

米国のヘーゼルトン研究所、(財) 食品薬品安全センター (FDSC)、米国のメルック社などが分担した。これらのデータから、両者の違いは、細胞の種類によるよりも、むしろ、実験法プロトコルによっていることが解る。昨年、英国環境変異原学会 (UKEMS) で作成されたガイドラインが改正された。その中では、上記日米協同研究の成果も考慮されている (UKEMS, 1990)。

5. 染色体異常試験の問題点

In vitro 染色体異常試験で陽性となったものについて、さらに、in vivo 染色体異常試験 (マウス小核試験や骨髄染色体異常試験など) を行っていると、その 50% 近くのものが陰性となる。従って、in vitro 法は感受性が高すぎるという批判もないわけではない。その理由として次のようなことが考えられる。

- 1) in vitro 試験では、解毒、排泄の過程が考慮されていない。
- 2) in vitro 試験で使用される代謝活性化法は極めて特殊なものである。
- 3) in vitro 試験では、生体内では考えられない非特異的な培養条件によっても結果が左右される。

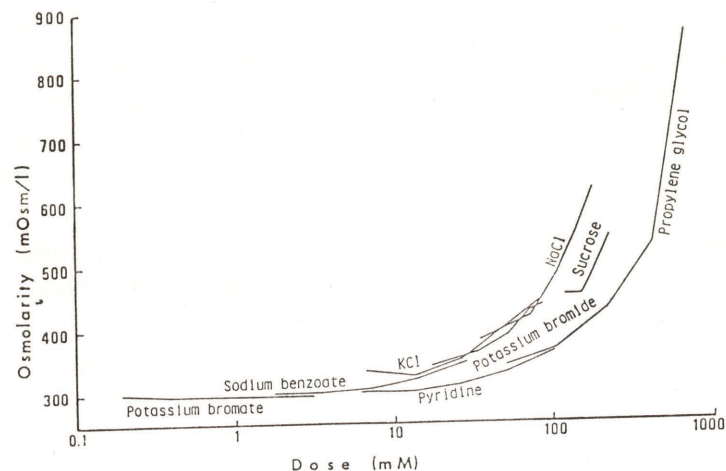


Fig. 5. 種々の化合物 (主に食品添加物) の処理濃度と培養液の浸透圧との関係, 浸透圧は氷点降下法による。

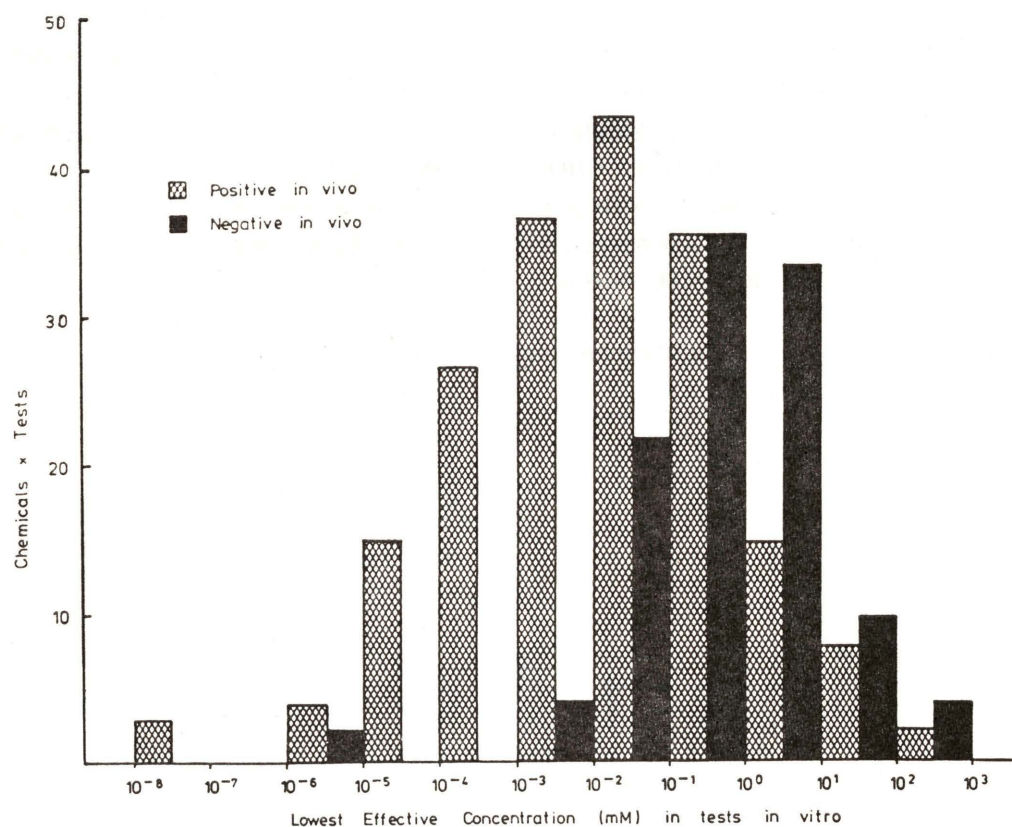


Fig. 6. マウス小核試験あるいは骨髓細胞の染色体異常 (*in vitro* 試験) でえられた最小有効濃度 (mM) との比較。
網カラム: *in vitro* 試験で陽性となったもの (62 種), 黒カラム: *in vivo* 試験で陰性であるが *in vitro* 試験で陽性となったもの (計 68 種), 縦軸は化合物数を示す。
(Ishidate *et al.*, 1988; Tompson, 1986 のデータより)

4) 生体内における標的臓器は必ずしも一様ではない。骨髓細胞以外にも感受性の高い臓器があるかも知れない。

これらの問題に対して, 適確な回答を得ることは必ずしも容易ではない。いずれもヒトへの安全性を評価するために重要な課題ではあるが, ここでは, 特に 3) の問題に限って触れて見たい。

(1) 高濃度処理について

In vitro 試験の結果が陰性と判断されるためには, 細胞が確かに十分な量の被験物質に暴露されているかどうかの問題となる。しかし, 被験物質が水溶性の場合には, 高濃度処理によって培養液の浸透圧が上昇する可能性が考えられる。例えば, 塩化ナトリウム, 塩化カリウム, 蔗糖, 尿素あるいはエチレングリコールなどは, かなり高濃度 (50 mM 以上) ではじめて染色体異常が誘発される。また, サッカリン塩の場合には, 約 20 mM で染色体異常が認められるが, いずれも, 浸透圧が 50 mOsmol kg⁻¹ 以上に達している (Ashby and Ishidate, 1986)。一方, グリセロールなどのように 1100 mOsmol kg⁻¹ (1000 mM 相当) でも染色体異常を誘発しない物質 (Galloway *et al.*, 1987) も存在する。一般に, 浸透圧の上昇によって, 細胞内イオンのバランスがくずれ, その結果, 細胞器官の破壊を通じ, 間接的に染色体異常を誘発する可能性が考えられる。この機構についてはまだ不明ではあるが, 化学物質の安全性を評価する際には, このように細胞にとって非生理的な条件で陽性となったとしても, ヒトへの有害性にはあまり問題とはならないかもしれない。食品添加物を例にとり, 培養液中の濃度と浸透圧の変化について測定した結果を Fig. 5 に示す。

(2) *In vitro* 試験と *in vivo* 試験との比較

培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性となった化合物について, 有効濃度を比較すると, 10⁻⁸ ~ 10³ mM の間に広く分布していることが解る。Fig. 6 は, *in vivo* 試験で陽性となる物質 (62 種) と陰性となる物質 (68 種) とを区別して, その分布を比較したものである。これによると, *in vivo* 試験で陽性となる物質の多くは, *in vitro* 試験において比較的低濃度で染色体異常を誘発してい

る。このうち, 約 11% (7 種) の物質は, *in vitro* 試験において, かなり高濃度 (10 mM 以上) ではじめて染色体異常を誘発する。しかし, それらの物質は処理時間その他の試験法プロトコルを吟味さえすれば, より低濃度で効果が現れる可能性があるという (Scott *et al.*, 1991)。ただし, 発がん性を持つウレタンは例外であった。

(3) その他結果を左右する条件

培養細胞を用いる染色体異常試験を行う際には最高濃度として細胞毒性を示す用量, すなわち, 細胞分裂あるいは増殖が 50% 以上阻害される濃度が用いられている。細胞の増殖が全く阻害されずに, 染色体異常のみが増加する場合は極めて稀である。時間に多少のずれはあるが, 概して細胞の死と染色体の異常は同時に進行する。染色体異常は通常, 処理後第 1 回目の中期分裂像において観察されるため, 被験物質の処理によって細胞周期がどのように影響されるかについて検討しておく必要がある。細胞毒性を示しても染色体異常を誘発しない物質も数多く知られている。ある種の化合物, 特に, 極めて単純な構造を持ち, しかも DNA 分子との反応性を期待し得ないような化合物, 例えば亜硝酸や塩化アンモニウムなどになぜ低濃度で染色体異常を誘発する性質があるのか, また, アスベストのように全く化学的活性を持たないものが, 細胞の貪食作用によって染色体に損傷を与える理由も明確ではない。

細胞培養液中の pH の影響にも問題がある。塩酸や酢酸の添加によって染色体異常が増加するが, この現象は S9 を添加した時に起り, pH の変化によって S9 自身が分解するためという意見もあるが (Brusick, 1986), S9 と関係なく, 硫酸では, pH 4.5 付近で有意な差が見られるという報告もある (Morita *et al.*, 1989)。ヒトのリンパ球では pH 3 まで下げても染色体異常が出ないという報告もあるので, 細胞の性質による可能性もある。一方, 苛性ソーダなどによって強アルカリ性としても, S9 を添加しない場合は影響はないようである。いずれにせよ, 適切な緩衝液を用いることによって極端な pH の影響をさけるべきである。

S9 自身にも CHO 細胞に対して染色体異常誘

発性があるという (Kirkland *et al.*, 1989)。この場合、カタラーゼあるいはビタミンEによって抑制されることから、活性酸素が関与している可能性もある。

6. 今後の問題点

変異原性試験は種々の生活関連化学物質 (天然物質を含む) の検出, 同定, 作用機序の究明のみならず, ヒトへの安全性を評価する行政の立場からも重要な課題である。国内外における所轄官庁では, 医薬品や農薬など, 新しく開発された製品あるいはそれらの原料に対して, どのような試験を要求するかに関する基本的な考え方を打ち出している。各国において多少考え方が異なるため, 現在, 国際的ハーモニゼーションの必要性が叫ばれている。

(1) 試験結果の評価

昨年フロリダで開催された米国 EMS では, EPA の考え方の一部が紹介された。それによると, 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の代わりにマウス・リンパ腫 L5178Y を用いる遺伝子突然変異試験を適用するべきであるという (Dearfield *et al.*, 1991)。細菌を用いる Ames テストに加えて哺乳類細胞 (真核細胞) を用いる試験の必要性については異論のないところであるが, 果たして, 上記試験によって染色体異常の情報を読み取ることができるかという問題に対して, 各国の研究者の間で必ずしも同意が得られているわけではない。米国では, 前記したように, NTP 計画の下に多くの既存化学物質について CHO 細胞を用いる染色体異常試験を行ってきた。また, Gene-Tox 計画に基づき, 広範なデータに関する解析が行われた。彼らのデータの解析の多くは極めて定性的なものであり, 発癌性の有無に対する一致率を問題としているに過ぎない。変異原性試験で得られた結果を単に all or none で比較して良いものであろうか。被験物質の種類によって変異原性の強さは 100 万倍もの開きのあることを全く無視して, 総合的な評価を下せるものなのであろうか。彼らは, 染色体異常試験においては, 発癌性に対して偽陽性 (false positive) となる物質が多過ぎることを指摘している。事実 *in vitro* 試

験で陽性となっても *in vivo* 試験で陰性となる場合は多い。しかし, 逆に, *in vivo* で陽性となったものが *in vitro* で陰性となるものは極めて稀である。

In vitro 試験では, 生体では投与し得ない程多量の濃度を加えることも可能である。また, 前記したように, 細胞にとって非生理的な条件で, 非特異的な異常を誘発する場合も考慮しなければならない。このような場合には, 概して切断型の構造異常が多く出現する傾向にあるが, 食塩, 蔗糖, 尿素などがその良い例である。あるいは, これらのものには, 癌源性は無くとも, プロモータ的役割があるのかも知れない。第2に, 染色体異常の誘発はがんの発生に限らず, 広く遺伝毒性に関与している。発癌性はなくとも生殖細胞に影響を与える物質があってもよい。むしろ, このような物質の方がヒトの健康にとって重要な問題であるかも知れない。今後, 染色体異常の種類およびそれらの誘発の特異性について詳細な究明が必要であろう。

(2) 染色体異常発現機構の究明

染色体異常に関する研究は, 最早, 形態学から分子生物学の問題に移行しつつある。化学物質によって誘発された異常がどのように細胞ゲノムに影響し, 特定の遺伝子の発現をどのようにコントロールするかについての情報はまだまだ不足している。各種の遺伝性疾患あるいは特殊な腫瘍については, 既にその原因と思われる特異的な染色体に関する解析が行われている。がん遺伝子が生物の種を越えて存在するように, さらに細胞の分化, 老化などの生命現象に染色体の構成要素がどのように関与しているかを見極める必要がある。

染色体は DNA, ヒストンおよび非ヒストン蛋白から構成されている。DNA とこれらの蛋白, 特に, 非ヒストン蛋白との結合と染色体の構造との関連性についてはまだ不明な点が多い。染色体異常はこれら高次構造の変化に外ならない。

現在, ヒトの個々の染色体のプローブの入手が可能となりつつある。一方では, 染色体 *in situ* hybridization, 染色体 painting の技術もかなり進歩してきた。また, そのための自動解析装置の開発も進められている。今後, これらの技術を結

集することによって, がんあるいは遺伝性疾患の診断にとどまらず, 予防あるいは治療への適用が可能となろう。

(3) 染色体異常試験の展開

本シンポジウムでは, 主に *in vitro* 染色体異常試験の問題点について触れた。本法を利用することによって, さらに, 色々な研究も進められている。例えば, バラコートあるいはメナジオンなどに対する耐性細胞を用いた活性酸素による染色体異常誘発機構の解析 (Sawada *et al.*, 1991), あるいは, 細胞内に特殊な代謝酵素遺伝子を導入することによって, 特定な環境変異原 (ジニトロピレンなど) に対するより感受性の高い細胞系を樹立する試みなどがあげられる。*In vitro* 試験は, *in vivo* で生じた現象を解析するために極めて有用な手段ではあるが, そこで得られた結果をヒトへ外挿するためには, 最終的に, 動物個体を用いる試験で再確認する必要がある。通常, げっし類を用いる小核試験あるいは骨髓細胞染色体異常試験が追加される。小核試験については, 本学会の MMS 分科会において, 広汎な共同研究が進められ, その数年間に亘る業績は国際的にも高く評価されている (林, 1991)。

(4) 変異原性試験に対する企業の対応

既存化学物質の安全性については, 国側にその責任が問われるが, 新しく開発された製品については, 生産者側である企業が責任を負わなければならない。しかしながら, この企業側の対応に問題が無いわけではない。製品の安全性のチェックのため, 新製品の開発あるいは申請が遅れる場合もあろう。我が国においては, 特に, 国が定めた試験法ガイドラインは絶対的な法律として効力を持つ傾向にある。従って, 企業側はガイドラインに従って, そこに上げられた試験項目, 試験法さえクリアすれば足りると考える。その他の試験は余計なものとする。果たしてこれで良いのであろうか。ガイドラインはあくまでも指針に過ぎない。本来ならば, 生産者自らが必要と思われる試験項目を選別し, その安全性を実証すべきであらう。企業は, そのために, その道の専門家を養成しておく必要がある。また一方, 安全性試験を受託する研究機関においても, 営利を目指すのみで

はなく, スポンサーに対して適切なアドバイスを与え, 必要に応じて, その他の試験も追加できるような研究体制と, そのための実力とを常時蓄えておくべきである。

我が国の環境変異原学会にはかなり多く企業の研究者が参加している。最近, これらの方々の間で, 積極的な共同研究が行われるようになった。基礎研究は学者自身のためにあるわけではない。そこで得られた考え方, あるいは, 新しい手法がどれだけ, 実社会で利用され, 還元され, 役に立っているかが問われている。

最後に, 本シンポジウムでは, 特に, 培養細胞を用いる染色体異常試験が取り上げられた。本法にもまだ解決すべき問題が多く残されている。例えば, 被験物質が不溶性の場合, 揮発性またはガス状の場合の用量設定法, あるいは, 処理時間と標本作製時期などの問題である。また, 染色体異常を観察する代わりに, 小核の出現率によっても同じような結果が得られないかについて研究が進められている。

参考文献

- Ashby, J. and M. Ishidate, Jr. (1986) Clastogenicty in vivo of the Na, K, Ca and Mg salts of saccharin; and of magnesium chloride; consideration of significance, *Mutation Res.*, **163**, 63-73.
- Brusick, D. (1986) Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment and increased ion concentration, *Environ. Mutagen.*, **8**, 879-886.
- Daley, G. Q., R. A. Van Etten and D. Baltimore (1990) Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210^{bcr/abl} gene of the Philadelphia chromosome, *Science*, **247**, 824-830.
- Dearfield, K. L., A. E. Auletta, M. C. Cimino and M. M. Moore (1991) Consideration in the U.S. Environmental Protection Agency's testing approach for mutagenicity, *Mutation Res.*, **258**, 259-283.
- Edelson, E. (1991) The human genome project will cost at least \$3 billion and take 15 years, Its aim: mapping all the genes in the human cell to provide a key to the vast book of life, *Popular Sci.*, **58**, 63-83.
- Gallway, S. M., D. A. Deasy, C-L-Bean, A. R. Kraynack, M. J. Armstrong and M. O. Bradley (1987) Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and

DNA strand breaks, and the relation to toxicity, *Mutation Res.*, **189**, 15-26.

林 真 (1991) 小核試験—実験法からデータの評価まで—, サイエнтиスト社, 東京

Heisterkamp, N., J. R. Stephenson, J. Groffen, P. F. Hansen, A. de Klein, C. R. Bartran and G. Grosveld (1983) Localization of the *c-abl* oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukemia, *Nature*, **306**, 239-242.

Ishidate, M., Jr., T. Sofuni, K. Yoshikawa, M. Hayashi, T. Nohmi, M. Sawada and A. Matsuoka (1984) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636.

Ishidate, M., Jr., M. C. Harnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, *Mutation Res.*, **195**, 151-213.

石館 基 (1991) 規制に関する国内外の動向, 医薬品の変異原性・遺伝毒性, 続医薬品の開発 (石館 基監修), 廣川書店, pp. 386-394.

Kirkland, D. J., R. R. Marshall, S. McEnaney, J. Bidgood, A. Rutter and S. Mullineux (1989) Aroclor 1254-induced rat-liver S9 causes chromosomal aberrations in CHO cells but not in human lymphocytes; a role of active oxygen?, *Mutation Res.*, **214**, 115-122.

Mitelman, F. (1990) Patterns of chromosome variation in neoplasia, In: G. Obe and A. T. Natarajan (Eds.), *Chromosomal Aberrations*, Springer-Verlag,

Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, pp. 86-100.

Morita, T., Y. Watanabe, K. Takeda and K. Ukumura (1989) Effects of pH in the in vitro chromosomal aberration test, *Mutation Res.*, **225**, 55-60.

Natarajan, A. T. (1984) Origin and significance of chromosomal aberrations, In: G. Obe (Ed.), *Mutation in Man*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 156-176.

Sawada, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1991) Isolation of a menadione-resistant subclone from Chinese hamster lung (CHL) cells in culture, *Mutation Res.*, **249**, 7-17.

渋谷正史 (1991) がん遺伝子の活性化, がん遺伝子と抑制遺伝子 (渋谷正史編), がんのバイオサイエンス 1, 東京大学出版会, 東京, pp. 77-93.

Scott, D., S. M. Galloway, R. R. Marshall, M. Ishidate, Jr., D. Brusick, J. Ashby and B. C. Myhr (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions, A Report from ICPENC Task Group 9, *Mutation Res.*, **257**, 147-204.

Thompson, E. D. (1986) Comparison of in vivo and in vitro cytogenetic assay results, *Environ. Mutagen.*, **8**, 753-767.

UK-EMS (1990) Metaphase chromosome aberration assays in vitro, In: *Basic Mutagenicity Tests*, UKEMS Recommended Procedures, D. J. Kirkland (Ed.), Cambridge Univ. Press, Cambridge, Port Chester, Melbourne, Sydney.

発がん物質の中期検索法の有用性と問題点

——肝発がん物質試験法——

名古屋市立大学医学部第一病理学教室 伊東信行, 長谷川良平, 増井恒夫

1. はじめに

化学物質の発がん性判定はラット, マウス, ハムスターなどの動物を用いた2年間にわたる長期の飼育観察と, 全身諸臓器に対する詳細な病理組織学的検索などによって行なわれている。しかもその評価に際しては国際的なガイドラインに沿って発がん性の検索がなされることが要求される。従って最終判定までには約3年の日時が必要となる (NCI, 1976)。そのためそれらに要する人的, 物的費用は莫大であり, さらにそれが可能な施設は我が国のみならず世界的にも限られている。これに対し検索を必要とする化学物質の数は世界的に増加の一途をたどっているのが現状である。

この様なさまざまな問題を打開するために検討された方法の一つは, 変異原性試験を中心とした短期発がん性試験法であろう。しかし, 最近のアメリカ NTP などの論評をみても長期発がん性試験の結果との一致性は充分ではなく (Zeiger, 1987), 新たな短期検索方法の検討が急がれるようになった。現在世界各国で短期試験法にかわる新たな発がん試験法の追求がなされている。

我々も以上の様な状況を打破するため新しい発がん性試験法の開発を目指してきた。

最初我々が注目したのはいわゆる Solt-Farber モデルとよばれているものである (Solt and Farber, 1976)。これは, 前がん病変の生物学的特性を検討するための肝の2段階発がんモデルを改良し短期間に肝に前がん病変を発生させるものである。我々はこの方法をがん発生の生物学的特性追究に終わらせることなく, これを発展させ検討を加えていけば, 新しい発がん性試験法として利用出来るのではないかと考えたわけである。

2. 発がん物質の臓器標的性

一般に発がん物質は種々の異なった標的臓器を持っている。これを確認するには動物で発がん試験を行なう以外それを見出すことが出来ないし, またそれに変わる方法はない。歴史的にも皮膚や肝臓などは化学物質による発がん性の研究の中心であった。特に肝臓は発がん標的臓器としてその60% 近くを占めていることが WHO や NTP の研究で確認されている (Table 1) (Zeiger, 1987;

Table 1. 発がん物質の肝に対する標的性

報告機関	評価された物質数	発がん性物質			
		合計	変異原性陽性 (%)	標的臓器 (%)	
				肝を含む	肝のみ
IARC ^{a)}	587	147	110 (75)	87 (59)	26 (18)
NCI/NTP ^{b)}	224	149	80 (54)	80 (54)	30 (20)

^{a)} IARC Monographs, Supplement 7, 1987.

^{b)} E. Zeiger, *Cancer Res.*, 1987.

〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1
Medium-Term Bioassay System for Detection of Carcinogens: Detection of liver carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis
Nobuyuki Ito, Ryohei Hasegawa and Tsuneo Masui
First Department of Pathology, Nagoya City University Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

IARC, 1987)。この事実は肝臓を標的とする発がん物質の新検出法の追究こそが各臓器の中では最も重要かつ緊急を要するものであることを示している。

3. 肝がんの発生過程

肝がんの実験的発生は発がん研究のルーツといえるものであり、その発生過程の病理学的研究は詳細になされて来た (Goldworthy *et al.*, 1986)。化学発がん物質の投与による検出によって肝が

Table 2. 肝発がん過程にみられる酵素変異巢の陽性酵素と陰性酵素

陽性酵素	陰性酵素
Glutathione S-transferase の胎盤型 (GST-P)	Glucose-6-phosphatase (G6Pase)
γ -Glutamyltranspeptidase (GGT)	Adenosinetriphosphatase (ATPase)
DT-Diaphorase	Acid and alkaline nuclease
Epoxide hydrolase	Glycogen phosphorylase
Esterase	Adenyl cyclase
UDP-Glucuronyl transferase	Enoyl CoA hydratase
G6P dehydrogenase (G6PD)	Mn-Superoxide dismutase (Mn-SOD)

Table 3. DEN-PH 法の開発まで

中期発がん試験法の可能性の検討 2-AAF, 3'-Me-DAB, DMN, DEN, DL-Ethionine, Quinoline, Quinoline derivatives	立松ら (Gann, 68: 499, 1977)
初期投与発がん物質の選択 DEN	立松ら (Gann, 68: 499, 1977)
DEN, Af-B ₁ , 2-AAF, 3'-Me-DAB	今井田ら (Cancer Lett., 14: 279, 1981)
DEN, N-OH-AAF, Af-B ₁	白井ら (Jpn. J. Cancer Res., 76: 16, 1985)
DEN 投与量の決定 200, 100, 50, 25, 12, 6 mg/kg	白井ら (Cancer Lett., 28: 127, 1985)
実験期間の決定 4, 6, 8, 10, 12 (週)	立松ら (Gann, 70: 125, 1979)
肝部分切除の必要性と時期 促進効果の確認 0, 1, 2, 3, 4, 5 週 (検出物質投与開始後)	立松ら (Gann, 68: 499, 1977) 長谷川ら (Cancer Lett., 32: 15, 1986)
肝前がん病変の発生促進効果 肝部分切除, D-Galactosamine, CCl ₄	津田ら (Cancer Lett., 37: 163, 1987)
ラット系の選択 F344, Lewis, SD, WBN, Wistar, NAR, ODS	朝元ら (Jpn. J. Cancer Res., 80: 1041, 1989)
ラット性差の検討 雄>雌	玉野ら (Cancer Lett., 20: 313, 1983)
ラット週齢の検討 6, 26, 46, 66 週齢	長谷川ら (Jpn. J. Cancer Res., 82: 293, 1991)
指標酵素の決定 GST-P, GGT	佐藤ら (Gann, 75: 199, 1984) 立松ら (Carcinogenesis, 6: 1621, 1985) 津田ら (Carcinogenesis, 9: 547, 1988)
GST-P, G6PD, GGT, ARPase, P-450	立松ら (Gann, 71: 843, 1980) 小木曾ら (Toxicol. Pathol., 13: 257, 1985) 小木曾ら (Carcinogenesis, 11: 561, 1990)
前がん病変と肝発がんの相関性 肝過形成結節 GST-P 陽性巢	今井田ら (Jpn. J. Cancer Res., 80: 326, 1989)
2次元と3次元検出法の比較 GST-P 陽性巢	伊東ら (Gann, 71: 832, 1980) 伊東ら (Carcinogenesis, 9: 387, 1988) 伊東ら (CRC Crit. Rev. Toxicol., 19: 385, 1989)
中期発がん性試験の応用 肝過形成結節 GST-P 陽性巢	

んの発生に至るまでには必ず過形成結節と呼ばれる前がん病変が出現してくるが、それよりさらに早期に酵素変異巢と呼ばれる小増殖巢が肝組織に認められることも明らかとなっている。またこれら病変の出現なく肝がん発生しない事も実験的に知られている (Bannash, 1987)。従って肝がん発生の有無で肝に対する発がん性を決定するのではなく、酵素変異巢発生の程度により発がん性の有無を決定出来れば、その判定ははるかに短期間で良いはずである。肝発がん過程の早期に出現する酵素変異巢において陽性を示す酵素と陰性を示す酵素は Table 2 に示す通り多くのものが知られている (Tsuda *et al.*, 1988)。

4. 肝中期発がん試験法 (DEN-PH 法) の確立

ラット肝の二段階発がん法について Craddock (Craddock, 1976) や Peraino ら (Peraino *et al.*, 1975) は 2-AAF の投与後に phenobarbital を与えると肝発がんは著明に促進されることを見出していた。即ち、肝においても皮膚と同様に二段階発がんの成立することが明らかとなっていた。

そこで我々は肝の酵素変異巢の出現の程度を指標とする肝発がんの中期発がん試験法の確立をめざし多くの実験を行なって来た (Table 3)。その結果、現在我々が確立した肝中期発がん試験法は Fig. 1 の如くである (Ito *et al.*, 1988)。

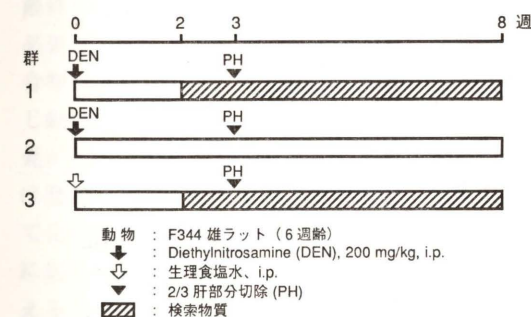


Fig. 1. ラット肝中期発がん試験法 (DEN-PH 法)。

5. 中期と長期試験の比較

これに関連して我々は 2 つの重要な実験を行い、中期試験成績との対比を行なった。

即ち 2-AAF, 3'-Me-DAB と ethionine をそれぞれ 3 つの異なった量で投与した 8 週間の DEN-

PH 法での成果と 2 年間の発がん実験での結果を比較した。その結果中期試験での成果は 2 年間の結果を良く予測しうることが明らかとなった (Ogiso *et al.*, 1985)。さらに ethionine, thioacetamide, phenobarbital についても DEN-PH 法の 8 週と 2 年間の成果を、比較検討したがこの成果でも極めて良い相関性が示された (Ogiso *et al.*, 1990)。

6. DEN-PH 法での用量相関

この方法による検出でもう一つ注目されるのは発がん強度との対比が可能な点であろう。

我々は DEN-PH 法でアメリカの NCTR で行なわれた 2-AAF によるマウスを用いた膨大な発がん実験の研究結果と同じ濃度の 2-AAF を与え、両者の比較を行なった (Tiawech *et al.*, 1991)。その結果は Fig. 2 の如く両者は極めて類似していた。また重要なことはマウスでの成果がラットで行なった DEN-PH 法での成果と一致した点であろう。このほか多くの肝発がん物質について用量相関性についての追及がなされ発がん強度についての多くの情報が得られつつある。

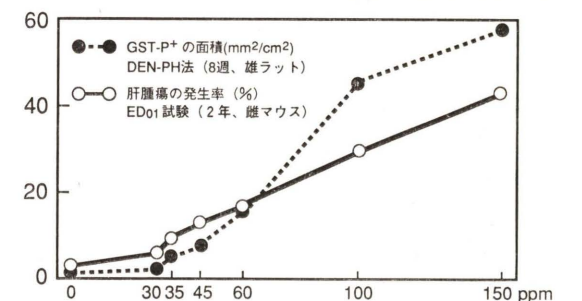


Fig. 2. DEN-PH 法と長期発がん性試験における 2-AAF の用量作用相関の比較。

7. DEN-PH 法での成果

現在までに行なわれた 183 の化合物についての検出結果を Table 4 に示す。即ち肝発がん物質は変異原性の有無に拘らず 93% が陽性である。ここで陰性となったのは主にペルオキシゾーム増殖性物質であり、これが我々が最終判定に用いているグルタチオン S トランスフェラーゼ-P により反応しないための特異減少である。従ってこれらに特

Table 4. DEN-PH 法で検索された 183 化合物の陽性率 (%)

検索物質	Ames 試験			合計
	+	-	?	
肝 発 がん 物 質	22/23 (96)	18/20 (90)	0/ 0 (0)	40/43 (93)
発がん物質 (肝以外)	7/21 (23)	1/10 (10)	0/ 3 (0)	8/34 (24)
非 発 がん 物 質	0/ 6 (0)	0/27 (0)	0/ 4 (0)	0/37 (0)
未知物質	1/ 9 (11)	12/34 (35)	7/26 (27)	20/69 (29)

異的に反応する酵素が見出されれば陽性率はさらに上昇すると考えている。またこの方法はすべてラットを使用しているのかかわらず、マウスのみに発がん性を示す物質でも陽性となり、その有用性は明らかである。

ただ発がん性はあっても肝以外の臓器に標的性がある化合物では、陽性率が 24% と低い欠点がある。しかし 8 週間の結果がよく 2 年間の結果を示唆することができるのであれば、50% 以上を占める発がん物質の早期判定による利点は計り知れないものがある。

8. 発がん抑制物質の検討

肝発がん物質の早期検索は高率にしかも短期間で可能となったが、この方法のもう一つの利点は肝発がんに対する抑制物質の追究が可能なことで

Table 5. DEN-PH 法で見出された肝がん抑制物質

化学物質	発がん性
Acetaminophen	—
Diphenyl	—
Ethyl alcohol	—
Eugenol	—
Hydroquinone	—
α -Tocopherol	—
Esculin	—
Gallic acid	—
<i>t</i> -Butylhydroquinone	?
Harman	?
Linolic acid hydroperoxide A	?
Linolic acid hydroperoxide B	?
<i>o</i> -Aminophenol	?
Indomethacin	?
Ferulic acid	?
<i>p</i> -Methoxyphenol	?
Methyltestosterone	?

あろう。

既に本法によりいくつかの肝発がん抑制物質が見出されている (Table 5)。このほか、がんの化学抑制 (chemoprevention) に働く物質もこの方法を応用し目下追跡中であり、今後新たな発がんに対する化学抑制物質が見出されるものと期待される。

9. 発がん物質の複合効果の検討

本法による研究の応用として肝発がん物質の複合による効果検討の問題がある。一般にヒトの生活環境を考えると一つの発がん物質に高濃度で曝露されていることは職業がんとして知られた過去は別として現在ではむしろ稀である。これに対し現状は低濃度で多数の発がん物質に曝露されているのが我々の生活環境といえる。しかし長期の発がん実験によってその程度や本態を確認することはほとんど不可能に近い。

最近我々は食物中の“焦げ”に含まれている発がん物質 5 つ (Table 6, Fig. 3) を正常発がん量

Table 6. 各群の飼料中のヘテロサイクリックアミン量と実験群

A.	Trp-P-1	0.015%
B.	Glu-P-2	0.05%
C.	IQ	0.03%
D.	MelQ	0.03%
E.	MelQx	0.04%
A + B + C + D + E (1/5, 1/25)		
A	(1/1, 1/5, 1/25)	
B	(1/1, 1/5, 1/25)	
C	(1/1, 1/5, 1/25)	
D	(1/1, 1/5, 1/25)	
E	(1/1, 1/5, 1/25)	

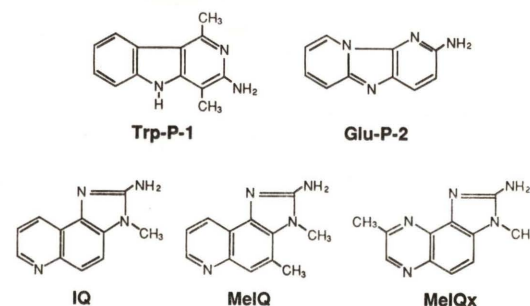


Fig. 3. 複合投与実験に用いたヘテロサイクリックアミン。

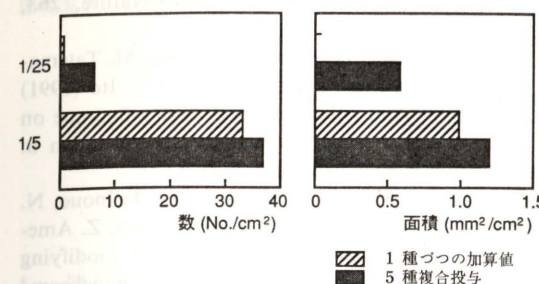


Fig. 4. 5 種のヘテロサイクリックアミンの複合効果。

の 1/5 と 1/25 で同時に投与しそれぞれの単独投与での加算値と比較する実験を DEN-PH 法を用いて行なった。その結果 5 種の組み合わせは単独での場合の単純加算値より明らかに高く (Fig. 4)、環境中の発がん物質による複合の危険性を示唆する成果が得られた (Ito *et al.*, 1991)。現在いくつかの発がん物質の複合効果についての研究を行っており、今後はこれらの研究も大いに進展すると思われる。

10. 中期発がん試験法の利点

DEN-PH 法の利点は種々あるが最も重要なのは観察動物数を少なくすることができることと、8 週間で 2 年以上におよぶ従来の発がんデータを予測しうることであろう。また特殊な酵素反応を最終判定に用いているため高度の病理学的知識を必要としないことも有用な点である。また検索化合物が少量でよいという効果がある。その結果同じ動物飼育施設内で、より多数の物質についての発がん性の検討が可能となる。さらに重要なことは発がん量が予測出来ることであり、これによって化学物質に関する発がんのリスクアセスメントに必要な多くの有用なデータが得られるものと考ええる。

11. おわりに

ラットの肝病変を指標とする中期発がん性試験法 (DEN-PH 法) は発がんのプロモーションの過程に出現する変化を巧みに増大させる方法といえる。化合物によってそれぞれ異なる遺伝子レベルから生物学的レベルまでさまざまな反応 (Table

Table 7. 発がん修飾物質による作用機序の多様性

1. 蛋白リン酸化酵素への作用
2. プロスタグランジンの合成、遊離の促進/抑制
3. ポリアミンの合成、ODC 活性への作用
4. リン脂質合成の促進、P-450 の増加/抑制、低下
5. 標的細胞の増殖、分化の促進/抑制
6. 細胞間代謝協同に対する影響
7. 細胞増殖因子に対する修飾
8. がん遺伝子の活性化
9. がん抑制遺伝子の不活性化、変異など

7) が出現するが、それを一括してとらえようとする方法ともいえる。この方法は動物を用いた実験であるためそれを可能にしたいと言えよう。

動物を用いる長期の発がん試験法は今や完全にその見直しが求められている。今後我々の開発した新しい発がん試験法が各方面で利用され、それにより多くの新しい成果の得られることを期待したい。

文 献

- Bannasch, P. (1987) Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing, I. Hepatic neoplasia, *Carcinogenesis*, **7**, 689-695.
- Craddock, V. M. (1976) Cell proliferation and experimental liver cancer, In: H. M. Cameron, D. A. Linsell and G. P. Warwick (Eds), *Liver Cell Cancer*, Elsevier, Amsterdam, pp. 152-201.
- Goldworthy, T. L., M. Hanigan and H. C. Pitot (1986) Models of hepatocarcinogenesis in the rat—contrasts and comparisons, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 61-89.
- IARC (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*, Supplement 7, IARC, Lyon, France.
- Ito, N., H. Tsuda, M. Tatematsu, T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki, S. Uwagawa, M. Kagawa, T. Ogiso, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima and M. Asamoto (1988) 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*, **9**, 387-394.
- Ito, N., R. Hasegawa, T. Shirai, S. Fukushima, K. Hakoi, K. Takaba, S. Iwasaki, K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1991) Enhancement of GST-P positive liver cell foci development by combined treatment of rats with five heterocyclic amines at low doses, *Carcinogenesis*, **12**, 767-772.

NCI (1976) Guidelines for Carcinogen Bioassay in Small Rodents: National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series, NCI, USA.

Ogiso, T., M. Tatematsu, S. Tamano, H. Tsuda and N. Ito (1985) Comparative effects of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase-positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay, *Toxicol. Pathol.*, **13**, 257-265.

Ogiso, T., M. Tatematsu, S. Tamano, R. Hasegawa and N. Ito (1990) Correlation between medium-term liver bioassay system data and results of long-term testing in rats, *Carcinogenesis*, **11**, 561-566.

Peraino, C., R. Fry, E. Staffeldt and J. P. Christopher (1975) Comparative enhancing effect of phenobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetyl-aminofluorene induced hepatic tumorigenesis in the rat, *Cancer Res.*, **35**, 2884-2890.

Solt, D. and E. Farber (1976) New principle for the

analysis of chemical carcinogenesis, *Nature*, **263**, 701-703.

Tiwawech, D., R. Hasegawa, Y. Kurata, M. Tatematsu, M.-A. Shibata, W. Thamavit and N. Ito (1991) Dose-dependent effects of 2-acetylaminofluorene on hepatic foci development and cell proliferation in rats, *Carcinogenesis*, **12**, 985-990.

Tsuda, H., M. A. Moore, M. Asamoto, T. Inoue, N. Ito, K. Satoh, A. Ichihara, T. Nakamura, Z. Amelizard and F. Oesch (1988) Effect of modifying agents on the phenotypic expression of cytochrome P-450, glutathione S-transferase molecular forms, microsomal epoxide hydrolase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and γ -glutamyltranspeptidase in rat liver preneoplastic lesions, *Carcinogenesis*, **9**, 547-554.

Zeiger, E. (1987) Carcinogenicity of mutagens: Predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity, *Cancer Res.*, **47**, 1287-1296.

環境変異原研究 **13**: 301-308 (1991)

胃および膀胱発がん物質試験法

大阪市立大学医学部第一病理学教室 福島昭治

1. はじめに

現在、化学物質の発がん性の評価にあたってはラット、マウス、ハムスターなどの小動物を用いた発がん性試験が要求される(厚生省生活衛生局食品化学課, 1987)。しかし、一つの発がん性試験を遂行するには約3年という長期間を要し、また、多額の費用、多数のスタッフ、さらに、空調コントロールされたしっかりした動物室などが必要である。したがって、環境中に存在する、また、医薬品、食品添加物、農薬や化成品として開発されつつある多数の化学物質のすべての発がん性をチェックするには途方もない努力が要求される。

一方、化学物質の発がん性を短期間に予知する方法として変異原性試験を中心とする短期検索法が開発されている(IARC, 1986)。しかし、その後の詳細な検討により短期検索法の結果と発がん性試験のそれとが必ずしも一致しないことが判明してきた。さらに、短期検索法の手法では検出不可能な発がん物質の存在が最近、クローズアップされてきている。

そこで、*in vitro* を主体とする短期検索法と発がん性試験との間を埋める試験法として、また、発がん性試験の代替法として、中期発がん性試験法の開発が進められ(IARC, 1986; Ito *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1990)、かつ、それが重要視されつつあるのが現状である。本項では我々が研究を進めている胃および膀胱を標的とする発がん物質の中期検索法について述べる。

2. 中期発がん法試験法の基本的な考え方

化学発がん物質による発がん過程として、イニシエーションとプロモーションという2つの過程からなる発がんの二段階説(現在ではさらにプログレーションという概念が加わり、多段階説として容認されている)が一般に認められている。この説に基づいて多数のプロモーターが種々の臓器に検出されており、さらに、発がん物質は概念的にはイニシエーション活性とプロモーション活性の両方を有していると考えられている(Table 1)(Ito *et al.*, 1980)。したがって、発がん物質であれば必ずプロモーション作用を発揮するはずであり、我々が開発を進めている胃および膀胱の中期発がん性試験法はこのプロモーション活性に焦点をあわせて検索を進める方法である。

また、中期発がん性試験法の期間としてはできる限り短いのが望まれる。*in vivo* のレベルで腫瘍性病変の発生をもって結果を判定できれば最良であるが、そのためには長期間にわたる観察が要求される。したがって実験期間の短縮化を図るためにそれにかわる指標病変の出現を把握することが必要である。現在、病理組織学的に胃および膀

Table 1. 化学物質の発がん性: イニシエーションおよびプロモーション作用による分類

化学物質の作用		分類
イニシエーション	プロモーション	
+	+	発癌物質
-	+	プロモーター
+	-	イニシエーター

(伊東ら, 1979)

〒545 大阪市阿倍野区旭町 1-4-54

Medium-term bioassay test of stomach and bladder carcinogens

Shoji Fukushima

Department of Pathology, Osaka City University Medical School, 1-4-54

Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545, Japan

膵における前がん病変が明らかにされており (福島ら, 1986), さらに, 免疫組織学的手法を用いて組織学的に把握できる前がん病変よりも早期に出現する病変をマーカーとすることにより, 実験期間の短縮化が可能となろう。

さらに, 如何に短期間に指標となる前がん病変を形成させるかというのも課題である。そのための一方法として, 種々の方法を用いて急激な細胞増殖をもたらす, プロモーション活性を増幅させることも重要な点である (Ito *et al.*, 1990)。

3. 胃発がん物質試験法

げっ歯類の胃には前胃と腺胃があり, 本項ではヒトとほぼ同じ組織構造からなる腺胃を標的とする発がん物質試験法について述べる。

(1) 腫瘍性病変を指標とする方法

高橋ら (Takahashi *et al.*, 1989) はラットに *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG), 100 mg/l を少なくとも 8 週間投与し, また, 同時に 10%NaCl を混飼投与することによって腺胃をイニシエーションし, その後, 種々の被験物質を 32 週間投与した結果, 食塩やコーヒー, チーズなど種々の食品に含まれている glyoxal, methylglyoxal に腺胃発がんを促進する作用のあることを見出している。また, MNNG をイニシエーターとし, プロモーションの過程で taurocholic acid, sodium taurocholate を 40~50 週投与するとそれらは胃発がんをプロモーションす

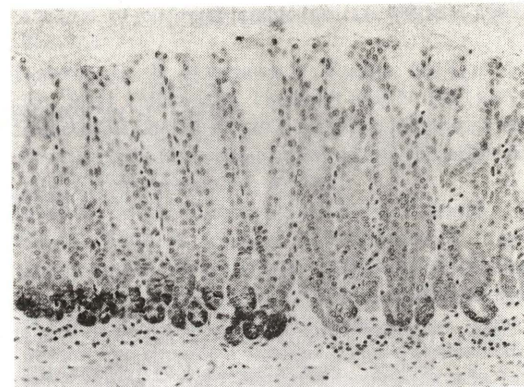


Fig. 1. MNNG 投与によって出現したラット腺胃粘膜の PAPG.

ることも発表されている (Kobori *et al.*, 1984; Salmon *et al.*, 1984)。

(2) pepsinogen 1 変異幽門腺を指標とする方法

ラット幽門腺には pepsinogen isoenzyme (Pg) の 1, 3, 4 が存在し, MNNG 腺胃がん発生過程の初期には Pg 1 の選択的低下がおこり, また, 腫瘍性過形成, 腺腫やがんにおいても Pg 1 が低下することが生化学的に認められている (Furihata *et al.*, 1975)。この Pg 1 低下は MNNG により変異した幽門粘膜増殖細胞から分裂増殖した変異幽門腺細胞に起因している と推測されている。また, 抗体を用いて免疫組織化学的に Pg 1 の低下した幽門腺の判別が可能であり, このような病変を Pg 1 変異幽門腺 (PAPG) と呼んでいる (Tatematsu *et al.*, 1987) (Fig. 1)。PAPG は

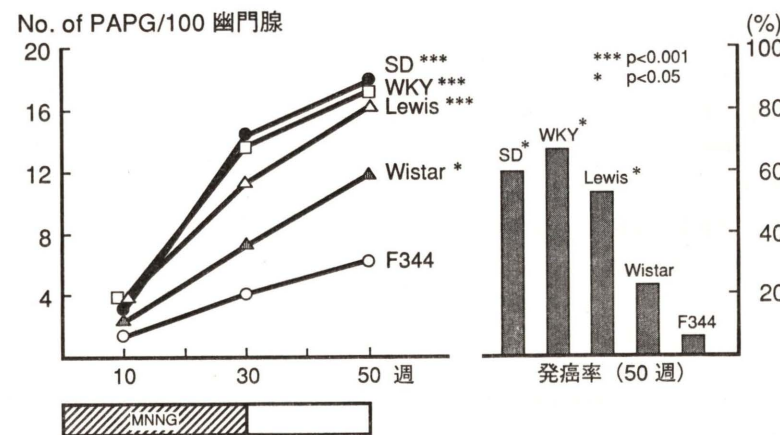


Fig. 2. ラット各系における PAPG 数の経時変化と発がん率. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; F344 と比較)

MNNG の用量に依存してみられる不可逆性変化であり, さらにその発生に明らかな系統差が報告されている (Fig. 2)。すなわち, MNNG, 100 mg/l 水溶液を 30 週まで投与し, それまでの PAPG の出現を見てみると, SD, WKY, Lewis 系ラットでは Wistar, F344 系よりいずれの時期においても PAPG が高率に形成されていた (Fig. 2) (Tatematsu *et al.*, 1988)。PAPG は粘膜過形成, 腺腫さらにはがんより早期に出現し, しかも, その出現率は Fig. 2 に示すごとく, 50 週の時点におけるがんの発生と相関していた。この事実は PAPG の出現が胃がん発生に密接に関係しており, PAPG は病理組織学的に検出可能な最も早期な前がん病変であることを明瞭に示している。

立松ら (Tatematsu *et al.*, 1989) は MNNG をイニシエーションとし, プロモーションの段階に, sodium taurocholate を投与すると PAPG の

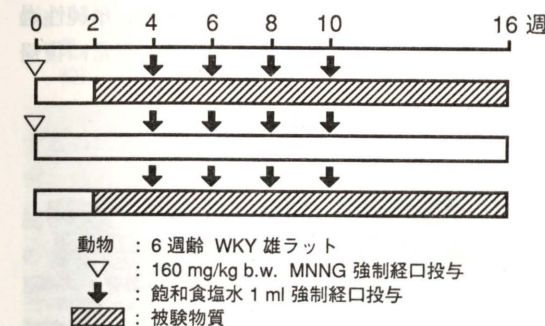


Fig. 3. 胃発がん物質中期試験法.

発生が増加することを見出しており, 最近, この方法を改良し, PAPG を指標とする胃発がん物質試験法を報告している (Tatematsu *et al.*, 1990)。Fig. 3 に示す如く, 6 週齢の WKY 雄ラットを

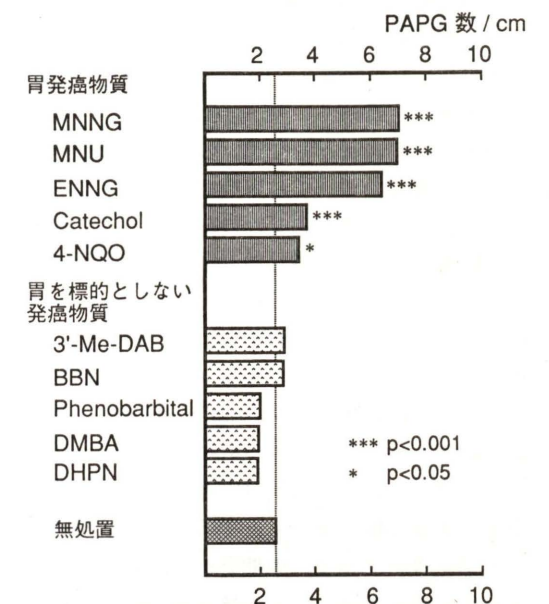


Fig. 4. 胃発がん物質による PAPG 形成の促進. (MNNG, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea; ENNG, *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine; 4-NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide; 3'-Me-DAB, 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene; BBN, *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine; DMBA, 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene; DHPN, dihydroxy-di-*n*-propylnitrosamine; 有意差は無処置群と比較)

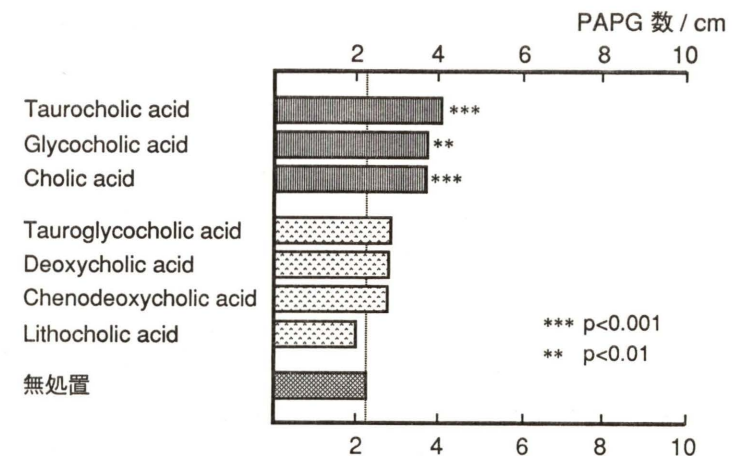


Fig. 5. 胆汁酸による PAPG 形成の促進. (有意差は無処置群と比較)

用い、実験開始時に 160 mg/kg 体重の MNNG を 1 回、強制経口投与し、その 2 週間より 14 週間、検索物質を投与する。その間、胃粘膜の細胞増殖を目的として、飽和食塩水 1 ml 第 2 週目より 2 週に 1 回の割合で 4 回、強制経口投与を行う。動物飼育期間は 16 週間で、対照群として MNNG と飽和食塩水の群を設け、PAPG の発生を比較検討する。

実際に検索物質として種々の発がん物質を投与すると、既存のすべての胃発がん物質は PAPG の発生を有意に増加させたのに対し、胃を標的としない発がん物質の投与群ではいずれも対照群と差はみられなかった (Fig. 4) (Tatematsu *et al.*, 1990)。また、Fig. 5 に示す如く、胆汁酸による PAPG の形成促進を検索してみると、taurocholic acid, glycocholic acid や cholic acid はいずれも陽性結果をもたらした (Yamaguchi *et al.*, 1990)。

この方法は観察期間が 16 週間と通常の二段階発がん実験 (40~50 週) と比較して、期間が著しく短縮化されており、中期発がん試験法としての有用性が極めて高く、その確立が期待される。

4. 膀胱発がん物質試験法

(1) 膀胱二段階発がん

膀胱における二段階発がんモデルは Hicks ら (1975) の報告に始まる。それによれば、発がんしない量の *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) をラットの膀胱内に経尿道的に 1 回注入した後、人工甘味料である sodium saccharin や sodium cyclamate を経口投与すると膀胱がんの発生が促進されるというものである。次いで、Cohen ら (1979) は *N*-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide (FANFT) を飼料中に混じて 6 週間の投与を行うモデルを用いて、sodium saccharin や DL-tryptophan が膀胱発がんプロモーターであることをつきとめている。また、Oyasu ら (1981) はラット異所膀胱を用いた実験モデルにより尿自身の発がんプロモーション作用を見出している。しかしながら、これらの発がん二段階モデルではイニシエーターである発がん物質を直接膀胱内に注入するといった不自然な投与方法が用いられていたり、イニシエーターとして用いる発がん物質

が入手困難であったり、実験操作が煩雑で、しかも長期間の観察が必要であるなどの欠点が挙げられる。一方、我々は後述する如く、*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) をイニシエーターとする膀胱二段階発がんモデルを確立している (Fukushima, 1991; Fukushima *et al.*, 1983a; Fukushima *et al.*, 1983b)。

(2) 前がん病変

BBN によるラット膀胱がんはその投与濃度、投与期間に相関して発生し、特に BBN の総摂取量にがん発生は依存している。そこで、BBN による発がん過程を病理組織学的に追求すると、BBN をラットに経口投与後、膀胱粘膜はびまん性に 4 層以上に肥厚 (単純性過形成) し、その後、血管結合組織の新生を伴い内腔に向け発育したり、また粘膜下に結節性に増殖する乳頭状ないし結節状過形成 (PN 過形成) が出現し (Fig. 6)、次いで乳頭腫を経てがんになる (Fig. 7) (Fukushima *et al.*, 1982; Ito *et al.*, 1969)。単純性過形成が発がん要因の消失により容易に正常に復帰

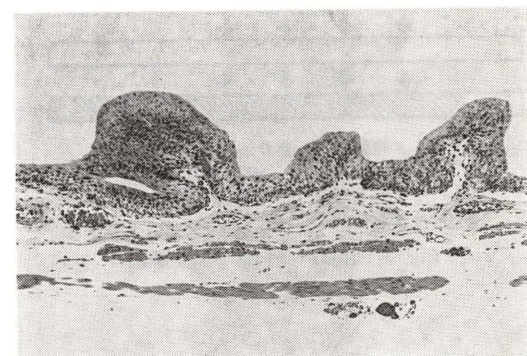


Fig. 6. BBN 投与によって出現したラット膀胱粘膜の PN 過形成。

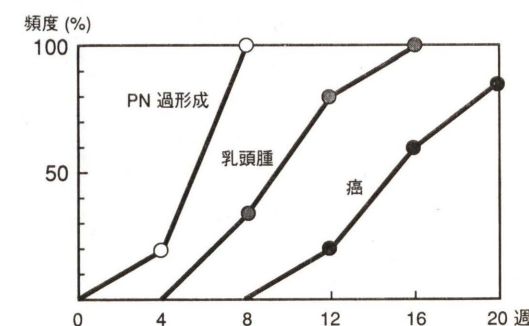


Fig. 7. BBN 投与期間とラット膀胱腫瘍発生頻度。

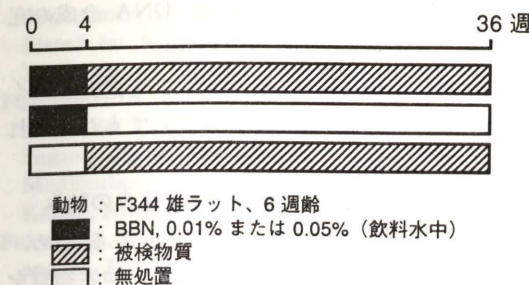


Fig. 8. 膀胱発がん物質中期試験法。

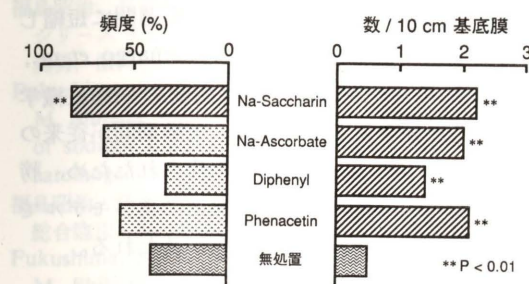


Fig. 9. 膀胱の PN 過形成発生に及ぼす被検物質の効果. (0.01% BBN の場合; 有意差は無処置群と比較)

するのに比し、PN 過形成には可逆性のものと不可逆性のものが存在し、発がん要因の消失後も引き続き増殖し、さらに乳頭腫、がんへと移行するものが多数含まれている。膀胱の前がん病変として重要なのはこの PN 過形成である。

(3) BBN を用いたラット膀胱発がん物質試験法

6 週齢の F344 ラットを用い、イニシエーターとして 0.01 ないし 0.05% BBN を給水瓶にて 4 週間投与した後、種々の検索物質を 32 週間投与する (Fig. 8) (Fukushima *et al.*, 1983a; Fukushima *et al.*, 1983b)。対照群として BBN のみの群、検索物質のみの群、無処置の群を設ける。全観察期間は 36 週間で、屠殺後、膀胱の HE 染色標本で膀胱病変を病理組織学的に検索するとともに、カラービデオ画像処理装置を用いて基底膜をライトペンで辿り、基底膜の長さを算出する。このプロセスにより、膀胱病変を単に発生頻度をもってデータ処理するのではなく、病変の発生個数を定量的に単位基底膜当たりの数値で表現できる。

Fig. 9 に BBN, 0.01% を投与した場合の、被

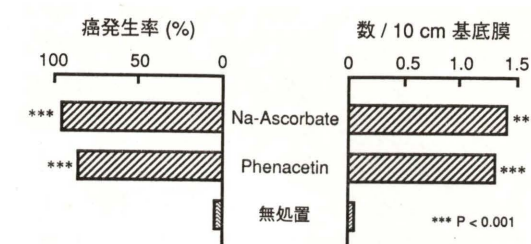


Fig. 10. 膀胱がん発生に及ぼす被検物質の効果. (0.05% BBN の場合; 有意差は無処置群と比較)

Table 2. BBN 膀胱発がんの抗がん剤によるプロモーション

処置	動物数	腫瘍の発生頻度	
		乳頭腫	癌
BBN→Adriamycin (1 mg/ml)	23	22(96)***	14(61)*
BBN→Adriamycin (0.5 mg/ml)	24	20(83)**	10(42)*
BBN→Mitomycin C (0.5 mg/ml)	27	22(82)**	13(48)*
BBN→生食	23	8(35)	3(13)

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (生食群と比較)

験物質による PN 過形成発生におよぼす影響を示す。Sodium saccharin, sodium L-ascorbate, diphenyl および phenacetin 投与群のいずれもが、対照群に比して、PN 過形成の有意な発生をもたらした。さらに、BBN, 0.05% を投与した場合には PN 過形成のみならず、Fig. 10 に示される如く、がんの発生率ならびに単位基底膜当たりの数とも sodium L-ascorbate, phenacetin 投与により有意に増加した。このように、膀胱発がん物質の検索に、前がん病変ないし腫瘍性病変を指標とする比較的短期間の検索システムは極めて有効な手段と考えられる。事実、我々はこのシステムを用いて、化学物質の膀胱発がんプロモーション作用を検索し、ナトリウムまたはカリウム塩 (Fukushima, 1991; Fukushima *et al.*, 1986), BHA, BHT などの酸化防止剤 (Imaida *et al.*, 1983), 膀胱結石あるいは高度の結晶尿を来す物質 (Kurata *et al.*, 1986), adriamycin, mitomycin などの抗がん剤 (Ohtani *et al.*, 1984) (Table 2) にその作用があることを見出している。

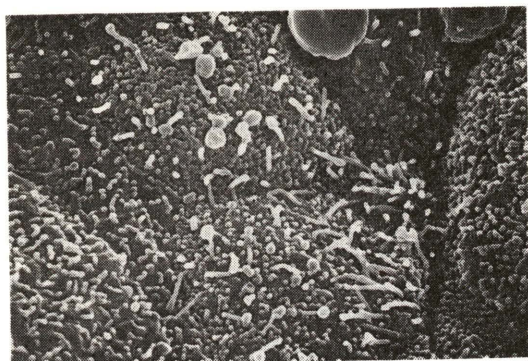


Fig. 11. BBN 投与ラット膀胱の走査電顕像。pleomorphic microvilli がみられる。

Table 3. 膀胱粘膜上皮における増殖性変化と DNA 合成

被験物質	動物数	単純性過形成	SEM 病変	[³ H]thymidine 標識率
Adriamycin	5	4	+++	4.07±0.99** ^a , ^b
Mitomycin C	5	3	+++	1.88±0.81* ^a , ^b
生食	5	2	+	0.46±0.81 ^a
無処置	5	0	—	0.04±0.05

* P<0.05, ** P<0.01 (生食群と比較)

^a P<0.05, ^b P<0.01 (無処置群と比較)

(4) 膀胱を標的とする化学物による膀胱粘膜の走査電顕像と細胞増殖

走査電顕的に膀胱発がん物質あるいはプロモーターをラットに投与すると早期から膀胱粘膜表面にはがんの表面にみられるのと同様の表層病変が出現する。例えば、0.05%BBN を F344 ラットに 4 週間投与すると、膀胱表層の細胞表面には長短とりまぜた微細絨毛, pleomorphic microvilli や切株状の短い均一な微細絨毛 (Fig. 11), short, uniform microvilli が観察され、さらにローブ状あるいは葉脈状の微細皺壁の ropy or leafy microridge などが観察される (福島と長谷川, 1986)。これらの所見は前がん病変にも出現するのと同様のものであり、走査電顕的に過形成病変を意味する。Table 3 に示すように adriamycin や mitomycin をラットに膀胱内注入するとこの様な走査電顕所見が得られる。

一般に膀胱発がん物質やプロモーターはその標的臓器の細胞増殖をひきおこす (Cohen and Ellwein, 1990)。Table 3 の如く adriamycin, mito-

mycin の膀胱内注入によっても DNA 合成の亢進がおこる (Shibata *et al.*, 1990)。

この様に、通常の H. E. 染色では把握しにくい時期においても、細胞増殖によってもたらされる過形成病変を走査電顕的に確認できる。

(5) ラット膀胱発がん物質試験法改良の試み

我々は最近、検索期間の短縮化を図るため、BBN によるイニシエーションの後、検索物質を与えている途中でウラシルを 3 週間与え、そのウラシル誘発結石による膀胱上皮細胞の増殖を利用することにより、実験期間を 20 週間に短縮した方法の開発を進めている (de Camargo *et al.*, 1991)。このモデルでは、発生病変の病理組織学的検索に熟練を要するものの、実験期間が従来の 36 週のモデルから 20 週に短縮化されたため、膀胱を標的とする発がん物質の検出に良いモデルであることが期待され、その確立が待たれる。

5. おわりに

従来、発がん物質や発がんプロモーターは臓器特異性があると認識されてきた。また、胃、膀胱を標的とする発がん物質はそれらの臓器にプロモーション活性を示すことも知られている。したがって、胃および膀胱を標的と考えられる化学物質の中期発がん性試験法としては我々が開発を進めている方法が、現在のところ最良であると我々は確信している。しかし、発がん物質が標的臓器以外の臓器に対して発がんプロモーションないしインヒビションという作用を発揮することが、最近、明らかにされつつある。従って、一つの臓器に固定した中期発がん性試験法の開発のみならず、個体の全臓器を対象とする多臓器中期発がん性試験法の開発が切に望まれる (Ito *et al.*, 1991)。

文 献

- Cohen, S. M., M. Arai, J. B. Jacobs and G. H. Friedell (1979) Promoting effect of saccharin and DL-tryptophan in urinary bladder carcinogenesis, *Cancer Res.*, **39**, 1207-1217.
- Cohen, S. and L. B. Ellwein (1990) Cell proliferation in carcinogenesis, *Science*, **249**, 1007-1011.
- de Camargo, J. L. V., T. Shirai, T. Kato, M. Asamoto and S. Fukushima (1991) Summation effects of uracil and other promoters on epithelial lesion

- development in the F344 rat urinary bladder initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1220-1225.
- Fukushima, S. (1991) Modification of tumor development in the urinary bladder, In: N. Ito, H. Sugano (Eds.), *Prog. in Exp. Tumor Res.*, **33**, Modification of Tumor Development in Rodents, Karger, Basel, pp. 154-174.
- Fukushima, S., A. Hagiwara, T. Ogiso, M. Shibata and N. Ito (1983a) Promoting effects of various chemicals in rat urinary bladder carcinogenesis initiated by N-nitroso-N-butyl-(4-hydroxybutyl)-amine, *Fd Chem. Toxic.*, **21**, 59-68.
- 福島昭治, 長谷川良平 (1986) 発生と進展; 図説臨床癌シリーズ 4, 膀胱癌, (末舛恵一, 高山昭三, 豊島久真男, 濱岡利之, 佐々木本道 編), pp. 117-127.
- Fukushima, S., K. Imaida, T. Sakata, T. Okamura, M. Shibata and N. Ito (1983b) Promoting effects of sodium L-ascorbate on 2-stage urinary bladder carcinogenesis in rats, *Cancer Res.*, **43**, 4454-4457.
- 福島昭治, 伊東信行 (1984) 発癌物質による初期病変, *総合臨床*, **30**, 215-218.
- Fukushima, S., K. Imaida, T. Sakata, T. Okamura, M. Shibata and N. Ito (1982) Histopathological analysis of preneoplastic changes during N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in rats, *Acta Pathol. Jpn.*, **32**, 243-250.
- Fukushima, S., M. Shibata, T. Shirai, S. Tamano and N. Ito (1986) Roles of urinary sodium ion concentration and pH in promotion by ascorbic acid of urinary bladder carcinogenesis in rats, *Cancer Res.*, **46**, 1623-1626.
- Furihata, C., K. Sasajima, S. Kazama, K. Kogure, T. Kawachi, T. Sugimura, M. Tatematsu, and M. Takahashi (1975) Changes in pepsinogen isozymes in stomach carcinogenesis induced in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 925-930.
- Hicks, R. M., J. S. J. Wakefield and J. Chowanec (1975) Evaluation of a new model to detect bladder carcinogens or co-carcinogens; results obtained with saccharin, cyclamate and cyclophosphamide, *Chem-Biol. Interact.*, **11**, 225-233.
- Imaida, K., S. Fukushima, T. Shirai, M. Ohtani, K. Nakanishi and N. Ito (1983) Promoting activities of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci development in the liver of rats, *Carcinogenesis*, **4**, 895-899.
- International Agency for Research in Cancer (WHO) (1986) Long-term and short-term assays for carcinogens: A critical appraisal, IARC Scientific Publications No. 83, Lyon.
- Ito, N., Y. Hiasa, A. Tamai, E. Okajima and H. Ki-

- tamura (1969) Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine in rats, *Gann*, **60**, 401-410.
- Ito, N., T. Shirai and S. Fukushima (1991) Medium-term bioassay for carcinogens using multiorgan models, In: N. Ito, H. Sugano (Eds.), *Prog. in Exp. Tumor Res.*, **33**, Modification of Tumor Development in Rodents, Karger, Basel pp. 41-57.
- Ito, N., M. Tatematsu, R. Hasegawa and H. Tsuda (1990) Medium-term bioassay system for detection of carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis utilizing the GST-P positive liver cell focus as an endpoint marker, *Toxicol. Pathol.*, **17**, 630-641.
- Ito, N., M. Tatematsu, K. Nakanishi, R. Hasegawa, R. Takano, R. Imaida and T. Ogiso (1980) The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitrosodiethylamine or N-2-fluorenylacetylamide, *Gann*, **71**, 832-842.
- Kobori, O., T. Shimizu, M. Maeda, Y. Atomi, J. Watanabe, M. Shoji and Y. Morioka (1984) Enhancing effects of bile and bile acid on stomach tumorigenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 853-861.
- 厚生省生活衛生局食品化学課監修 (1987) 化学物質の発癌性評価, 薬事日報社, pp. 1-111.
- Kurata, Y., M. Asamoto, A. Hagiwara, T. Masui and S. Fukushima (1986) Promoting effects of various agents in rat urinary bladder carcinogenesis initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, *Cancer Lett.*, **32**, 125-135.
- Ohtani, M., S. Fukushima, T. Okamura, T. Sakata, N. Ito, K. Koiso and T. Nijima (1984) Effects of intravesical instillation of antitumor chemotherapeutic agents on bladder carcinogenesis in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, *Cancer*, **54**, 1525-1529.
- Oyasu, R., Y. Hirao and K. Izumi (1981) Enhancement by urine of urinary bladder carcinogenesis, *Cancer Res.*, **41**, 478-481.
- Salmon, R. J., M. Laurent and J. P. Thierry (1984) Effects of taurocholic acid feeding on methyl-nitro-N-nitroso-guanidine induced tumors, *Cancer Lett.*, **22**, 315.
- Shibata, M.-A., R. Hasegawa, Y. Kurata, M. Yamada, S. Tamano and S. Fukushima (1990) Bladder epithelial hyperplasia in F344 rats after intravesical instillation of the antitumor chemotherapeutic agents Adriamycin and Mitomycin C, *Cancer Lett.*, **49**, 41-49.
- Takahashi, M., H. Okamiya, F. Furukawa, K. Toyoda, H. Sato, K. Imaida and Y. Hayashi (1989) Effects of glyoxal and methylglyoxal administration on gastric carcinogenesis in Wistar rats after initiation with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine,

Carcinogenesis, **10**, 1925-1927.

Tatematsu, M., T. Aoki, T. Inoue, M. Mutai, C. Furihata and N. Ito (1988) Coefficient induction of pepsinogen 1-decreased pyloric glands and gastric cancers in five different strains of rats treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, Carcinogenesis, **9**, 495-498.

Tatematsu, M., C. Furihata, T. Katsuyama, Y. Mera, T. Inoue, T. Matsushima and N. Ito (1987) Immunohistochemical demonstration of pyloric gland-type cells with low-pepsinogen isozyme 1 (Pg 1) in preneoplastic and neoplastic tissues of rat stomachs treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, J. Natl. Cancer Inst., **78**, 771-777.

Tatematsu, M., M. Mutai, K. Inoue, K. Ozaki, C.

Furihata and N. Ito (1989) Synergism between sodium chloride and sodium taurocholate and development of pepsinogen-altered pyloric glands: Relevance to a medium-term bioassay system for gastric carcinogens and promoters in rats, Jpn. J. Cancer Res., **80**, 1035-1040.

Tatematsu, M., K. Ozaki, M. Mutai, Y. Shichino, C. Furihata and N. Ito (1990) Enhancing effects of various gastric carcinogens on development of pepsinogen-altered pyloric glands in rats, Carcinogenesis, **11**, 1975-1978.

Yamaguchi, S., M. Tatematsu, C. Furihata, K. Takaba and N. Ito (1990) Effects of bile acids on development of pepsinogen-altered pyloric glands in rats, Cancer Lett., **55**, 129-134.

環境変異原研究 **13**: 309-314 (1991)

新しい試験法

——ミュータント (LEC, NAR) ラット——

国立がんセンター研究所 発がん研究部 長尾美奈子, 落合雅子, 曾根秀子

1. 緒言

化学物質の発がん性を検索するに当たり、動物の最大耐量を投与して行なう実験法の是非が論議されている最近であるが、一方、ヒトでは絶えず実験動物のように健全な状況下におかれているとは限らない。ウイルス性あるいはアルコール性肝炎、下痢、ストレス性潰瘍など、細胞の損傷を補償するための細胞増殖が起こっている状況のもとでは、低濃度の発がん物質が、細胞をがん化させる決定的な DNA 変化を誘発している可能性がある。最近、札幌医大および北大で、自然に肝炎を発症するミュータントラット、LEC が樹立された (Sasaki *et al.*, 1985)。このミュータントラットは、ヒトが肝炎発症時には、如何に発がん物質に対する感受性が高くなっているのかを明らかにするのに、格好の動物であると我々は考えている。食品中に存在し、ラットおよびマウスに肝がんを誘発する heterocyclic amine の 1 つ、2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) が低濃度で肝がんを誘発することを明らかにしたので紹介する。

ヒトでも無アルブミン血症の遺伝病というものがあるが (Ruyfner and Dugaiczky, 1988)、ラットにもそのようなミュータントが存在することが知られている (Nagase *et al.*, 1979)。このラットは種々の発がん物質に対し高感受性を示す (Kakizoe and Sugimura, 1988)。これまで約 10 種の化合物の発がん性が検討されているが、正常ラットと標的臓器に変わりがないが、膀胱、大腸、小腸

などで感受性が上昇していることが明らかにされている。無アルブミン血症ラットを用いることにより、発がん性未知物質のスクリーニングを、短期でしかも低容量で検討することができる。一方、このラットの高感受性の原因を追求することにより、内因性で発がんに対し促進的に作用する因子を明らかに出来ると考えている。

2. 自然肝炎発症ラットを用いた発がん実験

LEC (Long-Evans with Cinnamon-like coat color) ラットは、生後 4 ヶ月になると全例が肝炎を自然発症するミュータントである。80% には黄疸がみられ、20% は外観からは症状が認め難いが、GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) および GPT (glutamic pyruvic transaminase) の上昇および組織鏡検により肝炎発症が確認されている。肝炎急性期を過ぎると慢性期に移行し、1年2ヶ月位から1年6ヶ月位にかけて肝がんが自然発生する (Yoshida *et al.*, 1987) (Fig. 1)。肝炎発症に係わる遺伝子 *hts* (hepatitis) は、常染色体に存在し劣性遺伝する (Masuda *et al.*, 1988)。最近、LEC の肝臓には銅が蓄積していることが明らかにされた (Li *et al.*, 1991)。また、LEC と他の strain との F₁ を LEC と back cross させる実験により、*hts* の機能は、銅蓄積と強く連鎖していることを我々は明らかにした。

肝臓の銅代謝にはセルロプラスミンが主に関与している。腸管から吸収された銅はセルロプラスミンが蛋白と結合し、血液に分泌される。この

〒104 東京都中央区築地 5 丁目 1-1

Carcinogenicity tests using mutant rats (LEC, NAR)

Minako Nagao, Masako Ochiai and Hideko Sone

Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute, 1-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

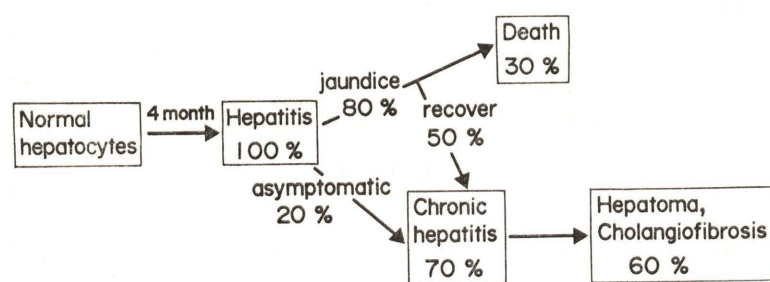


Fig. 1. 遺伝性肝炎発症 LEC ラットの自然史.
(Yoshida *et al.*, 1987; 伝法その他, 1989)

Table 1. 自然肝炎発症 LEC ラットにおける MeIQx の肝発がんにおよぼす影響

Group	Effective No.	No. of rats with HCC	No. of HCC	HCC/rat
LEC				
Control	8	2	2	0.3±0.5
MeIQx (40 ppm)	8	8*	22	2.8±2.0*
LEA				
MeIQx (40 ppm)	8	0	0	0

HCC: Hepatocellular carcinoma

*, $P < 0.01$

LEC ラットではセルロプラスミンペプチドは肝臓および血清中に正常ラットとほぼ同じレベルで存在していることを我々は Western ブロットで確認している。しかし血清中のセルロプラスミン分画には ferroxidase 活性がないことから、セルロプラスミンペプチドに Cu が結合するところ欠陥があるであろうと我々は考えている。

銅が肝炎を誘発する機構については、活性酸素の関与が考えられる。Cu⁺⁺ はスーパーオキシドやアスコルビン酸により Cu⁺ に還元され、H₂O₂ 存在下で・OH を生ずる。・OH が DNA や細胞の障害を引き起こし、肝炎を誘発させるものと考えられる。

この LEC ラットに、肝炎急性期を過ぎた 23 週から MeIQx を餌に混ぜて投与し、発がん性に対する作用を検討した。Fischer 344 (F344) ラットを用いた発がん実験では、400 ppm の MeIQx を含む餌を投与することにより、61 週で 100% に肝がんが誘発されているので、400 ppm の MeIQx を LEC ラットに投与したところ、約 3 週の投与で体重が著しく減少し、実験に耐えられないこと

がわかった。

そこで 40 ppm の MeIQx を含む餌を 40 週間与え、生後 63 週で実験を終了した。病理組織解析の結果を Table 1 に示す。対照群としては、LEC の近交系で肝炎を発症しない LEA (Long-Evans with Agouti coat color) ラットを用いた。LEC の基礎飼料投与群では 8 匹中 2 匹に、total で 2 個の肝がん (HCC) が発生したのに対し、MeIQx 40 ppm 投与群では 8 匹全例に total で 22 個の HCC が誘発された。MeIQx 投与群では、増殖性結節の一部が HCC に変化した組織像もみられ、少なくとも一部では自然発生した増殖結節が MeIQx により悪化したものと推定される。尚、LEA ラットには肝をはじめ、どの臓器にも腫瘍は認められなかった。

以上、正常ラットには何ら腫瘍を誘発しない量の発がん物質でも、肝炎を伴う場合は、肝がんへの進行を明らかに促進することが証明されたわけである。本実験では、正常ラット発がん量の 1/10 量を用いたが、更に低濃度を用い、用量相関を明らかにすることが重要であると考えている。

Table 2. 無アルブミン血症ラット NAR と SD ラットの発がん性の比較*

Carcinogen	Organ	Sex	Tumor incidence (%)		Reference
			NAR	SD	
<i>N</i> -butyl- <i>N</i> -(4-hydroxybutyl)-nitrosamine	Bladder	male	100	17	Kakizoe <i>et al.</i> , 1982
<i>N,N</i> -dimethylnitrosamine	Kidney	male	76	37	Nagase <i>et al.</i> , 1986
<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	Stomach	male	70	38	Sugiyama <i>et al.</i> , 1986
azoxymethane	Intestine	male	100	72	Nagase <i>et al.</i> , 1983
3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene	Liver	male	78	93	Sato <i>et al.</i> , 1980
7, 12-dimethylbenz[<i>a</i>]anthracene	Breast	female	35	69	Nagase <i>et al.</i> , 1984
3-methylcholanthrene	Skin	male	100	95	Takahashi <i>et al.</i> , 1985
	Subcutaneous	male	88	33	

*Kakizoe & Sugimura, 1988

Table 3. 種々の heterocyclic amine 投与ラットにおける DNA-付加物レベルと発がん性

	Adducts/10 ⁷ nucleotides			
	Liver	Pancreas	Kidney	Large Intestine
MeIQx	107	32	42	0.3
0.04%, 4 weeks	(100)	(0)	(0)	(10)
Glu-P-1	24	6.0	7.3	3.1
0.05%, 4 weeks	(83)	(0)	(0)	(62)
PhIP	1.0	9.0	4.0	5.8
0.05%, 4 weeks				

(): Tumorigenicity, %.

3. 無アルブミン血症ラットを用いた発がん実験

無アルブミン血症ラット、NAR は Sprague-Dawley に見つかったミュータント (Nagase *et al.*, 1979) で、アルブミンの構造遺伝子の splicing donor site に変異があるために血清アルブミンが著しく減少している (Esumi *et al.*, 1983)。勿論遺伝様式は常染色体劣性である。正常ラットでは血清蛋白質の約半分がアルブミンであるが、NAR では正常ラットの 1/3,000 以下である (Makino *et al.*, 1982)。その分血清中のアルブミン以外の殆ど全ての蛋白質が増加していて、血清中の蛋白質濃度は、正常ラットのそれとほぼ同じ濃度に維持されている。

これまでに報告されている NAR の種々の化学発がん物質に対する感受性を Table 2 に示す。*N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine による膀胱がん、*N,N*-dimethylnitrosamine による腎臓がん、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine に

よる胃がん、azoxymethane による消化管がんの発生率が増加している。一方、3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene による肝がん、3-methylcholanthrene による皮膚がん、7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene による乳がんの発生率は余り影響を受けないか、抑制されている。

Heterocyclic amines の 1 つである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-*b*]pyridine (PhIP) は加熱食品中の含量が多い (Felton *et al.*, 1986; Becher *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1988)。また、ラットに経口投与した後に生ずる DNA-付加物を ³²P-ポストラベル法により検討した結果、大腸における付加物レベルが比較的高く、肝臓におけるレベルが低いことがわかった (Table 3)。このポストラベル法による解析の結果は、PhIP に消化管がん誘発能がある可能性を示唆するものであり、我々は NAR を用いて発がん実験を行なった (Ochiai *et al.*, 1991)。400 ppm の PhIP を含

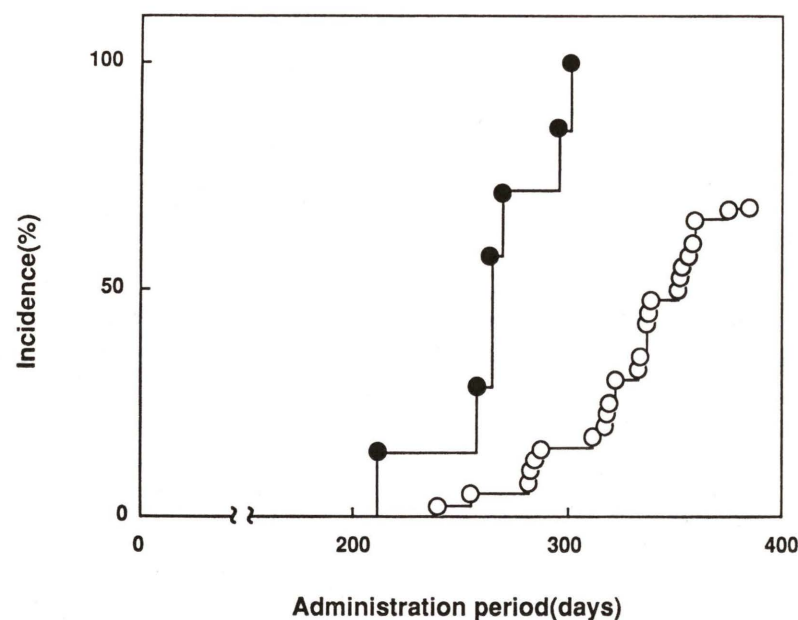
Table 4. NAR および F344 ラットにおける PhIP の発がん性 (Ochiai *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1991)

	Effective No.	No. of rats with tumors						
		Intestine				Zymbal glands	Pancreas	Skin
		Total	Small intestine	Cecum	Large intestine			
NAR ♂	13	10	9	3	6	4	2	1
F344 ♂	29	16	0	0	16	0	0	3

Table 5. PhIP により誘発された消化管腫瘍の発生部位 (Ochiai *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1991)

	Effective No.	No. of NARs bearing intestinal tumor	No. of intestinal tumors				Average (tumors/rat)
			Small intestine	Cecum	Large intestine	Total	
NAR ♂	13	10	24 ^{a)}	4	8	36	2.8
F344 ♂	29	16	0	0	19	19	1.2

^{a)} Two were diagnosed as adenomas and the others, including the cecum and large intestinal tumors, were all adenocarcinomas.

Fig. 2. IQ による消化管腫瘍の誘発. 300 ppm の IQ を含む餌を F344^{alb-} (●-●) および F344 (○-○) ラットに投与した.

餌で実験を開始したが、対照群との比較で体重抑制が著しいため 108 日から 300 ppm に濃度を減らしたが、引き続き体重抑制がみられたので、144 日から 100 ppm に減らし、311 日で実験を終了した。発がん実験の結果を、F344 ラットにおけるそれ (Ito *et al.*, 1991) との対比で Table 4 および Table 5 に示す。

この実験結果は、NAR では消化器腫瘍誘発に関して感受性が高く、この性質は化学物質に対する特異性というよりは、むしろ臓器に特異的であろうことを示唆するものであった。興味あることに、heterocyclic amine の 1 つである 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) は F344 ラットに肝がんおよび消化管がんを誘発する

Table 6. IQ 経口投与 F344^{alb-} および F344 ラットにおける IQ-DNA 付加体レベル

Animals	Adducts/10 ⁷ nucleotides				
	Proximal small intestine	Distal small intestine	Cecum	Large intestine	Liver
F344 ^{alb-}	0.3	0.3	0.5	0.4	34
F344	0.8	1.0	0.7	1.2	33

Administration for 12 weeks

(Wakabayashi *et al.*, 1991) ので、F344^{alb-} のコンジェニックラットを用いて発がん性を検討した。Fig 2 に、300 ppm の IQ を含む餌を投与した F344 ラットおよび F344^{alb-} ラットの消化管における経時的腫瘍誘発率を示す。F344^{alb-} では全例に 301 日の実験期間に消化管腫瘍が誘発され、その間に肝腫瘍は全く誘発されなかった。一方、F344 ラットでは、消化管および肝の腫瘍の経時的誘発率はほぼ同じで、F344^{alb-} の消化管腫瘍発生に比較して遅く、385 日で 70% であった。

さらに消化管腫瘍の発生部位を検討してみると、F344^{alb-} では 7 匹に生じた 12 個の腫瘍のうち小腸に 5 個 (42%)、盲腸に 4 個 (33%)、大腸に 3 個 (12%) であった。一方、F344 ラットでは 40 匹に生じた 69 個の腫瘍のうち、14 個 (20%) は小腸、盲腸 1 個 (1.4%)、大腸 54 個 (78%) で、F344^{alb-} ラットでは PhIP の場合と同様、小腸の末端部位に腫瘍が発生しやすいことがわかった。

アルブミンは化学物質と結合する能力があるので、無アルブミンラットでは、各臓器における化学物質の濃度分布が異なっている可能性がある。³²P-ポストラベル法により、肝および消化管における DNA 付加物レベルを検討した。方法としては、ヌクレアーゼ P₁ 法を用いた。300 ppm の IQ を含む餌を 12 週投与した時点での DNA-付加物レベルを Table 6 に示す。肝臓におけるレベルは F344 および F344^{alb-} ではほぼ同じであるのに対し、消化管では何れの部位も付加物レベルは F344^{alb-} の方が明らかに低かった。つまり無アルブミンラットの消化管発がん物質に対する高感受性は、化学物質の体内における分布の差異というよりは、むしろ内因性のプロモーター様物質に差があるものと推定される。

消化管がんのプロモーターとしては胆汁酸があるが、無アルブミンラットでは胆汁酸の代謝が正常ラットとは異なっている。血清中の胆汁酸の濃度は、小腸からの吸収と、肝細胞による血清からの uptake される量との差であるが、NAR では SD ラットの 1/10 に減少している。また胆汁中の胆汁酸のうち、tauro-抱合体が増加し、glyco-抱合体が減少していることが報告されている (Takikawa *et al.*, 1985)。Deoxycholic acid や lithocholic acid には消化管腫瘍発生におけるプロモーション作用があることが報告されている (Suzuki and Bruce, 1986; Hayashi *et al.*, 1986)。Tauro-抱合体や glyco-抱合体にプロモーション作用の差があるのかは現在不明であるが、IQ の投与自身が胆汁酸の代謝に影響を与えている可能性もあり、大変興味深い。

4. おわりに

ヒト肝がんには、B 型や C 型などの肝炎ウイルスによる肝炎に、さらに環境発がん物質が作用している可能性は広く受け入れられている考え方であるが、これまで実験的に証明された例はない。我々が用いたモデルは、銅蓄積による肝炎のモデルであるが、肝細胞が絶えず増殖しているという点ではウイルス性肝炎と共通の状況下にある。この肝炎ラットが発がん物質に対し、高感受性を示したことは、肝臓薬の開発にもこの LEC ラットは有用な実験系になると考えられる。NAR は種々の消化がん誘発物質に高感受性である。最近、トランスジェニックマウスを用い、高感受性に発がん性を検出する方法も開発されつつある (勝木, その他, 1991) が、これらミュータントラットを使用するのも 1 つの方法である。

文 献

- Becher, G., M. G. Knize, I. F. Nes and J. S. Felton (1988) Isolation and identification of mutagens from a fried Norwegian meat product, *Carcinogenesis*, **9**, 247-253.
- 伝法公磨, 高橋秀俊, 藤本佳範, 森 道夫 (1989) 遺伝性肝炎 (LEC) ラット, *病理と臨床*, **7**, 655-658.
- Esumi, H., Y. Takahashi, S. Sato, S. Nagase and T. Sugimura (1983) A seven-base-pair deletion in an intron of the albumin gene of analbuminemic rats., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 95-99.
- Felton, J. S., M. G. Knize, N. H. Shen, P. R. Lewis, B. D. Andresen, J. Happe and F. T. Hatch (1986) The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis*, **7**, 1081-1086.
- Hayashi, E., Y. Amuro, T. Endo, H. Yamamoto, M. Miyamoto and S. Kishimoto (1986) Fecal bile acids and neutral sterols in rats with spontaneous colon cancer, *Int. J. Cancer*, **37**, 629-632.
- Ito, N., R. Hasegawa, M. Sano, S. Tamano, H. Esumi, S. Takayama and T. Sugimura (1991) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis*, **12**, 1503-1506.
- Kakizoe, T. and T. Sugimura (1988) Chemical carcinogenesis in analbuminemic rats, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 775-784.
- 勝木元也, 斎藤温彦, 木村 穰 (1991) ras トランスジェニックマウスの高頻度個体発癌と導入 ras 遺伝子の特異的活性化, *実験医学増刊* Vol. 9, No. 10. 監修 村松正実, 羊土社.
- Makino, R., H. Esumi, S. Sato, Y. Takahashi, S. Nagase and T. Sugimura (1982) Elevation of serum albumin concentration in analbuminemic rats by administration of 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 863-870.
- Masuda, R., M. C. Yoshida, M. Sasaki, K. Dempo and M. Mori (1988) Hereditary hepatitis of LEC rats is controlled by a single autosomal recessive gene, *Lab. Animals*, **22**, 166-169.
- Nagase, S., K. Shimamune and S. Shumiya (1979) Albumin-deficient rat mutant, *Science*, **205**, 590-591.
- Ochiai, M., K. Ogawa, K. Wakabayashi, T. Sugimura, S. Nagase, H. Esumi and M. Nagao (1991) Induction of intestinal adenocarcinomas by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in Nagase analbuminemic rats, **82**, 363-366.
- Ruffner, D. E. and A. Dugaiczky (1988) Splicing mutation in human hereditary analbuminemia, **85**, 2125-2129.
- Sasaki, M., M. C. Yoshida, K. Kagami, et al. (1985) Spontaneous hepatitis in an inbred strain of Long-Evans rats, *Rat News Lett.*, **14**, 4-6.
- Suzuki, K. and W. R. Bruce (1986) Increase by deoxycholic acid of the colonic nuclear damage induced by known carcinogens in C57BL/6J mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 1129-1132.
- Takikawa, H., Y. Seyama, Y. Sugiyama and S. Nagase (1985) Bile acid profiles in analbuminemia rats, *J. Biochem.*, **97**, 199-203.
- Wakabayashi, K., T. Sugimura and M. Nagao (1991) Mutagens in foods, In: Albert P. Li, Robert H. Heflich (Eds.), *Genetic Toxicology*, CRC Press, Florida, pp. 303-338.
- Yoshida, M. C., R. Masuda, M. Sasaki, et al. (1987) New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat, *J. Hered.*, **78**, 361-365.
- Zhang, X-M., K. Wakabayashi, Z-C. Liu, T. Sugimura and M. Nagao (1988) Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines in Chinese cooked foods, *Mutation Res.*, **201**, 181-188.
- 環境変異原研究 **13**: 315-321 (1991)

トランスジェニックマウスによる個体発がんの研究

東海大学医学部 DNA 生物学教室 *勝木元也, 木村 穰, 斎藤温彦

1. はじめに

がんは、遺伝子の変異によって起る細胞の異常増殖であることが近年益々明らかになってきた。がんをひき起す遺伝子の異常は、がん遺伝子とがん抑制遺伝子とを数えると 50 遺伝子以上にのぼるものと考えられている。しかも、がん発症には、単一の遺伝子異常では充分でなく、多種類、多段階の遺伝子異常が重なることが必要で、悪性化もまた、多段階遺伝子異常によって説明されている。

それでは、これらの遺伝子異常はどのようにして、いつ、どこで起るのであろうか。少数の遺伝性のがんを除けば、そのほとんどは体細胞突然変異によるものと推定されている。しかし、体細胞突然変異を測定することは、その発生頻度の低さからみて大変困難なことである。ところが、腫瘍にはしばしば特定のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の特定の部位や領域に、点突然変異や欠失がくりかえし認められ、しかも、がん細胞にのみ検出されることから、特定の遺伝子については実験的にくわしく調べられるようになった (Barbacid, 1987)。その代表的ながん遺伝子が Harvey-ras (H-ras) 遺伝子である。ヒトのがんからくりかえし第 12 番コドンあるいは第 61 番コドンに点突然変異をもつ H-ras 遺伝子 (活性型 H-ras 遺伝子) が単離され、それらの遺伝子を NIH3T3 細胞に導入すると細胞が形質転換されることが示された (Tavarowsky et al., 1982)。この結果は、H-ras の点突然変異が腫瘍をひき起す原因の一つではないかと推定させるものである。ところで、がんになる前

の細胞は通常は正常な細胞であるから、もしこの推定が正しいなら、活性型 H-ras 遺伝子を正常細胞に導入すれば細胞は形質転換を起しがん化するであろう。そこで、NIH3T3 細胞以外の培養細胞をはじめ、多くの初代培養細胞を対象とした遺伝子導入実験が試みられたが、すべての実験結果は、活性型 H-ras 遺伝子だけでは細胞をがん化するのに充分でないことを示した。もし、活性型 H-ras 遺伝子とともに c-myc 遺伝子が導入されると、細胞が形質転換を起す (Land et al., 1983)。これらの事実は、がん化の機構には複数の遺伝子異常が関わっていることを示すものである。しかも、細胞の種類によってその関与する遺伝子異常が異なることも明らかになった。その結果、培養細胞を利用する実験系には限界があることが解ってきた。

そこで、トランスジェニックマウスのがん研究への応用が始まった。

2. トランスジェニックマウスによるがん研究

マウスの受精卵の核に遺伝子 DNA を注入すると、注入した DNA が受精卵の染色体に組み込まれ、この受精卵から発生した仔マウスは、注入した DNA を全細胞に組み込んだ遺伝子導入マウス (トランスジェニックマウス) となる。もちろん生殖細胞にも遺伝子は導入されているから、子孫へも伝達され導入遺伝子の生物機能を個体発生から成長、成熟、老化のすべてのライフサイクルを通して研究することができる。

さて、活性型がん遺伝子は単一では正常細胞を

〒259-11 伊勢原市望星台

* 現 九州大学生体防御医学研究所, 〒812 福岡市東区馬出 3-1-1

Studies on highly tumorigenic transgenic mice

Motoya Katsuki, Minoru Kimura and Atsuhiko Saitoh

Department of DNA Biology, School of Medicine, Tokai University, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-11, Japan

なかなかがん化するだけの能力がないことが示されている。しかし、発がんに関与していることも明らかである。そこで、本当に正常細胞をがん化する要因の一つであるのかどうかを確かめるため、すでに発現の組織特異性が明らかにされている適当な遺伝子のプロモーターの下流に、活性型 H-ras 遺伝子をつないだ DNA を作製し、トランスジェニックマウスが作られた。その結果は当然のこととはいえ、すでに活性化している H-ras 遺伝子をもつこれらのトランスジェニックマウスは、あらかじめ予測された通り、エラストーゼ I 遺伝子プロモーターの下流に活性型 H-ras をつなげた導入遺伝子をもつマウスは、膵臓がんになり (Quaife *et al.*, 1987), ケラチンのプロモーターの下流につなげば皮膚のパピローマになることが解った (Bailleul *et al.*, 1990)。この種の実験は、この他にも数多く行なわれ、いずれも、活性型 H-ras 遺伝子は、正常細胞のがん化に密接に関連していることが示唆された。

しかし、それではなぜ活性型 H-ras 遺伝子が検出されるがん組織に組織特異性があるのであろうか。この疑問には導入遺伝子のプロモーターをあらかじめ特定しては答えることができないであろう。そこで、我々は、ヒトの H-ras ゲノム遺伝子を、それ自身 (H-ras) のプロモーターのもとで発現するような構造のままマウス受精卵に導入することにした (Fig. 1)。

この試みによって、H-ras の活性化が原因となって起る組織特異的発がんの種類が検索できると考えたからである。

3. 活性型ヒト H-ras 遺伝子導入マウス個体は仔マウスまで発生しない

我々がまず試みたのは、第 12 番目に点突然変異をもつ膀胱がん由来の H-ras 遺伝子 (Fig. 1: BB) の導入である。続いて、悪性黒色腫由来の H-ras 遺伝子 (Fig. 1: MM) であった。いずれも 1,000 個以上のマウス受精卵に遺伝子導入が試みられたが、通常 20~30 匹のトランスジェニックマウスの誕生が期待されるに拘らず、健全な仔マウスに発生したものは 1 匹も存在しなかった (Katsuki *et al.*, 1989)。しかし、分娩時の約 1 日前に帝王

切開によって仔マウスを調べると、その中に奇形や、すでに死亡した胎児および通常の胎盤よりかなり大きな腫瘍性の細胞塊が認められ、それらのすべてに導入遺伝子が組み込まれていた。

以上のことは、H-ras 遺伝子が胚発生の初期にすでに発現されており、この時期に染色体に組み込まれた活性型の H-ras 遺伝子が発現すると、マウスの胚細胞を腫瘍化することを示している。奇形や死亡した胎児についても、活性型 H-ras の発現が検出されることから導入された染色体の位置によって様々な発生異常が引き起こされたものと推定される (Katsuki *et al.*, 1989)。

これらの実験結果から考えると生殖細胞に H-ras の点突然変異が生じていればその胎児は発生途上でがん化するか発生を停止し子供にまでは育たないことを示している。すなわち、正常に育ったマウスやヒトでは、遺伝子的に H-ras が全細胞で活性化されているような例はないものと推定できる。

4. ヒトプロト型 H-ras 遺伝子導入マウス

1) 高頻度自然発がんトランスジェニックマウス
活性型のヒト H-ras トランスジェニックマウスは、事実上生れて来ないとなれば、プロト型遺

Structure of Injected Human c-Ha-ras DNA

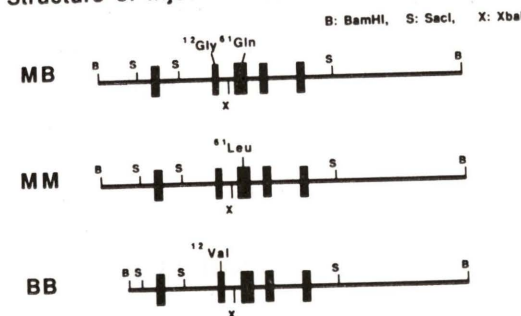
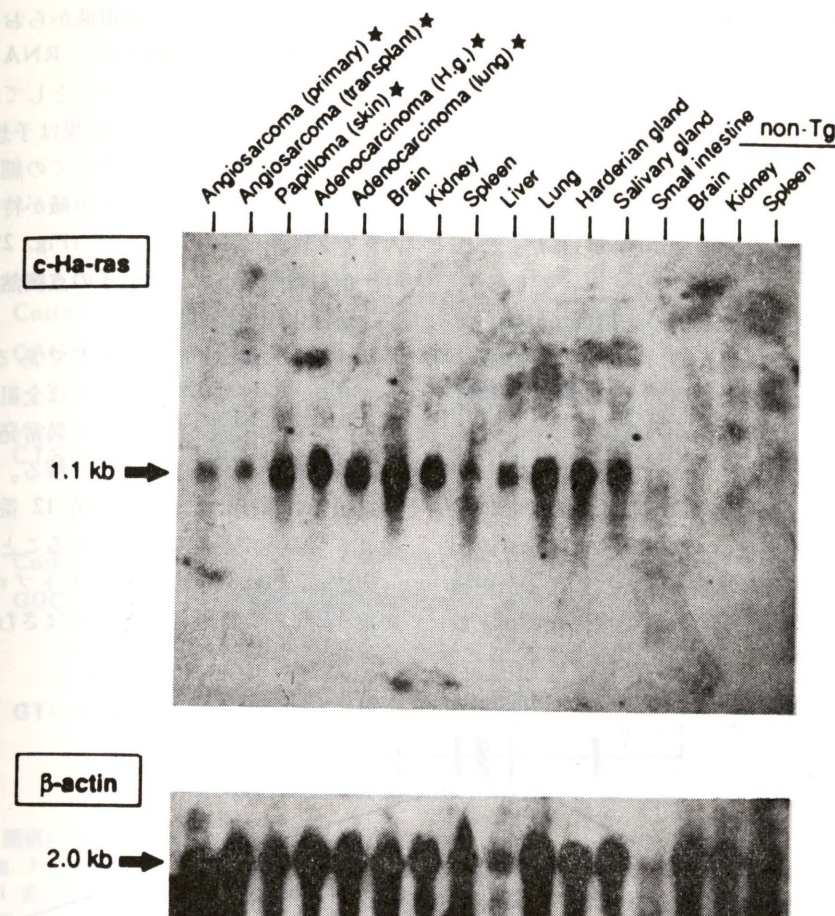


Fig. 1. 導入に用いたヒト c-Ha-ras 遺伝子 DNA の構造。

MB: MM および BB の正常領域をつなぎ合わせて作られたプロト型 c-Ha-ras 遺伝子。

MM: 悪性黒色腫由来の活性型ヒト c-Ha-ras 遺伝子 DNA, 第 61 番コドンが CAG (Glu) から CTG (Leu) へと変異している。

BB: 膀胱がん由来の活性型ヒト c-Ha-ras 遺伝子 DNA, 第 12 番コドンが GGC (Gly) から GTC (Val) へと変異している。



(★: Tumors, H.g.; Harderian gland)

Fig. 2. 導入遺伝子のがんおよび正常各組織での mRNA の発現。

全 RNA を各組織から抽出し、ノーザンブロットによって導入遺伝子ヒト c-Ha-ras mRNA を検出した。プローブとしてヒト c-Ha-ras cDNA を用いた。対照として β -アクチン遺伝子 mRNA の発現を検出した。

非トランスジェニックマウス (non-Tg.) では、当然のことながら導入遺伝子の発現は認められず、また腫瘍と非腫瘍正常組織とで異なる。

伝子導入マウスはいかなる性質をもつであろうか。ヒトプロト型 H-ras 遺伝子は、NIH3T3 細胞を形質転換する能力がないことが知られている。Sekiya らは、すでに Fig. 1 で示した MM 型と BB 型を Xba I で切断し、双方の非活性型の領域をつなぎ合せ、新しく MB 型 (Fig. 1) のヒト H-ras 遺伝子を構築した (Sekiya *et al.*, 1985)。この MB 型は、最終イントロンに発現量を大きくする点突然変異が確認されたものの、NIH3T3 細胞を形質転換する能力を失ったプロト型と同等

の性質をもつ遺伝子であった。このような性質をもつ MB 型遺伝子をプロト型としてマウス受精卵に導入した。独立に 3 匹のトランスジェニックマウスが得られ、それぞれ子孫を残すことができた。この点だけからみても、活性型 (BB 型, MM 型) とは明らかに異なる性質をもつことが示唆される。

これらのマウスは、通常のマウスより少し成長が遅いことを除けば、ほぼ正常マウスと変りない。ところが、飼育していくうちに子孫を含め、

トランスジェニックマウスが次々に腹腔内出血で突然死することが観察された。その死には、通常死の前兆となる立毛や衰弱が認められず、まさに突然としか形容しがたいものである。これら死亡したマウスを調べてみると、すべての例で、血管肉腫が検出された。また血管肉腫に多くは合併して、あるいは独立に肺腺腫が認められた。これらのマウスは、すべてトランスジェニックであり、非トランスジェニックマウスの兄弟姉妹には、何とも起らなかったことから、導入遺伝子の働きによるものと推定された。18ヶ月間50匹を飼育して、その24匹に、何らかの腫瘍が生じたのである。この値は、きわめて高頻度といえる。しかしながら、導入した遺伝子は NIH3T3 すら形質転換することができないプロト型の *H-ras* 遺伝子である。何か特殊な事情で、がんになった組織で導入遺伝子が大量に発現したのではないかと最

初は考えた。そこで、がん組織からおよびがんになったマウスの正常組織とから RNA を抽出し、ヒト *H-ras* cDNA をプローブとして、導入遺伝子の発現量を測定した。その結果は予想と異なり、がんと正常とを問わずほぼすべての細胞で、導入遺伝子は発現しており、がん組織が特別発現量が大きいとはみなされなかった (Fig. 2)。

2) がん細胞から導入遺伝子の点突然変異による活性化が検出された

H-ras 導入遺伝子がプロト型であることを考え、且つ、その発現様式が、ほぼ全組織に亘っていることを考え併せれば、その異常発現が高頻度発がんの説明にならないことが解る。そこで、導入遺伝子の活性化、すなわち第12番又は第61番コドンの点突然変異を検索することにした。

方法は、Fig. 3 に示す通り、ヒトプロト型 *H-ras* の第12番又は第61番コドンをはさむプライマー

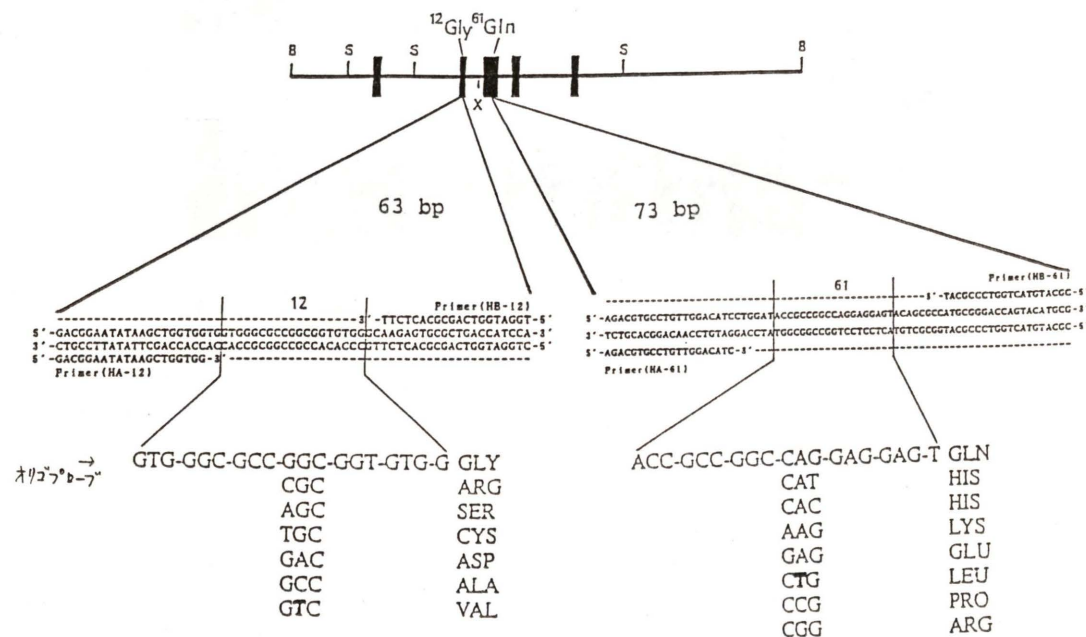


Fig. 3. 導入遺伝子に生じた体細胞点突然変異の検出法。

HA-12 および HB-12 をそれぞれプライマーとし、63 塩基対の DNA 断片を PCR 法によって作る。これらの断片は、導入遺伝子の第12番コドンを中心とした塩基対が増幅されたものである。これらの断片に対して、19 塩基対のオリゴプローブを準備し、サザンブロットを行う。オリゴプローブでは、図に示された通り、第12番コドンの1塩基対が変異を起しているもので、しかもアミノ酸の種類にも変異を起し活性型になったものである。サザンブロットの条件を選択すれば (Saitoh et al., 1990), 1 塩基対の変異をもつ遺伝子が同定できる。

第61番コドンについても同様に、HA-61 と HB-61 とをプライマーにして73 塩基対の DNA 断片を作り、61 番用のオリゴプローブを用いて検出することができる。

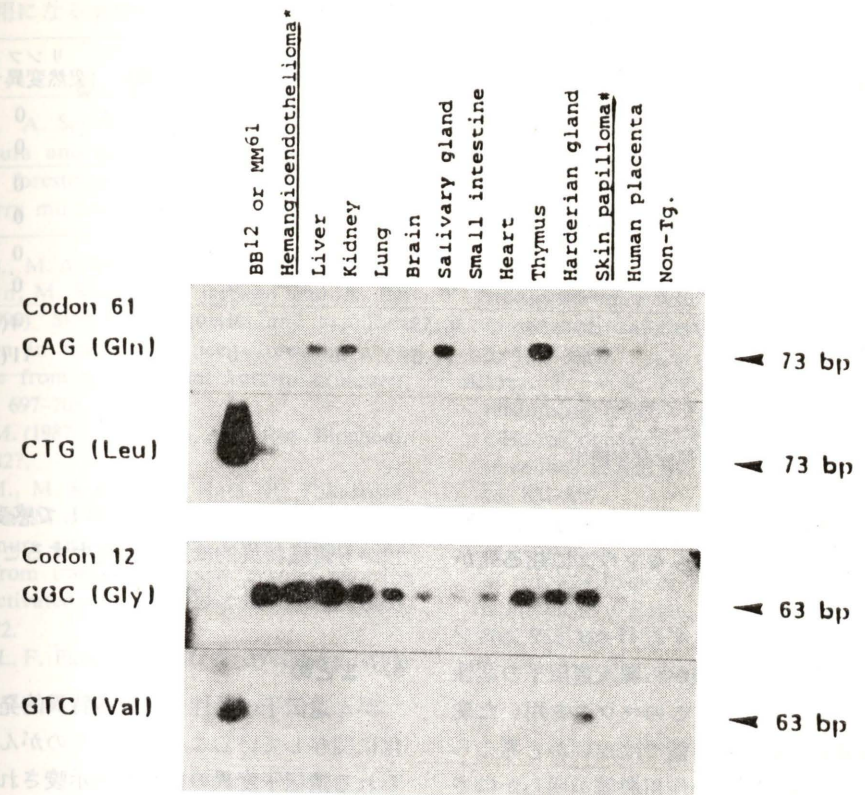


Fig. 4. 腫瘍に認められた導入遺伝子の体細胞点突然変異。

Fig. 3. で示した方法によって、腫瘍および非腫瘍正常部分の DNA から、第12番コドンおよび第61番コドンを含む DNA 断片を PCR 法によって増幅し、オリゴプローブによるサザンブロットの結果を示す。血管肉腫では、第61番コドンが CAG (Gln) から CTG (Leu) へと変異していることがわかる。また、皮膚パピローマでは、第12番コドンが GGC (Gly) から GTC (Val) へと変異していた。

を作り、がんおよび正常組織から抽出したそれぞれの DNA を鋳型として PCR 法によって第12番コドンに対しては63塩基対、第61番コドンに対しては73塩基対の断片を合成する。合成した断片にも点突然変異による活性型が存在すれば、その断片とのみハイブリダイゼーションする1塩基だけがプロト型と異なるプローブ (19 塩基対: Fig. 3) によって検出され得るような実験システムを応用した (Saitoh, et al., 1990)。結果は、きわめて驚くべきものであった。すべての血管肉腫は、導入遺伝子の第61番コドンが CAG (Gln) から CTG (Leu) へと変異していることが確認された (Fig. 4)。肺腺腫8例中2例、ハーダー腺腫4例中2例においても、導入遺伝子の第61番コドンの CAG から CTG への変異が認められ

た。一方、皮膚パピローマ4例中2例からは、第12番コドンの GGC (Gly) から GTC (Val) への点突然変異が認められた。以上のことから、導入ヒト *H-ras* 遺伝子の活性化が、高頻度発がんの原因であろうと推定された。しかし血管肉腫を除けば、いずれも100%の導入遺伝子に活性化が認められたわけではない。しかも、マウスの内在性 *H-ras*, *N-ras* には調べる限り点突然変異は認められていない。したがって、導入遺伝子や内在性の *ras* 遺伝子の活性化以外にも、このトランスジェニックマウスの高頻度発がんをひき起す要因があるものと考えられる。それは、第12番又は第61番コドン以外の突然変異である可能性を含め現在検討中である。

Table 1. MNU 投与による腫瘍発生*

MNU 投与量 mg/kg	被投与マウス数	前胃パピローマ (突然変異マウス数)	皮膚パピローマ (突然変異マウス数)	リンフォーマ (突然変異マウス数)
0	Tg. マウス	11	0	0
	対照マウス	13	0	0
0.5	Tg. マウス	19	1 (1)	0
	対照マウス	24	0	0
5	Tg. マウス	19	2 (2)	0
	対照マウス	25	0	0
50	Tg. マウス	56	56 (55)	9 (9)
	対照マウス	78	1 (0)	11 (0)

Tg. マウス: H-ras トランスジェニックマウス

対照マウス: 非トランスジェニックマウス

* 腹腔内 1 回投与後 12 週目に全身を検索

3) メチルニトロソウレア (MNU) 投与によって H-ras トランスジェニックマウスに起る発がん

自然発がんを高頻度に生ずる H-ras トランスジェニックマウスのがん組織から導入遺伝子の活性化が検出されたことから、このマウスを用いた変異原の作用機構の研究が可能ではないかと考えられた。そこで、すでにその作用機構が明らかにされているメチルニトロソウレア (MNU) を投与し、このマウスに発がんが認められるか否かを検討した。MNU を腹腔内に 1 回だけ投与し、投与後 12 週目に全身を検索し腫瘍の発生を調べた。その結果、MNU の投与量に依存して前胃および皮膚にパピローマを生じた (Table 1)。パピローマの他にリンフォーマも生じたが、この場合は非トランスジェニックマウスにも同程度認められることから、導入遺伝子の関与は考えられない。56 例の前胃パピローマ中 55 例で導入遺伝子の第 12 番コドンにのみ GGC (Gly) から GAC (Asp) への点突然変異が認められた。MNU は、GC から AT へのトランジションを誘発することが知られている。また、理由は不明であるが、H-ras の第 12 番コドンの第 2 文字の GC 塩基対を AT 塩基対に優先的に変異させることが報告されており、この例もそれを支持するものの一つとなった。したがって 100% ではないが、1 例を除きほぼすべてのパピローマは、導入遺伝子の活性化が直接その発生に関与しているものと推定された。皮膚パピローマは 9 例中 9 例に同様の活性化が認めら

れた。このマウスは変異原に対して感受性が高く、しかも組織特異的に腫瘍を発生することが示された (Ando *et al.*, 1992)。

5. まとめ

がん遺伝子の活性化が組織特異的発がんや悪性化に関与していることが、ヒトのがん組織から得られる遺伝子変異の研究から示唆されている。

H-ras 遺伝子はその代表的なものの一つである。ヒトプロト型 H-ras 遺伝子導入マウスは、ヒト活性型 H-ras 遺伝子導入マウスと異なり、個体発生することが出来、トランスジェニックマウスの系統として確立することができた。ところが、プロト型遺伝子導入マウスに拘らず、高頻度に組織特異的自然発がんが認められた。導入遺伝子の発現はがん組織でも正常組織とで異ならず、発現量だけから発がんを説明することはできない。

がん組織を調べると、導入遺伝子に体細胞突然変異が見出された。一方、変異原である MNU を投与すると、短期間に、しかもトランスジェニックマウス特異的に、きわめて高頻度に前胃パピローマを生じた。ほぼすべてのパピローマからは導入遺伝子の第 12 番コドンに突然変異が見出された。

以上の事実は、ヒト H-ras 遺伝子の特定の突然変異は、マウスの特定の組織に特異的に働き、細胞を腫瘍化させる働きがあることを示すものである。

このようなマウスは、変異原の探索にとってき

わめて有用になるものと期待できる。

参考文献

- Ando, K., A. Saitoh, O. Hino, R. Takahashi, M. Kimura and M. Katsuki (1992) Chemically induced forestomach papillomas in transgenic mice carry mutant c-Ha-ras genes, *Cancer Res.*, in press.
- Bailleul, B., M. A. Surani, S. White, S. C. Barton, K. Brown, M. Blessing, J. Jarcano and A. Balmain (1990) Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter, *Cell*, **62**, 697-708.
- Barbacid, M. (1987) ras genes, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 779-827.
- Katsuki, M., M. Kimura, J. Hata, R. Takahashi, S. Nozawa, M. Yokoyama, M. Izawa, T. Sekiya, S. Nishimura and T. Nomura (1989) Embryonal tumors from transgenic mouse zygotes carrying human activated c-Ha-ras genes, *Mol. Biol. Med.*, **6**, 567-572.
- Land, H., L. F. Parada and R. A. Weinberg (1983)

Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, *Nature*, **304**, 596-602.

Quaife, C. J., C. A. Pinkert, D. M. Ornitz, R. D. Palmiter and R. L. Brinster (1987) Pancreatic neoplasia induced by ras expression in Acinar cells of transgenic mice, *Cell*, **48**, 1023-1034.

Saitoh, A., M. Kimura, R. Takahashi, M. Yokoyama, T. Nomura, M. Izawa, T. Sekiya, S. Nishimura and M. Katsuki (1990) Most tumors in transgenic mice with human c-Ha-ras gene contained somatically activated transgenes, *Oncogene*, **5**, 1195-1200.

Sekiya, T., V. S. Prassolov, M. Fushimi and S. Nishimura (1985) Transforming activity of the c-Ha-ras oncogene having two point mutations in codons 12 and 61, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 851-855.

Taparowsky, E., Y. Suard, O. Fasano, K. Shimizu, M. Goldfarb and M. Wigler (1982) Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change, *Nature*, **300**, 762-765.

単一物質の発がん実験結果の意味するもの

国立がんセンター研究所 若 林 敬 二

我々の環境中に存在する種々の化学物質のヒトに対する発がん性の可能性を評価する際に、疫学調査及び長期動物実験の結果が用いられる。しかし、適切な疫学調査が実施されている例はほとんどなく、評価基準を長期動物実験結果に求める場合が多い。一般に行われている長期発がん実験では、最大耐量（腫瘍以外の原因で動物の寿命に影響することなく、最小限の毒性変化を現す量）の化学物質を、ヒトでの曝露経路に準じた経路で、雌雄のマウス及びラットに投与する。投与期間は最高、ラットで24～30カ月、マウスで18～24カ月である。現在までに報告されている発がん物質は遺伝子障害性発がん物質 (genotoxic carcinogen) と非遺伝子障害性発がん物質 (non-genotoxic carcinogen) に分類される。遺伝子障害性発がん物質とは、被験物質もしくはその代謝物が標的細胞の遺伝子に作用してがん化を起こす物質であり、ニトロソ化合物、芳香族炭化水素化合物、マイコトキシン、ヘテロサイクリックアミン化合物等がその例である。非遺伝子障害性発がん物質とは、細胞のがん化が起りやすいような条件をつくりだす物質で、各種ホルモン、生体内の内分泌環境を乱す物質、組織の壊死と再生を反復させる物質等がその範ちゅうに入る。本稿では、遺伝子障害性発がん物質としてヘテロサイクリックアミン化合物、非遺伝子障害性発がん物質として butylated hydroxyanisole を例にとり、これら化合物の発がん性のもつ意味について述べることにする。

1. ヘテロサイクリックアミン

焼肉及び焼魚の煙と焦げの部分に変異原性が見出されたことに端を発して以来、20種以上のヘテロサイクリックアミンが加熱調理した肉や魚、又、アミノ酸及びタン白質の加熱分解物中より変異原物質として単離・同定されている。(Sugimura, 1986; Wakabayashi *et al.*, 1992)。これら変異原性ヘテロサイクリックアミンの内、現在までに10種の化合物がマウス及びラットに対して発がん性を示すことが証明された (Esumi *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1991; Ohgaki *et al.*, 1991)。ヘテロサイクリックアミンの発がん実験においては、これら化合物の最大耐量 (100～800 ppm) を含む餌を雌雄の CDF₁ マウス及び F344 ラットに投与した。その結果、試験した10種のヘテロサイクリックアミンの全てにがん原性が認められた。10種のがん原性ヘテロサイクリックアミンのマウス及びラットにおける標的臓器を Table 1 に示す。ヘテロサイクリックアミンのマウス及びラットにおける主要な標的臓器は肝臓であり、その他にマウスにおいては前胃、肺、造血器及び血管、ラットにおいては小腸、大腸、外耳道腺、陰核腺、皮膚、口腔及び乳腺に腫瘍が発生した。

ヘテロサイクリックアミンのヒト発がん性及び影響を知る上には、これら化合物の発がん強度とヒトへの曝露量を比較する必要がある。加熱食品中のヘテロサイクリックアミン含量はブルーコットンと HPLC を組み合わせた方法により測定され、Table 2 に示すような結果が得られている (Wakabayashi *et al.*, 1992)。すなわち、加熱食

〒104 東京都中央区築地 5-1-1

Significance of long-term carcinogenesis experiment by a single compound

Keiji Wakabayashi

National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

Table 1. Induction of Tumors in Mice and Rats by Heterocyclic Amines

	Mice	Rats
IQ	Liver, Forestomach, Lung	Liver, Small and large intestines, Zymbal gland, Clitoral gland, Skin
MeIQ	Liver, Forestomach	Large intestine, Zymbal gland, Skin, Oral cavity, Mammary gland
MeIQx	Liver, Lung, Hematopoietic system	Liver, Zymbal gland, Clitoral gland, Skin
PhIP	Lymphoid tissue	Large intestine, Mammary gland
Trp-P-1	Liver	Liver
Trp-P-2	Liver	
Glu-P-1	Liver, Blood vessels	Liver, Small and large intestines, Zymbal gland, Clitoral gland
Glu-P-2	Liver, Blood vessels	Liver, Small and large intestines, Zymbal gland, Clitoral gland
AaC	Liver, Blood vessels	
MeAaC	Liver, Blood vessels	

Table 2. Amounts of Heterocyclic Amines

	Amount	
	Cooked food (ng/g)	Cigarette smoke condensate (ng/cigarette)
IQ	0.16~0.19	0.26
MeIQ	0.03	<0.03
MeIQx	0.64~6.44	<0.03
4,8-DiMeIQx	0.10~0.81	<0.03
PhIP	0.56~69.2	—
Trp-P-1	0.12~0.21	0.32
Trp-P-2	0.15~0.25	0.23
AaC	0.21~2.50	10.50
MeAaC	0.19	1.60

—: not tested

品中からは種々の変異・がん原性ヘテロサイクリックアミンが検出され、その内最も多量に存在するのは PhIP であり、その量は 0.56~69.2 ng/g であった。MeIQx は PhIP に次いで多く存在し、その量は 0.64~6.44 ng/g であった。その他のヘテロサイクリックアミン含量は 0.03~2.50 ng/g であった。同様な方法を用いて、タバコの煙中のヘテロサイクリックアミンの分析も行い、5種のヘテロサイクリックアミンを検出した (Table 2)。更に、10人の健康人の24時間尿中の PhIP, MeIQx, Trp-P-1 及び Trp-P-2 を分析したところ、全ての尿サンプルから、分析した4種のヘテロサイクリックアミンが検出された (Ushiyama *et al.*, 1991)。このことは、ヒトは常にかん原性

ヘテロサイクリックアミンに曝露されていることを強く示唆するものである。PhIP 及び MeIQx のヒトへの曝露量を、これら化合物の加熱食品中の存在量及びヒト尿中への排泄量から計算すると PhIP は 0.1~13.8 µg/日/人であり、MeIQx は 0.2~2.6 µg/日/1人であった。これらヘテロサイクリックアミンの曝露量と、マウス及びラットを用いて行った長期発がん実験結果より得られた PhIP 及び MeIQx の TD₅₀ 値 (50%の動物にかんを誘発させるための投与量; PhIP, マウス 31.3 mg/kg/day, ラット 0.9 mg/kg/day; MeIQx, マウス 11.0 mg/kg/day, ラット 0.7 mg/kg/day) を比較すると、PhIP 及び MeIQx のヒト曝露量はこれら化合物の TD₅₀ 値の数千分の一以下であ

った。このことは、ヘテロサイクリックアミンが単独ではヒトがん発生に重大な影響を与えているとは考えにくいことを示唆しているものである。

次に、微量のヘテロサイクリックアミンの発がんを与える影響を追究するために、0.4, 4, 40 及び 400 ppm の MeIQx をラットに投与し肝臓における DNA 付加体の生成を ³²P-ポストラベル法で調べた。その結果、MeIQx-DNA 付加体量と MeIQx 投与量との間には直線関係があることがわかった (Yamashita *et al.*, 1990)。また、Turteltaub ら (1990) は accelerator mass spectrometry を用い、更に低濃度の MeIQx 投与によっても明らかに DNA 付加体が生成することを報告している。以上の研究成果より、環境中の遺伝子障害性発がん物質による DNA 付加体生成には閾値がないことが示唆され、たとえ低濃度の曝露でもヒト体内に DNA 付加体が生成することが予想される。すなわち、ヘテロサイクリックアミンを含めた遺伝子障害性発がん物質は、環境中における存在量はたとえ微量であっても、他の発がん物質や発がんプロモーターの共存下、又は、組織の壊死・再生がくり返し起こっている条件下ではがん発生に関与している可能性が十分あり得るものと考えられる。

2. Butylated hydroxyanisole (BHA)

BHA は脂質の酸化防止の為、種々の食品に添加されている。この化合物はバクテリアを用いた変異原性試験では変異活性を示さない。しかし、1983年、伊東らは F344 系雌雄ラットに最大耐量である 2% と 0.5% の BHA を餌に混ぜて 104 週間投与したところ、2% 投与群の前胃に扁平上皮がんが発生するのを見出した。その発生率は雄で 29.4%、雌で 34.6% であった (Ito *et al.*, 1983)。BHA のラットに対する発がん性は 1 群 50 匹を用いた実験で再度確認されるとともに (Ito *et al.*, 1986)、この化合物はハムスターに対しても、1% 及び 2% の濃度で前胃に扁平上皮がんを誘発することがわかった (Masui *et al.*, 1986)。しかし、BHA はマウスに対しては明確な発がん性を示さなかった。又、BHA を前胃のない犬及びサルに投与しても、これらの動物の

消化管には何の変化も見い出されなかった (Tobe *et al.*, 1986; Iverson *et al.*, 1986)。すなわち、BHA の発がん性は 1~2% の化合物を餌に混ぜ、1年以上の長期にわたってラット及びハムスターに投与した場合にのみ認められ、標的臓器は前胃に限られることがわかった。

食品添加物に発がん性が認められた場合、その使用が禁止されるのはそれまでの社会常識であった。しかし、BHA は以下に述べる様な理由から、禁止措置はとられずに、現在、尚世界各国で広く使用されている。

1. BHA の発がん性はラットやハムスターの前胃に限られている。
2. 前胃をもたないイスヤサルではラットのような作用は認められない。ヒトも前胃に相当する臓器がない。
3. BHA の VSD (virtually safe dose, 実質安全量) は 300 µg/kg/day である。日本人の食品からの平均摂取量は 4.3 µg/kg/day であり、VSD をはるかに下回る。
4. BHA を用いない場合に食品中に生ずる過酸化物の危険性のほうがより大きいかもしれない。

このような従来とは異なる BHA の規制措置は、発がん物質といえども有用性と危険性を熟慮した上で規制すべきものであるという、化学物質の使用規制に新しい方向を示したものとして注目すべきものである。BHA の発がん性と規制に関する問題は、以後の環境中の発がん物質のリスクアセスメントに多大な影響を与えたことは言うまでもない。

3. おわりに

日本人の死亡の主要原因の一つはがんである。一方、我々の身の回りには化学物質が氾濫し、又、数多くの化学物質なしには日常生活に支障をきたすことも事実である。長期発がん実験に取って代わる十分な短期・中期試験法がない現状とヒトがん予防の見地に立つと、単一物質の最大耐量を用いての発がん実験結果から得られる情報は重要であることはまちがいない。しかし、単一物質の発がん実験結果から、その化合物のヒト発がんへの

危険度を評価することは不可能であることも周知の事実である。

ヒトがんは多くの遺伝子変化を伴い多段階的に発生する。又、様々な発がん過程に複数の環境発がん因子が関与している。ヒトがん発生を予防するためには、少しでもがん発生に関与していると思われる化学物質を環境中から取り除く方法がまず考えられる。しかし、発がん物質の閾値の有無、又は、動物からヒトへの外挿法についての正確かつ適切な情報のない現状を考え合せると、むやみに発がん物質を環境中から取り除く措置を講ずることはいたずらに混乱をまねくものと思われる。日常摂取している食事中に存在する発がん物質、例えば焼肉、焼魚中のヘテロサイクリックアミンを完全に除去することは非常に困難である。したがって、このような発がん物質への曝露はなるべく少ないことにこしたことはないが、最終的には個々人の判断にまかせるべきものと思われる。一方、食品添加物や医薬品に代表される人工合成化学物質については、BHAの例の如く、有用性と危険性を考慮した立場に立つことが必要である。環境発がん物質のヒトに対する危険度の評価をするためには、単一物質の発がん実験結果から得られる情報だけでは不十分であり、作用メカニズム、ヒト曝露量、修飾因子などを含めた総合的判断基準が不可欠である。その為の基礎研究が大いに重要な時である。

Abbreviations

IQ: 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline,
MeIQ: 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline,
MeIQx: 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline,
4,8-DiMeIQx: 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline,
PhIP: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine,
Trp-P-1: 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole,
Trp-P-2: 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole,

Glu-P-1: 2-amino-6-methyldipyrdo[1,2-*a*; 3',2'-*d*]imidazole,

Glu-P-2: 2-aminodipyrdo[1,2-*a*; 3',2'-*d*]imidazole,

AαC: 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole,

MeAαC: 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole,

参考文献

- Esumi, H., H. Ohgaki, E. Kohzen, S. Takayama and T. Sugimura (1989) Induction of lymphoma in CDF₁ mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, Jpn. J. Cancer Res., **80**, 1176-1178.
- Ito, N., S. Fukushima, A. Hagiwara, M. Shibata and T. Ogiso (1983) Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats, J. Natl. Cancer Inst., **70**, 343-352.
- Ito, N., S. Fukushima, S. Tamano, M. Hirose and A. Hagiwara (1986) Dose response in butylated hydroxyanisole induction of forestomach carcinogenesis in F344 rats, J. Natl. Cancer Inst., **77**, 1261-1265.
- Ito, N., R. Hasegawa, M. Sano, S. Tamano, H. Esumi, S. Takayama and T. Sugimura (1991) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), Carcinogenesis, **12**, 1503-1506.
- Iverson, F., J. Truelove, E. Nera, E. Lok, D. B. Clayson and J. Wong (1986) A 12-week study of BHA in the cynomolgus monkey, Fd Chem. Toxic., **24**, 1197-1200.
- Masui, T., M. Hirose, K. Imaida, S. Fukushima, S. Tamano and N. Ito (1986) Sequential changes of the forestomach of F344 rats, Syrian golden hamsters, and B6C3F₁ mice treated with butylated hydroxyanisole, Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **77**, 1083-1090.
- Ohgaki, H., S. Takayama and T. Sugimura (1991) Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food, Mutation Res., **259**, 399-410.
- Sugimura, T. (1986) Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan, Science, **233**, 312-318.
- Tobe, M., T. Furuya, Y. Kawasaki, K. Naito, K. Sekita, K. Matsumoto, T. Ochiai, A. Usui, T. Kokubo, J. Kanno and Y. Hayashi (1986) Six-month toxicity study of butylated hydroxyanisole in beagle dogs, Fd Chem. Toxic., **24**, 1223-1228.
- Turteltaub, K. W., J. S. Felton, B. L. Gledhill, J. S. Vogel, J. R. Southon, M. W. Caffee, R. C. Finkel, D. E. Nelson, I. D. Proctor and J. C.

Davis (1990) Accelerator mass spectrometry in biomedical dosimetry: Relationship between low-level exposure and covalent binding of heterocyclic amine carcinogens to DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **87**, 5288-5292.

Ushiyama, H., K. Wakabayashi, M. Hirose, H. Itoh, T. Sugimura and M. Nagao (1991) Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but not of inpatients receiving parenteral alimentation, Carcinogenesis, **12**, 1417-1422.

Wakabayashi, K., M. Nagao, H. Esumi and T. Sugimura (1992) Food-derived mutagens and carcinogens, Cancer Res. (Suppl.) in press.

Yamashita, K., M. Adachi, S. Kato, H. Nakagama, M. Ochiai, K. Wakabayashi, S. Sato, M. Nagao and T. Sugimura (1990) DNA adducts formed by 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in rat liver: dose-response on chronic administration, Jpn. J. Cancer Res., **81**, 470-476.

複数物質の組合せによる発癌性の変化

——多臓器中期発癌性試験——

名古屋市立大学医学部第一病理 白井智之, 玉野静光, 萩原昭裕,
増井恒夫, 伊東信行

1. 緒言

一般に化学物質の発癌性の判定にはラット, マウス, あるいはハムスターなどの数多くの実験動物と2年間の実験期間さらに多数の病理組織標本の作製とその検索などデータの整理と結論までの期間を含め約3年という長い試験期間と膨大な費用が必要である。さらにこれらの試験を施行するに当たっては設備の整った施設と専門知識を十分に習得した研究者が不可欠であり, 検討できる化学物質の数は自ずと制限される。

発癌性試験の短期スクリーニングとして Ames 法を中心とした多くの変異原性試験や染色体テストが用いられているが, 長期発癌性試験の結果と一致しない場合が多いことが次第に明らかにされてきている (Zeiger *et al.*, 1987; Ashby *et al.*, 1988; Ishidate *et al.*, 1988)。より良い検索法として, 実験動物を用いた中期発癌性試験法の必要性が叫ばれてきており, 最近 Lyon の IARC の会議で従来の短期と長期の発癌性試験のほか, 新たに中期発癌性試験法を加えることが採択されている。

中期発癌性試験法として, ラット肝臓の前癌病変である肝細胞小増殖巣を指標とした試験系がいろいろ開発されてきた (Goldsworthy *et al.*, 1984; Bannasch, 1986; Ito *et al.*, 1989)。そのなかで小増殖巣を GST-P 陽性細胞巣として容易にしかも的確に定量測定し, きわめて良好な結果が8週間の短期間に得られる試験法が開発された

(Ito *et al.*, 1988; Ito *et al.*, 1989)。その方法と結果については本号に詳しく述べられている。加えて肝臓以外の臓器として膀胱 (Fukushima *et al.*, 1983a; Fukushima *et al.*, 1983b) と胃 (Tatematsu *et al.*, 1988; Tatematsu *et al.*, 1990) を標的とした検索法が紹介されているが, その他にも皮膚 (Hennings and Yuspa, 1985), 乳腺 (Russo and Russo, 1978; Hirose *et al.*, 1986), 肺 (Maronpot *et al.*, 1986; Yokose *et al.*, 1988; Shirai *et al.*, 1988) などの試験法も知られている。

いずれの系もそれぞれの利点があるものの, 単一臓器を指標としているため各々の検索系がもっている標的臓器, すなわち肝, 胃あるいは膀胱以外の臓器に発癌性を示す物質については検出率が低下するという短所がある。この項で紹介する多臓器中期発癌性試験はこの短所をカバーし, 多種多様の発癌物質すなわち臓器標的性が異なる物質の発癌性を一つの実験系で短期間に検出できることを目的として開発されたものである。さらに化学物質に内在するプロモーション (促進) 作用やインヒビション (抑制) 作用などの発癌修飾作用についても幅広い臓器で検索可能な点でも注目される。

2. 実験材料と実験方法

実験動物としてラットを用いる。実験期間をできるだけ短縮するために腫瘍性病変よりも, それ

〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1

Medium term bioassay system using Multi-organ models

Tomoyuki Shirai, Seiko Tamano, Akihiro Hagiwara, Tsuneco Masui and Nobuyuki Ito

First Department of Pathology, Nagoya City University Medical School

1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

Table 1. 多臓器中期発癌性試験法に利用する指標病変

臓器	定量的解析	発生頻度による解析
鼻腔		PN 過形成, 乳頭腫, 癌
肺	腺腫, 腺癌	腺腫, 腺癌
舌, 食道	PN 過形成	PN 過形成, 乳頭腫, 癌
前胃		上皮過形成, 乳頭腫, 癌
腺胃	PAPG	腺腫様過形成, 腺腫, 腺癌
腸		腺腫様過形成, 腺腫, 腺癌
肝	GST-P 陽性巢	過形成結節, 肝細胞癌
脾	変異腺房細胞巢	変異細胞巢, 腺腫, 腺癌
腎	酵素変異尿管	腺腫, 癌
膀胱	PN 過形成, 乳頭腫, 癌	PN 過形成, 乳頭腫, 癌
甲状腺		腺腫, 腺癌
副腎		腺腫, 腺癌
乳腺		腺腫, 腺癌
前立腺, 精囊		異型増殖巣, 腺癌
子宮		異型増殖巣, 腺癌

PN, 乳頭状結節状; PAPG, ペプシノーゲン1変異門腺

以前に発生してくる前癌病変をも指標とする。さらにそれら病変の早期出現を促すため, 肝, 膀胱, 胃など単一臓器を標的とした中期発癌性試験法で用いられている発癌2段階法を採用する。たとえば肝を標的とした系では肝に標的性の強い発癌物質である DEN を用いて肝に発癌イニシエーションをかけたが, 多くの臓器に発癌標的性のある物質を用いることによってより多くの臓器にイニシエーションをかけることができる。そのあと検索物質を一定期間投与する。実験終了後, 全身臓器を病理組織学的に, 一部については酵素あるいは免疫組織学的に検討し, 出現した前癌病変あるいは腫瘍病変 (Table 1) の頻度や定量的解析値を対照群と統計学的に比較する。それらが有意に ($p < 0.05$) 増加した場合には陽性すなわち発癌性や腫瘍促進作用があると判定し, 逆に有意に減少した場合には抑制作用があると判定される。しかし抑制作用があってもある臓器で促進作用が示されれば総合評価として陽性と判定する。以上が本法の基本的な点である。

(1) 単一発癌物質を用いた系

N-methyl-N-nitrosourea (MNU) は代謝活性化を必要としない発癌物質で, 肝, 膀胱, 舌, 前胃, 腺胃, 小腸, 大腸, 肺, 造血器, 乳腺, 甲状腺など広範囲な臓器に対し発癌性を持っている (Rice and Peratoni, 1983)。この MNU を 20 mg/kg で

週 2 回腹腔内投与を 8 回行なった後検索物質を 32 週間投与した実験系を検討した。

その結果, 6 検体すべての発癌性と臓器標的性を確認でき, 多臓器中期発癌性試験法の理論が正しいことが判明した (Ito *et al.*, 1990)。しかし早期に白血病が発生したり, イニシエーションの強さが必ずしも各臓器で均一でないことが判明し, 複数の発癌物質を組み合わせた複合処置による多臓器のイニシエーションが望ましいことが明らかになった。

(2) 複数発癌物質を用いた系

(i) DED 法

方法: 6 週齢の F344 ラットを用い, Fig. 1 に示す如く, それぞれ標的性の異なる 3 種類の発癌物質すなわち N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine

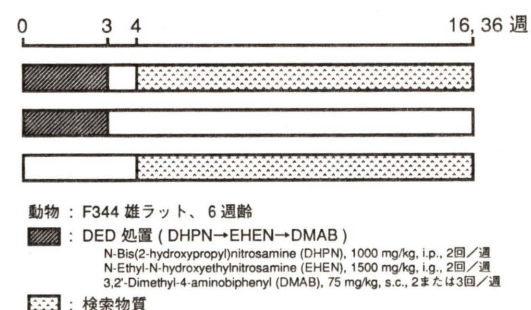


Fig. 1. 複合処置による多臓器中期発癌性試験法 (DED 法)。

Table 2. 検索物質 (DED 法)

検索物質	略号	投与方法
2-Acetylaminofluorene	2-AAF	0.01% D
3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene	3'-Me-DAB	0.06% D
Ethionine	—	0.25% D
Phenobarbital	—	0.05% D
4,4'-Diaminodiphenylmethane	DDPM	0.1% D
3-Methylcholanthrene	3-MC	0.02% D
7,12-Dimethylbenz(a)anthracene	DMBA	0.01% D
N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine	BBN	0.1% W
Clofibrate	—	0.3% D
Catechol	—	0.8% D
γ -Orizanol	—	1% D
Phytic acid	—	2% D
n-Tritriacontane-16,18-dione	TTAD	1% D
Tannic acid	—	1% D

D: 飼料混合 W: 飲料水混合

Table 3. DED 法の結果 (16 週)

検索物質	発癌性	Ames 試験	病変出現臓器						判定
			肝	肺	甲状腺	前胃	腺胃	膀胱	
2-AAF	+	+	↑	→	→	→	→	→	+
3'-Me-DAB	+	+	↑	↓	→	→	→	→	+
DMBA	+	+	↑	→	→	→	→	→	+
3-MC	+	+	↑	↑	→	→	→	→	+
BBN	+	+	→	↓	→	→	→	↑	+
DDPM	+	+	↑	→	↑	→	→	→	+
Ethionine	+	—	↑	→	→	→	→	→	+
Phenobarbital	+	—	↑	→	↑	→	→	→	+
Clofibrate	+	—	↓*	→	→	→	→	→	—
Catechol	+	—	→	→	→	↑	↑	→	+

↑: 高度促進 ↑: 促進 ↓: 抑制 →: 不変
 +: 陽性 —: 陰性 *: GST-P 陰性細胞巢の増加

(DHPN), N-ethyl-N-hydroxyethyl nitrosamine (EHEN), 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) を経時的に 3 週間以内に処置をした。その後 4 週目から Table 2 に示す発癌物質あるいは非発癌物質を検索物質として 12-22 週間投与した (Uwagawa *et al.*, 1988; Hirose *et al.*, 1991)。検索物質の投与濃度は通常の発癌量あるいは LD 50 の 1/5 から 1/10 量である。

結果: Table 3 に示す如く 10 の発癌物質のうち 9 物質が陽性と判定された。偽陰性となった clofibrate はペルオキシゾーム増殖剤で指標に用いた GST-P の活性を抑制するために見かけ上抑

制の結果となった。これは肝のみを指標とした中期発癌性試験 (DEN-PH 法) でも同様の結果となっている (Ito *et al.*, 1989)。酸化防止作用のある 4 種の物質のうち γ -orizanol と phytic acid に肺と膀胱に対し促進作用があることが判明した (Table 4) (Hirose *et al.*, 1991)。Tannic acid については投与経路の違いによって偽陰性になったと考えられる。

(ii) DMD 法

方法: 6 週齢 F344 ラットを用いた。Fig. 2 に示すように 3 種の発癌物質, diethylnitrosamine (DEN), MNU および DHPN を経時的に投与

Table 4. DED 法の結果 (36 週)

検索物質	発癌性	Ames 試験	病変出現臓器						判 定
			肝	肺	甲状腺	前胃	腺胃	膀胱	
γ-Orizanol	—	—	→	↑	→	→	→	→	+
Phytic acid	—	—	→	↑	→	→	→	↑	+
TTAD	?	?	↓	→	→	→	→	→	—
Tannic acid	+	—	→	→	→	→	→	→	—

↑: 促進 ↓: 抑制 →: 不変 +: 陽性 -: 陰性 ?: 未評価

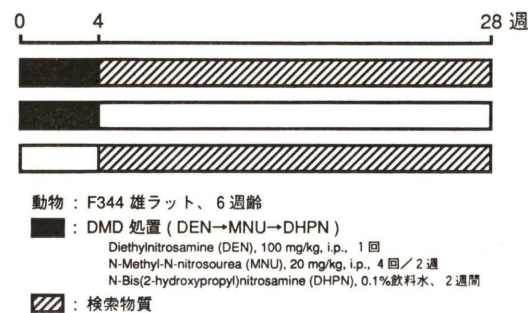


Fig. 2. 複合処置による多臓器中期発癌性試験法(DMD 法).

したあと 24 週間検索物質を投与した。検索対象とした 20 種類の化学物質を肝に発癌性のあるもの、肝以外に発癌性のあるもの、発癌性のはっきりしないもの、さらに発癌性がないと結論されているものの 4 種に分け、それぞれの投与濃度と方法を Table 5 に示した (Shibata *et al.*, 1990; Fukushima *et al.*, 1991)。

結果: 病変が観察された臓器は肝, 肺, 甲状腺, 前胃, 腺胃そして膀胱であった。Table 6 に DEN-PH 法さらに Ames の突然変異原性の結果と対比して本法における評価の結果を表わした。7 つの肝発癌物質のなかで DEN-PH 法や DED 法で偽陰性であった clofibrate は膀胱の前癌病変出現を促進し, 陽性の結果となった。また DEN-PH 法で陰性であった 4,4-diaminodiphenylmethane(DDPM) も肝での促進作用のほか甲状腺で強い促進作用が示された。肝以外に標的性のある 9 種類の発癌物質のうち 7 種類は DEN-PH 法では陰性結果であったが, 本法ではすべて陽性の結果が得られた。このうち重要な点は多くの化学物質が 2 臓器以上で促進作用やあるいは相反する作用を示すことが注目される。発癌未知物質の

Table 5. 検索物質 (DMD 法)

検索物質	濃度 (%)	投与方法
肝発癌物質		
2-AAF	0.01	D
DBN	0.005	D
3'-Me-DAB	0.06	D
Ethionine	0.25	D
Phenobarbital (PB)	0.05	D
DDPM	0.1	D
Clofibrate	1.0	D
肝以外の発癌物質		
B(a)P	0.02	D
Captan	0.4	D
DMBA	0.01	D
3-MC	0.02	D
MNNG	0.005	W
BHA	1.0	D
Catechol	0.8	D
Propineb	0.1	D
Folpet	0.2	D
発癌性未知物質		
Phosmet	0.04	D
Na-Ascorbate	5.0	D
非発癌物質		
Caprolactam	1.0	D
Daminozide	1.0	D

D: 飼料混合 W: 飲料水混合
DDPM: 4,4'-Diaminodiphenylmethane

phosmet と Na-ascorbate はともに陽性の結果であった。2 つの非発癌物質は何れの臓器においても促進作用はなく陰性の結果であった。

DMD 法で得られた陽性率を Ames 試験法と DEN-PH 法のそれと比較したのが Table 7 である。DMD 法では発癌物質の陽性率は 100% であり, 非発癌物質は何れも陰性であり検出特異性は 100% であった。

(3) DMD 法を用いた低濃度複合投与の検討

DMD 法を利用し, 検索物質投与時期に複数の化学物質を低濃度で複数同時投与し, 化学物質の

Table 6. DMD 法の結果

検 索 物 質	DEN-PH法	Ames 試験	病変出現臓器						評価
			肝	肺	甲状腺	前胃	腺胃	膀胱	
肝発癌物質									
2-AAF	+	+	▲→	→	→	→	→	+	
DBN	+	+	→▲	→	▲	→	→	+	
3'-Me-DAB	+	+	▲→	→	→	→	→	+	
Ethionine	+	—	▲→	↓	→	→	→	+	
PB	+	—	▲→	▲	→	→	→	+	
DDPM	—	+	▲→	▲	→	→	→	+	
Clofibrate	—	—	↓*→	↓	→	→	▲	+	
肝以外の発癌物質									
B(a)P	+	+	→▲	→	→	→	→	+	
Captan	+	+	▲→	→	▲	→	→	+	
DMBA	—	+	→→	→	▲	→	→	+	
3-MC	—	+	▲▲	→	→	→	→	+	
MNNG	—	+	→▲	→	→	→	→	+	
BHA	—	—	↓→	→	▲	→	→	+	
Catechol	—	—	→→	→	▲	▲	→	+	
Propineb	—	—	→→	▲	→	→	→	+	
Folpet	—	?	→▲	▲	▲	→	→	+	
発癌性未知物質									
Phosmet	+	?	▲→	→	→	→	→	+	
Na-Ascorbate	—	—	→→	→	→	→	▲	+	
非発癌物質									
Caprolactam	—	—	→→	→	→	→	→	—	
Daminozide	—	?	→→	→	→	→	→	—	

▲, 高度促進; ▲, 中等度促進; ▲, 軽度促進
 ▼, 中等度抑制; ▼, 軽度抑制
 →, 不変; *, GST-P 陰性細胞巢

Table 7. 肝および多臓器中期発癌試験法における陽性率

検索物質	Ames 試験	DEN-PH 法	DMD 法
肝発癌物質			
	+	22/23 (96)	4/4 (100)
	—	18/20 (90)	3/3 (100)
肝以外の発癌物質			
	+	7/21 (23)	6/6 (100)
	—	1/10 (10)	3/3 (100)
	?	0/3 (0)	1/1 (100)
非発癌物質			
	+	0/6 (0)	—
	—	0/27 (0)	0/1 (0)
	?	0/4 (0)	0/1 (0)
未知物質			
	+	1/9 (11)	—
	—	12/34 (35)	1/1 (100)
	?	7/26 (27)	1/1 (100)

(%)

Table 8. 各種化合物の投与濃度および標的臓器

化合物	投与濃度* (ppm)	標的臓器
酸化防止剤群 [A]…混餌		
BHA	1000	前胃, 膀胱
Catechol	800	前胃, 腺胃
Propyl gallate	100	
TBHQ	1000	膀胱
肝発癌物質群 [H]…混餌		
2-AAF	20	肝, 膀胱
Dimethylnitrosamine	10	肝, 腎
3'-Me-DAB	60	肝
Phenobarbital	50	肝, 甲状腺
Thioacetamide	60	肝
ニトロソ化合物群 [N]…飲料水		
BBN	100	膀胱
Dibutyl nitrosamine	100	膀胱, 食道, 舌, 肝
EHEN	50	肝, 腎
MNNG	5	前胃, 腺胃
Propylnitrosourea	60	腸, 舌, 胸腺

* 通常使用されている濃度の 1/10 量

Table 9. 群構成および各群における化合物の複合投与

群	DMD 処置	動物数 (有効匹数)	化合物の 組み合わせ
1	+	15 (15)	—
2	+	15 (15)	A
3	+	15 (15)	H
4	+	15 (15)	N
5	+	15 (13)	A+H
6	+	15 (15)	A+N
7	+	15 (14)	H+N
8	+	15 (14)	A+H+N
9	—	10 (10)	A
10	—	10 (10)	H
11	—	10 (10)	N
12	—	10 (10)	A+H
13	—	10 (10)	A+N
14	—	10 (10)	H+N
15	—	10 (10)	A+H+N

A: 酸化防止剤群 H: 肝発癌物質群
N: ニトロソ化合物群

相加作用や相乗作用と言った複合作用の有無について検討した (Fukushima *et al.*, 1991)。

方法: DMD処置を行なったあと Table 8 に示すように 4 種の酸化防止剤, 5 種の肝発癌物質として 5 種のニトロソ化合物の計 14 化合物を通常投与されている 1/10 の濃度で, Table 9 に示した如くの実験群構成と化合物の組合せで 16 週間投与した。さらに Table 7 には各物質の標的臓器を示した。

結果: 肝腫瘍の発生に対しては Fig. 3 に示した如く肝発癌物質とニトロソ化合物の複合投与によって過形成結節と肝細胞癌の発生を強力に促進し明らかな相乗作用が認められた。しかしそれに酸化防止剤が加わると明らかな肝癌発生の抑制が

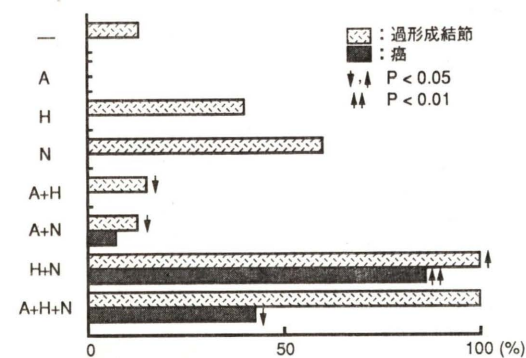


Fig. 3. DMD 処置群における肝腫瘍性病変の発生率。

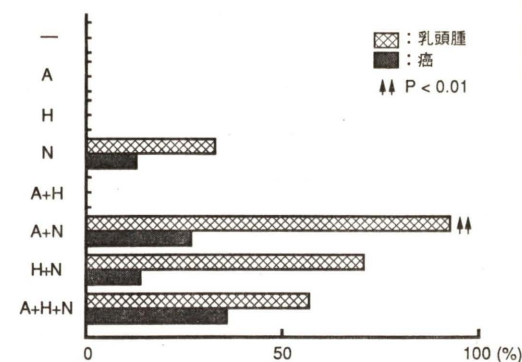


Fig. 4. DMD 処置群における膀胱腫瘍の発生率。

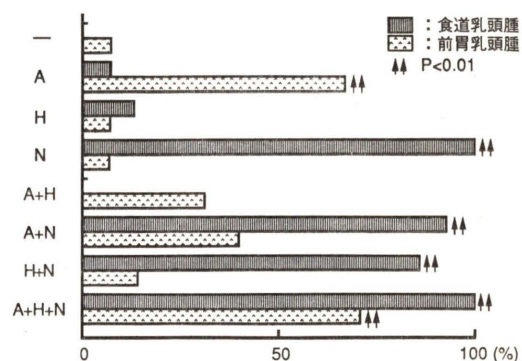


Fig. 5. DMD 処置群における食道および前胃腫瘍発生率。

みられた。膀胱ではニトロソ化合物と酸化防止剤の同時投与によって乳頭腫の発生に相乗作用が観察されたが、それに肝発癌物質が加わることによってむしろ抑制された (Fig. 4)。食道と前胃には乳頭腫の発生がみられた (Fig. 5)。食道ではニトロソ化合物の強い影響が認められ、その他の化合物による影響ははっきり観察されなかった。前胃では酸化防止剤に強い促進作用がみられたが、肝発癌物質やニトロソ化合物によってその作用は減弱され、3 者同時投与ではそれらの拮抗作用が弱められ、酸化防止剤の促進作用が回復した。

3. 考察

環境中には多種多様の化学物質が低濃度ながら数多く存在し、しかも毎年新しい化合物が生産され続けている。これら全ての物質について発癌性を 2 年間の長期発癌性試験でもって検討することは不可能なことである。本稿で述べた多臓器中期

発癌性試験法は肝を標的とした中期発癌性試験すなわち DEN-PH 法と有効に組み合わせることにより発癌物質のスクリーニングを短期に行なうためのものである。

一般的に中期発癌性試験は発癌 2 段階説に基づいた試験法であり、適切な発癌物質をイニシエーターとして一回あるいは短期間投与し、ある臓器に発癌好発状態を形成させた後、検体を一定期間投与して目的とする臓器に出現する前癌病変あるいは腫瘍性病変の発生頻度を対照群と比較し、その検体の発癌修飾作用から発癌性を判定するのである。

単一臓器を指標とする試験系を用いる時はその検体の標的性がはっきりしている場合やその用量相関またその臓器に対する発癌作用機序の追究には適切と考えられる。しかし、本来標的臓器の不明な検体を対象としている検索法では、できる限り多くの臓器で発癌性が検出できるようにしなければならない。これが多臓器中期発癌性試験法の基本概念である。そのためには一団体レベルでできるだけ多くの臓器に好発状態を作る必要がある。従っていかに多くの臓器に効率よくしかも均一に癌好発状態を作るかが試験システムの鍵ともいえる。MNU はきわめて広範囲の臓器に標的性のある発癌物質であり、単一発癌物質で行える点で魅力的で、この目的には優れた物質と考えられる。この MNU を用いた多臓器発癌イニシエーションの実験はほかの施設でも行なわれている (Diwan *et al.*, 1985)。しかし前述の如く、白血病の早期発生や臓器間のイニシエーションの不均一性があり、実用性が低いと判断された。この結果を踏まえて、希望する臓器にできるだけ均一に発癌好発状態を誘発するために複数の発癌物質を複合投与したのが、DED 法と DMD 法である。この複数の発癌物質の複合組合せには無数の方法が可能であるが、各々の発癌物質の臓器標的性、投与量、毒性、相互作用、入手難易度を勘案して決められるべきである。本試験法の DED 法や DMD 法は我々教室で長年にわたり培われた経験とデータから得られたものである。本結果が示すように、突然変異性の有無に拘らず肝以外を標的とするものなど多種の検体に対して発癌性と

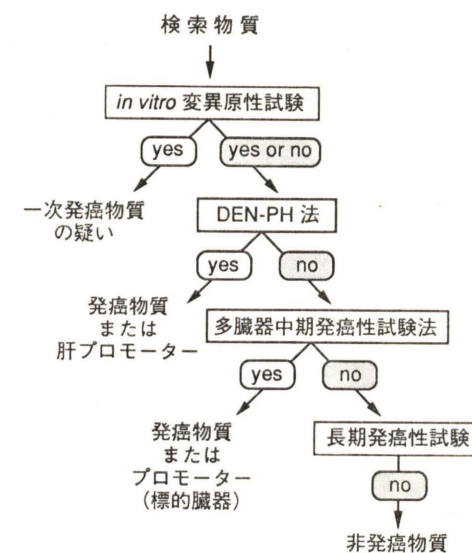


Fig. 6. 発癌性評価のための新しい検索法と手順。

相応した陽性成績が得られ、きわめて有用であることが示された。DED 法と比較して DMD 法がより高い陽性率を示し、優れた手法と考えている。

以上、多臓器中期発癌性試験法の利点は次のようになる。

1. 多くの臓器に好発状態を形成することにより多種多様の発癌物質を 1 つの実験法で短期間に検出することが可能である。
2. 臓器毎の発癌修飾作用の違いすなわち促進作用や抑制作用の検索が可能である。
3. 発癌物質を含めた複数化学物質の複合作用すなわち相加、相乗、抑制などの作用について多くの臓器で検索が可能である。

本法は肝を標的とする DEN-PH 法と組み合わせて利用することはすでに述べたが、Fig. 6 に示すように発癌性評価のための手順を提案したい。すなわちまず DEN-PH 法でスクリーニングを行い、陽性物質は発癌物質あるいは肝プロモーターと判定し、陰性物質についてはさらに多臓器中期発癌性試験法で検討する。ここで陰性となったものについてのみ従来の長期発癌性試験で発癌性の無いことを再確認する。この手順によって、発癌物質をきわめて早期にスクリーニングする事

が可能と考えられる。事実すでに多くの検体について実施されており、満足する成果が得られている (Jang *et al.*, 1991)。

今後の課題として、より多くの臓器に対する好発癌状態の形成、指標となる前癌病変の検討とそれに対する特異的な形質認識マーカーの確立、それによる病変の定量的解析の充実化が重要であり、それによって検索期間の一層の短縮化が可能となるであろう。この試験法の一層の充実と幅広い応用さらに用量相関試験によって将来発癌物質の安全性評価のうえで重要な試験法となることを期待している。

4. 謝辞

本研究の一部は文部省癌特別研究費、厚生省癌研究助成金および名古屋病理振興会助成金によった。

文 献

- Ashby, J. and R. W. Tennant (1988) Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP, *Mutation Res.*, **204**, 17-115.
- Bannasch, P. (1986) Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic neoplasia, *Carcinogenesis*, **7**, 689-695.
- Diwan, B. A., A. E. Palmer, M. Ohshima and J. M. Rice (1985) N-Nitroso-N-methylurea initiation in multiple tissues for organ-specific tumor promotion in rats by phenobarbital, *J. Natl. Cancer Inst.*, **75**, 1099-1105.
- Fukushima, S., A. Hagiwara, M. Hirose, S. Yamaguchi, D. Tiwawech and N. Ito (1991) Modifying effects of various chemicals on preneoplastic and neoplastic lesion development in a wide-spectrum organ carcinogenesis model using F344 rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 642-649.
- Fukushima, S., A. Hagiwara, T. Ogiso, M. Shibata and N. Ito (1983a) Promoting effects of various chemicals in rat urinary bladder carcinogenesis initiated by N-nitroso-n-butyl-(4-hydroxybutyl)amine, *Fd. Chem. Toxicol.*, **21**, 59-68.
- Fukushima, S., K. Imaida, T. Sakata, T. Okamura, M. Shibata and N. Ito (1983b) Promoting effects of sodium L-ascorbate on 2-stage urinary bladder carcinogenesis in rats, *Cancer Res.*, **43**, 4454-4457.
- Fukushima, S., M.-A. Shibata, M. Hirose, T. Kato, M. Tatematsu and N. Ito (1991) Organ-specific modification of tumor development by low-dose combinations of agents in a rat wide-spectrum carcinogenesis model, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 784-792.
- Goldsworthy, T., H. A. Campbell and H. C. Pitot (1984) The natural history and dose-response characteristics of enzyme-altered foci in rat liver following phenobarbital and diethylnitrosamine administration, *Carcinogenesis*, **5**, 67-71.
- Hennings, H. and S. H. Yuspa (1985) Two-stage tumor promotion in mouse skin: an alternative interpretation, *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 735-740.
- Hirose, M., A. Masuda, T. Inoue, S. Fukushima and N. Ito (1986) Modification by antioxidants and p,p'-diaminodiphenylmethane of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis of the mammary gland and ear duct in CD rats, *Carcinogenesis*, **7**, 1155-1159.
- Hirose, M., K. Ozaki, K. Takaba, S. Fukushima, T. Shirai and N. Ito (1991) Modifying effects of the naturally occurring antioxidants, γ -oryzanol, phytic acid, tannic acid and n-tritriacontane-16,18-dione in a rat wide spectrum organ carcinogenesis model, *Carcinogenesis*, **12**, 1917-1921.
- Ishidate, M. Jr., M. C. Harnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, *Mutation Res.*, **195**, 151-213.
- Ito, N., K. Imaida, R. Hasegawa and H. Tsuda (1989) Rapid bioassay methods for carcinogens and modifiers of hepatocarcinogenesis, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **19**, 386-415.
- Ito, N., T. Shirai and S. Fukushima (1990) Medium-term bioassay for carcinogens using multiorgan models, In: Ito, N. and H. Sugano (Eds.), *Modification of Tumor Development in Rodents*. Basal, Karger, pp. 41-57.
- Ito, N., H. Tsuda, M. Tatematsu, T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki, S. Uwagawa, M. Kagawa, T. Ogiso, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima and M. Asamoto (1988) Enhancing effects 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*, **9**, 387-394.
- Jang, J. J., K. J. Cho, Y. S. Lee and J. H. Bae (1991) Modifying response of allyl sulfide, indole-3-carbinol and germanium in a rat multi-organ carcinogenesis model, *Carcinogenesis*, **12**, 691-695.
- Maronpot, R. R., M. B. Shimkin, H. P. Witschi, L. H. Smith and J. M. Cline (1986) Strain A mouse pulmonary tumor test results for chemicals previously tested in National Cancer Institute carcinogenicity tests, *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 1101-1112.
- Rice, J. M. and A. Peratoni (1983) Organ specificity and interspecies differences in carcinogenesis by metabolism-independent alkylating agents, In: Langenbach, R., S. Nesnow and J. M. Rice (Eds.), *Organ and Species Specificity in Chemical Carcinogenesis*, New York, Plenum Press, pp. 77-104.
- Russo, I. H. and J. Russo (1978) Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**, 1439-1449.
- Shibata, M.-A., S. Fukushima, S. Takahashi, R. Hasegawa and N. Ito (1990) Enhancing effects of sodium phenobarbital and N,N-dibutyl nitrosamine on tumor development in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model, *Carcinogenesis*, **11**, 1027-1031.
- Shirai, T., A. Masuda, K. Imaida, T. Ogiso and N. Ito (1988) Effects of phenobarbital and carbazole on carcinogenesis of the lung, thyroid, kidney and bladder of rats pretreated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 460-465.
- Tatematsu, M., T. Aoki, M. Asamoto, C. Furihata and N. Ito (1988) Coefficient induction of pepsinogen 1-decreased pyloric glands and gastric cancers in five different strains of rats treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *Carcinogenesis*, **9**, 495-498.
- Tatematsu, M., K. Ozaki, M. Mutai, Y. Shichino, C. Furihata and N. Ito (1990) Enhancing effects of various gastric carcinogens on development of pepsinogen-altered pyloric glands in rats, *Carcinogenesis*, **11**, 1975-1978.
- Uwagawa, S., H. Tsuda, K. Imaida, S. Takahashi and N. Ito (1988) A medium-term multiple organs bioassays for carcinogenesis modifiers, *J. Toxicol. Sci.*, **13**, 322.
- Yokose, Y., K. Yamamoto, A. Nakajima, H. Eimoto, H. Maruyama, Y. Mori and Y. Konishi (1988) Carcinogenic potency of N-nitrosomethyl(2-hydroxypropyl)amine and other metabolic relatives of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine by single intraperitoneal injection on the lung of rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 698-704.
- Zeiger, E. (1987) Carcinogenicity of mutagens: Predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity, *Cancer Res.*, **47**, 1287-1296.

発がん物質のリスクアセスメント

国立衛生試験所安全性生物試験研究センター 林 裕 造

はじめに

リスクは「ある要因または要因群が定められた条件下でヒト、ヒト集団、生態系等に対して特定の障害 (hazard) をひきおこす確率 (probability)」と定義される。従って、化学物質のリスクアセスメントとは「化学物質のヒトあるいは環境に及ぼす有害影響を評価するための考え方/方法/作業」を意味する。発がん物質についてのリスクアセスメントもそのひとつである。このような安全性評価の考え方をリスクアセスメントの名前で大系化した功績は米国の EPA にあるが、基本的に同様な方法は以前より用いられ、例えば、職業がん等の予防対策の設定に役立っている。

リスクアセスメントは今や一種の流行語である。新聞、雑誌等の紹介文からわかるように、その概念は極めて単純、明快である。しかし、リスクアセスメント、特に発がん物質のリスクアセスメントが人々の間で具体的にどのように理解されているかを調べてみると、そこには大きな個人差があるように感じられる。妙な現象であるが、先ずこの問題を考えて見たい。

発がん物質のリスクアセスメントと言っても、その内容は対象とする物質によって著しく異なる。即ち、発がんの機序、強度、ヒトにおける曝露量は物質毎に相違があり、最終的な評価についても、ヒトに対する発がん性があると判断されれば直ちに生活環境から除去してしまいたい物質もあれば、多少の発がん性があると判断されても有用性あるいは技術的問題から除去しえないものまである。更に、アセスメントに必要な情報が十

分に準備されている物質もあれば、僅かな資料しかあたえられない例もある。従って、リスクアセスメントは物質によって、あるいは目的によって case-by-case の対応をとらざるを得ない現状にある。言い換えると、それぞれのヒトがどのような目的で、どの物質のリスクアセスメントに関与したか、あるいは興味を持っているかによって、リスクアセスメントについての具体的な理解が著しく異なってくることになる。

今回のシンポジウムには様々な分野の方々が出席されておられるとのことなので、誤解を避けるために、敢えて特定の実例を用いることをやめて、発がん物質のリスクアセスメントを実施する際の基本的な考え方を 4 つの項目、1) リスクアセスメントが意味するもの、2) リスクアセスメントが意図するもの、3) リスクアセスメントを支えるもの及び、4) リスクアセスメントを活かすものに分けて述べてみたい。

1. リスクアセスメントが意味するもの

リスクアセスメントは「既存の情報にもとづいてある物質もしくは物質群が特定の条件下でヒトに及ぼす（もしくはその可能性がある）有害影響の性質とその強さを推定するための考え方/方法/作業」と定義される。今回の場合、有害影響は発がん性を指し、特定の条件は日常生活での接触条件、あるいはその物質の使用目的に沿った曝露条件を意味する。

〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Risk Assessment of Carcinogenic Chemicals

Yuzo Hayashi

Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan

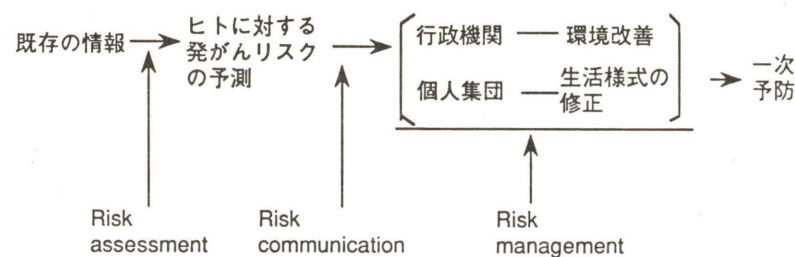


Fig. 1 発がん物質のリスクアセスメントが意図するもの。
対象とする要因(群)による発がんの一次予防対策への科学的基盤の提供。

2. リスクアセスメントが意図するもの

発がん物質のリスクアセスメントの究極的な目的は、対象とする物質によるヒトでの発がんの一次予防、より厳密に言う、一次予防対策に必要な科学的基盤を提供することにある。

Fig. 1 に示すごとく、発がんに関する科学的情報あるいは研究知見がいくらあっても、そのままではガンの一次予防は達成されない。まず、科学的情報に基づいて、対象とする物質のヒトに対する発がんリスクを予測し、その結果を行政機関あるいは一般の人々に正しく伝達して、その物質によるリスクを防止するための対策として行政上の規制による環境改善が実施され、あるいは、個人又は集団による生活様式の修正が行われて、始めて一次予防が軌道に乗ることになる。言い換えると、リスクアセスメントは、研究知見を具体的ながん予防対策の実施あるいは、リスクマネジメントに反映させるための橋渡しの役をになっていると言える。

3. リスクアセスメントを支えるもの

リスクアセスメントの拠り所は科学的情報そのものであり、現在、必要な情報は次の3種に大別されている。

- 1) 対象とする物質がヒトにがんを発生させる作用を持っているか否かを判断するための情報。リスクアセスメントでは、この情報による評価を有害性確認と呼んでいる。
- 2) 対象とする物質にヒトがどの程度曝露されているかを判断するための情報。リスクアセスメントではこの情報による評価を曝露評価と呼んで

いる。

3) 対象とする物質の発がん性がどの程度であるかを判断するための情報。リスクアセスメントではこの情報による評価を用量反応評価と呼んでいる。

リスクアセスメントではこれら3段階での評価を総合して、最終的にその物質によるヒトにおける発がんリスクを判定する手順が取られ、この最後の段階をリスク判定 *risk characterization* と呼んでいる。ここまでの話は単純であるが、実際にはこれらの段階のひとつひとつに多くの複雑な問題がからんでいる。

(1) 有害性確認 *hazard identification*

疫学的データで対象とする物質がヒトに対して発がん性を持つことが確認されれば、その時点で有害性確認は終了したことになる。しかし、実際にはヒトでの十分な知見が得られることは稀なので、多くの例では、動物実験データあるいは変異原性試験のデータに基づいて評価しなければならない。このような場合、最終的な結論を得る際に次の問題が生じてくる。

- 1) 動物実験で発がん性有りと結果が得られた場合、これらの動物実験の知見をそのままヒトに当てはめてよいのか？
- 2) 変異原性試験で陽性の結果を示す物質のすべてが発がん性をもつと言えるのか？
- 3) 変異原性試験で陰性の結果を示す物質のすべてが非発がん性であると言えるのか？
- 4) 動物実験で発がん性がみられ、変異原性試験で陽性の結果を示すすべての物質が *genotoxic carcinogen* と言えるのか？

現実に発がん物質のリスクアセスメントを実施する際に直面する問題、不確実性 *uncertainties* の中には、これら4つの事項のいずれかに由来するものが多い。これらの問題をふまえて有害性確認は次の2段階の手順でおこなわれる。

1) 対象とする物質は動物にがんを発生させる作用をもっているか？(動物実験データによる判断)

あるいは、

1') 対象とする物質は発がんに関係のある作用をもっているか？(変異原性試験等のデータによる判断)

2) その作用はヒトにも現れるとみなしうるか？(作用機序、代謝等に関する研究データ、類縁物質の発がん性に関する調査データ等による推定)

(2) 曝露評価 *exposure assessment*

対象とする物質への曝露実態、即ち曝露量、曝露期間、曝露経路等を確認もしくは推定する段階を言う。どのように強力な発がん物質であっても、曝露量が0ならばそれによるリスクも0になる。逆に、微弱な発がん物質であっても、曝露量が高ければヒトに対するリスクを無視することは出来ない。従って曝露評価はリスクアセスメントの結果を左右する重要な要素であるが実際には曝露に関する正確な直接データが得られない例が多い。このような場合の対応として、推定値(例えば食品中の残留量あるいは存在量からの推定値)で代用する方法がとられるが、推定値の求め方によってリスクを過大もしくは過小に評価する危険をともなう。

(3) 用量反応評価 *dose-response assessment*

動物実験における曝露量/曝露期間と発がん率との関係、あるいは曝露量と発がん影響の程度(DNA付加体の生成量等)との関係等の知見に基づいて、対象とする物質の発がん性強度を評価する段階を言う。一般に動物実験ではヒトにおける曝露に相当する低用量では明確な知見が得られないのでかなり高用量の投与がおこなわれる。従って、実際的には高用量でおこなった実験データから低用量におけるリスクを予測(低用量外挿)することが用量反応評価の主な仕事になる。現在、

低用量外挿の方法として種々の数理モデルが提案されているが、どのモデルを使用するかが議論の対象となっている。特に、*genotoxic-carcinogen* と *nongenotoxic-carcinogen* とでは別のモデルが適用されるべきであるが、現時点では適切なモデルを選択する基準は提案されていない。

(4) リスク判定 *risk characterization*

有害性確認、曝露評価、用量反応評価での知見を基礎に、対象とする物質(群)が予想される曝露条件においてヒトに対してどの程度の発がんリスクを示すかを予測する段階、即ち、リスクアセスメントの最終的な評価段階を言う。一般には次のいずれかの方式による評価がおこなわれる。

1) 予想される日常の曝露条件でのリスクはどの程度か？

2) 許容されるリスクに対応する曝露量はどの程度か？

なお、発がん物質のリスクアセスメントでは、特別の根拠がない限り、[ゼロリスクレベルが存在する]という立場をとらず、理論的に予測されるリスクの程度で安全性を判断する方式がとられる。

(5) 科学的情報とリスクアセスメント

リスクアセスメントでは、まず対象とする物質の発がん性に関連する各種情報(特異情報と呼ぶ)に基づいて、その物質のヒトにおける発がんリスクを評価する作業がおこなわれる。しかし、その際に十分な特異情報が得られる例は極めて少ない。情報が少ないと、評価の結果は不確実になり、時には、評価そのものが不可能ということにもなりかねない。このような場合の対応として、発がんに関する基礎的な研究知見(一般情報)を拠り所として適切な仮説を立てて、特異情報の不足を補い、とにかく、リスク判定をおこなうという手順がとられる。この場合においても、不適切な仮説を立てると、リスクを過小又は過大に評価する危険を伴う。

現在、リスクアセスメントを必要とする物質は極めて多く存在するが、一方、人的および経済的問題から、これらの物質のすべてについて十分な特異情報を提供することが困難な状態にある。従って、発がんに関する基礎的研究を強化して、特

異情報の不足を補うための一般情報、いわばリスクアセスメントに普遍的に適用しうる科学的原則をつくりあげることがリスクアセスメントを向上させるための重要な課題である。

4. リスクアセスメントを活かすもの

(1) 基本的事項

リスクアセスメントの将来課題をふまえ、科学的研究知見をがん一次予防に反映させるための作業を適切に実施していくための問題点について考えてみたい。この問題は、科学的情報を提供する人(researcher)リスクアセスメントの担当者(risk-assessor)とがん予防の対策を決定する人(risk manager)が、相互理解の下に、それぞれの仕事をいかに実施していくべきかの議論でもある。この問題について、著者は発がんに関する researcher および, risk assessor としての立場から次の3事項を取り上げたい。

1) Risk assessor: 科学的事実と見解に基づいて適切なアセスメントを実施し、アセスメントの結果を正しく risk manager に伝達する。

2) Researcher: がん一次予防への応用を出来る限り考慮に入れて研究を実施する。言い換えると、risk assessor の立場を出来る限り考慮に入れた研究計画を立てる。

3) Risk manager (Regulator): リスクアセスメントの結果を正しく理解し、必要に応じて経済的要素、社会的要素、心理的要素等を取り入れて、最終的な施策の決定と実施をおこなう。

次にこれらの問題をリスクマネジメントの立場からもう少し掘り下げて考えてみよう。

(2) リスクアセスメントの再吟味

リスクアセスメントの拠り所は既存情報である。従って、リスクアセスメントの結果は対象とする物質の発がん性に関連する既存情報の質と量に依存する。従って、不十分な情報でアセスメントをおこなうためには、前述のごとく、より多くの仮説の設定が必要となる。一方、リスクアセスメントの実施に際して用いた仮説の適否が各時代における発がんに関する一般の見解の水準に依存していることも考えるべきである。

以上をまとめてみると、risk manager は assess-

ment の結果が提出された場合、最終的な施策を決定するに先立って、assessment の拠り所となった科学的情報の質と量、assessment に際して用いた仮説の適否を再吟味する、もしくは再吟味する場を設ける必要がある。特に、同じ物質について、過去におこなわれた assessment の結果と現在提出された assessment の結果との間に著しい相違がみられた場合、再吟味によって、いずれが適切であるかを判断することは極めて重要である。極端な例をあげると、おなじ特異情報を用いているにもかかわらず、risk-assessor の間で結論が異なる場合がある。このような例を調べてみると、発がんに関する基礎的知識の水準が両 assessor 間で著しく異なり、その結果、特異情報の解釈と一般情報による仮説の設定について両者間に相違を来たしたことがその原因になっているように思われる。

(3) リスクマネジメントの難易

リスクアセスメントの結果をがん一次予防の目的に活かす最大の立役者は risk-manager であるが、リスクマネジメントにも容易なものと同難なものがある。

容易な例

1) 科学的事実に基づいてヒトに対する発がんリスクがないと判断された物質。

2) 科学的事実に基づいて、通常の曝露条件下でヒトに対する発がんリスクが明らかであると判断され、且つその物質の除去が可能である場合。

困難を伴う例

3) 科学的事実に基づいて、通常の曝露条件下でヒトに対する発がんリスクが明らかであると判断されるが、その物質の排除が技術的立場からあるいは存在価値の観点から困難と予想されるもの。この場合にはその物質の有用性、心理学的要素、経済的要素を考慮に入れた総合判断が必要である。

4) 実験系において、発がん性の実証または示唆されるが、ヒトに対する影響が不確実なもの。

4) の例は、研究知見の補強あるいは仮説の設定により 1), 2), 3) のいずれかに入れて評価することになる。

おわりに

最後にリスクアセスメントの実効をあげていくための条件をまとめてみたい。

1) リスクアセスメントは決して新しい概念ではなく、基本的な方法/考え方は、すでに確立され、職業がん等の一次予防について実効を上げている。問題はこの原則を通常のがん(common cancer)の一次予防にいかに関与するかを考え、実行することである。

2) 発がん物質のリスクアセスメントでは、特別の根拠がない限り、[ゼロリスクレベルが存在する]という立場をとらず、理論的に予測されるリスクの程度で安全性を評価する。

3) 一般的には、対象となる発がん物質の作用強度、作用機序、曝露条件等が多様なため、現時点では case-by-case の対応が有効である。

4) リスクアセスメントあるいはリスクマネジメントに際して困難を伴う例は、有用性が高く且つ適切な代替品が求められない物質あるいは環境からの除去が技術的に困難な物質を対象とする場合である。

5) 上記の場合には、リスクマネジメント(行政的判断/決定)に際して関連科学者のほかに社会/経済学者、心理学者、報道関係者等からの意見を広く求めるべきである。

6) 発がん物質のリスクアセスメントを向上さ

せる第一の前提は researcher, risk assessor, risk manager 間でアセスメントに必要な研究課題について討議し、それを実施することである。

7) リスクアセスメントの拠り所は研究知見である。その意味で、発がんに関連する研究者は、好むと好まざるとにかかわらず、リスクアセスメントにかかわりあいをもつ researcher, いわば risk researcher であることの自覚が必要である。

謝辞

本総説は対がん10ヶ年総合戦略プロジェクト研究分野3「発がん促進とその抑制に関する研究」の班会議における討議を参考にしてまとめたものである。資料の収集と原稿の作成に御協力いただいた国立衛生試験所、吉村博之氏に感謝します。

参考文献

- Federal Register Part II (1985) Office of Science and Technology Policy: Chemical Carcinogenesis; A Review of the Science and its Associated Principles
邦訳一厚生省生活衛生局食品科学課(監修), 林 裕造ほか(監訳): 化学物質の発癌性評価, 薬事日報社(1986).
林 裕造(1990) 化学物質の発がん性リスクアセスメント, 衛生試験所報告, 108, 1-16.
林 裕造, 吉村博之(1991) 医薬品の投与と発がん, 医薬品研究 22, 345-353.

第15期最初の総会開催される

平成3年8月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議の第15期が7月22日から発足し、7月22日～24日の3日間、第15期最初の総会が開催されましたので、その総会等についてお知らせします。

日本学術会議第112回総会報告

7月22日の第15期の発足に伴い、内閣総理大臣による日本学術会議会員の辞令交付が行われた。第15期の会員は、選出制度が学術研究団体を基礎とする推薦方式になって、3回目の会員である。この第15期会員による最初の総会である、第112回総会が7月22日から24日までの3日間、本会議講堂で開催された。

第1日目(22日)は、午前は新会員への辞令交付式があり、午後総会が開会され、直ちに、会長及び両副会長の選挙が行われた。会員による互選の結果、会長には近藤次郎第5部会員が13期、14期に引き続き三選された。人文科学部門の副会長には、川田侃第2部会員、自然科学部門の副会長には、渡邊格第4部会員が選出された(渡邊副会長は再選)。選挙終了後、近藤会長から「新人の方が半数以上おられ、大きな抱負をもっておられると思う。挫折感を持つことのないようできるだけ努力をしたい。皆様にも御協力をお願いしたい」との就任のあいさつがあり、又、川田、渡邊両副会長からもそれぞれ就任のあいさつがあった。

会長、副会長選出後は、直ちに各部会が開催され、各部の部長、副部長、幹事の選出が行われた。(第15期の役員については、別掲を参照)

第2日目は10時に総会が開催され、近藤会長が14期の会長という資格で第14期の総括的な活動報告を行った。その報告の折々には、国際交流とか、将来計画委員会、学術会議の予算等、会長の感慨、または感想をも交えてその所感を述べた。続いて、会員推薦管理会報告として、久保亮五委員長代理として事務総長が、第15期会員の推薦を決定するまでの経過報告を行った。

引き続き、会長から3日目の総会で提案・審議する予定の「第15期活動計画委員会の設置について(申合せ案)」に関する各部での事前討議について、並びに各常置委員会の各部での委員の選出について、それぞれ各部へ依頼した。

総会終了後、各部会が開催され、前述の申合せ案の討議及び各常置委員会委員の選出等が行われた。

第3日目(24日)。10時に総会が開会され、会長から「第15期活動計画委員会の設置について」の提案が行われた。

これは、第15期の活動の基本計画の立案を目的とする臨時の委員会を次の定例総会までの間、設置するという内容を内容としている。そしてこの提案は原案どおり可決された。

総会終了後、直ちに各部会が開会され、設置が決定された第15期活動計画委員会委員の選出等が行われた。

なお、この第15期活動計画委員会は、総会期間中に第1回の会議を開き、全会員を対象にした第15期の学術会議の活動に関するアンケートの実施を決めるなど、早速その活動を開始した。

また、運営審議会附置委員会、常置委員会、国際対応委員会等も活動を開始した。

第15期日本学術会議の辞令交付式等について

第112回総会に先立ち、第15期日本学術会議会員の辞令交付式が7月22日(月)11時から、総理大臣官邸ホールで行われた。辞令交付式は、海部内閣総理大臣、坂本内閣官房長官、大島、石原両官房副長官、稲橋総理府次長等の出席を得て執り行われた。

第1部から第7部までの会員1人ずつの名前が読み上げられた後全会員の最年長である渡邊格第4部会員が代表して海部総理から辞令を手渡された。この後、海部総理大臣から「会員の皆様には、創造性豊かな科学技術の発展、総合的観点に立った学術研究に係る諸活動に御尽力いただきたい。」とのあいさつがあり、これに代えて第15期会員を代表して渡邊格会員が「微力ながら全力を尽くし、重要な責務を全うし、国民の期待に応えたい。」とあいさつがあり、式は終了した。式には192名の会員が出席した。

また、総会2日目の夕方には、学術会議ホールで、坂本官房長官主催の第15期会員就任パーティーが開催された。パーティーは坂本官房長官のあいさつで開会し、日本学士院院長代理の藤田良雄幹事の祝辞があり、これに対する近藤会長の答礼のあいさつ、沢田敏男日本学術振興会会長の発声による乾杯の後、懇談に入った。ホールには溢れんばかりの人々で歓談が続き盛会であった。

第15期日本学術会議役員

会 長	近藤 次郎 (第5部・経営工学)
副会長	川田 侃 (第2部・政治学)
副会長	渡邊 格 (第4部・生物科学)
<各部役員>	
第1部 部 長	肥田野 直 (心理学)
副部長	弓削 達 (歴史学)
幹 事	一番ヶ瀬康子 (社会学)
"	山本 信 (哲学)
第2部 部 長	西原 道雄 (民事法学)
副部長	細谷 千博 (政治学)
幹 事	正田 彬 (社会法学)
"	山下 健次 (公法学)
第3部 部 長	大石 泰彦 (経済政策)
副部長	島袋 嘉昌 (経営学)
幹 事	岡本 康雄 (経営学)
"	藤井 隆 (経済政策)
第4部 部 長	中嶋 貞雄 (物理科学)
副部長	田中 元治 (化学)
幹 事	竹内 郁夫 (生物科学)
"	樋口 敬二 (地球物理学)
第5部 部 長	岡村 総吾 (電子工学)
副部長	市川 惇信 (計測・制御工学)
幹 事	内田 盛也 (応用化学)
"	増子 昇 (金属工学)
第6部 部 長	中川昭一郎 (農業総合科学)
副部長	水間 豊 (畜産学)
幹 事	志村 博康 (農業工学)
"	平田 熙 (農芸化学)
第7部 部 長	岡田 晃 (社会医学)
副部長	伊藤 正男 (生理科学)
幹 事	渥美 和彦 (内科系科学)
"	金岡 祐一 (薬科学)

(注) カッコ内は、所属部・専門

平成4年(1992年)度共同主催国際会議

- 本会議は、昭和28年以降、学術関係国際会議を関係学術研究団体と共同主催してきたが、平成4年(1992年)度には、次の6国際会議を開催することが、6月7日の閣議で了解された。(カッコ内は、各国際会議の開催期間と開催地)
- ・第9回国際光合成会議
(平成4年8月30日～9月5日、名古屋市)
共催団体：日本植物生理学会
 - ・国際地質科学連合評議会及び第29回万国地質学会議
(平成4年8月24日～9月3日、京都市)
共催団体：(社)東京地学協会外5学会
 - ・第5回世界臨床薬理学会議
(平成4年7月26日～31日、横浜市)
共催団体：日本臨床薬理学会

第15期日本学術会議会員の概要について

この度任命された210人の第15期日本学術会議会員の概要を以下に紹介する。(カッコ内は前期)

1 性別	男子207人(207人)	女子3人(3人)
2 年齢別	50～54歳 3人	55～59歳 29人
	60～64歳 105人	65～69歳 58人
	70～74歳 15人	
	最年長 74歳(76歳)	
	最年少 54歳(51歳)	
	平均年齢 63.5歳(63.1歳)	
3 勤務機関及び職名別		
(1) 大学関係	国立大学 71人(78人)	
	公立大学 2人(4人)	
	私立大学 93人(88人)	
	その他 3人(2人)	
	計 169人(172人)	
(2) 国公立試験研究機関・病院等	11人(9人)	
(3) その他	法人・団体関係 9人(10人)	
	民間会社 9人(6人)	
	無職 10人(13人)	
	その他 2人(0人)	
	計 30人(29人)	
4 前・元・新別	前 会 員 88人(109人)	
	元 会 員 3人(4人)	
	新 会 員 119人(97人)	
5 地方別(居住地)	北海道 4人(3人)	
	東北 8人(6人)	
	関東 133人(130人)	
	中部 20人(17人)	
	近畿 34人(42人)	
	中国・四国 5人(4人)	
	九州・沖縄 6人(8人)	

(注) 詳細については、日本学術会議月報7月号を参照

- ・第11回国際光生物学会議
(平成4年9月7日～12日、京都市)
共催団体：日本光生物学協会
- ・第14回国際平和研究学会総会
(平成4年7月27日～31日、京都市)
共催団体：日本平和学会
- ・第8回国際バイオレオロジー会議
(平成4年8月3日～8日、横浜市)
共催団体：日本バイオレオロジー学会

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。
〒106 東京都港区六本木7-22-34
日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

日本学術会議だより

№.23

第15期活動計画決まる

平成3年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、このたび開催した第113回総会において、第15期活動計画と新しい特別委員会の設置を決定しましたので、その概要をお知らせいたします。

日本学術会議総会における内閣官房長官挨拶

平成3年10月23日(水) 日本学術会議講堂

日本学術会議第113回総会に当たりまして、一言ご挨拶を申し上げます。

御承知の通り、日本学術会議は、我が国の科学者の内外に対する代表機関として、科学の向上発展を図り、行政、産業及び国民生活に科学を反映浸透させるという重大な責務を負っております。

21世紀に向けて、さらに調和のとれた真に豊かな国民生活を実現するためには、創造性豊かな科学技術は申すまでもなく、学術全般を一層発展させることが必要であります。また、我が国の国際的地位の向上に伴い、全地球的視点に立った我が国の国際的な貢献が強く求められております。

そこで、日本学術会議の皆様におかれましては、日本の科学研究の一層の進展のために、長期的かつ高い観点から議論を重ねていただくとともに、科学研究の分野において我が国がどのような国際的貢献をなすべきか等自然科学のみならず、人文・社会科学も含めた全学問的領域から総合的に検討していただき、建設的な御意見を積極的にお出しいただきたく、お諮りをいたします。

頂戴いたしました有意義な御意見につきましては、その実現に最大限の努力をいたしたいと考えております。

終わりに、日本学術会議の今後の御発展と、御出席の皆様方の御健勝を祈念いたしまして、私の挨拶といたします。

日本学術会議第113回総会報告

日本学術会議第113回総会(第15期・第2回)は、10月23日～25日の3日間開催された。

総会冒頭、官房長官の挨拶があった。(上掲)

近藤会長からの前回総会以降の経過報告に続いて、運営審議会附置委員会、部会、常置委員会、国際対応委員会の各委員長、部長からの報告があった。そして第15期日本学術会議の活動方針となる「第15期活動計画(申合わせ)」と「臨時(特別)委員会の設置について(申合わせ)」(別掲)の2件の提案があり、真剣な討議の後、一部修正をして、圧倒的多数の会員の賛成により可決した。この2件の提案内容は、前回の臨時総会で設置された第15期活動計画委員会

が審議を重ねて作成したものであり、またその間に2回の連合部会及び部会を開いて、各会員の意見を集約したものである。

総会2日目は、予定を急遽変更してSSC(超電導超大型粒子加速器)計画についての討議を行った。これは去る10月15日に運営審議会のメンバーに対し、米国大統領補佐官D・アレン・プロムリー博士が、SSC建設計画に関して日本の協力を求めるスピーチを行ったのに対して、第4部から総会討議資料が提出されたためである。中嶋貞雄第4部長と伊達宗行会員が登壇し説明を行い質問等に答えた後討議に入った。午後も熱心な討議は続き政府に対して要望を提出することが採択された。

内閣官房長官挨拶の中で語られた学術に関する国際対応については、第15期活動計画の中にも提唱されているが学術会議としては、今後、重要案件として審議することとした。

このほか、広報委員会、将来計画委員会も開催された。

総会3日目は、各常置委員会、各特別委員会(第1回会議)が開催された。

第15期活動計画

日本学術会議は、創設以来、科学者や学術研究団体との連携の下に、その目的・職務の遂行に努力し、我が国の学術研究体制の整備についての重要な勧告等を行い、研究所の設立などを含めて数々の業績を挙げてきた。また、数多くの国際学術団体との連携・協力、国際学術協力活動への参加など世界の学界と提携しつつ学術の進展に貢献してきた。しかしながら、創設後40有余年を迎えた現在、学術を取り巻く状況は、国際的にも国内的にも著しい変化を生じた。このような状況を踏まえて、第15期日本学術会議は、本会議の創設以来の基本的精神を引き続き堅持しながら、変動の激しい内外情報に対応して、なお一層の成果を挙げるべく努力する。

日本学術会議は、学術に関する重要事項を自主的に審議し、我が国の学術研究の在り方についての方策を立案し、学術研究の成果を行政、産業及び国民生活に反映浸透させることを使命としている。このため、会員の科学的知見を結集し、時代の要請に即応しつつ将来を見通し、以下の視

点から学術研究の一層の推進を図る。

人文・社会及び自然科学を網羅した日本学術会議は、学問的視野に立ち、学術研究団体を基盤とする科学者の代表機関であることを認識して、全科学者の参加と意見の集約を図らなければならない。さらに、本会議が集約した科学者の意見を速やかに政策の形成に反映させるようにすべきである。特に学術政策については、他の関係諸機関との連携を強化し、その実現を図る。

また、学術研究団体を基盤とする日本学術会議は、関係ある学術研究団体等から推薦された科学者を中心として構成される研究連絡委員会的重要性を認識し、その活動を強化するとともに、学術研究団体との連絡を密にし、研究基盤の強化を図り、高度化する学術の発展に貢献する。

我が国の科学者を内外に代表する機関である日本学術会議は、国際社会における我が国の地位の向上に照らし、海外諸国の期待と時代の要請にこたえて、学術の分野における国際貢献に積極的な役割を果たすべきである。

日本学術会議は、真理探究という基本理念に立脚し、国民とともに学術の在り方を考え、同時に学術の国際性を重視するものである。そのためには、学術の健全な発展に向けて、学問・思想の自由の尊重と研究の創意への十分な配慮の下に、長期的かつ大局的な視点に立ち、創造性豊かな研究の推進に努める。

科学が文化国家の基礎であるという確信に立ち、日本学術会議は、科学者の総意を代表してその精神を高揚したい。即ち、21世紀に向けて学術体制及び研究・開発の望ましい在り方を抜本的に検討し、我が国の学術政策に指針を与えることにより、国民の期待にこたえとともに、人類の福祉と世界の平和に貢献することを期するものである。

1. 重点目標

第15期活動計画の重点目標は、次のとおりとする。

(1) 人類の福祉・平和・地球環境の重視

今世紀において、科学・技術は長足の進歩を遂げたが、一方において、地球環境の悪化を始めとして、人類の将来を脅かすような事態が起きている。さらに現在の世界は、激動の渦中にあり、その影響は、学術の分野にも及んでいる。

今日の社会的現実が提起している問題を解決するには、直接に関係する研究だけでなく、広く諸科学が積極的に関与する必要がある。そのためには、多くの研究領域が、それぞれ独自に一層の深化を図るとともに、共同の努力を行い、研究の内容、学問体系の変革にまで進むべきである。人文・社会及び自然科学を包含する日本学術会議は、その特徴を生かして十分な審議を行い、人類の福祉・平和・地球環境を重視して、学術研究の進むべき方向を提示する。

(2) 基礎研究の推進

学術の研究は、人類の発展に不可欠であることは言をまたない。日本学術会議は、将来の学術の発展に向けて、各分野の基礎研究の推進に積極的に取り組むこととする。

また、学術の領域は広範多岐であり、基礎研究であれ応用研究であれ、それぞれの領域ごとに方法論も異なり、研究者の求めるものに大きな違いがあることを十分に考慮し、各分野の研究者の声を聞き、それぞれに適した育成策を講ずる必要がある。それと同時に、学術研究の動向に注目し、いわゆる学際的研究や学問の総合化に留意しつつ、諸科学の調和のとれた発展を目指すことが重要である。

以上のため、第13期においては学術研究動向、第14期においては学術研究環境に関する調査研究を行い、我が国の学術水準の国際比較やその発展を阻害する諸因子な

どを指摘した。今期においては、これらの調査結果を参考にしつつ、創造性の基礎となる個人の着想を重視し、かつ、国際的にみた学術研究の動向を見極め、独創的研究の強化策等を積極的に図る。さらに、国民生活の向上発展に資する学術の具体的方策を審議提言する。

(3) 学術研究の国際貢献の重視

学術研究は、本来、真理の探究を目指す知的活動であり、その成果は広く人類共通の資産として共有されるべきものである。したがって、学術の国際交流は、学術研究にとって本質的に重要であり、その在り方に常に関心を払う必要があることは言うまでもない。

さらに近年は、国際平和の推進や環境問題の解決等、いわゆる地球のあるいは国際的規模の課題について、我が国の研究を充実させつつ、広く世界の諸科学の発展を積極的に推進する必要が増大している。また、発展途上国及び近隣諸国の学術振興のため、これら諸国の研究者に協力して、貢献策を立案することが強く要望されている。これらのことから、我が国の科学者が今後積極的に国際貢献に取り組み、学術を人類の繁栄と世界の平和に役立てるため積極的な役割を果たすことが必要となりつつある。

以上のような状況から、本会議が築いてきた国際学術交流・協力の在り方についての諸原則と実績を基盤として、学術の国際交流・協力の飛躍的な拡充強化を図り、国際的寄与を格段に拡大することが極めて重要である。

2. 具体的課題（要旨）

次の課題を選定した。

- (1) 科学者の倫理と社会的責任
- (2) 学術研究の長期的展望
- (3) 研究基盤の強化と研究の活性化
- (4) 研究者の養成
- (5) 学術情報・資料の整備
- (6) 学術研究の国際交流・協力
- (7) 国際対応への積極的取り組み
- (8) 文化としての学術
- (9) 平和と安全
- (10) 死と医療
- (11) 生命科学と社会的諸問題
- (12) 人口・食糧・土地利用
- (13) 資源・エネルギーと地球環境
- (14) 巨大システムと人間

3. 具体的課題への対処及び臨時（特別）委員会設置について（省略）

注：国際対応委員会の扱いは常置委員会の並びとする

◇今回の総会決定により設置された特別委員会◇

- ・文化としての学術
- ・平和と安全
- ・死と医療
- ・生命科学と社会的諸問題
- ・人口・食糧・土地利用
- ・資源・エネルギーと地球環境
- ・巨大システムと人間

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

第1条 本会は日本環境変異原学会(The Environmental Mutagen Society of Japan)と称する。

第2条 本会は人間環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。

第3条 本会の会員は、正会員、学生会員および賛助会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者とする。学生会員は、大学、または大学院に在籍し、毎年所定の手続を経て、定められた会費を納入した者とする。賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。

第4条 本会に入会を希望するものは、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込むものとする。

第5条 会員は毎年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は評議員会において審議し総会において定める。

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
2. 奨励賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行い、将来の成果が期待される研究者（原則として会員）に授与する。
3. Mutation Research誌の特別巻を特価で購入配付する。
4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
5. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

会長 1名 庶務幹事 1名
会計幹事 1名 国際交流幹事 1名
編集幹事 1名 会計監査 2名
および評議員若干名。

評議員は正会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。

庶務幹事、会計幹事、国際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承認を得て、評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。

役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

第8条 評議員会は会員を代表し、事業計画、経費の収支、予算決算およびその他の重要事項について審議する。

第9条 本会は年1回総会を開く。総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

附 記

1. 本会則は平成2年1月1日より施行する。
2. 本会は事務所を静岡県三島市谷田1,111番地に置く。
3. 正会員、学生会員および賛助会員の会費は、それぞれ年額5,000円、3,000円および1口20,000円とする。ただし、Mutation Research誌の特別巻の配付を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

日本環境変異原学会平成4～5年役員名簿

会 長	早 津 彦 哉
庶 務 幹 事	祖父尼 俊 雄
会 計 幹 事	渋谷 徹
国際交流幹事	長 尾 美奈子
編 集 幹 事	佐 藤 茂 秋
会 計 監 査	松 下 秀 鶴
〃	乾 直 道
賞等選考委員	祖父尼 俊 雄
	菊 池 康 基
	渡 部 烈
	佐々木 正 夫
	若 林 敬 二
編 集 委 員	島 田 弘 康
	後 藤 純 雄
	菊 川 清 見
	林 真 穂
	田 中 憲 穂
企 画 委 員	大 西 克 成
	菊 池 康 基
	若 林 敬 二
	山 添 康

日本環境変異原学会平成4～5年評議員名簿

(五十音順)

氏 名	所 属
大 西 克 成	徳島大学医学部
加 藤 隆 一	慶応義塾大学医学部
鎌 滝 哲 也	北海道大学薬学部
菊 川 清 見	東京薬科大学薬学部
菊 池 康 基	武田薬品工業(株)研究開発本部
黒 田 行 昭	麻布大学生物科学総合研究所
後 藤 純 雄	国立公衆衛生院
佐々木 正 夫	京都大学放射線生物研究センター
佐 藤 茂 秋	富山県衛生研究所
渋谷 徹	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
島 田 弘 康	第一製薬(株)中央研究所
清 水 英 佑	東京慈恵会医科大学
須 藤 鎮 世	伊藤ハム(株)中央研究所
祖父尼 俊 雄	国立衛生試験所
武 部 啓	京都大学医学部
田 中 憲 穂	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
常 盤 寛	福岡県衛生公害センター
長 尾 美奈子	国立がんセンター研究所
西 岡 一	同志社大学工学部
林 真	国立衛生試験所
早 津 彦 哉	岡山大学薬学部
松 島 泰次郎	日本バイオアッセイ研究センター
山 添 康	慶応義塾大学医学部
吉 川 邦 衛	三菱化成工業(株)総合研究所
若 林 敬 二	国立がんセンター研究所
渡 部 烈	東京薬科大学

日本環境変異原学会入会申込書

平成 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

フリガナ			
氏 名	印		
ローマ字つづり			
生年月日, 性別	年	月	日 男 女

所属機関 部局 職名	(和)
	(英)
所属機関 所在地	〒 電話 内線 () FAX (和)
	(英)
自宅 住所	〒 電話 内線 () FAX (和)
	(英)
会誌送付先 ① 所属機関 ② 自宅	

学 部	学部学校名	卒業年次	年
歴 大学院	課程学校名	修了年次	年
学 位		取得年	年
<p>研究領域 (下記にあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)</p> <p>1. 変異原 2. 検出系 3. 毒性 4. 発生異常 5. 汚 染</p> <p>6. 疫 学 7. 遺 伝 8. が ん 9. 微 生 物 10. 高等動物</p> <p>11. 高等植物 12. 食 品 13. 気体・粉じん 14. 医 薬 品 15. 農 薬</p> <p>16. 代 謝 17. 分子機構 18. その他 ()</p>			
<p>研 究 歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)</p>			
<p>加入学会名 (本学会以外の)</p>			

推 薦 者 (日本環境変異原学会評議員)
氏 名 (署名) 印
入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

入会申込書の送付先: 〒105 東京都港区新橋 5-23-7

三造写真工業株式会社内 学会事務局

住所・所属等変更届

平成 年 月 日

日本環境変異原学会
事務局 御中

下記変更がありましたのでお届け致します。

フリガナ	
氏 名	印
旧 所 属	

新 所属機関 部局 職名	(和)
	(英)
新 所属機関 所在地	〒 電話 内線 () FAX (和)
	(英)
新 自 宅 住 所	〒 電話 内線 () FAX (和)
	(英)
会誌送付先 ① 所属機関 ② 自 宅	

送付先：〒105 東京都港区新橋 5-23-7
三造写真工業株式会社内 学会事務局

環境変異原研究 第 13 巻 第 3 号 1991 年

平成 4 年 2 月 10 日 印 刷
平成 4 年 2 月 10 日 発 行

発 行 者 日本環境変異原学会

発行責任者 早 津 彦 哉

印 刷 所 三造写真工業株式会社
〒105 東京都港区新橋 5-23-7
TEL 03-3433-1869

ISSN 0910-0865