

S. Arimoto

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Sakae Arimoto

Vol.4 No.1 1982

目 次

昭和56年学会奨励賞を受賞して 賀 田 恒 夫 2

第10回研究発表会・シンポジウムの記録 石 館 基 3

第10回研究発表会・特別講演要旨 J. R. Miller 9

変異原性・癌原性の定量的評価へのアプローチ

1. クラスター分析と最小自乗法の組み合わせによる

突然変異原性物質の分類 今 村 詮 13

2. 環境変異の定量的評価 賀 田 恒 夫 21

3. 染色体異常誘起性の定量化 石 館 基 26

4. 化学変異原における閾値の問題 田 島 弥太郎 32

5. 化学物質と放射線による遺伝毒性の相違

——放射線相当量 REC はよくない—— 近 藤 宗 平 37

6. 発癌性化学物質の定量的リスク・アセスメント

——最近の文献から—— 中 村 晃 忠 41

7. 発癌性試験の結果の評価

——Dr. Squire の提案をめぐって—— 黒 川 雄 二 52

日本環境変異原学会会則 58

編集後記 62

昭和56年学会奨励賞を受賞して

国立遺伝学研究所・変異遺伝部

賀 田 恒 夫

環境変異原がヒトの健康に与えつつある重大さに対して、自分らのなし得たことの至らぬことを思うのみであります。暖かいお励げましと受けとめ、関係者に厚く御礼申し上げます。

この分野の研究の歴史を辿って行きますと、約10年前に、発がん物質の代謝の解析と、微生物における突然変異の研究とが見事に合流して、新しい分野が開けていたことに気がつきます。それぞれの分野は、この合流点に至るまで、さらに様々な先駆的研究の流れを汲んでいることも明らかです。このような科学の発展を見つめつつ、科学そのものが、人間としての人間の幸福に役立つことの素晴らしさを識るゆえに、微力ながら、それに参加することの厳しさを泌々と感じる次第であります。

災害を体験してから始めてその対策を講じるのでは遅すぎることは云う迄ありません。ある場合には事実の中に埋もれた仮説を求め、先見を重ねつつ問題を進めたいと思います。

第10回研究発表会・シンポジウムの記録

「食品関連物質と変異原性—その現状と評価」

国立衛生試験所・安全性生物
試験研究センター・変異原性部

石 館 基

はじめに

食品関連物質の変異原性について、改めて本シンポジウムで取り上げたことにはいくつかの理由がある。まず、第1に、本学会では依然として食品に関する報告が多いこと。第2に、食品に関連する諸物質の変異原性、あるいは発癌性の有無は、一般消費者にとって最大の関心事であること。第3に、得られたデータを研究者自身がどのように解釈または評価しているかについて忌憚のないところを披露してもらいたいこと、などによる。

食品関連物質は、食品添加物（天然添加物を含む）のように人工的に加えられるもの、食品自身の成分、あるいは、調理の過程で生成されるもの、食品相互あるいは生体内で新しく合成されるもの、また、偶発的に食品に混入する汚染物質などに大別されよう（図1）。本シンポジウムでは、それぞれの領域で活躍されている専門家に、最近の知見を披露していただいた。以下、発表内容に関する概略を紹介する（敬称を略させていただきます）。

（1）石館らは、厚生省、食品化学課の依頼を受け、現在、本邦で使用されている合成食品添加物（天然添加物を含む）の変異原性試験を担当している。これらは、他の毒性試験とともに食品添加物の安全性の再評価の一環として行われているものである。

彼らによると、現在までに約120種の合成品および約20種の天然添加物について、サルモネラ菌を用いるAmesテスト、並びにチャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験を終了

している。また、上記いずれかの試験で陽性となった数種のものについて、さらに、マウス個体を用いる小核試験を行っている。

現在のところ、Amesテストで陽性となったものには、酸化防止剤のエリスルビン酸、漂白剤の亜塩素酸ナトリウム、殺菌剤の次亜塩素酸ナトリウムのほか、着色料の食用緑色3号（不純物を含む）、発色剤の亜硝酸ナトリウムおよび小麦粉改良剤の臭素酸カリウムなどが含まれている。最近の実験では、殺菌漂白剤の過酸化水素も陽性という結果が得られている。厚生省がん研究班の結果によると、これらのうち、次亜塩素酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウムには、マウス、ラットいずれにも発癌性は認められていないが、臭素酸カリウムおよび過酸化水素には、それぞれ、ラットあるいはマウスで発癌性が認められている。天然添加物では、現在までのところ、カカオ色素およびビートレッドが陽性となっている。

一方、培養細胞を用いる染色体異常試験では、合成品120種のうち32種類が陽性となったが、そのうち、特に交換型異常を多発するもの（TR値の高いもの）は、亜塩素酸ナトリウム、没食子酸プロピル（酸化防止剤）、過酸化水素、臭素酸カリウム、オイゲノール（着香料）、亜硝酸ナトリウム、および塩化アンモニウム（膨剤）などであった。強化剤のリボフラビンあるいは、保存剤のチアベンダゾールでは、染色体数を倍化させる作用が認められるという。調味料である5'-イノシン酸ナトリウムその他の核酸系調味料あるいは溶剤のプロピレングリコールなど、高濃度（10 mg/ml以上）ではじめて染色体異常を誘発するが、その異常は切断型のものであり、交換型の異常は殆んど

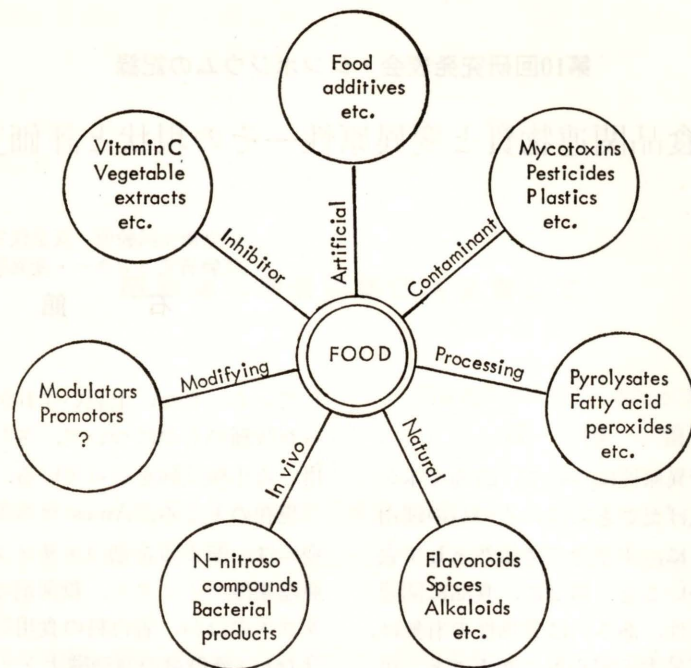


図 1 食物関連物質の種類

誘発されない。天然添加物では、クルクミンおよびカフェインが交換型異常を誘発する。

マウスを用いる小核試験では、現在までのところ、臭素酸カリウム、亜塩素酸ナトリウムが陽性となった。亜硝酸ナトリウム、オイゲノール、あるいは塩化アンモニウムのように、培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性であっても、小核試験では陰性に終るものはかなり多い。

彼らの結論によると、Ames テストあるいは培養細胞を用いる染色体異常試験はいずれも *in vitro* 系としてかなり感度の高い手法であり、この両者を併用することによって、少なくとも発癌性を持つ物質を逃さず捕えることができるという。しかしながら、*in vitro* 系で得られたデータは、必ずしも *in vivo* の事象をすべて反映するものではない。従って、彼らは、*in vitro* 法で得られた結果から、直ちにその物質の安全性を評価することを避け、*in vivo* 法による確認試験を行った上で最終的評価を行う必要性を強調している。

(2) 岩原ら(奏野研究所)はプラスチック製の食品用器の溶出物について微生物を用いる変異

原性試験を行った成績について報告した。包装用ラップフィルムを9種類、食品の容器を10数種、つまようじなど17種について、サルモネラ菌、TA1537, TA100, および TA98 を用いて検索した。大部分のものには変異原性は認められなかったが、赤色のマドラー(清涼飲料水などの攪拌に使用するもの)のヘプタン溶出物については弱ながら陽性となるものが見出された。これらの結果から、その原因物質が、プラスチックそのものか、あるいは添加物であるかは別として、その約1%以上のものが溶出されてこない限り、Ames テストでは検出できないという。今後、食品容器の食品中への移行およびその安全性については、化学分析にとどまらず、上記のような生物学的活性試験も重要視されるべきであることを示唆している。

(3) 長尾ら(国立がんセンター)は、従来、アミノ酸あるいは蛋白質の加熱分解物中からいくつかの高い変異原活性を持つ化合物を分離同定してきた。今回は、焼肉、焼魚、漬物、スパイス、コーヒーおよびマイコトキシンなどに関する最近

の所見を報告した。

丸干いわしのエタノール抽出物について Ames テストを行って見ると、その活性は調理時間(網焼き)につれて上昇してくる。ハンバーグもまた同様である。前者の抽出物から IQ, および MeIQ, 後者からは、それらと構造の似ている MeIQ_x という新しい化合物を分離同定することができた。これらはすべてフレームシスト型の変異原であり、現在動物に対する発癌性の有無を検討中である。

動物に毎日、終生投与してその50%に発癌する量(TD₅₀)を計算すると、ヒトは、プロモーターの存在を加味(約100倍)しても、TD₅₀の1/10~1/20位の焼魚を食べていることになるという。

植物性食品のうち、漬物および香辛料には変異原性が認められている。これらの原因はすべてフラボノイドで説明ができる。このうち、最も変異原活性の高いケルセチンは、植物界に広く分布し、Ames テスト、染色体異常、および SCE など *in vitro* の試験系では陽性である。ケルセチンを餌に1~10%混入してラット、マウス、およびハムスターによる発癌実験を行ったところ、すべて陰性の結果に終わっている。*in vivo* のマウス小核試験では陰性であるという報告も多いこと、また、ケルセチンには抗プロモーター的作用もある可能性もあるという所見もあるので、今後とも生体内の動態については更に検討する必要があると思われる。植物成分中にはフラボノイドのほか、クマリン誘導体、アントラキノン系化合物およびアルカロイド類のうちに変異原性のあるものが含まれている。

しょう油、そばつゆ、きな粉その他の日常食品は、それ自身に変異原性はなくとも、亜硝酸の存在下で変異原性が現われる場合が多い。その生成物は必ずしもニトロサミンのみではなさそうであるが、現在精製中である。

コーヒーは焙煎によって変異原性が現われてくる可能性がある。最近、コーヒーとヒトの膀胱癌との相関について疫学的データがある。コーヒーのサルモネラ菌に対する変異原性は、食品添加物である亜硫酸ソーダあるいはビタミンCによって低められるという所見も得られている。

食品汚染物質として知られているアフラトキ

ンには極めて高い変異原活性が知られているが、漢方薬あるいは発酵食品についてはステグマトキシシン以外の変異原を生産する微生物が存在する可能性もあるので注意を要するという。

彼女らは、今後さらに食品中に存在する変異原の単離、構造決定を進めるとともに、それらの発癌性について検討する必要性を強調し、あわせて、変異原の修飾、抑制、あるいはプロモーターの作用機序に関する研究の重要性を指摘した。

(4) 賀田ら(国立遺伝研)は、特に生体内における変異原の生成並びに抑制に関する知見について報告した。二級アミンなどが亜硝酸と反応して胃の中でニトロサミンを生成することは既に知られているが、ソルビン酸のような食品添加物や、コショウのピペリン類やフェノール類、また、カルバメート系あるいは尿素農薬や合成医薬品などもまたニトロソ化されることによって強力な変異原となる。最近、脂質の酸化物も重要視されている。後者の場合は、食物の自動酸化によって、ラジカルによる連鎖反応を生じ、酸化的にDNAに作用する可能性が指摘されている。広義では生体内で代謝生産されるすべての物質が対象となる。ソルビン酸と亜硝酸との反応によって生ずる種々の変異原については、既に名古屋大の並木らおよび岡山大の早津らによってその構造が決定されている。大沢らによって報告されたコショウの成分も、生体内ではじめて変異原性を獲得するものの1種といえよう。グルコースとリジンを加熱することによっても、変異原が生ずることも、大野らによって報告されている。

一方、Epstein らの報告によれば、脂質の摂取量とヒト乳癌の発生との間には直線的な相関があるという。脂質の自動酸化によって、オレイン酸あるいはアルデヒド類が生成される。ラジカル的にDNAに作用する場合もあるし、また、これらの生産物が直接変異原性を示す場合もあろう。

Tannenbaum らの仕事によれば、生体内におけるニトロソ化反応は、ビタミンCで阻害されるが、その他野菜のエキスやトコフェロールなどの抗酸化剤によっても阻害されることがわかっている。脂質の自動酸化も抗酸化剤によって阻害される。

リオンの IARC グループの報告によると、ヒトの尿に排泄されるニトロソ体の量によって、阻害剤の影響を容易に定量することができるという。

生体内においては、変異原の生成を左右する因子のほか、細胞自身の感受性の問題も考慮に入れる必要がある。細胞内の DNA 傷害に対し、新しく修復酵素が合成されるが、正常の機能を持つ細胞と修復能に欠損を持つ細胞とではかなりの開きが出てくる。実際にヒトの癌の発生には、このような遺伝的背景も考慮に入れる必要があろう。

一方、彼らは、食品中の変異原活性を抑制する物質について、広範囲なスクリーニングを行っている。現在のところ、胎盤組織成分、椿科の植物成分、あるいは、緑茶の成分についてその作用が認められている。

(5) 早津ら(岡山大学)は、食品中の変異原に対する抑制因子について報告した。

変異原性の抑制因子を大別すると、第1に変異原に直接作用して分解してしまうもの、第2に、直接作用はないが、捕獲してしまうもの、第3に、代謝活性化を阻害するもの、第4に、変異原の生成反応を阻害するもの、第5に、変異原と結合して、排泄させてしまうもの、などである。ヘミンの作用は第2のカテゴリーに属し、極めて低濃度(数 nM)で、ベンツピレンあるいは Trp-P-1 の変異原活性を抑制する。オレイン酸は、糞便のエーテル抽出物に含まれる作用物質である。当物質は脂肪の中に広く分布するが、ヘミンと同様、細胞 DNA に対する直接的な障害を防御する作用を持っている。

牛のヒキ肉をフライパンの上で焼いた場合、塩基性分画には変異原性が認められるが、酸性分画には変異原性は認められない。この両者を適当な比率で混合すると変異原性は低下する。これは、酸性分画中に含まれるオレイン酸の作用として説明できるという。

ヘミンが煙草の煙の濃縮物の変異原性を抑制することは、既に楠らによって報告されているが、オレイン酸も同じ様な抑制効果を持っている。また、お茶のエーテル抽出物にはポリフェノール類が含まれているが、Trp-P-1 あるいはベンツピレ

ンに対して抑制作用を示す。この場合には、恐らく Ames テスト系での S9 mix の作用を阻害していると考えられている。有本らの実験によると、エタノール自身にも、物質によって、Ames テストにおける変異原活性を抑制する作用と、逆に促進する作用との両面があるという。さらに、アミン類のうち、セロトニンにも代謝活性化を阻害する作用がある。

上記所見を総合すると、変異原性の発現はかなり複雑な要素によって左右される可能性がある。上記 *in vitro* で得られた所見が、生体内の各臓器で、細胞レベルで実際にどのように進行しているかについて今後、さらに検討して行く必要がある。

(6) 近藤(大阪大学)は、田島(国立遺伝研)の代理として、環境変異原と遺伝毒性という題のもとに特別発言を行った。彼はまず、最初に寺田寅彦の言葉「ものを怖がらな過ぎたり、怖がり過ぎたりするのは易しいが、正當に怖がることはなかなか難しい」を紹介し、研究者をはじめ、現代人のものの考え方に対する警告をうながした。

遺伝毒性の研究には、第1に、なるべくヒトに近い動物を用いること、第2に、ヒトが暴露される経路と似た条件のもとに実験を行うこと、第3に、その動物の性細胞に生ずる変化を見ること、第4に、遺伝子障害を指標とすること、第5に、ヒトへの外挿によって危険の程度を推定すること、第6に、ヒトの疫学的データによって、最終的に診断すること、などの点に留意すべきであるという。

遺伝毒性を検索するためのスタンダードとなるアッセイ法は、米国オークリッジの Dr. Russell らによって開発された特定座位法である。ここでは性細胞として精原細胞が重視されている。本法は既知の劣性突然変異を指標としているため、マウスよりヒトに近い動物を使用することは不可能である。現在まで、約20種類の化合物が試験されているが、陽性となったものはわずか5種類に過ぎない。MMS, MNNG および MNU は疑陽性となっているが、これらの発癌剤については、もう少し厳密に実験を繰り返せば陽性となる可能性

はある。一般に、マウスの精原細胞はかなり突然変異を起こしにくい傾向にあると思われる。従って、*in vitro* の試験系で陽性であるからといって、軽々しく、遺伝毒性があると言い切るのは早計であるという。

精原細胞は精子を形成する場合のステム細胞であるため、一端、突然変異を起こすと、一生、変異精子を生産する。本試験法は実験動物の供給の問題もあって、化学物質を用いる研究は、ほんのわずかの研究機関で行われているに過ぎない。

もう一つの問題は、生殖細胞の成熟時期、あるいは変異原の種類によってかなりの差があることである。ENU は精原細胞に対して非常によく突然変異を起こすが、精母細胞に移行するにつれ殆んど起こさなくなる。また、卵母細胞は未成熟期にあっても、化学物質のみならず放射線に対してもかなり強い抵抗性を持つ傾向にある。DNA 損傷に対する修復が完全に行われるような特別な機構を備えているものと考えられる。Russell らのデータによると、MNU は精原細胞に対して疑陽性ではあるが、その後のステージの細胞に対しては陽性となる。MNU の発癌性は ENU よりも強いといわれている点を考慮すると、上記の差は興味ある所見といえよう。すなわち、体細胞に比較して、精原細胞だけが非常に特殊な細胞であって、さらに、卵母細胞はもっと特殊であり、環境変異原に対してより抵抗性を持っていると考えられる。

Ehling らは、上記劣性突然変異にひきかえ、優性突然変異に着目している。ヒトの場合、前者に比べ後者では約10倍も高く起こっているという事実もある。また、本法では、骨格異常、白内障、腫瘍形成、奇形性などを指標とするため、ある特定のマウスを使用する必要もなく、ラットその他の野性系統を用い、外見上の変化によって診断し得る利点を持っている。Miller 氏の講演にも触れているように、実際にヒトへの外挿を問題とする場合には、直接的に計算が可能である。

最後に、ショウジョウバエなどを用いる生体個体レベルの突然変異を観察する必要性を強調した。広島大の藤川らの実験によれば、ショウジョウバエの幼虫に Trp-P-1 あるいは Trp-P-2 を餌と

して与え、体細胞の突然変異を観察すると、前者よりも後者の方が出にくい。次に、上記の検体を水に溶解し、成虫に与え、卵母細胞に見られた突然変異の出現率を求めると、検体濃度にして一桁高い値となる。すなわち、体細胞で出にくいものが、卵細胞になるともっと出にくくなる。従って、細菌などを用いる *in vitro* 試験でかなり高い変異原性をもつもの、例えば、Trp-P-1 などでも、生体全体を用いる遺伝毒性試験を行って見ると、比較的弱いものであることがわかる。野村らの実験によるとウレタンは成虫に投与すると肺に腫瘍を生ずるが、もしも、父親に投与して、その F₁ に見られる遺伝的影響を見ると、その出現率は200分の1に低下するという。X線の影響では、上記両者の間にそれ程の開きは見られない。従って、ウレタンの場合には、体細胞に対して、イニシエーション活性のほかにプロモーション活性をも兼ね備えている可能性も考えられる。

要するに、発癌性は高くても、遺伝毒性は低いという物質はかなり多い。今後、遺伝毒性の検索は、発癌性の事象と別個に、究明して行くべき重要な分野であらう。

ま と め

河内(国立がんセンター)は、総合討論に入る前座として、環境変異原、特に食品に関連する変異原性試験の意義について発言した。現在までに得られた変異原性のデータの大部分は *in vitro* 系試験の結果であるが、現在までのところその陽性物質の中に発癌性を示すものが含まれていることは事実である。これは14種類の食品熱分解物のうち6種類のものに実際に発癌性があった事実からも理解される。しかしながら、DNA との反応は発癌現象に限られるものではない、老化の問題その他の疾病にどのような関連を持っているかについて留意することも大切である。

食品中の亜硝酸、アスコルビン酸塩、ケルセチン、植物性繊維の役割は極めて複雑である。我々は現在これらの要素を個々に究明しているわけであるが、実際には同時に色々なものを摂取している。相互の反応によって相乗するもの、また、逆に打ち消し合うものもあろう。また、イニシエー

ターに対して数多くのプロモーターが存在する可能性もあろう。今後、試験法の改良、代謝機構の究明あるいは、突然変異現象の分子レベルの解析をはじめ、新変異原の検出、および、それらの修

飾因子に関する研究も必要である。今回のシンポジウムは、問題提起に終わったが極めて複雑であるという印象を深くした。

（以下、このページの下半分は、非常に薄い文字で印刷された、ほとんど読み取れない文章が続く。これは、おそらく原稿の複製ミスや印刷の質の問題によるものである。）

第10回研究発表会・特別講演要旨

“Man—The Ultimate Test Organism”

武田薬品・中央研究所・生物医学顧問

Dr. James R. Miller

There is general concern that human mutation rates and consequent genetic ill health are increasing as a result of the action of ionizing radiation and the vast numbers of complex chemicals that are a significant part of the environment of modern man. One consequence of this concern has been the development of a battery of non-human test systems. Although these guarantee that some potentially deleterious compounds will be effectively screened out, the biological reality is that the human being is the ultimate test organism, and epidemiologic studies must be carried out on human populations to determine the genetic risks posed by environmental pollutants. Surveillance of a large population (e.g., newborns) or monitoring of individuals (and their offspring) exposed to a known or suspected mutagen are the two principal approaches to such studies. The latter, the focus of this presentation, can take many forms depending on whether the exposure is of long or short duration and whether it is widespread or confined to a circumscribed population. Each type of study requires different epidemiologic strategies, usually case-control studies in surveillance and cohort studies in monitoring.

Five primary elements must be defined or determined in an epidemiologic study: the characteristics of the population (including controls) under study, the description of the cause, the genetic characteristics to be used as endpoints, dose/response relations, and time/response relations. In addition, proper statistical analysis and evaluation are critical. In general, determining an increase in mutation frequency requires large samples; the smaller the increase to be detected (or excluded), the larger the sample required.

Appropriate controls are an essential part of defining the population to be examined. This presents a formidable challenge. The principal difficulty is created by variables that might influence the mutation rate directly or indirectly. Some of these might be obvious (e.g., radiation exposure), but most will be subtle and difficult to measure. Such variables can be controlled by exclusion, by matching cases and controls for some factors, and by statistical analysis for others.

The genetic endpoints may be somatic (structural chromosome aberrations and sister chromatid exchanges) or germinal events (structural and numerical chromosome aberrations, sentinel phenotypes, biochemical variants, and embryonic and fetal deaths). Because these events, particularly the germinal ones, are rare, indicator disorders (such as cancer, reproductive performance, birth weight, sperm abnormalities, and sex ratio) which are relatively easy to determine are often used as endpoints. However, these are not "clean" genetically and must be evaluated cautiously.

Detecting somatic mutagens requires follow-up of exposed individuals and their offspring to determine the ill-health consequences of somatic aberrations observed in the former and to seek evidence of germinal mutations in the latter. These studies are facilitated by record linkage technology. Although such technology is not well developed in Japan, other features of Japanese society- life time employment and good company-union relations - provide ideal circumstances for sound epidemiologic studies. Japanese investigators have already made an enormous contribution to studies on environmental mutagenesis, and the necessary talent - epidemiologic, cytogenetic, clinical, and biochemical - exists to make significant contributions in mutation epidemiology.

GENETIC END POINTS

Endpoints	Somatic	Germinal
Chromosome aberration		
- structural	+	+
- numerical		+
- SCEs	+	
Sentinel phenotypes		+
Protein and enzyme variants		+
Embryonic and fetal deaths		+

EXPOSURE CLASSES

Population	Short Duration	Long Duration
Small-localized	Industrial accident (Seveso)	Smelter, uranium mine
Large-localized	Atomic bomb	Exposure to chemical with long lasting effects (PPBs in Michigan)
Ubiquitous	Drug (thalidomide)	Smoking

SOME DEFINITIONS

Surveillance: Ongoing evaluation of rates of certain genetic endpoints in a large population (analogous to infectious disease surveillance).

Monitoring: Evaluation of a population at presumptive specific risk because of exposure to known or putative mutagens.

Case Control Study: Groups of individuals are selected in terms of whether they do (the cases) or do not (the controls) have the trait under study.

Cohort Study: The group or groups of persons to be studied (the cohorts) are defined in terms of characteristics manifest prior to the appearance of the trait under investigation; these groups are observed over a period of time to determine the frequency of the trait among them.

変異原性・癌原性の定量的評価への アプローチ

ものを怖がらな過ぎたり、怖がり過ぎたりするのはやさしいが、正当に怖がることはなかなかむづかしい。

—寺田寅彦—

1. クラスター分析と最小自乗法の組み合わせによる

突然変異原性物質の分類

滋賀医科大学・化学

今 村 詮

1. はじめに

近年、多種類、大量の環境変異原物質の危険性が叫ばれ、とくに発癌性との関連でこれら環境変異原物質の製造を規制するための基準を確立することが必要になってきた。この基準として今日 Ames 法が広く用いられ、多くの物質がテストされてきている。しかしながら、この Ames 法によって得られた用量-反応曲線からどのような情報を得て、その情報を用いてどのように上記の基準を確立するかについては、いまだ試行錯誤の段階にある。とくに、変異原性の有無をどういう基準で判定するかは、非常に重要な問題であるが、通常は用量-反応曲線の形をみて、対照群のデータとの比較で決められている。

そこで、筆者らはこの用量-反応曲線を用いて、突然変異原性の強弱による分類を、より定量的に行うことを試みた。すなわち、クラスター分析と最小自乗法を組み合わせることによって、突然変異原性物質の分類をおこなった。この方法は、以下の特徴を有する。

- 1) 電子計算機を用いることによって、人手を介せず大量のデータ処理が可能であること。
- 2) クラスター分析を用いることによって、分類が人為的でないようにしたこと。
- 3) 最小自乗法と組み合わせることによって、単なる用量-反応曲線ではなく、その物質のもつ性質に基づく分類が行えること。
- 4) 用量-反応曲線を修飾することによって、突然変異原性の有無に重点をおく分類、あるいは強弱に重点をおく分類をするなど、使い分けができること。

以下、この方法の概略について述べ、ついでその応用例について述べる。

2. クラスター分析とは

Cluster を辞書でひいてみると、ブドウなどの房、ひとかたまり、あるいは群といった訳がある。すなわち、いまのわれわれの問題に還元して考えると、数多くのデータをなんらかの規則でいくつかの群に分けることになる。この規則は、たとえばブドウの房ならば、同じ枝からでたものといった直観的な方法も可能であるが、いまのわれわれの問題には、こういった直観的な方法を用いることは非常に困難である。そこで、もう少し数学的にクラスターというものを考えてみよう。あるクラスターに属する化合物のもつデータは、同じクラスターに属する化合物のデータとは近い値をもっているが、他のクラスターに属するデータとはかなり異なった値をもっているというように分類するのが妥当であろう。したがって、 i 番目の化合物の突然変異原性をあらわす数値を x_i とすると、 i 番目の化合物と j 番目の化合物の間の距離を

$$d_{ij}^2 = (x_i - x_j)^2 \quad (1)$$

と定義すると、この d_{ij} の値が小さいほど近い値をもっていることになる。なお、この距離の定義は、 i 番目の化合物の突然変異原性の強さが1個の数値ではなく、複数の k 個の数値 $x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ik}$ で表わされる場合（たとえば Ames 法において、化合物のいくつかの濃度に対する復帰突然変異株の数）にも容易に拡張できて、(2)式のように表わされる。

$$d_{ij}^2 = \sum_{l=1}^k (x_{il} - x_{jl})^2 \quad (2)$$

このようにして定義された距離を用いて、同じクラスターに属する化合物間の距離は、他のクラスターに属する化合物間の距離よりも大きくなるよ

うに分類すればよい。

つぎに、それではどのようにして化合物をいくつかのクラスターに振り分けるかについて、具体的に考えてみよう。いま、多くの化合物を2個のクラスター a, b に分ける場合を考えてみる。その各クラスターに属する $n(a)$ 個および $n(b)$ 個の化合物の数値を $x_1^{(a)}, x_2^{(a)}, \dots, x_{n(a)}^{(a)}, x_1^{(b)}, x_2^{(b)}, \dots, x_{n(b)}^{(b)}$ とし、その平均値を $m^{(a)}, m^{(b)}$ で表わす。すると

$$m^{(a)} = \sum_i x_i^{(a)} / n(a) \quad (3)$$

$$m^{(b)} = \sum_j x_j^{(b)} / n(b) \quad (4)$$

となり、すべての化合物の数値に対する平均値 m は

$$m = (\sum_i x_i^{(a)} + \sum_j x_j^{(b)}) / [n(a) + n(b)] \quad (5)$$

で与えられる。ここで、平均値と各測定値との距離の2乗の和（これを平方和という）を計算すると、

全平方和（すべての化合物の平方和）

$$S_T = \sum_i (x_i^{(a)} - m)^2 + \sum_j (x_j^{(b)} - m)^2 \quad (6)$$

つぎに、クラスター内平方和を次式の如く定義する。

$$S_W = \sum_i (x_i^{(a)} - m^{(a)})^2 + \sum_j (x_j^{(b)} - m^{(b)})^2 \quad (7)$$

ここで、クラスター間の平方和を次のように定義する。

$$S_B = \frac{n(a) \cdot n(b)}{n(a) + n(b)} (m^{(a)} - m^{(b)})^2 \quad (8)$$

すると、 S_T, S_W と S_B の間に次式が成立することが証明できる。

$$S_T = S_W + S_B \quad (9)$$

そこで、この(9)式において、なるべく S_W が小さくなるように化合物を2個のクラスターに振り分けると、そのクラスターに属している化合物は、その平均値からのずれが小さいものを集めていることになるので、たがいに近い数値をもっている化合物であるということができよう。そこで、まず化合物を適当な方法で2つのクラスターに振り分けて S_W を計算し、つぎにそのなかの1つの化合物を他のクラスターに移動させた方が S_W がよ

り小さくなるかどうかを調べて、小さくなれば移動させ、ならなければそのままにしておく。この手順を順次他の化合物にもくりかえし適用することによって、クラスターをつくることができる。いままで述べてきたことからわかるように、このクラスター分析は、全く自動的に行われるので、人為的に分類されない特色を有している。なお、上記の例では、測定値は一種類、クラスターは2つのもっとも簡単な場合について述べたが、測定値が多く、クラスターが3個以上の場合に拡張することは容易にできる。また、あるクラスター内にある1個の化合物を他のどのクラスターに移せばもっとも S_W が小さくなるかを判定する式も導くこともできる。これらの点についての説明は、紙数の関係で割愛するが、興味ある読者は、クラスター分析に関するわかりやすい解説もあるので、それを参照されたい¹⁾。

3. モデルの設定と最小自乗法

さきに述べたクラスター分析法を、そのまま Ames 法による用量-反応曲線で得られる復帰突然変異株の数の適用することも可能であるが、その場合得られる情報は単に2つの用量-反応曲線が似ているかどうかをみるだけになってしまい、化合物の持っている個々の性質を反映して得られた用量-反応曲線の情報を十分にひきだしているとはいいがたい。そこで、筆者らは、one-hit モデルに化合物の毒性の効果を入れた次式²⁾を用量-反応曲線に fitting させることを試みた。

$$m(x) = (B + S_x) \exp(-T_x) \quad (10)$$

ここに x は化合物の濃度、 B は Background、 S は初期突然変異率（one-hit モデルで得られるポアソン分布の指数関数をテイラー展開して得られる1次の項である）、 T は毒性の強さを示すパラメータで、 $m(x)$ は復帰突然変異株の数を表わす。したがって(10)式は3個のパラメータ B, S, T を含んでいる。この式のパラメータは、Ames 法で得られた用量-反応曲線ともっともよく適合するように、最小自乗法を用いて決定できる。

ここで、筆者らは、Ames 法で得られた用量-反応曲線の形に注目して分類することを考えた。すなわち、突然変異原性の強さを、復帰突然変異

Table I-1 Number of Revertant Obtained by the Ames Test

Compound	class							
Acetaminophen	6	Dose	0	250	1000	2500	5000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	137	123	125	113	118	(rev/p)
Saccharin sodium	6	Dose	0	500	2000	5000	10000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	94.5	103	96	96	96	(rev/p)
Barbital	4	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	94.5	89	97	107	94	(rev/p)
Urethan	4	Dose	0	500	2000	5000	10000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	133	120	129	150	128	(rev/p)
Thioacetamide	4	Dose	0	500	2000	5000	10000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	147.5	148	121	118	131	(rev/p)
Thiourea	4	Dose	0	500	2000	5000	10000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	147.5	173	163	136	141	(rev/p)
Fluorene	3	Dose	0	5	20	50	100	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	191.5	151	205	151	165	(rev/p)
Stilbene	3	Dose	0	10	40	100	200	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	191.5	171	203	217	179	(rev/p)
Aminopyrine	3	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	94.5	100	94	111	95	(rev/p)
Aniline HCl	4	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	191.5	139	179	141	178	(rev/p)
Epsilon - Caprolactone	6	Dose	0	0.5	2	5	10	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	114.5	131	115	114	119	(rev/p)
N-Methylurea	6	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	96.5	86	101	86	95	(rev/p)
			0.955	0.851	1.000	0.851	0.941	

株の数の絶対値では比較せずに、化合物の濃度変化による復帰突然変異株の増加率によってみようとしたのである。もし、復帰突然変異株の絶対数に対してクラスター分析を適用した場合は、少し弱い突然変異原性を有する化合物は、突然変異原性を有していない化合物と同じクラスターに分類されてしまう。というのは、強い突然変異原性を有する化合物は、復帰突然変異株の数の絶対値が非常に大きく、そのためにその絶対値の小さい弱い突然変異原物質と非突然変異原物質との間の距離は相対的に極めて小さくなり、同じクラスターに入ってしまうことになる。したがって、突然変異原性の有無を調べるには極めて不都合である。さらに、復帰突然変異株の数の絶対値でみる場合は、物質の有効濃度を常に一定にして比較する必要があり、厳密に言えば、実験に用いられる物質の分子量、純度を用いて基準（有効濃度）を決めるという厄介な問題が生じてくる。

そこで、筆者らは、濃度をかえて得られた復帰突然変異株の絶対値の最大値を1.0に規格化して、他の濃度における復帰突然変異株の相対値を求め、この用量-反応曲線に対して(10)式を用いて最小自乗法を適用した。したがって、(10)式に含まれる B, S, T はもはや当初定義した意味はもたなくなってくる。たとえば、突然変異率の大小をみるには、 S の値だけでは判定できずに、 B と S の相対的な大きさによってみなければならない（この点については、後に実例でもう少し詳細に説明する）。

このように最大値を1.0に規格化して得られた測定値を、最小自乗法で(10)式に適合させて、パラメータ B, S と T を決定した。このとき、最小自乗法のプログラムは、東大大型計算機センターで公開されているプログラムパッケージ SALS (Statistical Analysis with Least-Squares Fitting の略) を用いた³⁾。こうして決められた3個のパ

Table I-2 Number of Revertant Obtained by the Ames Test

Compound	class							
4-Amino-biphenyl	1	Dose	0	10	50	100	200	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	101	295	2108	4212	3992	(rev/p)
			0.024	0.070	0.500	1.000	0.948	
Nitrofurazone	5	Dose	0	0.25	1.0	2.5	5.0	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	186	272	571	1480	2928	(rev/p)
			0.064	0.093	0.195	0.505	1.000	
Epichlorohydrin	1	Dose	0	0.1	0.4	1.0	2.0	($\mu\text{l/p}$)
		Revertant	126	131	254	1100	1760	(rev/p)
			0.072	0.074	0.144	0.625	1.000	
4-Amino-quinoline-1-oxide HCl	2	Dose	0	5	20	50	100	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	119.5	157	202	377	595	(rev/p)
			0.201	0.264	0.339	0.634	1.000	
Sodium nitrite	2	Dose	0	200	800	2000	4000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	170	175	203	349	534	(rev/p)
			0.318	0.328	0.380	0.654	1.000	
N-n-Butyl-N-nitrosourea	1	Dose	0	25	100	250	500	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	186	201	285	363	565	(rev/p)
			0.329	0.356	0.504	0.642	1.000	
Hydralazine HCl	1	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	147.5	197	296	368	697	(rev/p)
			0.212	0.283	0.425	0.528	1.000	
Beta-Naphthylamine	1	Dose	0	5	20	50	100	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	92	390	1274	2186	2900	(rev/p)
			0.032	0.134	0.439	0.754	1.000	
1,3-Propane sultone	1	Dose	0	0.005	0.02	0.05	0.1	($\mu\text{l/p}$)
		Revertant	94.5	587	1805	3124	3996	(rev/p)
			0.024	0.147	0.452	0.782	1.000	
4-Acetylaminobiphenyl	1	Dose	0	10	50	100	200	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	101	187	734	1304	2006	(rev/p)
			0.050	0.093	0.366	0.650	1.000	
Alpha-Naphthylamine	5	Dose	0	10	40	100	200	($\mu\text{g/p}$)
		Revertant	113.5	138	221	261	211	(rev/p)
			0.435	0.529	0.847	1.000	0.808	

The integers in the column of class have following meaning (C; Carcinogenicity, M; Mutagenicity);

1; M+ C+ , 2; M+ C- , 3; M- C-
4; M- C+ , 5; M+ C? , 6; M- C?

The number in the line below Revertant is the number which is recalculated with the maximum of 1.0.

ラメータをもとにして、3変数に対するクラスター分析を適用した。このように、用量-反応曲線の数値をそのまま用いずに、モデル化して得られた(10式)のパラメータ B, S, T の値によってクラスター分析することによって、物質のもっている性質(いいかえれば、パラメータ B, S と T の値)によって分類することになり、どのクラスターはどのような特性をもっている物質の集合であるかをみることができるという利点がある。しかしながら、この方法では如何に適切にモデルを作るかということが、重要になる。すなわち、モデルの設定が適切でない、如何に大がかりに計算して、クラスターに振り分けても、あまり意味のあるクラスター分析にはならない。したがって、この方法を適用するには、まずモデルの設定が、化学的、生物学的あるいは医学的にみて十分妥当で

あることと、最小自乗法によって得られた(10式)の曲線と、Ames法によって得られている実験値との適合が十分よく、実験値との残差が十分小さいことが必要になってくる。なお、この方法はいろいろ修飾することも可能で、たとえばクラスター分析をおこなう前に、パラメータ B や S 、あるいは T に適当な重み (Weight) をかけて、初期突然変異率を重視して分類するとか、毒性を重視して分類することもできる。

4. Ames法による実験結果への応用

前節で述べた方法を、Ames法によって得られた実験結果に応用した⁴⁾。Table Iには、国立がんセンター研究所の河内・長尾・杉村らによって得られた種々の化合物のAmes法による復帰突然変異株の数が、濃度の関数として与えられている。

Table II Cluster Analysis into Two Groups

Cluster	Compound	Class	Parameters		
			B	S	T
1	Acetaminophen	6	0.927	0.015	0.019
	Saccharin sodium	6	0.940	0.022	0.020
	Barbital	4	0.842	0.069	0.046
	Urethan	4	0.828	0.052	0.035
	Thioacetamide	4	0.929	0.014	0.018
	Thiourea	4	0.913	0.034	0.036
	Fluorene	3	0.869	0.021	0.025
	Stilbene	3	0.823	0.091	0.057
	Aminopyrine	3	0.848	0.063	0.044
	Aniline HCl	4	0.850	0.014	0.012
	Epsilon-Caprolactone	6	0.904	0.016	0.015
	N-Methylurea	6	0.911	0.023	0.020
	Nitrofurazone	5	0.052	0.040	-0.008
	4-Aminoquinoline 1-oxide HCl	2	0.202	0.044	0.004
	Sodium nitrite	2	0.298	0.029	-0.007
2	Alpha-Naphthylamine	5	0.419	0.184	0.081
	Epichlorohydrin	1	0.022	0.058	0.008
	N-n-Butyl-N-nitrosourea	1	0.335	0.032	-0.001
	Hydralazine HCl	1	0.251	0.020	-0.021
	Beta-Naphthylamine	1	0.034	0.114	0.042
	4-Amino-biphenyl	1	-0.041	0.187	0.067
	1,3-Propane sultone	1	0.031	0.123	0.046
	4-Acetylaminobiphenyl	1	0.041	0.083	0.027

The meaning of the integer in the column of class is the same as one in Table I.

Table III Cluster Analysis into Two Groups

Cluster	Compound	Class	Parameters		
			B	S	T
1	Acetaminophen	6	0.927	0.015	0.019
	Saccharin sodium	6	0.940	0.022	0.020
	Thioacetamide	4	0.929	0.014	0.018
	Thiourea	4	0.913	0.034	0.036
	Epsilon-Caprolactone	6	0.904	0.016	0.015
	N-Methylurea	6	0.911	0.023	0.020
2	Barbital	4	0.842	0.069	0.046
	Urethan	4	0.828	0.052	0.035
	Fluorene	3	0.869	0.021	0.025
	Stilbene	3	0.823	0.091	0.057
	Aminopyrine	3	0.848	0.063	0.044
	Aniline HCl	4	0.850	0.014	0.012
3	4-Aminoquinoline 1-oxide HCl	2	0.202	0.044	0.004
	Sodium nitrite	2	0.298	0.029	-0.007
	N-n-Butyl-N-nitrosourea	1	0.335	0.032	-0.001
	Hydralazine HCl	1	0.251	0.020	-0.021
	Nitrofurazone	5	0.052	0.040	-0.008
4	Epichlorohydrin	1	0.022	0.058	0.008
	Beta-Naphthylamine	1	0.034	0.114	0.042
	1,3-Propane sultone	1	0.031	0.123	0.046
	4-Acetylaminobiphenyl	1	0.041	0.083	0.027
	4-Amino-biphenyl	1	-0.041	0.187	0.067
5	Alpha-Naphthylamine	5	0.419	0.184	0.081

The meaning of the integer in the column of class is the same as one in Table I.

この実験結果は *Salmonella typhimurium* TA100 に S-9 mix を加えて得られたものである。同じ Table I に、復帰突然変異株の最大値を 1.0 とし、他を相対値で表わした数値が括弧内に示されている。この実験では、加える化合物の濃度比が常に

0:1:4:10:20 になっているので、この規格化をする(最大値を 1.0 にする)ことによって、用量-反応曲線の形のみに注目し、化合物の有効濃度の絶対値は気にせずにクラスター分析をすることができる。また、いままで河内らにより化合物

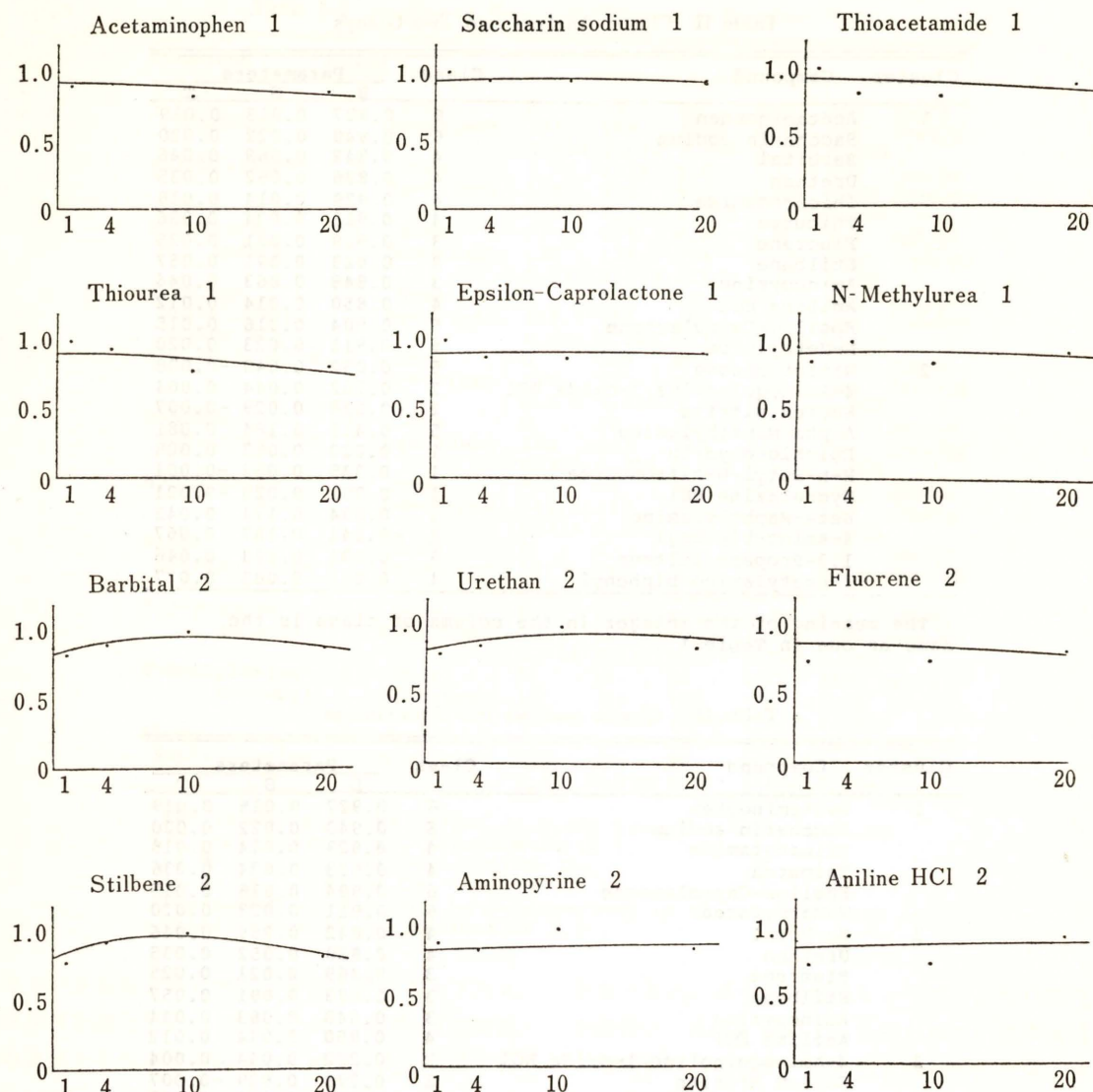


Fig. 1-1. Dose-response curve of compounds

の突然変異原性の有無、発癌性の有無が判定され、1から6までのクラスに分類されていたので、そのクラスもこの表の Class の欄に記入している。

Table I の数値を用いて、前節で述べたように、最小自乗法によってパラメータ B, S, T の値を決め、その値に対してクラスター分析をおこなった。まず、2個のクラスターに振り分けた結果を Table II に示した。この Table II で、クラスター1には突然変異原性がないと判定されていた化合物が入り、クラスター2には突然変異原性があると判定された化合物が全て含まれていることが

わかるであろう。すなわち、われわれの方法は、突然変異原性の有無を判定するのに十分有効な方法であることがわかる。ここで、クラスター1に含まれる化合物のパラメータの値をみると、 B の値が非常に大きいことがわかる。これは、さきにも述べたように、復帰突然変異株の数の最大値を1.0としたことによるものであって、 S や T の値が小さいことと相まって、用量-反応曲線が flat に近いことを示している。くどいようであるが、ここで定めたパラメータ B, S, T の値は、もとの Background、初期突然変異率、毒性の絶対値を

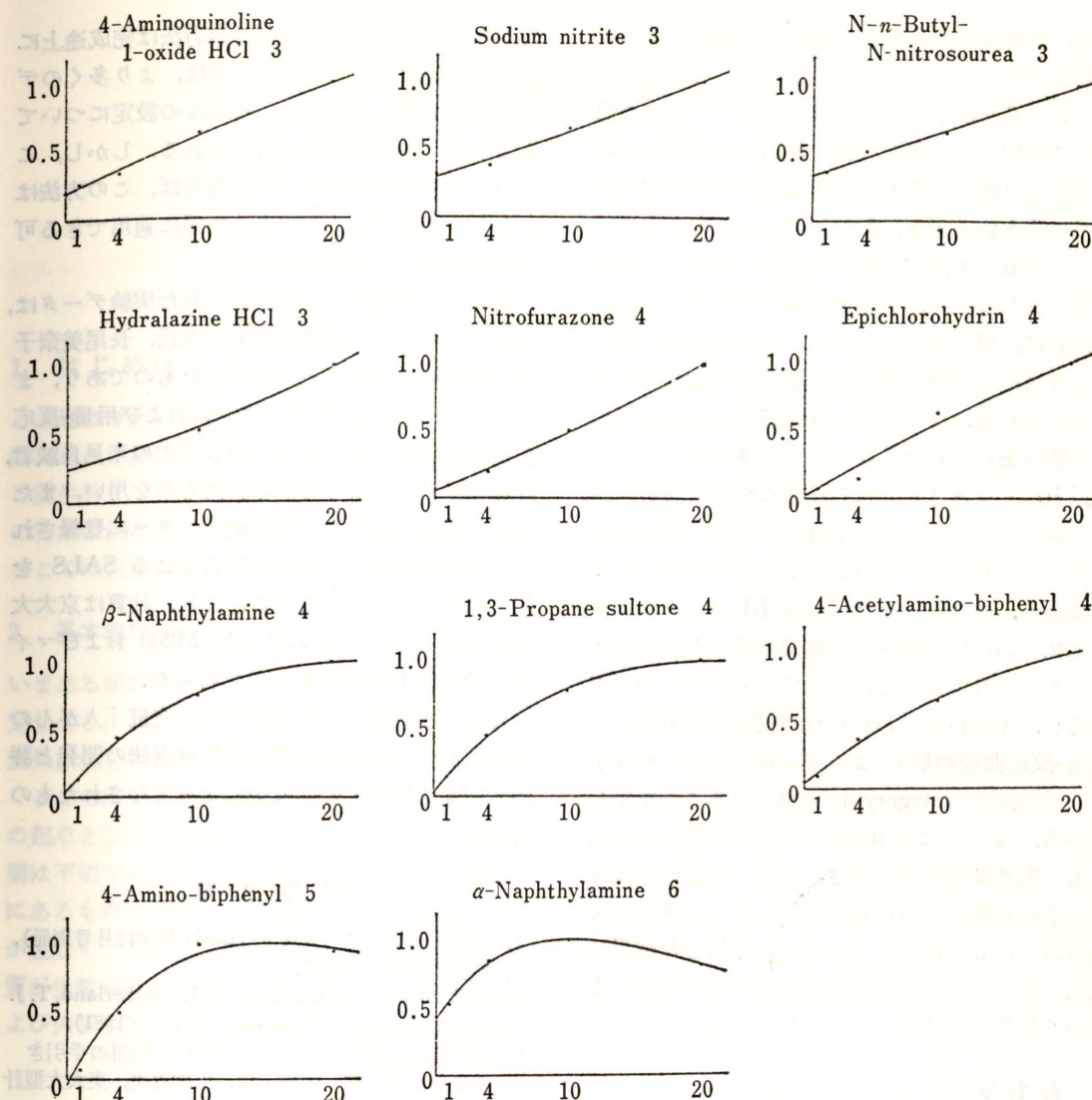


Fig. 1-2. Dose-response curve of compounds

The number in the graphs is the number of class in Table III.

示しているのではなくて、あくまで各パラメータの相対的な値を示していることに留意して頂きたい。

つぎに、Table III には、クラスターの数を6個にして分析した結果を示した。Table II の結果と対応させると、Table II のクラスター1は、Table III のクラスター1とクラスター2を含み、Table II のクラスター2は、Table III のクラスター3, 4, 5, 6 を含んでいることがわかる。Table III のクラスター1と2への振り分けは、パラメータ B の値のちがいで決まっている。クラス

ター3はパラメータ S に比してかなり大きいパラメータ B の値を有し、比較的突然変異原性の弱い化合物を集めていることがわかる。それに対して、クラスター4は、 B に比して幾分大きい S の値を有して、少し強い突然変異原性を有する。また、このクラスター3と4の毒性のパラメータ T はそれほど大きい値を有していない。一方、クラスター5と6は各々1個の化合物を有するのみであるが、これらは幾分大きい毒性のパラメータ T の値を有しているとともに、突然変異原性のパラメータ S の値がかなり大きいことを示している。すな

わち、突然変異原性および毒性の比較的大きい化合物であることを示している。なお、このクラスター5と6を区別しているのはパラメータBの値で、この値とSの値との相対値からクラスター5の方がより強い突然変異原性を有する化合物を含んでいるといえよう。なお、これらの表の中のパラメータBとTが負の値をとっているが、これは、設定されたモデルからは無意味な値になる。いいかえれば、現在のモデルでは、負の値になっているパラメータの絶対値程度の誤差が含まれていると考えられる。よりモデルを精密化していけば、負の値はあらわれなくなると期待される。

以上、クラスター分析の結果について簡単に述べたが、ここで得られた結果が、用量-反応曲線の形とどう対応しているかを示したものが、Fig. 1である。さきに示したTable IIIでのクラスター1, 2, ..., 6は、用量-反応曲線の特色を非常に巧みにとり入れて振り分けられているのがわかるであろう。すなわち、われわれの提唱した方法は、用量-反応曲線の形によって、容易に多くの分子をいくつかのcategoryに分類できることを示している。また、この用量-反応曲線の形を、物質のもつ突然変異原性の強さ、あるいは毒性の強さという化合物の性質に基づいたパラメータで表現しており、したがってクラスター分析した結果は、物質のある特性のちがいを反映して得られているという特色を有する。

5. おわりに

以上、突然変異原性物質を分類するために、われわれが提唱しているクラスター分析を最小自乗法と組み合わせる方法の要点を紹介した。しかし

ながら、現時点では、まだこの方法は完成途上にある。今後なすべきこととしては、より多くのデータを取り扱うとともに、モデルの設定についてもより深い検討が必要と考えられる。しかし、こういった点の検討がなされたならば、この方法はかなり有効な方法として多くの系に適用できる可能性があるように思われる。

なお、本研究において用いられた実験データは、国立がんセンター研究所の河内卓氏、長尾美奈子氏、杉村隆氏らによって得られたものであり、またクラスター分析のプログラムおよび用量-反応曲線を描くプログラムは、滋賀医大の来見良誠君、弾塚孝雄君らによって作られたものを用い、また最小自乗法は東大大型計算機センターに登録されている中川徹氏、小柳義夫氏らによるSALSを用いて得られたものである。なお、計算は京大大型計算機センターのFACOM M200およびマイコン NEC PC8001を用いて行った。

なお、本研究は、厚生省がん研究班「人がんの原因としての発がん物質の短期検索法の開発と評価に関する研究」の助成金によってなされたものである。

参 考 文 献

- 1) 統計手法ア・ラ・カルト (Basis 数学12月号別冊), 現代数学社, 1979年.
- 2) L. E. Myers, N. H. Sexton, L. I. Southerland, T. J. Wolff, Environ. Mutagen., 3, 575 (1981).
- 3) 最小自乗法標準プログラム SALS 利用の手引き 第1部, 第2部 中川 徹, 小柳義夫, 東大大型計算機センター, 1979年.
- 4) A. Imamura, Y. Kurumi, T. Danzuka, S. Kodama, T. Kawachi, M. Nagao, T. Sugimura, 投稿中.

2. 環境変異の定量的評価

国立遺伝学研究所・変異遺伝部

賀 田 恒 夫

1. はじめに

本題はきわめて大きな問題で、ここに記したのは、その手始めに止まる。すなわち評価につながる微生物データの表示法に関するものである。この特集の他の項とも重なる点もあると思うが、ここでは素粗の提供ということでお許しを得たい。

2. 基本的な考え

いまある変異原物質の有する変異原活性をMと規定しよう。Mは、全く裸のDNAと反応して突然変異損傷を誘発する活性を示す。

ここで出来た損傷は、発がんあるいは遺伝毒性の起点となると仮定する。ただ、発がんの最終機構は不明であるが、その起点事象はMと比例関係にあるものとする。また個体において遺伝的变化が生じて、これが子孫に伝わるためには、化学物質が生殖巣に至るまでに遭う様々なBarrierおよび失活因子との遭遇があり、DNA損傷の修復

に加えて、たとえ一たん固定された突然変異遺伝子の発現の問題もある。これらはMを修飾する諸因子であって、Mを減少させるよう働き、これをC(≪1)とすると、ヒトに与える影響(がんあるいは遺伝的毒性)は

$$X=MC$$

と表現される。

以下、Mを如何に算出するか、Cには、どんな内容があるかについて論じる。

3. 変異原性の表示

まず、エームス試験における試料の突然変異誘発性を数量的に表現する試みについてのべる。ここで強調したい点として、このように示された数は、試料のもつ一つの属性を示しているが、それはヒトに与える発がん活性あるいは遺伝的毒性とは別のものであって、このようなヒトに与える影響の解析を行うために必要な資料を得るための操作の一つである。

表 1 エームス 300 化合物論文に示された変異原性比活性の例

化 学 試 料	菌 株	His ⁺ /μg	比 活 性	
			μg 当たり	mg 当たり
N-acetoxy-2-acetylaminofluorene	98	886/5	173	1.7×10 ⁵
Acridine Orange	097	4370/20	219	2.2×10 ⁵
β-naphthylamine	058	590/10	59	5.9×10 ⁴
benzidine	8	265/50	5.3	5.3×10 ³
ICR-170	7	6410/10	641	6.4×10 ⁵
ICR-191	7890	566/0.5	1,132	1.1×10 ⁷
captan	095	820/10	82	8.2×10 ⁴
AF-2	09	1674/0.02	83,700	8.4×10 ⁷
dimethylnitrosamine	03	1100/4440	0.25	2.5×10 ²
aflatoxin B ₁	098	2260/0.1	22,600	2.3×10 ⁷
dexon	0957	719/100	7.2	7.2×10 ³

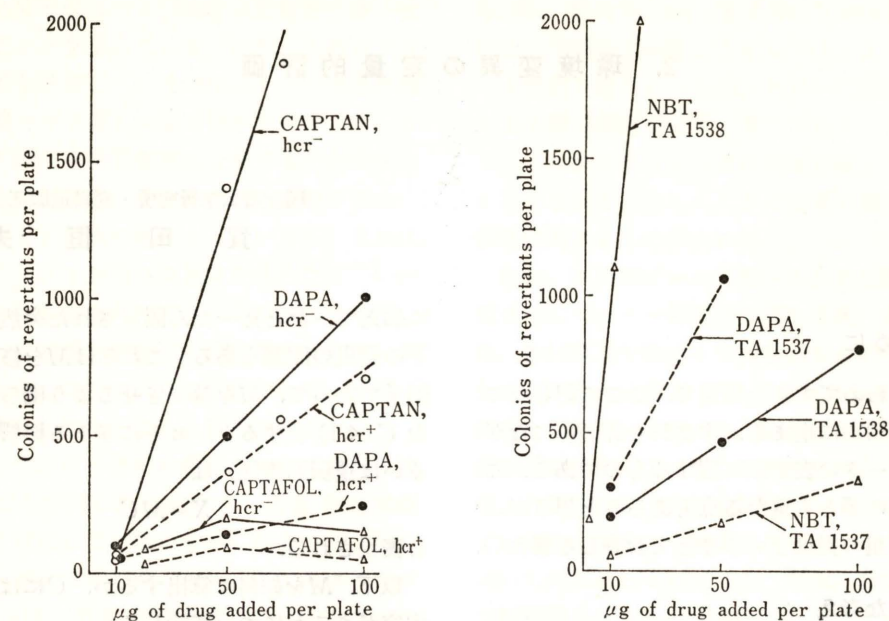


図1 比活性の算出に利用されたデータの例 (Kada et al., Mutation Res, 26: 243~248, 1974)

表2 環境変異原の危険評価の簡易法 (河内ら²⁾より改写)

化合物	物質 mg 当たりの His ⁺ 復帰変異体 (A)	年間生産量 (B)	A × B (f)
煙草 (シガレット当たりのタール20mg)	1.0×10^3	290×10^9 本	5.8×10^{15}
AF-2	4.7×10^7	3トン	1.4×10^{17}
キャプタン	5.1×10^5	422トン	2.2×10^{17}
Tris-BP	2.0×10^4	200トン	4.0×10^{15}
カラメル	1.9×10^1	15,000トン	2.9×10^{14}
焼き魚 (60gの魚当たり3.9gの焦げ部分)	8.0×10^0	9,860,000トン (鮮魚)	5.1×10^{15}
コーヒー	1.1×10^1	134,000トン	1.5×10^{15}
緑茶	3.9×10^1	222,000トン	7.8×10^{15}

3.1 比活性

エームスは既に300の化合物に関するエームス試験の結果を示すに際し¹⁾, 試料 μg 当たりが誘発する His⁺ コロニー数をもってその比活性を表現した(表1). そのためには, プレートに入れた化学試料の量と誘発されて出てきた His⁺ コロニー数との間に正比例的な関係(図1)が存在する領域を求めて比活性を算出する. 表1に示すように, これまで得られている結果によると, この比活性は物質によって 10^7 のオーダーの変動がある.

ここであえて提唱するならば, S9 で活性化して得られた結果と, S9 なしに得られた結果とを区別して簡単に示すために, 前者の数字の下にアンダーラインを引いたらどうであろうか. その例は表1に示してある. この比活性は, 化学物質の属性の一つで, 一定の実験条件下でのサルモネラ DNA に対する一種の“反応活性”を示している.

3.2 国民総量活性

河内ら²⁾は, エームス試験において変異原活性

表3 1g (または 1ml) の食品の有する突然変異誘発活性 (Mut-g)

飲料水 (カナダでの報告)	0.047
1 ppm のアフラトキシン B ₁ で汚染した食品	12,000
焼いた牛肉 (Trp-P-1 が 53 ng 相当生成した場合)	2,067

を示す化学物質が, わが国でどの位の量生産されているかを調査し, これに前項で示した比活性を掛けることにより, その化学物質が国全体として有する変異原性の総量——これは His⁺ 変異体数で示す——を示した(表2). この数字は, 国民全体が, 如何なる変異原活性の中で生活しているかを考える目安を示している. 表2で明らかなように, たとえ変異原比活性が低い場合でも, 総生産量(あるいは, 国民総使用量)が大きい場合には, 両者を掛け合わせると大きな値を得ることになる. その例には, カラメル, コーヒーのようなものがある. この国民総量活性の示す意義に関しては, 後述するところであるが, やはり, 変異原の各々が, どのような態でヒトに暴露しているか, またその作用の大きさの評価が問題である. 何れにせよ, 重要な一つの観点を与える数字である.

4. Mutations/g

筆者は, 食品などのように, 複合物であり, 変異原の汚染がある場合に, そのg当たりの有する変異原活性を示すことを提唱した(表3). そのために, アフラトキシン B₁ の例のように, その純品の有する比活性と, 汚染濃度から計算して示す場合と, 食品試料そのものを丸ごと変異原試験の系に入れて変異原活性を得る場合とがある. 後者においては, 食品試料から有機溶媒で抽出してこれを乾固して, 検定試料としている場合もある. 何れにせよ, この Mutations/g あるいは略して (Mut-g)は, われわれが日常どの位の変異原活性を食品として摂取しているかを知る目安を与える. ここでも注意せねばならぬ点として, この量は決してヒトに対する作用量ではないことである. また, 比活性から計算した量を, そのまま Mut-g として考えてよいのか否かも疑問である. これらの問題に関しては後で論ずる.

5. 変異原性評価について

以上記した, 変異原に関する比活性・国民総量活性・Mut-g は, みな特徴のある表現方法であり, その数字を示されることにより, 異なった重要なそれぞれの概念を把握するのに非常に役立っている. それでは, これらの数字を識った上で, これを評価するに当たってどのように考え, どのように対処すべきか?

この小文は, 専門家を対象としていることでもあるし, 読者の御批判を得たい点をあえて記す. 以下, 項目別にのべる.

5.1 変異原活性の修飾

ある変異原の活性が, 他因子の存在で修飾される様式については, 既に2, 3の綜説で論じたが³⁻⁵⁾, 変異原の毒性評価の立場から簡単にのべる. 代謝活性化されることなしに DNA と反応する各種の変異原(キャプタン, デクソン, MNNG のようなもの)は, システイン, グルタチオンのような SH 因子, あるいはD-エリスロビン酸, ビタミンCのような抗酸性因子によって直接不活化される⁶⁾. これらは食品成分であるので, 変異原で汚染した食品そのものが抗酸化的に働らくか否かによって全体としての変異原活性の強さのレベルを定めていることになる. 野菜, 果実, あるいは食肉のような生鮮食品の場合には, しばしば酵素的な不活化が起こっている. また, 変異原が他の高分子に非可逆的に結合吸着される場合がある.

一方, エームス試験において, 代謝活性化を阻害する種々な因子の存在が知られている. この場合, 見かけ上著しい変異原活性の低下をもたらすが, このような *in vitro* 系での事実の生体内での意義は不明な点が多い. 代謝活性化阻害因子は, ある組織臓器でたしかに働らくであろうが, 変異

原に暴露される他の組織、臓器ではこのような阻害因子が存在せず、代謝活性化されて変異原活性が発現するであろう。また、代謝活性化は、肝臓などにおける解毒機構の一側面である場合も多く、阻害因子が体内に過剰にとりこまれた場合、かえって有害ではないかとも考えられる。この点、今後なお充分な研究が必要である。

5.2 相乗効果と相殺効果

ノルハルマンの例⁷⁾が著名のように、全く変異原性の陰性の物質が、他の因子の存在によって変異原性が発現する場合がある。その作用機構の一つとして、2次的な代謝活性化があると論ぜられている⁸⁾。いま、変異原の比活性として、種々な条件下における最高値が示されているとするならば、他因子の存在は、変異原活性に関して無関係か、相殺かの何れである。この比活性に注目することは毒性評価において、過少評価の危険をさけるという原則に叶っている。ところが、ノルハルマンのような相乗作用については、どのようにこれに対処してよいか苦しむ。一つの方法としては、食品、空気、水といったように、ヒトと接触する環境資料に関しては、その中から変異原を抽出、分離することとは別に、混合物のまま変異原試験を行うことが必要であろう。化学工場における労働環境の場合は別として、そのような複合物の状態で体中にとり入れるのが常である。このようなデータは Mut-g として表示されるわけである。

筆者ら⁹⁾は、ヒスチジンを含む食品試料などの変異原性の測定に適したサルモネラ SD 法を開発して、複合物の変異原試験を行なっている。その感受性はエームス法にほぼ匹敵するのでその結果を同列に比較できると思われる。

5.3 閾値について

ある群の変異原物質は、生体中で不活化を受けるので、その不活化作用の強さに応じて、ある濃度以下では生体に対する作用を無視しうる、すなわち閾値を有する。このことは、これまで得られた知識により、明らかな事実であろう。しかし、閾値が全くない場合もありうる。たとえば、生体中で全く不活化を受けることのない変異原であ

たらどうか。この場合、他の生体物質とは反応せず、DNA とのみ反応するというでなくてはならぬ。このような変異原は、その生体中の濃度に完全に正比例した数の、DNA 損傷を誘発するであろう。無限に低い濃度であっても、ゼロということはないので、無限に少いが、ある大きさの DNA 損傷が常に誘起される。すなわち、閾値はない。しかし、次のような問題点がある。

第1に、純粋に DNA とのみ反応して、他の生体分子とは全く反応しないような化学種は果してありうるか？ DNA を構成する化学基、原子結合類は広く他の生体物質に存在しており、DNA に反応性を有する化学物質は、他の生体物質とも多少は反応するのではないか。従って、変異原のターゲットである特異的な DNA 部位が、露出していることを想像せぬ限り全く閾値はないと考えることは困難であろう。

変異原の作用起点として、DNA 損傷があるので、生体によるその修復を考えてみよう。第一に、全く修復の対象とならない種類の損傷がありうるか？ その可能性は極めて少いが、全く否ともいえない。この場合、DNA 損傷はそのまま傷害・毒性へ通じることになる。しかし、多くの場合 DNA 損傷は、生体の有する種々な型の DNA 修復機能の対象となって、消失すると考えられる。修復の対象となる種類の損傷に限って考えると、生体修復能力に応じて、一定数以下の DNA 損傷は完全に消滅するであろう。すなわち、閾値は存在する。一方、毒性の問題で常に考えられることは、特異的体質の存在である。DNA 修復に関していえば、遺伝学的に DNA 修復に欠損した個体が存在することに注目せねばならない。ただ、この場合何時でも問題になるのは、集団の平均からシフトした個体のどの範囲迄を対象とするかである。

次に DNA 損傷の障害としての発現の問題がある。この場合遺伝毒性として考えられる劣性な点突然変異は、全く単一な (single) 損傷が発現する例である。一方、がんの発生に関しては、このような単一損傷の関与ではないのでないか？ しかし、この点は不明である。また、傷害・毒性の発現レベルには、量的な問題が存在する。たとえば、ある遺伝子生産物の量的低下ということである。

さらに、自然誘発率のレベルの問題がある。どのような傷害毒性にも、自然誘発の現象がある。たとえば、自然突然変異誘発率は、もっとも例として考え易い。いま、外的因子によって、誘発突然変異の率が上昇するためには、自然的に起こるレベルをかなり超えない事象の検出は困難である。たとえば 1.0 という値に対する 0.01 程度の寄与は無視されてしまう。このように仮に外的因子による 0.01 という値が検出されぬことは、閾値の概念とは別のものである。しかし、実際問題としては、閾値の測定の系の内にはいってくる。

ここで複合系における問題点をのべたい。2つ以上の因子が相殺的あるいは相乗的に働きうるためには、それぞれの濃度がある程度以上であることが必要である。逆に極めて低い濃度で存在する2因子の作用の総計は、単に算術的加算となるであろう。従って、もし、0.01の寄与が100因子あれば全体として1.0となり、影響の総計は2となる。

おわりに

以上、物質の属性としての変異原活性 M を知ることが可能であるがヒトにおける影響の推測のためにはまだまだ多くの問題がある。しかし化学物質は非常に多数あるので、その安全性の評価のためには、種々な実験系の結果からより信頼しうる仮説に基づいた推算を重ねるべきである。なお本稿は、この問題に関して行なわれた 2, 3 の国際協力研究の成果^{10, 11)}に多く依っていることを記す。

参考文献

- 1) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 72: 5135~5139, 1975.
- 2) Kawach, T., Nagao, M., Yahagi, T., Takahashi, Y., Sugimura, T., Matsushima, T., Kawakami,

T. and Ishidate, M. Our view on the relation between mutagens and carcinogens, in "Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis", E. C. Miller et al. (Eds.) Japan Sci. Press Tokyo/Univ. Park Press, Baltimore, pp. 337~344, 1979.

- 3) Kada, T. Mechanisms of genetic implications of environmental antimutagens, in "Environmental Mutagens and Carcinogens" (ed. T. Sugimura et al.) Univ. Tokyo Press, pp. 335~359, 1982.
- 4) Kada, T., Inoue, T. and Namiki, M. Environmental desmutagens and antimutagens, in "Environmental Mutagenesis and Plant Biology" Ed. F. J. Klekowski, Praeger Sci. New York, in press.
- 5) 賀田恒夫：自然因子による変異原の抑制，遺伝，34，pp. 49~54，1980；環境変異原の研究，日本農芸化学会誌，55，pp. 597~605，1981；変異原活性を抑制する因子，環境変異原研究，3，pp. 29~32，1981；変異原性を指標とした発癌物質の不活化，月刊薬事，24，pp. 67~72，1982；抗突然変異因子，化学と生物，1982.
- 6) Onitsuka, S., Chang, N. V., Murakawa, S., Takahashi, T. 文部省科学研究費（環境科学）成果報告書（1978）A2.
- 7) Nagao, M., Yahagi, T., Honda, M., Seino, Y., Matsushima, T., and Sugimura, T. Demonstration of mutagenicity of aniline and o-toluidine by norharman. Proc. Jpn. Acad., 53B; 34~37, 1977.
- 8) Umezawa, K., Shirai, A., Matsushima, T., and Sugimura, T. Comutagenic effect of norharman and harman with 2-acetylaminofluorene derivatives. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, pp. 928~930, 1978.
- 9) Kada, T., Aoki, K. and Sugimura, T. Isolation of streptomycin-dependent strains from *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 and their use in mutagenicity tests. Environmental Mutagenesis (submitted).
- 10) Kada, T. Mutagenicity of selected chemicals in the rec-assay in *Bacillus subtilis*, in "Comparative Chemical Mutagenesis" (eds, F. J. de Serres and M. D. Michael) Plenum Pub. Co., pp. 19~26, 1982.
- 11) Kada, T. The DNA-damaging activity of 42 coded compounds in the rec-assay, in "Evaluation of short-term tests for carcinogens" (eds, F. J. de Serres and J. Ashby) Elsevier North-Holland, pp. 175~182, 1981.

3. 染色体異常誘起性の定量化

国立衛生試験所・安全性生物試験
研究センター・変異原性部

石 館 基

1. はじめに

染色体異常(chromosome aberration)と呼ばれる現象には2つのカテゴリーがあるように思われる。その一つは、放射線あるいは化学物質によって、染色体の数に変動が起こったり、また、構造上の変化として、染色分体、あるいは染色体レベルでのギャップ、切断、交換、あるいは環状形成が観察される場合である。これらのいわば急性的な変化は、通常 clastogenicity と呼ばれている。この場合、染色体の異常を伴った細胞は必ずしも生存し得ないかも知れない。他の一つのカテゴリーは、染色体異常と呼ぶよりは、むしろ、染色体変異(chromosome mutation)と呼ぶべきものである。この場合は、数あるいは形態(核型)が正常とは異なるが、ある特定の細胞集団として増殖し得るものである。癌化した細胞の多くはこのカテゴリーに入り、また、ある種の先天性の遺伝病患者の細胞もこれに含まれよう。しかしながら、後者の染色体変異は、前者の急性的な変化の結果として生ずるものと考えられる。

著者らの研究室では、次の様な実験を試みたことがある。まずチャイニーズ・ハムスターの胸線組織を培養し、正常に近い核型を持つ線維芽細胞

のクローンを分離する。この細胞に MNNG あるいは PNU を作用させると、濃度に依存して、染色体異常(第1のカテゴリー)が出現する。48時間目に、一定数の処理細胞を新しい培地に播種すると、生存し得た細胞のクローンを得ることができる。これらのクローンについて、ギームザ・バンディグ法による核型の比較(第2のカテゴリー)を行った。その結果、染色体異常をより多く出現させた高濃度処理群では、核型に異常を持つ細胞がより多く出現してきた(表1)¹⁾。上記の事実は、急性変化としての染色体異常の発現は、細胞の染色体変異につながる重要な要因であることを示唆している。外村らも、ヒトのリンパ球を用いて同様な所見を得ている²⁾。

著者らは、過去、数年にわたり、約700種類の化合物(天然を含む)について、上記第1のカテゴリーに属する検索を行ってきた。特に、チャイニーズ・ハムスター線維芽細胞系(CHL)を好んで用いてきたことにはいくつかの理由がある。1)培養が容易であること(MEM 培地, 10% CS), 2)細胞周期が短いこと(約15時間), 3)無処理細胞に異常を持つ細胞の出現率が低いこと(通常2%以下), 4)染色体数が少なく、形が大きく異常の見分けが容易であること, 5)ヒトその他の細胞

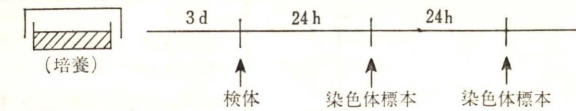
表1 MNNG による染色体異常誘発性と染色体変異細胞の分離

MNNG ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	染色体異常 (%)	細胞生存率 (%)	変異コロニー/分離コロニー		
			数の異常	構造異常	異常総数
0	0	97.0	1/20	1/20*1	2/20
2.0	22.0	32.0	4/20	5/20	9/20
4.0	61.0	12.0	6/20	7/20	13/20
8.0	100.0	0.5	7/19	—*2	—

*1 染色体数は正二倍体であるが、バンディング・パターンに異常が認められるもの。

*2 観察していない。

直接法



代謝活性化法

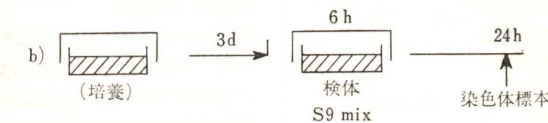
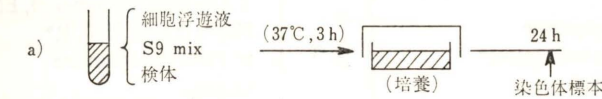


図1 培養細胞による染色体異常試験
—CHLを用いる簡便法—

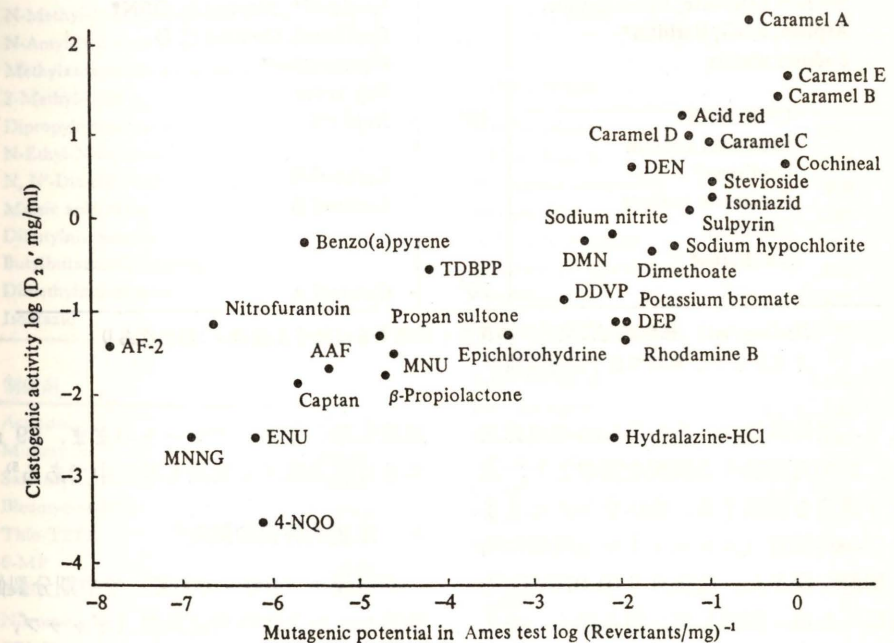


図2 Ames 試験および *in vitro* 染色体異常試験で得られた強さの比較

比較し、薬物に対する感受性が高いこと、などをあげることができよう。

以下、試験法の概略並びに定量的表示の試みについて述べる。

2. 試験法の概略

CHL 細胞の一定数 (2×10^4) をプラスチックプレート (直径 6 cm) に播き、3日間培養した後、

表 2 染色体異常試験で陽性となった化合物の定量的評価 (D₂₀ 値)

Ames テスト陰性のもの	D ₂₀ (mg/ml)	Ames テスト陽性のもの
	10 ⁻⁴	
	10 ⁻³	4-NQO* Trp-P-1* <i>o</i> -Phenylene diamine, ENU* Hydralazine-HCl MNNG*, Trp-P-2 2-Amino-5-nitrophenol, ENNG* NO-carbaryl, MNUR*
NO-propazine Diethylstilbestrol* Carbaryl <i>Propyl gallate</i> <i>Acetaminophen</i>	10 ⁻²	<i>m</i> -Phenylenediamine Captan β -Propiolactone* AAF*, 2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine AF-2*, Propan sultone* Rhodamine B*, BNU*
<i>Hydrogen peroxide</i> * 4-AQO, Noscapine Maleic anhydride* <i>Caffeine</i> Ethionamide*	10 ⁻¹	<i>Nitrofurantoin</i> <i>Potassium bromate</i> , PNU* DEP*, <i>DDVP</i> , <i>Sodium hypochlorite</i> Styrene monomer, Sodium nitrite Tris-dibromopropylphosphate* Quinoline*, B(a)P*, DMN*
Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate Phenylbutazone, Furosemide Sodium benzoate, Ethenzamide Aspirin, ENG, Barbitol* Sodium nitrate	10 ⁰	<i>Sulpyrin</i> , Pyrovatex CP Tris-dichloropropylphosphate Isoniazid*, Stevioside, DEN* Cochineal, <i>Caramel C, D</i> <i>Phenacetine</i> * Soy sauce Acid red
Urea, NaCl Saccharin sodium Urethane* <i>Potassium sorbate</i> Diazinon Saccharose	10 ¹	Caramel E Caramel B
	10 ²	Caramel A

D₂₀(mg/ml) : 細胞20%に染色体の異常を誘発するに要する濃度 * : 発癌性あり
イタリック : 本邦で目下発癌実験中

検体を加える。検体濃度は、あらかじめ増殖抑制試験を行い、約50%抑制する濃度を基準とし、通常公比2で3濃度を使用する。検体を加えたまま、24時間および48時間目（コルセミドを2時間作用させる）に細胞を採集し、塩化カリ(0.075 M)で低張処理を行った後、固定して、型の如く、空気乾燥法により染色体標本を作製する(直接法)³⁾。

検体の代謝活性化を目的とする場合には、あらかじめ細胞浮遊液を調製し、ラット肝 S9 mix (Ames テストと同様)と共に検体を3時間処理した後、さらに24時間培養し、染色体標本を作製する(代謝活性化法)⁴⁾。後者の場合には、細胞浮

遊液を用いずに、プレートのまま、S9 mix と共に6時間処理する変法も考案中である⁵⁾ (図1)。

3. 定量的評価の試み⁶⁾

顕微鏡下(400~1000倍)で中期分裂像100個を観察し、染色体の構造異常(ギャップ、切断、交換、環状形成など)を持つ細胞の出現頻度を求める。10%以上の出現率を示し、かつ、濃度依存性が認められた場合に陽性と判定する。陽性物質について、以下に示す D₂₀ 値および TR 値を算出する。

表 3 チャイニーズ・ハムスター培養細胞に対する染色体異常誘発試験 (TR 値)

発癌性物質	その他の医薬品類
4-Nitroquinoline 1-oxide 30000	Aminacrine-HCl 42000
Trp-P-1 (a tryptophan pyrolysate) 12800	Triamterene 9333
N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 9600	Tolazoline 880
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 6200	Acetaminophen 583
Trp-P-2 (a tryptophan pyrolysate) 4667	Hydralazine-HCl 333
N-Methyl-N-nitrosourethane 3400	α -Methyl-dopa 260
β -Propiolacton 2267	Sodium azide 250
N-Butyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 1800	Levodopa 233
N-Propyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 1733	Sulpyrin 113
Styrene oxide 1567	Papaverine-HCl 96
Butyl-(1-acetoxybutyl) nitrosamine 1317	Methyclothiazide 24
N-Amyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 1167	Theophylline 23
N-Ethyl-N-nitrosourethane 1067	Cocaine-HCl 21
N-i-Butyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 767	Aspirin anhydride 16
N-Butyl-N-nitrosourethane 750	LSD 11
Propan sultone 728	Phenylbutazone 9
N-Methyl-N-nitrosourea 580	Nitrofurantoin 8
N-i-Butyl-N-nitrosourea 512	Ethenzamide 8
N-Propyl-N-nitrosourethane 467	Phenacetine 8
Nitrosahydantoic acid 304	Trichlormethiazide 7
N-Propyl-N-nitrosourea 200	Isoniazid 7
Rhodamine B 183	Ethionamide 4
N-Butyl-N-nitrosourea 155	Aspirin 3
N-Methyl-N-acetylnitrosourea 152	Chlorpropamide 3
N-Amyl-N-nitrosourea 104	
Methylazoxymethanol acetate 80	工業用化学物質
2-Methyl-DAB 71	Ethylacrylate 3200
Dipropylnitrosamine 66	β -Propiolactone 2267
N-Ethyl-N-nitrosourea 56	<i>o</i> -Phenylenediamine 2000
N, N'-Dibutyl-N-nitrosourea 48	Styrene oxide 1567
Maleic anhydride 40	<i>m</i> -Phenylenediamine 1267
Dibutylnitrosamine 33	2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine 800
Butylbutanolnitrosamine 21	Formaline 733
Dimethylnitrosamine 16	Propan sultone 728
Isoniazid 7	Acrylonitrile 600
制癌剤	Epichlorhydrin 576
Actinomycin D 696000	Methylacrylate 533
Mitomycin C 470000	Ethidium bromide 330
Saframycin A 190000	4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine 267
Bleomycins-HCl 51000	4-AQO 205
Thio-TEPA 23200	THPC 200
6-MP 11000	TDCPP 96
5-FU 9280	Quinoline 47
Nitromin 7625	TDBPP 0
EBNU 7000	
BCNU 6200	THPC: Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride
Busulfan (100倍散) 10	TDCPP: Tris-(2, 3-dichloropropyl)phosphate
Cyclophosphamide 4	TDBPP: Tris-(2, 3-dibromopropyl)phosphate

表 3 続 き

農薬類			
Captafol	2500	Sodium nitrite	52
Captan	933	Sodium hypochlorite	18
Carbaryl (NAC)	500	Riboflavine	13
Maneb	200	Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	12
Sumithion	120	Food Red No. 2 (Amaranth)	8
Malathion	112	Food Red No. 3 (Erythrosine)	5
DDVP	80	Food Green No. 3 (Fast Green FCF)	5
DEP	48	Food Yellow No. 4 (Tartrazine)	5
Dimethoate	37	Food Blue No. 1 (Brilliant Blue FCF)	3
MTMC	16	Sodium nitrate	2
Simazine (CAT)	0	Sodium dehydroacetate	1
MPMC	0	Disodium glycyrrhizinate	1
Simetryne	0	Food Yellow No. 5 (Sunset Yellow FCF)	1
Ametryne	0	Trisodium glycyrrhizinate	0.8
Atrazine	0	Sodium <i>d</i> -tartrate	0.8
Prometryne	0	Sodium 5'-inosinate	0.8
Propazine	0	Sodium benzoate	0.5
		Acetone	0.4
DDVP: 2, 2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate		Potassium sorbate	0.3
DEP: 2, 2, 2-Trichloro-1-hydroxyethyl dimethyl phosphonate		Saccharin sodium	0.3
MTMC: 3-Methylphenyl-N-methyl-carbamate		Ethyl acetate	0.3
MPMC: 3, 4-Dimethylphenyl-N-methyl-carbamate		Food Red No. 106 (Acid Red)	0.2
		Propylene glycol	0.2
農薬類のニトロソ化体		Sodium 5'-cytidilate	0.1
NO-MTMC	12267	Sodium 5'-uridilate	0.1
NO-MPMC	5067	Food Red No. 102 (New coccine)	0
NO-NAC	4933	天然物類	
NO-CAT	2066	クルクミン	400
(NO) ₂ -Simetryne	1500	クニルセチン	217
NO-Atrazine	1000	カフェイン	35
NO-Prometryne	0	ラッカイン酸	6
NO-Simetryne	0	ステビオサイド	5
NO-Ametryne	0	カカオ色素	3
		コチニール色素	3
食品添加物		ラック色素液	2
Propyl gallate	275	カラメル	2
Hydrogen peroxide	144	醬油	2
Potassium bromate	116	塩	1
		砂糖	0

1) D₂₀ 値

陽性と判定された検体について、中期分裂細胞の 20% に異常を出現させるに要する検体濃度 (mg/ml) を求める。すなわち、D₂₀ 値が小さい程、供試検体の染色体異常誘発性は高いことになる。代表的と思われる検体の D₂₀ 値を表 2 に示す。

D₂₀ 値は、Ames テストで得られた変異活性値

(検体の濃度当たりの復帰コロニー数) とかなり良い相関を示す (図 2)。

2) TR 値

染色体の構造的異常は、切断型のものと交換型 (環状形成あるいは多動原体を含む) とに大別される。著者らの経験では、比較的高濃度で染色体異

常を誘発する検体 (D₂₀ 値の高いもの) には、切断型を示すものが多く、交換型を示すものは少ない。一方、培養液中の滲透圧を測定 (氷点降下法による) して見ると、検体によって多少の開きはあるが、約 10mM を境として上昇する傾向にあり、それ以上の濃度で陽性となった検体には比較的切断型を示すものが多い傾向にある。さらに、既知発癌性物質の多くのものは、D₂₀ 値が低い上に、切断型に加えて交換型異常を多く誘発する傾向にある。従って、著者らは特に交換型の出現に注目し、一定濃度 (mg/ml) 当たりに交換型異常を持つ細胞の出現頻度を算出することによって染色体異常の強さの指標とすることを提案している。染色体異常試験で陽性となった検体の TR 値を表 3 に示す。ただしこの値はあくまでも比較値であり、この数値によってその検体の安全性の基準を定めることはできない。

4. おわりに

哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験は、他の染色体異常を指標とする短期試験法のうち、最も簡便で、感受性の高い方法といえることができ

る。さらに、本試験は、Ames テストその他の微生物試験では得られない情報を提供してくれる。しかしながら、*in vitro* 試験系で得られた情報は、そのまま、*in vivo* 試験系を代表するものではない。著者らは、まず、第一次的試験として *in vitro* 試験法を行い、その結果を定量的に比較することによって、より疑わしい検体から、優先的に *in vivo* 試験を行い、その上で最終的にその検体の安全性について評価して行くべきであると考えている。

参 考 文 献

- 1) 沢田稔ほか：日本環境変異原学会第 7 回研究発表会 (1978)。
- 2) 越智尚子ほか：日本環境変異原学会第 8 回研究発表会 (1979)。
- 3) M. Ishidate, Jr. and S. Odashima: Mutation Res., 48, 337~354 (1977)。
- 4) Matsuoka, A. et al.: Mutation Res., 66, 277~290 (1979)。
- 5) 松岡厚子ほか：日本環境変異原学会第 11 回研究発表会 (1982)。
- 6) M. Ishidate, Jr. et al.: Gann, Monograph, 27, 95~108 (1981)。

4. 化学変異原における閾値の問題

国立遺伝学研究所

田島 弥太郎

化学変異原の生物効果に、害のない“安全量領域”があるか否かは、研究者はもちろん社会的にも大きな関心を呼んでいるところである。

われわれの関心の対象とする化学変異原の用量レベルは一般に低いので、用量—効果関係を実験的に求めることは容易でない。そのため、この領域の効果については高レベル域での実験で得られた用量—効果曲線を、そのまま下方に延長して、効果が0になる点の用量を求めるとか、実験値の最低用量の効果を用量0の点に結んでその効果を推定するとかの方法がとられている。

この場合厄介なことには問題にする生物効果が自然界でも起こっていて、変異原によるものと、自然発生のものとの区別ができないばかりでなく、処理区の誤差と無処理区の誤差とがオーバーラップして、この領域について用量—効果関係を明瞭につかむことができない。このため従来から閾値の有無について理論的立場からさまざまな議論が行われたが、未だに決定的なことが言えなかったわけである。

ではこの問題には手も足も出せないのか、以下問題点を整理してこの問題に考察を加えて見よう。

1. 生物反応の標的としての DNA

生物が化学変異原から受ける影響（大部分は障害）にはさまざまなものがある。これまで知られている影響の種類としては遺伝子突然変異、染色体突然変異、細胞致死、畸形、腫瘍の発生などがあげられる。いずれも細胞核内の DNA に作用して、これに障害を与えた結果出現してくることが知られている。このほか細胞致死の場合には、細胞質内にある各種のオルガネラの機能障害も考えられないわけではないが、ここでは共通した生物

効果として DNA の障害を取り上げることとする。

変異原物質が生体内で DNA に作用する場合、さまざまな反応機構が考えられるが、重要なのは塩基（複数の場合を含む）の変換または欠失に由来する DNA の損傷である。これが原因となって、上に述べた各種の障害が生ずるものと考えられる。それ故ここでは DNA の損傷に視点を据えて考えることにする。

2. 化学変異原による DNA 損傷の量的対応関係

化学変異原が DNA に対しどのような作用をするかを知るため、まず反応に関与する分子数の計算から始めよう。

ここでは変異原として EMS を取り上げ、作用を受ける細胞の大きさを $10,000\mu^3$ と仮定する。EMS の分子量は 124.16 であるから、EMS 0.1 mol 液 1 l 中に 12.416 g の EMS を含み、その分子数は $N \times \frac{1}{124.16} \times \frac{1}{10} = 4.8 \times 10^{20}$ である。細胞の大きさは $10,000\mu^3$ であるから $10^{-11} l$ に相当する。これだけの容積の細胞中に含まれる EMS の分子数を計算してみると、 4.8×10^9 個となる。細胞 1 個中に含まれる DNA 量は塩基数にしておよそ 3×10^8 個と見られるから、塩基 1 個あたりほぼ 10 個の EMS 分子が細胞内に存在するという計算になる。これは細胞内 EMS 濃度をいま 1 桁下げて 0.01 mol としても平均 1 個に相当し、さらに低い濃度にしても細胞内には反応に充分の EMS 分子が存在することがわかる。このことは変異原性の強い物質についてはよほど薄い濃度であっても、突然変異を誘発するに充分な機会がありうることを意味する。

次にこのような変異原物質の分子と DNA との相互作用によって生ずる損傷の大きさと用量との

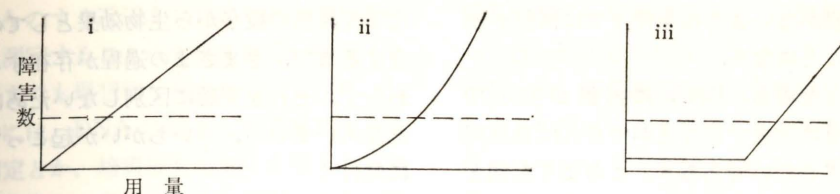


図 1 変異原物質の用量と障害度との関係における 3 型

(注) いずれの場合も自然発生数を差引いたもの

間の量的対応関係について、特に低用量領域に限定して、考えて見ると少なくとも次の 3 つの反応型が考えられる(図 1)。

- (i) 直線関係を示す場合
- (ii) 指数関数形を示す場合
- (iii) 閾値の存在を示す場合

(i) は 1 ヒットで生ずる遺伝子突然変異、染色体切断のようなもので、自然発生頻度を差引けば直線と横軸と 0 点で交わる。(ii) は 2 ヒット以上で起こる事象またはそれらと 1 ヒット事象との混合型として見られるもので、ダイセントリック、大きな欠失のような染色体異常がこれに属する。この場合も曲線は横軸の 0 点を通る。(iii) は多数の損傷が重なり合ってはじめて表現されるような場合に見られるもので、ある用量域までは何等の効果も表現されないが、一定の用量域を越えからはじめて障害が発現を見ようになるもので、その限度以上の用量では直線的に上昇する。細胞致死の場合などがこの好例であろう。なお (i), (ii), (iii) いずれの場合も化学変異原の用量が高い領域では飽和効果が働いて曲線はある用量域以上からプラトーを示すか、かえって低下を示す場合があるが、このことはここでは問題にしないこととする。

ところで問題は生物効果の自然発生量との関係である。図では (i), (ii), (iii) のいずれの場合にも自然発生量を差引いた値で示してあるが、この自然発生量は場合によってかなりの変動を示す。それで、図 1 にはその変動の範囲を誤差域として点線で記入して置いた。誤差が小さい場合は問題ないが、場合によっては (i), (ii), (iii) とともに低用量域では誤差におおわれてしまい、用量がある大きさに達すると、そこから曲線がはじめて立上がりを示すようになる。図のような場合にはいずれ

の場合もそれが直線であるのか、指数函数的であるのか、閾値があるのか、何も区別できないことになる。このため高用量域で実験的に得られた直線や曲線を下方に延長して、これが効果 0 の横軸を切る点 (+x) の用量を求め、これを閾値とするという方法も行われている。

しかし、これを果たして閾値と見てよいかどうかは問題で、供試個体数を増大して、誤差を小さくするとか、実験系の感度を高めてやるとかの方法を講ずればある程度まで判定の精度を上げることが可能であるが、それも程度問題で、本質的な解決にはならない。ところが次に記すように閾値の存在する可能性が考えられる場合が確かにあり得るのである。

3. 閾値存在の可能性が考えられる場合

化学変異原の用量—作用関係に関し閾値が存在する可能性のある場合としては次の 4 つが考えられる。

- ① 変異原物質が標的まで到達しえない場合：この場合ある濃度まで無反応域が存在するのは当然である。
- ② 多重標的の場合：homogeneous な複数の細胞から成る組織または器官では、そのうち少数の標的が障害を受けても他の標的が代償的にその機能を補うが、損傷が一定数を越えると完全な機能を果たし得なくなる場合、例えば畸形形成の場合、細胞致死、染色体異常などが考えられる。
- ③ 多段階の生物反応：例えば発がんについては initiation と promotion の 2 つの異なった機構が共存した場合にはじめて腫瘍が発生するものと考えられている。細胞死、器官の機能喪失、個体死の如き現象もこの中に含めることができよう。このような場合には DNA の損傷だけが起り、

第2の機構が働かないような条件下では閾値が確実に存在することになる。

④ 修復の完全な場合: DNA に損傷が生じて、これを完全に除去することができれば当然突然変異は生じてこないであろう。このような例として inducible repair の例が考えられる。例えば低濃度のアルキル化剤 (MNNG) 中にあらかじめ大腸菌を培養しておく、そのあとで高濃度のアルキル化剤に短時間曝露しても出現する突然変異の数は著しく抑制される。このことは前処理によって大腸菌内に「適応反応」が起こり、アルキル化剤による損傷を修復する酵素 (transmethylase) が誘導されるためと説明されている (Samson and Cairns, 1977; Mount et al., 1982)。近藤によると N-ヒドロキシウレタンもこのようなアルキル化塩基修復の誘導力を持っているという (近藤, 1981)。このタイプのものは理論上は無作用量領域の存在を示すはずであるが、実際に明らかにそれと指摘することは難しい。むしろ次項に述べる型のものと一緒に扱った方がよいであろう。

4. 閾値が不完全ながら認められる場合 (準閾値型)

無作用領域の存在が完全には認められないが、低用量領域における反応曲線の傾斜と高用量領域の反応曲線の傾斜とが明らかに異なり、前者が後者に比べてはるかに小さい場合がある。例えば (a) 指数函数型を示す場合とか、(b) 障害の修復が不完全ながら起こるが時々修復もれがある場合、(c) 突然変異に対する感受性の異なる細胞が heterogeneous に入りまじっている場合等があげられよう。このような場合を仮に準閾値型と名付ける。この型の反応を示すものは理論的には閾値はないはずであるが、前述したように自然発生の障害の誤差の変動の中におおわれてしまって、實際上、閾値が存在する場合と区別が困難である。したがってこれをどのように扱うかが大きな問題である。この議論に入る前にもう一つ次のことをよく考えておこう。

5. 化学変異原投与から障害発生までの諸段階

閾値に関する従来の議論をふり返って見ると、

化学変異原の投与から生物効果としての障害が成立するまで、さまざまな過程が存在するにもかかわらず、それを明確に区別しないために議論の根拠があいまいで、くいちがいが起こっていることに気付く。

化学物質の投与から障害発現までの一連の過程は、これをいくつかの段階に分けることができるが、便宜上 Ehrenberg らの分類をそのまま次に引用することにしよう (Calleman, 1981)。

段階 説明

- 1 前変異原もしくは終局変異原への曝露
- 2 吸収
- 3 組織内に変異原の最終反応物形成
- 4 変異原の最終反応物の標的分子近傍への到達
- 5 標的分子 (macromolecule) の決定部位に生ずる化学的变化
- 6 反応または人の危険度

このほか厳密には段階6以降、実際の危険度発生につながるまでの間にもさまざまな段階が考えられよう。

以上記した諸段階のうち、以後の議論に必要な段階だけを摘出して整理して見ると次のようになる。

6. 反応型についての議論の基準となる用量

I. 投与量 = 変異原物質が前駆体の形で投与された時でも、それが生体内で代謝を受けて終局変異原に変化してはじめて作用するような場合でも生物効果の大きさを比較する基準になるものは投与量である。これらの物質が生体内に取り込まれると、生体内で活性化されて突然変異を起こす原因となる作用基を生成したり、分解されたりするが、生物作用が起こるためにはそれらが標的器官まで運搬されなければならない。

II. 標的分子 (多くの場合 DNA) の近辺まで到達した変異原物質の量 = (近似的に標的細胞到達量) = 生物効果の大きさについて、用量との関係を厳密に知るためには、標的の直ぐ近辺まで到達し、対象とする生物作用に有効に使われる変異原の量を基準にしなければならない。ことに障害修復効果を問題にする場合にはなおさらである。と

ころが DNA のすぐ近辺まで到達した化学物質の量を正確に測定することは不可能に近いので、この値はあくまでも理想的な概念上の値となる。しかし近似的には、DNA に結合した変異原由来の作用基の測定とか、培養細胞を用いた場合ならば培養液の濃度などで代表させることができる。厳密にはこれらのほか細胞膜透過性とか、細胞質内の代謝の諸過程等による修飾なども考慮しなければならぬであろう。従来細菌や培養細胞を用いた研究は培養液の濃度を議論の出発点としてきた。

III. 標的分子における決定センターの化学変化 = 標的が DNA である場合には、細胞から DNA を抽出してこれに結合している変異原の結合量を測定する。この値は測定可能である。この量は化学的結合が起こってから以後の段階で、生物効果があらわれるまでの間に、損傷の修復が起こるような場合、その基礎として重要である。変異原物質を放射性元素でラベルし、その量を基準に議論する立場をとった研究も行われた (Sega et al., 1974)。

最終産物 (生物効果、障害) = 遺伝子突然変異、染色体異常、細胞死、畸形、腫瘍形成等の最終産物は測定可能であることは言うまでもない。

以上を要約すると、I. 投与量、II. 標的細胞到達量 (近似的に)、III. 標的への化学的結合量については測定が可能ということになる。閾値の存在の有無はどの段階での変異原の量を基準にしているかを明白に区別した上で論ぜられなければならないことは言うまでもない。ところが不思議なことにそれらの区別が必ずしも明瞭に区別されず、もしくは意識外におかれて議論されていた点に問題がある。

7. 論 議

上述の諸点を明瞭に認識した上で、改めて従来の問題点を見直すと結論は明白である。

まず第一に閾値の有無の議論は当然投与量を基本として行わなければならないことは言うまでもない。日常生活の場合でも法的規制の場合でも、それ以上の段階では規定のしようがない。このことは判りきったことであるにもかかわらず、突然

変異に関する閾値の議論は、細胞到達量を起点として行われてきた場合が多いようである。これは細菌とか、培養細胞を使った実験結果をもとにしたことに原因すると思われる。修復機構の研究にはこれで充分であるが、risk の議論はこれでは困るのである。

このことの重要性については昨年行われた第3回国際環境変異原会議の席上、筆者が強く指摘したところである (Tazima, 1982)。また同じことは近刊の「環境と人体 I」(田島, 1982) にも述べて置いた。投与量と標的到達量との間には当然大きな差がある。例えば食下により体内に取り込まれた化学物質は消化管内で各種消化酵素の作用を受けるが、西ら (1980) は唾液の中に変異原を破壊する物質が存在することをつきとめた。また有本らは porphirin 類が多くの化学変異原を不活性化すること、このような物質としては胆汁中の bilirubin, biliverdin, 血液内に存在する hemin などがあることを指摘した (Arimoto ら, 1980)。いったん生体内に入った物質は当然これらの作用を受けて不活化される。また望月ら (1982) はヒトの胎盤に強力な抗変異原活性が見られることを報告している。

このように考えてくると、化学変異原の投与から標的到達までの過程が遠い程変異原が修飾されたり、分解されたりする機会が多いはずで、カイクの卵細胞突然変異やマウスの経胎盤法による体細胞突然変異などについての用量-変異率曲線はこのことをよく反映している (村上, 1979; 乾, 1978)。よしんばこれらの例が準閾値型のものであったとしても、変異原が一定の投与量に達するまでは標的に到達できない場合が理論上考えうるわけで、この場合には閾値の存在は確実に考えられることになる。

次に問題になるのは準閾値型の場合である。この類型に属する変異原については理論上閾値があるのか、無いのか決定しようがない。

このような場合には risk-benefit の概念を導入して判断する。ある物質に何らかの効用がある場合、しかも曲線の傾斜が充分に小さい場合には、無作用量領域の存在を設定することは社会的に意義あることである。これに対しもし何等の効用も

認められないものであったら、安全側に立って、閾値はないと判断してもかまわないであろう。

こうしたことを敢えてここに記したのは環境変異原の検出精度が上がってきて、われわれが日常摂取している食品の中につぎつぎに突然変異性を持ったものが発見されて、研究者自身すら、何を食べたらよいか迷ってしまう段階にあるからである。漬物、味噌、醤油、ソース、スパイス、ジュースなどから、緑茶、紅茶、インスタントコーヒー、香辛料に至るまで、程度こそ弱い、サルモネラ菌に対し変異原性を持つことが報告されている。

サルモネラ菌で検出される変異原性をそのままヒトに外挿することは無理であるけれども、変異原性の強いものでは、サルモネラ菌に対する変異原性と哺乳動物の培養細胞に対する変異原性との間にかんがりの平行性が見られる。

したがって低い所から高い所まで一連の変異原性のスペクトラムをどこかで足切りしなければ食べることのできる食物がないわけである。そうである以上、上述のような閾値の判断が必要になってくるわけである。

以上を要約すると、化学変異原の生物効果には閾値の存在を科学的に認めうる場合がある。それはその変異原が生体内で代謝分解その他の変化を受けて、標的まで到達できない場合である。しかしこの他に理論上閾値の存在が充分考えられるにもかかわらず、バックグラウンドノイズに妨げられて、科学的にその存否を決定できない場合がかなりあり得る。このような場合には risk-benefit balance をよく考えて、社会的にその存否を判定することになる。こうした実際的方法を非科学的と批難することは必ずしも当たらないと思う。

引用文献

- Arimoto, S., T. Negishi, and H. Hayatsu (1980): Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Letters*, 11: 29~33.
- Calleman, C. J. (1982): A model for low dose risk estimates, in "Environmental Mutagens and Carcinogens" eds. T. Sugimura et al. pp. 701~708, Tokyo Univ. Press.
- 乾 直道(1978): 経宿主細胞突然変異による化学物質の定量的評価に関する基礎的研究。田島弥太郎: "化学変異原の突然変異作用の定量的評価" 研究報告書(昭和54年) pp. 30~34.
- 近藤宗平(1981): 化学物質および放射線による突然変異、奇形、癌の生成と閾値の機構。日産科学振興財団研究報告書(昭和56年度)。
- 望月 肇, 原 雅子, 賀田恒夫(1981): 抗突然変異因子に関する研究Ⅱ, 胎盤因子について。日本農芸化学会, 昭和56年度講演要旨集 p. 11.
- Mount, D. W., J. W. Little, B. Markham, H. Ginsburg, C. Yanish and S. Edmiston (1982): Mechanism of mutagenesis in bacteria, in "Environmental Mutagens and Carcinogens" eds. T. Sugimura et al. pp. 105~111, Tokyo Univ. Press.
- 村上昭雄(1978): カイコにおける化学変異原物質による遺伝的障害の定量的研究, 田島弥太郎: "化学変異原の突然変異作用の定量的評価" 研究報告書(昭和55年) pp. 41~44.
- 西 一能, 京兼弘一, 西岡 一(1980): ヒト唾液の各種化学変異原に対する処理効果。日本環境変異原学会第9回研究発表会講演要旨集 p. 134.
- Samson, L. and J. Cairns (1977): A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature*, 267: 281~282.
- Sega, G. A., R. B. Cumming and M. F. Walton (1974): Dosimetry studies on the ethylation of mouse sperm DNA after *in vivo* exposure to [³H] ethylmethanesulfonate. *Mutation Res.*, 24: 317~333.
- 田島弥太郎(1982): 環境変異原—高等生物における定量的評価。中馬一郎他編「環境と人体Ⅰ」, pp. 225~240. 東京大学出版会。
- Tazima, Y. (1982): Apparent threshold and its significance in the assessment of risks due to chemical mutagens, in "Environmental Mutagens and Carcinogens" eds. T. Sugimura et al. pp. 729~735, Tokyo Univ. Press.

5. 化学物質と放射線による遺伝毒性の相違

—放射線相当量 REC はよくない—

大阪大学医学部・放射線基礎医学

近 藤 宗 平

1. はじめに

環境因子がヒトに遺伝的障害を与える危険の可能性に関しては、電離放射線の遺伝的影響に関する研究が一番すすんでいる。そこで、環境中の化学的変異原の遺伝毒性の強さを、放射線相当量(REC: rem equivalent chemical)で表示しようという提案がなされた(1975)。しかし、著名な遺伝学者はこれはよくないと、反対している。ここでは、その問題点を紹介する。

2. 遺伝毒性の危険度評価における基本的考え方¹⁾

ヒトの集団では、高い率で遺伝病をもつ子が生まれる。これらの遺伝病は大部分が性細胞に生じる突然変異と遺伝性染色体異常に起因すると考えられている。ところが、ヒトに関する疫学的調査では、原爆放射線の場合でも、被ばく者の次代に現われた遺伝病の頻度は対照と比べて少し上昇しているが、その差は統計的に有意でない²⁾。したがって、ヒトに近いマウスに放射線をあて、その性細胞に生じる突然変異の研究結果をもとにして、ヒトへの放射線影響を推定する外挿法がとられている。

哺乳類の成熟精子や発生途中の性細胞は、それに突然変異が起こっても、その変異した性細胞は一過性の運命しかもたない。他方、精原細胞に突然変異が生じると、その個体が生殖年齢期間にある限り、突然変異を起こした精子をつくりつづける。したがって、長い一生の間に、環境中の微量変異原にさらされるときの遺伝的危険度の評価では、精原細胞の突然変異のみを重視する。マウスの卵母細胞は、微量放射線を被ばくしても、ほとんど突然変異を起こさない。しかし、危険度の評

価は、不十分な資料に基づいて行わねばならないので、評価の誤りが過少にならないようにするのが、評価方法の指導原理となっている。したがって、ヒトに対する放射線の遺伝的危険度の評価では、マウスのオスと同じ感受性が、ヒトの男と女にあてはまると仮定する。

3. 放射線による遺伝毒性の危険度¹⁾

マウスの精原細胞に、放射線を照射すると、突然変異頻度(y)は、線量(x)にほぼ比例して上昇する:

$$y = a + bx \quad (1)$$

a は、自然突然変異率で、 b は、放射線の量1単位(1ラドという)当たりの変異誘発率である。自然変異率に等しいだけの変異を誘発するのに必要な線量のことを“倍加線量”(doubling dose)という。この値(上式で、 a/b によって求められる値)は、毛色などの可視劣性突然変異に関する場合、低線量率照射では約100ラドである。

倍加線量は、変異を起こす遺伝子座や変異の種類によらないで、大体にた値をとるようであるが、厳密に証明されたものではない。この仮定が正しく、マウスとヒトが同じ放射線感受性をもつとすれば、ヒトへの放射線の遺伝的危険度はつぎのようになる。

ヒトの遺伝病の原因である突然変異および遺伝性染色体異常の頻度は、ヒトがある世代に集団として平均100ラド被ばくすると、自然頻度に等しい分だけ新しく変異が誘発され、次代の遺伝的変異頻度は倍加される。

新しく突然変異が起こっても、全てがすぐ遺伝病として発病するとは限らない。この点は複雑であるので、ここではこれ以上立入らない。

上述の倍加線量による危険度推定法は間接法と

よばれる。なぜなら、マウスの遺伝病の実際の発生頻度を調べるのではなくて、毛の色の変化という突然変異の頻度から、遺伝病の発生頻度を推定する手法であるからである。マウスにX線をあてると、次世代に骨格異常³⁾や白内障⁴⁾が現われ、それは優性突然変異の伝達様式にしたがって、子孫に伝達される。これらの突然変異とそっくりのものが、人間にも優性遺伝病としてみつまっている。したがって、この場合は、マウスの優性遺伝病の誘発率をもとにして、直接にヒトの遺伝病の放射線誘発率が推定できる^{3,4)}。直接法による遺伝的危険度の推定値は、間接法による推定値とあまりかわらない、といわれている^{4,5)}。

4. 化学的変異原の遺伝毒性の危険度と放射線相当量

もし、マウスの精原細胞に投与した化学的変異原の量(x)と、それによって誘発される突然変異の頻度(y)が、式(1)に示した放射線の場合と同じように、直線関係にあるならば、次のようにすることができる。

$$y = a + cx \quad (2)$$

ただし、 c は化学的変異原の投与量1単位当たりの誘発率で、 a はまえと同じく自然変異率である。倍加用量(doubling dose) x_{doub} は、放射線の場合と同じようにして次式で定義される:

$$x_{\text{doub}} = a/c \quad (3)$$

制がん剤プロカルバジン Maus の精原細胞に与えると、ほぼ直線的反応で劣性可視突然変異が誘発される⁶⁾。したがって、式(2)がほぼ成立し、倍加用量を求めることができる⁶⁾:

$$\text{プロカルバジンの } x_{\text{doub}} = 110(\text{mg/kg}) \quad (4)$$

マイトマイシンC⁶⁾やENU(エチルニトロソウレア)^{4,7)}も精原細胞に突然変異を誘発するが、用量効果曲線が直線型であるかどうか疑わしい。しかし、直線型反応を仮定して、倍加用量の近似値が次のようにえられる。

$$\text{マイトマイシンCの } x_{\text{doub}} = 1(\text{mg/kg}) \quad (5)$$

$$\text{ENUの } x_{\text{doub}} = 3(\text{mg/kg}) \quad (6)$$

放射線の倍加線量は100ラドだから、上述の3種の変異原の x_{doub} 値は100ラド相当である。い

各変異原 1 mg/kg が何ラド相当量 (REC)⁸⁾ になるかという表示に変換される。

$$\left. \begin{aligned} [\text{プロカルバジン } 1 \text{ mg/kg}] &= 0.9 \text{ REC} \\ [\text{マイトマイシンC } 1 \text{ mg/kg}] &= 100 \text{ REC} \\ [\text{ENU } 1 \text{ mg/kg}] &= 33 \text{ REC} \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

これらは、放射線になじんだ者には、大へん分かりやすい表示で、マイトマイシンCやENUの遺伝毒性の怖ろさが、何となく肌でわかるような気持ちになる。しかし、まさに、この何となくわかったようになる点に対し、Auerbach⁹⁾、Russell¹⁰⁾、Lyon¹¹⁾、Adler¹²⁾から強い“REC使用反対”の議論がだされている。その議論主旨は、つぎのようなものである。化学的変異原は、非常に複雑多様な様式に従って遺伝毒性を発揮するので、放射線の単純な作用——これですら十分複雑であるが——で置換するRECの採用は、化学的変異原の遺伝毒性の真の危険度をいじめるしくゆがめる。次節に、この結論の証拠となる実験事実を紹介する。

5. 化学的変異原と放射線による突然変異の比較

a. 性細胞の発生段階依存性

X線による突然変異の誘発では、マウスの成熟精子は、精原細胞より約2.5倍感受性が高い^{3,4)}。しかし、前節にのべたマイトマイシンC⁶⁾やエチルニトロソウレア¹³⁾の精子に対する変異誘発力は、ほとんどないかまたは激減する。他方、微生物や哺乳類培養細胞、高等植物やショウジョウバエに対し、強い変異誘発力をもっている各種アルキル化剤(EMS, MMS, MNU, MNNG)¹⁴⁾は、精原細胞に対しては、今までの実験の範囲内では、突然変異を、自然率より有意に高く、誘発したという証拠はえられていない^{6,13)}。このうちで、EMS, MMS, MNUは、精子に対しては、かなりの頻度で劣性可視突然変異を誘発する^{6,13)}。したがって、この種の化学物質の遺伝毒性の危険度の査定では、減数分裂期以降の精細胞の感受性を無視できなくなる¹⁵⁾。

b. 分割投与効果

放射線をマウスの精原細胞に与えるとき、少量

ずつに分割して、少しずつある間隔をおいて与えると、変異誘発頻度は減少するが、その値は1回照射時の1/3までで、それ以下には低下しない¹⁾。ところが、ENUの場合は、100 mg/kgを10等分し、1週間間隔で投与すると、1回に全量投与したときの誘発頻度の約10分の1に低下する¹³⁾。プロカルバジンの場合も、分割投与は、放射線の場合よりも、著しく大きな低減効果を、精原細胞の誘発突然変異に対して与える¹⁶⁾。このような効果は、少なくとも一部は、精原細胞のDNA損傷に対する修復機構の反映と思われる。したがって、化学的変異原の精原細胞への作用では、ある量以下で突然変異がほとんどおこらないような閾値の可能性も考えなければならなくなる。X線と化学物質によるDNA損傷の種類が違うので、それぞれに対する修復系も異なる。したがって、突然変異の様子が、X線と化学物質の間だけでなくて、各化学物質の間でも大いに異なること¹²⁾は、予期されることである。

c. 誘発される突然変異の質的相違

7種の劣性可視突然変異座位(a, b, c, d, se, p, s)のどれが精原細胞内で突然変異を起こしやすいかを見てみよう。自然変異では、 b が一番よく変異を起こし、 p がつづいている³⁾。X線誘発のときは、 s が一番よく変異し、つぎは d で、 p と b がそれにつづいている。化学変異原(プロカルバジン, ENU, マイトマイシンC)では、 p がもっとも変異しやすく、 d がこれにつづいている^{3,4)}。

X線で誘発された劣性可視変異の全体のうちで、ホモ接合体にしたときの致死率は約70%であるのに、化学物質によって生じた変異のホモ接合致死率は約20%にすぎない^{3,4)}。

以上の2つの事実は、X線による誘発変異と化学物質による誘発変異は、分子レベルでは、かなりちがっていることを示唆する。

d. 反応曲線の形の違い

精原細胞のX線による変異の誘発頻度は、線量に対して直線的反応をとる。しかし、ENUによる誘発反応は非直線的である¹³⁾。減数分裂期以後の精細胞の変異誘発反応は、X線のときは直線的

であるが、MMSに対しては、非直線性が示唆されている¹⁵⁾。

e. ヒトへの遺伝毒性の外挿法による推定

マウスの実験値では、遺伝的影響に対する倍加線量は約100ラドである。ヒトもマウスと同じ感受性をもつと仮定して、放射線のヒトへの遺伝毒性を推定する方針がとられている¹⁾。ところで、広島・長崎で原爆放射線を被ばくした人の子どもに生じた遺伝的障害は、非被ばく者群の頻度よりわずかに高い。この差は、統計的には有意ではないが、これを額面通りにうけると、ヒトへの遺伝的影響に対する放射線の倍加線量は、マウスの場合の4~5倍になる²⁾。つまり、現在使われている放射線の遺伝的危険度の推定値そのものが、4~5倍の過大評価になっている可能性が高い。したがって、化学的変異原の遺伝毒性の危険度の推定の基準をX線の作用におくことは、その基準そのものがゆらぐので、あまりよくないということになる。

人間はマウスより数千倍大きいからだから、マウスと同じ濃度の化学物質を摂取しても、性細胞が両方で同じ濃度の化学物質に暴露されることにならない可能性が大きい。その上、代謝系やDNA修復系などもマウスとヒトではかなり違う可能性がある。したがって、外挿による誤差は、放射線の場合より化学物質の場合の方が、さらに大きいだろう。

6. むすび

化学物質の遺伝毒性の危険度は、どうやって推定すればよいか。マウスでの実験値にもとづいて、それぞれの化学物質の作用特性に応じて推定すればよい。その推定方法は、放射線の遺伝的影響のとき採用された間接法または直接法をもちいれればよい¹⁷⁾。REC単位に変換する簡便法は、複雑な化学物質の作用を短絡させるのでいけない、ということである。

文 献

- 1) UNSCEAR: Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations, New York (1977).
- 2) Schull, W. J., Otake, M. and Neel, J. V.: Genetic

effects of the atomic bombs: a reappraisal. *Science* **213**: 1220~1227 (1981).

- 3) Ehling, U. H.: Evaluation of genetic hazards in man from radiation and chemical mutagens. In: Radiobiological equivalents of chemical pollutants, IAEA, Wien, pp. 71~81 (1980).
- 4) Ehling, U. H., Favor, J., Kratochvilova, J. and Neuhäuser-Klaus, A.: Dominant cataract mutations and specific locus mutations in mice induced by radiation or ethylnitrosourea. *Mutation Res.* **92**: 181~192 (1982).
- 5) Selby, P. B. and Selby, P. R.: Gamma-ray-induced dominant mutations that cause skeletal abnormalities in mice. *Mutation Res.* **43**: 357~375 (1977).
- 6) Ehling, U. H.: Specific-locus mutations in mice. In: Chemical Mutagens, (A. Hollaender and F. de Serres, Eds.), Plenum Publishing Corporation, **5**: 233~256 (1978).
- 7) Russell, W. L., Kelly, E. M., Hunsicker, P. R., Bangham, J. W., Maddux, S. C. and Phipps, E. L.: Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5818~5819 (1979).
- 8) Committee 17: Environmental mutagenic hazards. *Science* **187**: 503~514 (1975).
- 9) Auerbach, C.: The effects of six years of mutation testing on our attitude to the problems posed by it. *Mutation Res.* **33**: 3~10 (1975).

- 10) Russell, W. L.: The role of mammals in the future of chemical mutagenesis research. *Arch. Toxicol.* **38**: 141~147 (1977).
- 11) Lyon, M. F.: Sensitivity of various germ cell stages to environmental mutagens. *Mutation Res.* **87**: 323~345 (1981).
- 12) Adler, I.-D.: Comparison of types of chemically induced genetic changes in mammals. *Mutation Res.* (in press).
- 13) Russell, W. L.: Factors affecting mutagenicity of ethylnitrosourea in the mouse specific-locus test and their bearing on risk estimation. In: Environmental Mutagens and Carcinogens (T. Sugimura et al., eds.), Univ. Tokyo Press, Tokyo and Alan R. Liss, New York, pp. 59~70 (1982).
- 14) De Serres, F. J. and Shelby, M. D. (eds.): Comparative Chemical Mutagenesis. Plenum Press, New York (1981).
- 15) Kondo, S.: Comparative mutagenicity of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate. In: Comparative Chemical Mutagenesis (De Serres, F. J. and Shelby, M. D., eds.), Plenum Press, New York, pp. 743~785 (1981).
- 16) Ehling, U. H.: Induction of gene mutations in germ cells of the mouse. *Arch. Toxicol.* **46**: 123~138 (1980).
- 17) 近藤宗平: 環境変異原の人への危険度評価「環境と人体」II (中馬一郎他編), 東京大学出版会 (印刷中) (1983).

6. 発癌性化学物質の定量的リスク・アセスメント

——最近の文献から——

国立衛生試験所・療品部

中 村 晃 忠

1. はじめに

著者は、家庭用品に含まれる有害化学物質の規制に関連して、公定分析法を作成する仕事に携わっており、化学物質の発癌性およびその規制に関して色々な疑問を持ちつづけて来たものである。そのために、定量的リスク・アセスメントに関する文献に目を通す必要性にせまられた。癌学者でもなく、数学者でもない著者が上記のような重要な問題について言及することは、いささかあつかましい感もするが、最近、米国あるいはカナダの行政官僚の手で、上記問題に関するかなり詳しい総説が出ているので、非才をかえりみず、ここに紹介する次第である。あくまでも、問題提起を目的とするものであるが、著者の理解の及ばない部分もあるので、興味のある方は直接、参考文献をあたっていただきたい。

2. 動物を使った発癌実験の意義

動物を使った発癌実験の目的は、最終的には「人間を癌による死から守る」ことにある。また、現在、世界中で行われている実験の大部分は「ある化学物質に発癌性があるかないか」を明らかにするためのものである。このような目的で行う動物実験には、「実験動物と人間の間には本質的な差はない。あるいは、差はないとして対処することが安全性を高めることにつながる。事実、大きな流れとしてはこの認識は正しかった。」ということが前提となっていると思う。

疫学的に人間に発癌性の明らかとなっている化学物質は、1978年の *Cancer Research* によれば26種とされている²⁾。これらの大部分は動物にも癌をつくらせることができる。従って、“逆は必ずしも真ならず”であるが、動物で発癌性の明ら

かとなったものは人間にも発癌性があると考えた方がよい。

では、現在、何種類の化学物質が動物実験で発癌性ありとされているのだろうか。1980年のEPAのリストでは96種³⁾；IARCが発癌性ありと認めたもの、342種²⁾；OSHAのリストによるカテゴリーIのもの、259種⁴⁾；Saffiottiらの調査によれば評価に足る実験のみに限ると、世界中で約3,500がテストされ、そのうち750がポジティブであった⁵⁾。

3. 発癌性の定量的リスク・アセスメントが期待される背景 (弱い発癌物質に対する行政対応のとまどいとデラニー条項)

有名なデラニー条項は次のようである：『動物または人で発癌性の明らかとなった化学物質はどんなに少量でも食品に添加することを禁止する』⁶⁾。日本においても、ほぼ同様な態度が食品については取られて来た。ところが、動物実験のデータが蓄積され、思わぬものに発癌性が明らかになり、デラニー条項の単純な割り切りで処理しにくい事態が出てくるに及んで、アメリカでも日本でも行政の対応にとまどいが現われて来た。厚生省食品化学課長・藤井正美氏の最近の文章にもそれが如実にあらわれている^{7,8)}。このとまどいの最たるものは大量投与ではじめてポジティブになる、いわゆる弱い発癌物質に対する取扱いである。“50%の動物に腫瘍を発生させる発癌物質の量”という粗い物差しで強弱を比較した例があるが^{9,10)}、これによると最強と最弱の間には10⁶ものひらきがある。このような発癌物質をデラニー条項だけであつかえるか、というところに最大の問題があり、それに対する一つの答え (より妥当な対応の仕方の一つ) が定量的リスク・アセスメ

ントである。文献で見ると、米、欧、カナダの行政のこの面での対応はかなり進んでいるように思えるのに対し、日本では依然として気分で左右される定性的な議論にとどまっているのは残念である。

とまどいは「大量投与」ととどまらない。動物による発癌実験と、その結果の取り扱いに対してはいろいろな疑問が提出されている。それらは主に次のようである：i) 通常の使用濃度で実験すべきではないか；ii) 発癌物質にも threshold はあるのではないか；iii) 発癌物質についても安全率の考えを導入できないか；iv) 純系動物を使った結果を人に適用することは妥当か；v) 投与ルートの違いを無視できるか、等々。

これらに対しては Fishbein の総説¹¹⁾、FDA Advisory Committee による報告¹²⁾、等が答えてくれるので省略する。ただし、以下の議論にも関係があるので、これらの点の一部に触れてみたい。

動物実験は常に統計的な問題として評価されねばならない。通常、発癌実験（一群50匹）で統計的に有意とされるには5%以上の発癌頻度が必要であり、コントロール群との差が1%以下でも統計的に有意とする結果を得るには約24,000匹以上の動物が必要である¹³⁾。仮りに、動物と人間の感受性が等しいとするなら、1%の発癌率とは100万人に10,000人である。通常の使用量で実験し、24,000匹もの大規模な実験でやっと有意になる化合物は100万人に1万人もの発癌を起こす極めて強いものである。それより弱いものはポジティブにならない。しかも、24,000匹もの動物を使って長期の実験を行うのはかなり困難である。結局、中規模（50～100匹）の動物を使って大量投与で実験するしかない。問題は、その結果から low dose のリスクをどう外そうするかにある。

「threshold level はある」とする考えがある。Druckrey は、dose(d) と tumor growth の時間(t)の間に $d \cdot t^n = \text{const.}$, $n=2, 3$ or 4 の関係があり、 d が小さくなった時、 t が人間（または動物）の寿命を超えてしまう場合があり得る、従って、threshold level がある、といっている¹⁴⁾。仮りに個々の人にはこの関係がなり立つとしても、

個人差があり、群として見た時にはやはり統計的な問題に帰結する。そして、このような群としての *actual threshold level* を見つけ出す手段はない¹⁵⁾。

これに対し、*practical threshold level* を考えようとするやり方がある。発癌率が100万人に1人(10^{-6})あるいは1億人に1人(10^{-8})なら受け入れよう、そして、そのような risk を与える dose を「**VIRTUAL SAFE DOSE (VSD)**」としよう、とするものである。そのためには low dose での risk を定量的に評価できねばならない。定量的リスク・アセスメントの目的の一つはそこにある。

4. 定量的リスク・アセスメント

定量的リスク・アセスメントは、おおむね次のようなプロセスで行われる：i) 動物実験から得られた dose-response curve に数学的なモデルをフィットさせ、そのモデルのパラメーターを決定する；ii) i) で得られたパラメーターを用いて計算を行い、low dose 方向への外そうを行って risk を算出する。このようにして得られる low dose での dose-response curve は、どの数学モデルを用いるかで大きく異なる（後述）。また、この low dose での dose-response curve は best-estimate curve を中心として統計的な幅をもったものである。その幅の大きさは信頼限界 (confidence limit) をどれくらいにとるか (99% or 95% or それ以下?) によって変動する。また、基礎となった動物実験の質によっても変動する。すなわち、1群の数が増し、また、dose の数が増すほど信頼性は増し幅は小さくなる。従って、より良いアセスメントを行うには、より質の高い実験が要求される。

定量的リスク・アセスメントを概説した文献は、引用文献11), 12) の他に、Interagency Regulatory Liaison Group (IRLG) によるもの¹⁶⁾、Van Ryzin らによる三つの総説^{17), 18), 19)}、カナダ厚生省の Munro らによる総説²⁰⁾、など多くのものがある。私の紹介文は主にこれらの文献によった。

4.1. 数学モデル

現在よく文献に現われる数学モデルの数学的表

Table 1. Mathematical models and their low-dose behaviour in the case of zero background²⁰⁾

Model	Probability $P(d)$ of a response at dose d †	Low-dose behaviour‡		
		Linear	Sublinear	Supralinear
Probit	$\Phi(\alpha + \beta \log_{10} d)$	—	$\beta > 0$	—
Logit	$[1 + \exp(-\alpha - \beta \log d)]^{-1}$	$\beta = 1$	$\beta > 1$	$\beta < 1$
Weibull	$1 - \exp(-\lambda d^m)$	$m = 1$	$m > 1$	$m < 1$
One-hit	$1 - \exp(-\lambda d)$	$\lambda > 0$	—	—
Multi-hit	$1 - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{(\lambda d)^i e^{-\lambda d}}{i!}$	$k = 1$	$k > 1$	$k < 1$
Multi-stage	$1 - \exp\left(-\sum_{i=1}^k \beta_i d^i\right)$	$\beta_1 > 0$	$\beta_1 = 0$	—

† With independent background, the probability of a response at dose d is given by $P^*(d) = \gamma + (1 - \gamma)P(d)$, where γ ($0 < \gamma < 1$) denotes the spontaneous response rate. Under additive background, $P^*(d) = P(d + \delta)$ where $\delta > 0$ denotes the effective 'background' dose.

‡ Low-dose behaviour for independent background also. (All models are linear at low doses under additive background.)

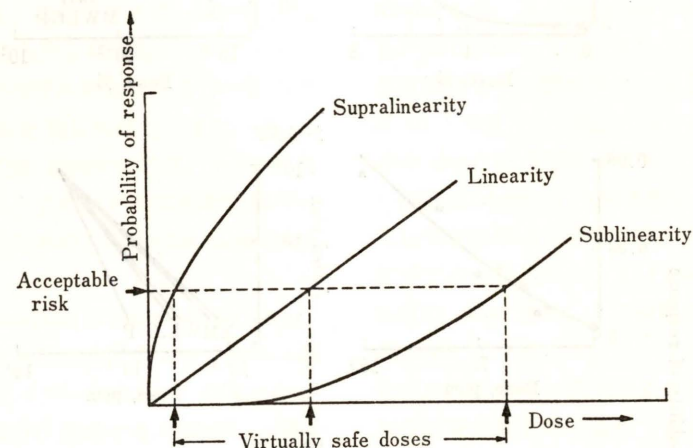


Fig. 1. Linearity, sublinearity and supralinearity at low doses.²⁰⁾

現とその low dose での curve の形を Table 1 と Fig. 1 に示した。以下に個々のモデルについて説明する。

4.1.a. One-Hit Model (Linear Model, Single-Hit Model)

この方法は飲料水中のバクテリア濃度を計算するために長く用いられてきたものである²¹⁾。発癌という毒性は標的臓器（またはレセプター）への1回以上の化合物のヒットの結果として発現するものであり、レセプターをヒットする確率は回数に対し Poisson 分布になっていると考える。そして、特にただ1度のヒットでもレスポンスは発現すると考えると（当然2回ヒットしても発現する）、

ある dose(d) によって発癌の起こる確率 $P(d)$ は Table 1 のように表現されるのである。 λ は化合物に特有のパラメーターである。このモデルでは、low dose の領域では近似的に $P(d) = \lambda d$ となり、dose に対し linear になるため linear model ともいわれる。このモデルは radiation の場合によくあてはまるようである²²⁾。

4.1.b. Multi-Hit Model (Gumma Multi-Hit Model, k -Hit Model)

この方法は One-Hit Model の一般化であって、response (発癌) の発現にはレセプターに少なくとも k 回のヒットを必要とする、と考える。その確率 $P(d)$ は Table 1 の式のように表現される

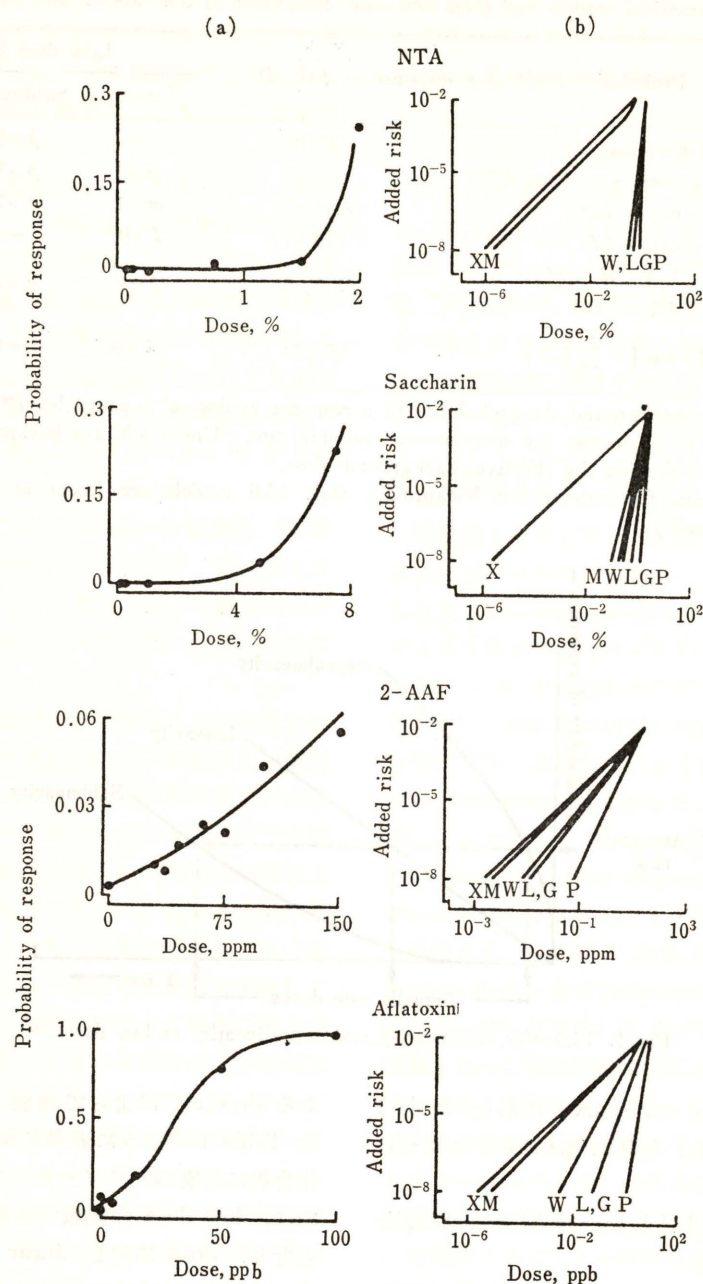


Fig. 2. (a) Weibull dose-response models fitted to the observed data for four compounds (nitrotriacetic acid (NTA), sodium saccharin, 2-acetylaminofluorene (2-AAF) and aflatoxin) and (b) estimates of the added risk over background based on six extrapolation procedures: X—linear extrapolation; M—multi-stage model; W—Weibull model; L—logit model; G—multi-hit model; P—probit model.²⁰⁾

が, low-dose では近似的に $\log P(d) = \log \lambda + k \cdot \log d$ となる. 従って, $k > 1$ では dose-response curve は sublinear (Fig. 1); $k = 1$ (one-hit) では linear; $k < 1$ では supralinear となる. このモデルの生物学的バックグラウンドについては, Cornfield²³⁾, Nordling²⁴⁾, Marshall と Groer²⁵⁾ の論文を見てほしい.

4.1.c. Multistage Model (Armitage-Doll Model)

この方法は Multi-Hit Model の一般化で, 癌とは“限られたステップで起こる一連の somatic-like mutations によってイニシエートされた悪性の細胞である”とする. そして, 一つ一つの mutation の段階は Poisson process に従い, さらにその process の確率は dose とほぼ直線関係にある, と考える. 数式的には Table 1 に示したように表現される. このモデルは Armitage と Doll によって提示され²⁶⁾, Crump らによって一般化された²⁷⁾. このモデルにおいても $k=1$ の時は One-Hit Model と同じになる. また, $\beta_i > 0$ の時は low-dose では linear であり, $\beta_i = 0$ の時は sublinear となる. このモデルに動物実験データをフィットさせるための computer algorithm がある²⁸⁾.

4.1.d. Probit Model (Log-Probit Model)

この方法の基になる考えは次のようである. 癌が発現したか否かという二分的な (dichotomous) な考えをした場合, 動物でも人間でも, 個々の個体においては個々の threshold dose を持つと考える. しかし, この threshold dose は個体によって異なり, その分布は ED_{50} を中心として正規分布になる, と考える. 数式的には Table 1 のように表現される. Φ は standard cumulative distribution function である. このモデルでは $\beta > 0$ であり, dose-response curve は sublinear になる.

4.1.e. Logit Model

基本的には Probit Model と変わりなく, probit の代りに logit を単位とする. dose-response curve は Probit Model に形は似るが, probit のそれよりゆっくりとゼロ点に近づく.

4.1.f. Weibull Model

このモデルは Armitage-Doll Model, Multi-

Hit Model, One-Hit Model のいずれにも似ているもので, Armitage-Doll Model については, “各 stage での細胞の変化の確率は dose のみに比例する”と考えたケースであり, また, One-Hit Model (Multi-Hit Model) については, 確率は d^m ($m > 0$) に比例すると考えたものに該当する¹⁷⁾. 数式表現およびカーブの形は Table 1 の通りである.

4.1.g. Mantel-Bryan Procedure¹⁾

これはデラニー条項に代るものを提供しようとの意図で Probit Model を基本にして打ち出された「発癌物質の取り扱いに関する考え方」である. 彼らは次のような条件を設定した時に得られる VSD を発癌物質に対する社会的な許容量とすることを提案した. i) モデルとしては Probit Model を用いる; ii) dose-response curve の傾斜を, はじめから 1 にしてしまう; iii) その上で 99% 信頼限界の上限のリスクを見積る; iv) リスクが 10⁻⁸ の時を“安全”ということにして, その時の dose を VSD とする.

傾斜を dose の 10 倍希釈について 1 probit としたのは理由がある. 彼らが確かめた範囲では, すべての化合物について Probit Model を適用した時の low dose での傾斜は 1 probit/10 fold dilution より急であった. すなわち, 傾斜を 1 としておけばリスクは実際より大きく見積ることになり, 安全性を高めるのである. 99% の信頼限界の上限を採用するのも, 同様に“安全”の幅を大きくとっておこうとの意図に基づいている. リスクを 10⁻⁸ とした点に根拠はなく, この方法を採用した FDA は 10⁻⁶ を目安としている.

Mantel-Bryan Procedure で 10⁻⁶ のリスクに対する VSD を求める場合, 基礎となる動物実験の群の数が VSD の値に影響を与える. 例えば, 実験で 4% の発癌率を示した場合を想定した時, その投与量の何分の一が VSD になるかという: 一群 50 匹の実験では (2 匹が発癌) VSD はその投与量の 1/5630 であるのに, 一群が 400 匹 (従って, 16 匹が発癌) の場合は同じ dose の 1/1860 が VSD ということになる¹¹⁾. 彼らは「このことがしっかりした動物実験を奨励することにもなる」といっている¹⁾.

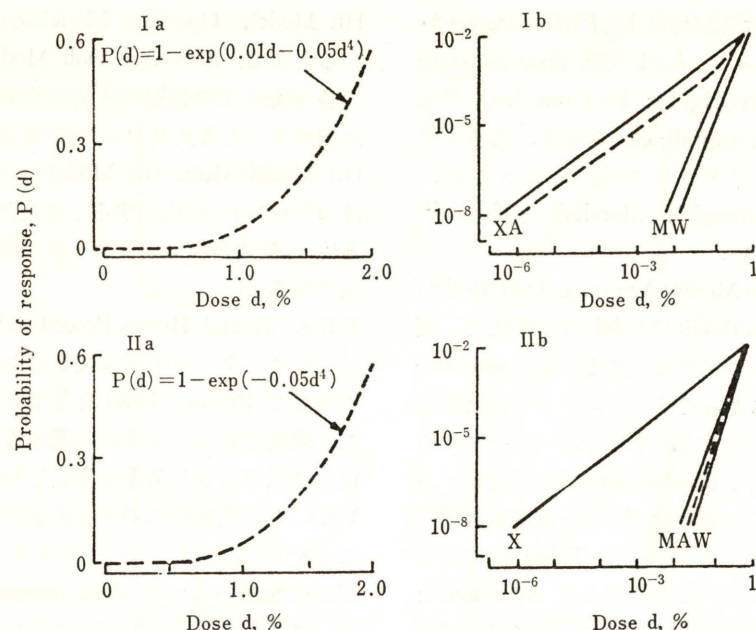


Fig. 3. Hypothetical dose-response curves (a), exhibiting (Ia) low-dose linearity and (IIa) low-dose sublinearity, together with corresponding estimates of added risk over background (Ib and IIb), based on three extrapolation procedures: X—linear extrapolation; M—multi-stage model; W—Weibull model; A—actual risk (estimates averaged over 250 simulated experimental outcomes).²⁰⁾

4.2. モデルの妥当性の検証

以上のモデルで計算した low dose でのリスクが本当のリスクを表わしているのだろうか。多く見積りすぎたり少なく見積りすぎたりしないか。この間に答えることは非常に難しい。以下に実例をあげてみよう。これらから定量的リスク・アセスメントの現状を理解できると思う。

4.2.a. 同じ動物実験データを基にして異なるモデルを用いて計算した結果の比較²⁰⁾

Fig. 2(a) は動物による発癌実験のデータである。上から nitrilotriacetic acid (NTA), saccharin, 2-acetylaminofluorene (2-AAF), aflatoxin である。投与量は NTA, サッカリンでは %オーダーであり, 2-AAF では ppm, アフラトキシンでは ppb オーダーである。これらのデータをつかって種々のモデルで計算した low dose での dose-response curve が Fig. 2(b) である。すべてに共通して, One-Hit Model (x) はリスクを最大に見積るのに対し, Probit Model (p) はリスクを最小に見積っていることが分かる。その他のモデルによる計

算値は, この両者の間に納まる。10⁻⁸ のリスクを与える dose で比較すると, VSD はモデルによって大きく異なり, その差は最大 10⁶ にもなる (10⁻⁶ のリスクで比較すると約 10⁴ の差)。

4.2.b. Simulation

Fig. 3 は Fig. 2(a) のサッカリンのデータに似たカーブを仮りに設定して行った simulation の結果を表わしたものである。

Ia と IIa を現実で得られた動物実験データの dose-response curve とする。見かけは全く同じである。しかし, この二つは発癌のメカニズムが異なると仮定する。すなわち, Ia の場合は二つのメカニズムが同時に起こり, それぞれのメカニズムによる発癌は One-Hit Model と Weibull Model で表わせるようなものとする。この時の数式的表現は $P(d) = 1 - \exp(0.01d - 0.05d^4)$ のようである。一方, IIa では一つのメカニズムによる発癌で Weibull Model で表わされるようなものとし, その式は $P(d) = 1 - \exp(-0.05d^4)$ である。これが真の姿と仮定した時 high dose で

Table 2. Observed and predicted malignant neoplasms in EDB production workers at two locations²⁹⁾

Location	Number of employees	Number of malignant neoplasms		
		Observed	Predicted ^a	
			3.0 ppm ^b	0.9 ppm ^b
Michigan	57	5 ^c	32	19
Texas	99	3 ^d	53	35
Total	156	8	85	54

^a Number of neoplasms above the normal background incidence predicted with the one-hit carcinogenic model used by CAG.

^b Assumed atmospheric TWA concentrations of EDB.

^c Includes one employee who died of prostatic cancer at age 88.

^d Includes one employee with metastatic lymph node carcinoma: primary cause of death was arteriosclerotic heart disease.

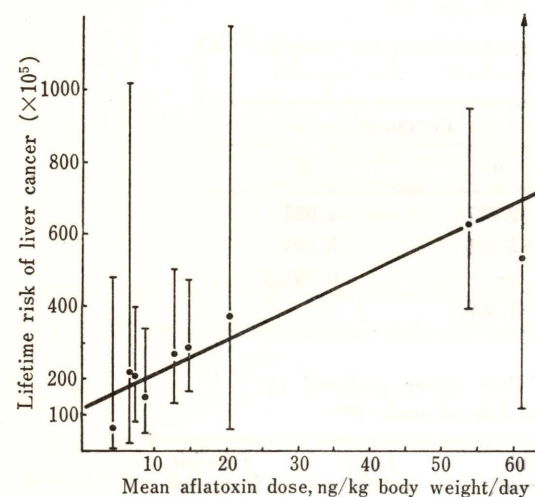


Fig. 4. The dose-response relationship between aflatoxin intake and lifetime risk of liver cancer in man, from epidemiological data.³⁰⁾

の dose-response curve は Ia, IIa のように全く同じになるが, low dose では大きく異なってくる。すなわち, 二つのメカニズムが併行する場合の low dose でのカーブは Ib の A のようであり, Weibull Model type のメカニズムのみの場合のそれは IIb の A のようである。

Ia (または IIa) のデータを基にして三つのモデルで計算した low dose のカーブは Ib (X, M, W) および IIb (X, M, W) に示してある。Ib (X, M, W) の曲線と IIb (X, M, W) の曲線は同一であるが, A との比較のために再録してある。

A を真の姿とすれば, 同じ動物実験データから計算したにもかかわらず, I の場合は Multi-Hit や Weibull Model ではリスクを小さく見積りすぎている (従って, VSD は大きくなりすぎる) のに対し, II の場合では One-Hit Model はリスクを大きく見積りすぎる (従って, VSD は小さくなりすぎる)。

4.2.c. 疫学データとの比較

疫学データとモデルによる計算値を比較した例はあまり多くない。以下に二つの例を示す。

i) Ethylenedibromide (EDB) について²⁹⁾

ラットによる発癌データをベースとして One-Hit Model を用いて計算したリスクを, EDB 製造工場 (Michigan, Texas) の労働者156人の疫学調査結果と比較した。結果は Table 2 の通りである。この結果から Ramsey らは, One-Hit Model はリスクを実際より大きく見積りすぎると結論している。ただし, 母集団が小さいこと, 観察期間が短いことなどのために observed risk はもう少し増える可能性はある。

ii) Aflatoxin について³⁰⁾

Fig. 4 はアフラトキシンによる肝癌多発地帯 (タイ, ケニヤ, スワジランド, モザンビーク) における疫学調査のデータをまとめたものである。また, Table 3 は動物実験データを示してある。Table 4 は Table 3 の実験の結果に各モデルをフィットさせた時のパラメーターである。Table 5 には, Table 4 のパラメーターを使って動物実

Table 3. Liver tumour data from aflatoxin feeding studies with rats (data from males only)³⁰⁾

Study no.	Strain of rats	Type of aflatoxin	Incidence of liver cancer at aflatoxin doses (ppb) of								
			0	1	5	10	15	20	50	100	500
I*	Fischer	Crystalline B ₁	0/18 (0)	2/22 (0.09)	1/22 (0.05)	—	4/21 (0.19)	—	20/25 (0.80)	28/28 (1.0)	—
II†	Fischer	Spectally pure B ₁	0/16 (0)	—	—	—	—	5/13 (0.38)	—	—	—
III†	Wistar	Spectally pure B ₁	0/17 (0)	—	—	—	—	0/20 (0)	—	7/17 (0.41)	—
IV‡	Porton	Rosetti (98% B ₁)	0/46 (0)	—	—	—	—	—	—	17/26 (0.47)	25/25 (1.0)
V§	USC	B ₁ from peanuts	0/9 (0)	0/16 (0)	—	0/10 (0)	—	—	—	—	—

* Wogan, Paglialunga & Newberne (1974).

† Nixon, Sinnhuber, Lee, Landers & Harr (1974).

‡ Butler & Barnes (1968).

§ Alfin-Slater, Aftergood, Hernandex, Stern & Malnick (1969).

Table 4. Parameters for study 1 estimated using the various mathematical models³⁰⁾

Mathematical model	Parameter	
	α	β
Probit	2.537	1.906
Logit	-5.075	3.785
One-hit	—	0.03013
Mantel-Bryan (upper 0.99)	-1.499	—

Table 5. Calculated frequencies of liver cancer predicted by the three models from the data of study 1³⁰⁾

Dose (ppb)	No. at risk	Observed frequency	Probit frequency	Logit frequency	One-hit frequency
1	22	2	0.1	0.1	0.6
5	22	1	2.8	1.8	3.1
15	21	4	8.7	7.3	7.6
50	25	20	19.5	19.9	19.5
100	28	28	25.5	25.9	26.6

験 I の dose での肝癌の頻度を計算した結果が示してある。いずれのモデルもこの dose level では実験値とよく一致していることが分かる。

同様に実験 I～Vのすべてのデータを使って各モデルのパラメーターを求め、それを用いて low dose level へ外そうし、Fig. 4 の疫学調査結果と比較したのが Fig. 5 である。白丸が動物実験データ、黒丸が人でのデータであり、各ラインがモデルでの計算結果を示している (Mantel-Bryan の

み99%上限信頼限界を表わし、他は best estimate line である)。人で肝癌が多発する dose level では各モデルともそれなりの適合を示している。しかし、リスクを 10^{-6} とした時には、やはりモデル間のひらきは大きなものになることが予想される。因みに、 10^{-6} のリスクに相当する VSD は best estimate で計算した時に次のようである (ただし、Mantel-Bryan の場合は 99% upper confidential limit): Probit Model, 0.054 ppb;

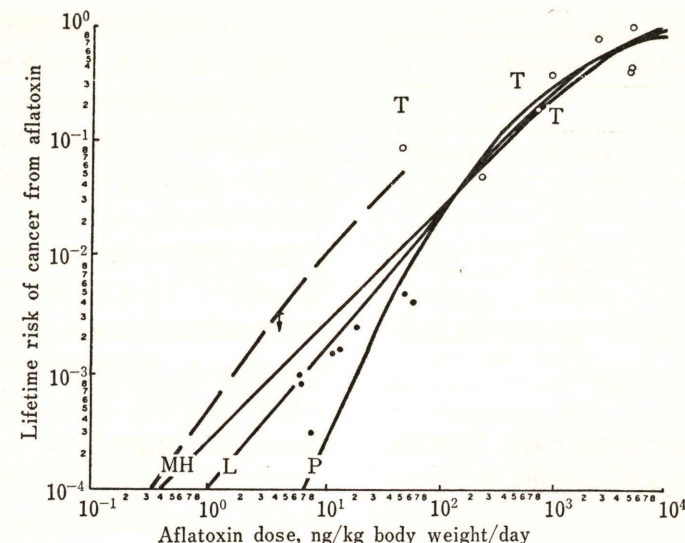


Fig. 5. Best estimates of the dose-response relationship between aflatoxin intake and risk of liver cancer in the rat using each of the models for all of the rat data combined: probit (P), logit (L), one-hit (H) and Mantel-Bryan (M). Observed data for rats (○); observed aflatoxin lifetime risks for man (●); upper 99% confidence limits for an observed human risk of zero (↓); upper 99% confidence limit for an observed risk of zero for a group of rats (T).³⁰⁾

Logit Model, 0.77×10^{-3} ppb; One-Hit Model, 0.14×10^{-3} ppb; Mantel-Bryan, 1.3×10^{-3} ppb.

5. おわりに

以上、述べて来たように、定量的リスク・アセスメントにも多くの問題点がある。まず、low dose でモデル間の差が大きいことが指摘される。動物実験の dose level では、どのモデルもよく実験結果にフィットするので、統計的なフィットの優劣だけからモデルの妥当性を云々することはできない。

放射線による発癌や強い求電子性の (従って、DNA にすみやかに結合する) 発癌物質による癌には One-Hit Model が適用されるのがよいようであるが、弱い発癌物質に対して One-Hit Model をつかうのが正当とはいえないようである。しかし、どのモデルを使うべきかは明らかではない。

このようにしてみると、数学モデルを使ったアセスメントもデラニー条項に変わるべきものではない、と考えるかもしれないが、私にはこのやり方はより真に近いもののように思える (もっとも

らしく思える)。少なくとも、発癌のリスクを、ある幅を持って (その幅が大きすぎるが) 定量的に比較できる点が、今までの癌原性物質に対する議論に比べて大きな進歩といえる。今までの議論は 0 から ∞ までの幅があったが、それが有限になった。

定量的リスク・アセスメントについては二通りの面から考えてゆく必要がある。

一つは、純粋に学問的な意味で、ある化合物についてどんなモデルを使ったら真の姿を表現するかを研究することである。このためには大規模な動物実験 (米国 NCTR はこれを一つの目的としているのではないかと?) と疫学調査が必要である。あるモデルが真に近いものを表現するなら、その化合物による発癌のメカニズムはそのモデルに近い姿だとはいえないだろうか。

もう一つの面は、発癌物質の規制という側面から考えるものである。すでに米国では、EPA が One-Hit Model を³¹⁾、FDA が Mantel-Bryan Procedure³²⁾ を導入している。モデルの妥当性についてはすぐに結論は出ないとしても、発癌物質

Table 6. Estimate risk to Tris-BP-induced kidney cancer per 1,000,000 exposed

Total lifetime exposure (mg/kg)	Risk	
	One-Hit	Probit*
0.085	1.8	0.1
0.85	18.0	1.2
8.5	180.0	100.0
85.0	2,240.0	4,400.0

* Slope is 1 probit/10-fold dilution. (Mantel-Bryan Method)

に対してデラニー条項に代るところの“よりましな”割り切り方をこのモデルは提供してくれると思う。

その例として、消炎剤 Tris-BP について米国 CPSC のとった軌跡を見てみよう³³⁾。

この化合物は NCI の実験では、ラットやマウスに腎臓癌をつくり、その強さはおおむねベンジジンほどであるとされた。この動物実験結果を基にリスクを計算した結果が Table 6 である。

米国では12歳以下の子供の寝衣には消炎加工が義務づけられており、Tris-BPで加工したポリエステル製パジャマが広く使用されていた。そのパジャマの溶出実験などから、12年間に最大 85 mg/kg の Tris-BP が体内に吸収されると計算された。このような暴露レベルでは100万人当たり何人の腎臓癌が発生するかを One-Hit Model と Mantel-Bryan Procedure で計算したものである(ただし、この表では傾斜を1とした時の Probit Model の best estimate の結果を示してある)。Total lifetime exposure は、パジャマ中に約 5,000 ppm の溶出可能な Tris-BP が存在するとして計算された(この値は reasonable である)。この計算からは、Tris-BP によって増える癌を100万人に1人以下にするには、パジャマ中の Tris-BP を現在のレベルの 10^{-3} 以下にしなければならぬことになる。すなわち、数 ppm がパジャマ中の許容量となるであろう。

結局、Tris-BP 加工は禁止された。

このような割り切り方を正当とするか否かは広い範囲で議論すべきことがらである、と思う。

また、定量的リスク・アセスメントのためには、

しっかりした定量的発癌実験が必要となる。

「種差」は依然として大きな問題である。しかし、これは比較代謝学などによって乗り越えられるべき問題であって、種差を理由に人への外そうをあきらめるなら、すべての毒性実験を否定することになりはしないか。

最初にお断りした如く、著者はこの分野の専門家ではない。しかしながら、第三者として、日頃、発癌性の評価はどうあるべきかについて深い関心を覚えている。動物実験で得られた結果を定量的に把握することは、ヒトへの危害を予測する上で極めて重要な問題である。

また、最近、統計数理研究所の柳本武美氏が数学者として本問題に取り組まれていることを知り³⁴⁾、心強く思った。

ここに紹介した内容が、いくらかでも役に立てば幸せである。

(“衛試情報”より転載)

References

- 1) N. Mantel and M. A. Schneiderman, *Cancer Res.*, **35**, 1379 (1975).
- 2) *Cancer Res.*, **38**, 877~885 (1978).
- 3) EPA Preliminary List of Carcinogens Subject to TSCA Labelling Requirements, June 19, 1980.
- 4) *Chem. & Eng. News*, July 31, p. 20 (1978).
- 5) U. Saffiotti et al., *Science*, **201**, 1200 (1978).
- 6) Scientific Committee, Food Safety Council, *Food Cosmet. Toxicol.*, **16** (Suppl. 2), 109~120 (1978).
- 7) 藤井正美, *食品衛生研究*, **30**(11), 1002 (1980).
- 8) 藤井正美, 第18回全国衛生化学技術協議会講演要旨, p. 18 (1981).
- 9) N. K. Hooper et al., Progress Report for IARC/WHO Meeting, Oct. 1977.
- 10) 石館 基, *食品衛生研究*, **30**(6), 557 (1980).
- 11) L. Fishbein, “Occupational Cancer and Carcinogenesis” ed. by H. Vainio et al., Part VI, p. 355, McGraw-Hill Internat. Book Corp. (1981).
- 12) FDA Advisory Committee on Protocols for Safety Evaluation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **20**, 419 (1971).
- 13) T. Cairns, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **3**, 1~7 (1979).
- 14) H. Druckrey, “Potential Carcinogenic Hazards from Drugs, Evaluation of Risks”, ed. by R. Truhaut, p. 60~78, Springer-Verlag, 1967.
- 15) NAS, “Drinking Water and Health”, p. 19~62, Washington D. C., NAS (1977).
- 16) Interagency Regulatory Liaison Group (IRLG),

- J. Natl. Cancer Inst., **63**(1), 241~268 (1979).
- 17) J. Van Ryzin, *J. Occup. Med.*, **22**(5), 321~326 (1980).
- 18) J. Van Ryzin and K. Rai, “The Scientific Basis of Toxicity Assessment”, ed. by H. R. Witschi, p. 273, Elsevier, 1980.
- 19) J. Cornfield, K. Rai and J. Van Ryzin, “Quantitative Aspects of Risk Assessment in Chemical Carcinogenesis”, ed. by J. Clemmensen et al., *Arch. Toxicol.*, Suppl. 3, p. 295~303, 1980, Springer-Verlag.
- 20) I. C. Munro and D. R. Krewski, *Food Cosmet. Toxicol.*, **19**, 549~560 (1981).
- 21) H. O. Halvorson and N. R. Ziegler, *J. Bacteriol.*, **25**, 101 (1933).
- 22) NAS, “Report of the Advisory Committee of the Biological Effects of Ionizing Radiation”, Govt. Printing Office, Publ. No. 0-489-797, Washington D. C., 1972.
- 23) J. Cornfield, “Statistics and Mathematics in Biology”, p. 123, Iowa State Univ. Press, 1954.
- 24) C. O. Nordling, *Brit. J. Cancer*, **7**, 68~72 (1953).
- 25) J. H. Marshall and P. G. Groer, *Radiation Res.*, **71**, 149~192 (1977).
- 26) P. Armitage and R. Doll, *Proc. of 4th Berkley Symp. on Stat. and Prob.*, **4**, 19~38 (1961).
- 27) K. S. Crump, H. A. Guess and K. L. Deal, *Biometrics*, **33**, 437~451 (1977).
- 28) IRLG, “Scientific Bases for Identifying Potential Carcinogens and Estimating Their Risks. A Report of the IRLG Work Group on Risk Assessment”, Washington D. C., DHEW, 1979.
- 29) J. C. Ramsey, C. N. Park, M. G. Ott and P. J. Gehring, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 411~414 (1979).
- 30) F. W. Carlborg, *Food Cosmet. Toxicol.*, **17**(2), 159~166 (1979).
- 31) EPA, “Water Quality Criteria: Request for Comments”, *Fed. Regist.*, **44**, 15926 (1979).
- 32) FDA, “Criteria and Procedures for Evaluating Assays for Carcinogenic Residues in Edible Products of Animals”, *Fed. Regist.*, **42**, 10412 (1977).
- 33) C. Brown, M. Schneiderman and K. Chu, “Estimates of Human Lifetime Carcinogenic Risk from Exposure to Tris”, Report from NCI to CPSC, March 1977.
- 34) 柳本武美, 変異原と毒性, **5**(2), 162~168 (1982).

7. 発癌性試験の結果の評価——Dr. Squire の提案をめぐって——

国立衛生試験所・安全性生物試験
研究センター・病理部

黒 川 雄 二

最近 (1981年11月), Science 誌上に発表された Robert A. Squire 博士による, 「発癌物質のランキングづけ」が, 特に発癌性試験に従事している関係者の間で非常に話題になっているので, 広く紹介してみたいと思う¹⁾.

Squire 博士は, 長年米国国立ガン研究所において, 発癌実験, 特に動物を用いる化学物質の発癌性試験のエキスパートで, 1975年に出版された最初の詳細な発癌性試験の教科書とも言えるべき “Guidelines for Carcinogen Bioassay in Small Rodents” の立案者の1人である²⁾. 現在は, Johns Hopkins 大学の比較医学講座の準教授の地位にある.

この「ランキングづけ」の試みの元になっている事実として重要なことは, 現行の法規制では全ての発癌物質があたかも等しい危険性を有するかの如く取り扱われていることである. この背景には, かの有名な米国の「デラニー条項」があることは言うまでもない. すなわち, 強弱にかかわらず, 発癌性が有り動物実験で証明された化学物質 (食品添加物) に対しては一気に法規制としては禁止の措置を取るものである. サッカリンに対するこの「デラニー条項」の適用が, 多くの論議をかもし出したことは, 未だ記憶に新しいところである³⁾. このような史的背景と共に, 一方, 動物による発癌性試験のガイドラインが国際的に確立されつつあり, かつ GLP 規制の施行と共に実験設備, 人員等の充実しつつあることがこの「ランキングづけ」の発想を生み出したとも考えられる.

勿論, この「ランキングづけ」以前にも, 「定性的」な意味での発癌性試験の評価の試みはなされているので, 先ずそれを解説してみたい.

IARC では, 1971年から化学物質のヒトに対す

る発癌性の評価を行っているが, 1978年には, 蓄積した 456 種の化学物質に関する発癌性のデータの再評価が行われ, そこで一つの提案が出されている⁴⁾. それによれば, 発癌性試験による発癌性を “Sufficient evidence” 及び “Limited evidence” の2種に分類している. “Sufficient evidence” とは先ず, 悪性腫瘍の高い発生率を示す実験であることが大前提である. 更にそれが, (1)種々の種又は系統, (2)種々の実験 (投与経路又は投与量) においても生じ, (3)異常な程度 (発生率, 部位, 種類, 発生の時期) にまで見られる場合である. 付加的な因子としては, 発生率の用量相関関係, 変異原性の結果及び既知発癌物質との化学構造の相関などがあげられている. 一方, “Limited evidence” というのは, 上記の様々な結果が定量的に限定されている場合と定性的に問題のある場合を意味する. 後者の定性的に限界のある例としては, 自然発生率の高いマウスの肝又は肺腫瘍の発生率を増加させた場合があげられている. 明らかなように, この分類は全く定性的なものであり, 発癌性の強弱をわずかに示しているとは言えないものである.

その後, 1980年に Griesemer & Cueto は, 上記の IARC の評価法をふまえて, やや複雑な方法を考案し米国国立ガン研究所のコントラクトで行われた 198 の発癌性試験を評価した⁵⁾. この方法は, Step 1~4 を設定して段階的に評価を進めて行くものである.

先ず, Step 1 では, 発癌性試験での方法及び施行を5つの因子について評価をする. 即ち(1)被検物質の確認がされているか, (2)実験動物数は適当か, (3)被検物質が実験動物のほとんど全生涯に亘って投与されているか, (4)生存率は十分に高いか, (5)適当なる実験対照群の動物があるか, であ

る. この Step 1 から, 実験は(A)適当なもの, (B)不適当なものに分けられる.

Step 2 では, 悪性腫瘍の発生率の増加を問題とする. 特に, 悪性腫瘍の発生が, 自然発生的に極めて稀な臓器か, もしくは高い臓器 (1%以上) においてかが注意されている. 更にある特定の部位の悪性腫瘍の発生率の増加は, 適当な対照群の動物に比べて統計学的に有意差を示し, 年齢と共に増加を示さねばならない. これらに照らし合せてみて, 発癌性試験の結果を3種に分類できる. 即ち, 悪性腫瘍の(A)発生率の増加を示すもの, (B)発生率の増加を示さないもの, (C)判断が不可能なもの, である. (C)に入る実験は, 発生率が過去の対照群 (historical control) の率よりは高いがその実験の対照群 (matched control) よりは低い場合を示している. この(C)の場合には, 発癌性を疑わしめるが, 未だ結論は出せず, 更に実験を要するものとして取り扱うのである.

Step 3 では, Step 2 で(A)悪性腫瘍の発生率の増加を示した実験について, 更に2つの観点から評価する. すなわち(1)種々の実験 (投与経路, 投与量, 両性の動物) において見られているか, (2)異常な程度にまで (発生率, 発生部位, 腫瘍組織像, 発生時期) 生じているかの2つである. 従って当然各々の実験は, (A)両者共に見られるもの, (B)どちらか一方の見られるもの, (C)両者共に見られないものの3種に分類できることになる. 同様に, Step 2 で, (B)発生率の増加を示

さないものと判断された実験については, (D)適当な実験と(E)限界を示す実験とに分類される.

Step 4 では, Step 3 での発生率の結果が, (A)2種の動物にも生じているのか, (B)1種の動物にのみ生じているのかを問題とする. 勿論, この場合には2種の動物において見られることをより重要視するわけである. Step 3 での, (A)(B)(C)(D)についてそれぞれが2つの結果に分かれることになる.

最終的にこれらの分類に基づいて, 発癌性の強さを9段階に分けて評価する方法を提唱している. grade 1 から9の順に発癌性は弱いと解釈するのである. 以下, 順を追って説明を加える (表1).

- grade 1. Step 3 で, 2種の動物が非常に強い発癌性を示した場合
- grade 2. Step 3 で, 1種の動物が非常に強い発癌性を示し, 他の1種ではやや弱い場合.
- grade 3. Step 3 で, 1種の動物が非常に強い発癌性を示し, Step 2 で, 他の1種が発癌性を示さない場合.
- grade 4. Step 3 で, 2種の動物共にやや弱い発癌性を示した場合.
- grade 5. Step 3 で, 1種の動物がやや弱い発癌性を示し, Step 2 で, 他の1種は発癌性を示さない場合.
- grade 6. Step 2 で, 1種又は2種の動物で, 発癌性が判断不可能な場合.

表 1 発癌性の強弱の段階 (Griesemer & Cueto, 1980)

強 度 (grade)	強い発癌性 (step 3 で)	充分な発癌性 (step 3 で)	発癌性無し (step 2 で)	判断不可能 (step 2 で)
1	× ×			
2	×	×		
3	×		×	
4		× ×		
5		×	×	
6				× ×
7			× × ¹⁾	
8			×	
9			× ×	

×印は一種の動物を表す.

1) 不完全な実験の場合

grade 7. 不十分な条件の実験で、1種又は2種の動物が発癌性を示さなかった場合。

grade 8. Step 2で、1種の動物でのみ実験が行われ、発癌性を示さなかった場合。

以上が、Griesemer & Cueto による評価法であるが、前述の如くこの方法を適用した発癌性試験は、米国国立ガン研究所のガイドラインに従ってのコントラクトの下に行われたものであり、2種の動物を用いて一定の実験条件下にあるものである。従って、他のガイドラインによる実験の場合には、評価の際に問題が生ずることが予想される。更にこの評価法の問題点の一つは、発癌性の強度を全て動物による発癌性試験の結果に基づいて評価している点である。彼らは、既知発癌物質との化学構造の相関性、変異原性の強さ及び前癌性病変の発生率などはあえて考慮しなかったと述べている。それにもかかわらず、この Step をふんで評価する方法はかなり客観性をおびた容易な方法が開発されたと見るべきであろう。これらの提案に更に他の要素を加えて、点数制を導入して見た案が、Squire による「ランキングづけ」である。

説明に入る前に3つの点をあらかじめ理解しておく必要がある。第1は、どのような化学物質といえども疫学的にヒトに対する発癌性が証明されている事実は最も説得力があること。逆に言えば、そのような化学物質が動物で発癌性が弱いか陰性であったとしても問題にはならないということである。第2には、最近目覚ましい発達を遂げつつある *in vitro* 及び *in vivo* での short term test は、現時点では法規制の際の決定的な根拠となり得るだけのデータが蓄積していないという事実であり、やはりヒトの代用品としての実験動物の結果が最優先していることである。第3には、この方法に適用が可能な発癌性試験においては、少なくとも2種の動物に種々の投与量で、投与が行われていなければならない。その他の実験方法及び結果に関しても、現時点の国際的に通用するガイドラインから見て、評価に耐え得るものであり、発癌性に関しては疑いのない結果を示していなければならないと限定されている。これらの内の一つでも満足しないものは先ずこの方法による評価に

表2 動物発癌物質にランク付けを行う方法 (Squire, 1981)

因子	点数
A. 影響を受けた動物種の数	
2以上	15
1	5
B. 1又はそれ以上の動物種における組織学的に異なるタイプの悪性腫瘍の数	
3以上	15
2	10
1	5
C. 投与群において誘発された悪性腫瘍の適当な対照群における自然発生率	
1パーセント未満	15
1～10パーセント	10
10～20パーセント	5
20パーセントを超えるもの	1
D. 用量相関関係(2年間の1日当たり体重1kg当たりの累積経口投与相等量)*	
1マイクログラム未満	15
1マイクログラム～1ミリグラム	10
1ミリグラム～1グラム	5
1グラムを超えるもの	1
E. 誘発腫瘍における悪性腫瘍の割合	
50パーセントを超える	15
25～50パーセント	10
25パーセント未満	5
悪性腫瘍無し	1
F. 適当な組合せの試験で測定された遺伝毒性	
陽性	25
疑陽性	10
陰性	0

* 体重1kg当たりの推定飼料消費量100gとした場合。点数は吸入その他の投与経路に対してもつけることは可能であろう。

は適さないのである。当然、発癌性試験が一定レベルに達してきている最近のデータのみが対象となり、かなり過去のそれはほとんどが対象外になることはやむを得ぬであろう。

「ランキングづけ」には、6つの因子が選ばれている(表2)。それぞれは過去の多くの発癌性試験及び遺伝毒性試験の結果から、妥当性が最も高いと考え得るものである。

Factor A では、種数を問題にしているがこれは既知の発癌物質が2種以上の動物において発癌性を示している事実に基づいている。

Factor B は、腫瘍の発生した臓器数と動物種の数に因るものであるが、これも多くの発癌物質が1種類以上の動物で1個以上の臓器を標的臓器とすることによる。多くの動物種で多くの臓器に発癌性を示す事実は、代謝、薬理、解毒機構等を考えれば、哺乳類の一種であるヒトにも発癌性を疑わしめることは自明であろう。

Factor C では、投与群で腫瘍発生率の標的となった臓器の、実験対照群における発生率を問題とする。腫瘍の自然発生率は、実験動物では一般的にヒトに比べて著しく高いことが知られており、これは動物での化学物質に対する著しく高い感受性のためか又は動物には前癌状態の細胞がかなり多く存在しているとも考えられている。この点での動物とヒトの違いを考えれば、動物での自然発生率の低い臓器に発癌性を示す物質はより強度なものであると言える。

Factor D では、用量相関関係が取り上げられている。特に、腫瘍発現までの時間と用量の大小は最もよく発癌性の強度を示すマーカーと考えられてきた。しかし、この腫瘍の潜伏期間の算定はガイドラインに従った発癌性試験では、時期を区切ったデータを得られないので通常不可能である。そこで、その代りに、化学物質の2年間の累積摂取量の大小により評価することになっている。

Factor E では、誘発された腫瘍の悪性度についてふれている。IARC の評価では、すべて悪性腫瘍の発生率のみを問題としてきたが、ここでは良性腫瘍の発生率も含めて考慮されている。すなわち、悪性腫瘍の比率が高い程、強度の発癌性を示すものとするのが当然であるが、同時に良性腫瘍から悪性腫瘍への移行の問題も取り入れられているのである。

Factor F では、これまで取り入れてこられなかった遺伝毒性も考慮されている。しかしこの場合には、特定の試験法が列記されておらず、ある数種類の試験法の結果をまとめて、陽性、疑陽性又は陰性とし取り扱うようにしてある。

これら6つのFactor を見てみると2つに大別できることがわかる。すなわち、Factor A 及びFは、その化学物質に対する総合判断であり、B・C・D 及びEはその化学物質について行われた

表3 総因子点数に従って動物発癌物質を5つのクラスに分類する方法


総因子 点 数	発癌物質 のクラス	法規制上の選択
86～100	1	法規制又は禁止
71～ 85	2	
56～ 70	3	
41～ 55	4	
41 未満	5	
		いくつかの選択（措置せ ず、限定使用、表示、公 衆の教育）

表4 提案された方法に基づく10の発癌物質のおおよそのランク

発癌物質	点数	ランク
アフラトキシン	100	1
ジメチルニトロソアミン	95	1
塩化ビニル	90	1
トリス(2,3-ジブロプロピル)ホスフェート(Tris)	90	1
2-ナフチルアミン	81	2
クロロホルム	65	3
NTA	51	4
クロルデン	40	5
サッカリン	36	5
DDT	31	5

発癌性試験の中、最も強い結果を示した試験に対する個別判断である。

以上、6つの因子それぞれに点数をつけていけば、表3に示すように総点数は最低13点、最高100点となる。この点数づけの際に注意すべきことは、もしも発癌性が一種以上の動物又は性、各種の投与法、投与量などで陽性であった時には、その最も感受性の高かった成績をFactor B, C, D, E に当てはめることである。

更にこの総点数に従って、発癌物質の強度を5つのクラスに分類し、行政上の法規制の際に用いようとするのである。表4には、これまでに適切な発癌性試験が行われた化学物質の中から10種について、点数づけとランキングが行われている。今までかなり印象的にしかその発癌性の強弱を理解していなかった化学物質が、かなりはっきりした形でその強弱が示されているように思われる。厚生省がん研究助成金による研究班の一つとして、

表 5 厚生省小田嶋班で行われた発癌性試験のランキングづけ

物質名	用途	A	B	C	D	E	F	総合点	クラス
AF-2	食品添加物	15	10	15	5	5	25	75	2
フェナセチン	医薬品	15	15	15	1	15	10	71	2
臭素酸カリウム	食品添加物	5*	15	10	5	15	10	70	3
スルピリン	医薬品	5	5	10	5	5	25	55	4
バルビタール	医薬品	5	5	15	5	10	10	50	4
BHA	食品添加物	5	5	15	5	10	10	50	4
過酸化水素	食品添加物	5	5	15	5	5	10	45	4

* マウスは雌のみで陰性

「変異原性物質の動物発癌テストに関する研究」班がある⁶⁾。1974～1978年度にかけて、29種の化学物質について国際的に通用するガイドラインに従って、発癌性試験が行われ、その中7種で発癌性が証明された。試みに、Squireの方法によってランキングづけしてみた結果が、表5である。各々の化学物質に対する法規制は、このランキングづけからみて妥当のように思われる。以上で「ランキングづけ」に対する解説を終り、以下この方法に対する問題点についてふれてみたい。

まず、全般的には原著を読んでみて気付くことであるが、各々のFactorについての点数の元となった根拠が示されていない点があげられる。Factor AからEまでが、同様に15～1点に価値づけされていることも問題であろう。Factor Fでは、変異原性が如何に強くとも、それを25点、すなわち100点中1/4の価値を与えることは、現時点で変異原性と発癌性の相関関係が未だ確立していないことを考えると疑問を感じざるを得ない。各々のFactorの中の段階についての点数づけには、更に多く発癌性試験のデータに基づいて妥当な方法で決定されねばならないと思う。

Factor Cの自然発生腫瘍の発生率に関しての問題としては、ある種の系統のマウスにおける肝及び肺腫瘍があげられる。これらは遺伝的に発生率が高く20%を越えることが多い。そして一方には、発癌物質の標的臓器として、肝及び肺は非常に頻度の高いという事実がある。とすれば、マウスを用いて発癌性試験を行った場合、標的臓器が肝及び肺であったときには点数づけからは無視される程低くなるという結果になる。マウスでは、肝及び肺に対しては発癌物質（イニシエーター）

ではなく、プロモーターしか存在しないような結果にもなることが考えられる。

Factor Dは、腫瘍の潜伏期間をやむを得ず化学物質の累積投与量から算定しようという試みであるが、腫瘍の発生時期の早い遅いの問題は非常に重要な因子であるので、このFactor Dの他に新しいFactorとして設定する必要がある。もっともその場合には、発癌性ガイドラインの中に更にサテライト群として、例えば、12カ月、15カ月もしくは18カ月の時点で、高濃度群の雌雄10頭ずつを病理組織学的に検索するという項目が加えられなくてはならない。

Factor Eの悪性腫瘍の割合というのは、勿論最も重要なことで、これの統計学的な有意差が全ての発癌性試験の評価の土台となるものである。しかし、あらためて一つのFactorとして点数づけを行おうとする時には大きな壁にぶつかることを感ずる。何故なら悪性腫瘍の頻度を出すためには、当然ながら各々の腫瘍の詳細な病理組織学的検討を経て悪性か否かを判断しなければならず、これが多くの臓器においてはなはだ主観的要素を含んでくることは、筆者のみならず腫瘍病理学、特に実験動物のそれに従事されている研究者にとっては日常よく経験されることであろう。実験動物の腫瘍の病理組織学的診断に関する確固たる教科書が未だなく、一方世界中でしばしば病理組織学的診断に関するワークショップなるものが開かれている事実がそれを物語っているともいえよう。実に、「言うは易く、行うは難し」は、このFactor Eに関してであり、これをきっかけに早急に実験動物の腫瘍病理組織の診断に関しての統一の見解の出現が望まれるのである。

最後に問題となるのは、この「ランキングづけ」はあくまでも実験動物に対する発癌性の強度を現わしているものであり、はたしてその点数に基づいて5つのクラスに分類し、法規制に進む、すなわち人間に外挿してよいかという点である。Squireもふれている如くに、ある化学物質が発癌性を示し、それが「ランキングづけ」されたとしても更に法規制の前にその化学物質の、(1)性質、(2)用途、(3)人間への暴露の種類、程度、(4)暴露される人間の数、(5)健康上の利点、(6)経済上の利点などが考慮されねばならぬのであろう。同時に筆者の意見では、その他に人間の組織又は細胞を用いての代謝、解毒に関するデータが必要と思われる^{7,8)}。当然ながら種特異性を考えれば実験動物と人間とである化学物質に対する代謝過程が異なる場合にはその危険性は極めて低いと考えられるからである。

すなわち、ある化学物質の発癌性試験を評価するプロセスとして、(1)動物への発癌性の強さによるランキングづけ→(2)人間への影響についての生物学的、社会経済学的、環境科学的見地からのランキングづけ→(3)行政上の法措置と進むことが妥当と思われる。(2)に関しては、今後の検討を待たねばならないが。

ガン予防という大きな目的のための手段の一つとして、環境化学物質の発癌性の検討、そして発癌性を有する化学物質の人間への暴露の防止がある。現時点では、疫学による評価が最も信頼度が高いと考えられてはいるが、到底全ての化学物質についてデータを集めることは不可能である。そこに実験動物が登場してくるわけであり、特に中動物（イヌ、サル）はある種の化学物質に対する毒性学的、薬理学的反応が人間に類似していることも知られている。しかしながら、これら中動物を発癌性試験に用いることは、時間経済の面から一般的に不可能であることも明らかである。最終的に、現在では小動物2種以上を用いての発癌性試験が国際的に広く普及しているが、これら小動物と人間との差は余りにも大きい。すなわち、発癌性試験で「クロ」と出ても直ちにその化学物質

の全面的禁止をすることは、その物質によってもたらされてきたプラスの面をあまりに単純に否定することになる。しかしながら、動物による発癌性試験の結果の評価法が確立しない内は、人間への外挿も無理な話である。発癌性試験の方法論がほぼ国際的に統一化され、実験設備なども目覚ましい発展進歩を遂げつつある時点で、このSquireの提案した「ランキングづけ」は未だ問題点を含みながらも、一つのユニークな試みであり、大きな前進である。今後、多くの研究者がよりよくこの提案を理解し、更に発展させて行くことを望むものである。

最後に、このランキングづけに対する問題点に関しては、本年7月に行われた厚生省林班班会議における討論を参考にしたので、日本でのこの分野における第一線の研究者による批判と解釈できることを一言付け加えたい。

文 献

- 1) Squire, R. A., Ranking Animal Carcinogens. —A proposed Regulatory Approach. Science, 214, 877～880 (1981).
- 2) Guidelines for Carcinogen Bioassay in Small Rodents. U. S. Department of Health, Education and Welfare (1975).
- 3) Lijinsky, W., Wolfe, S. M. & Martin, J. G., Should the Delaney be changed?. Chemical and Engineering News. 27, 24～46 (1977).
- 4) International Agency for Research on Cancer. Chemicals with Sufficient Evidence of Carcinogenicity in Experimental Animals—IARC Monographs Volumes 1～17, IARC Internal Technical Report No. 78/003, 1～20 (1978).
- 5) Griesemer, R. A. & Cueto, Jr., Toward a classification scheme for degrees of experimental evidence for the carcinogenicity of chemicals for animals. IARC Scientific Publications No. 27., 259～282 (1980).
- 6) 厚生省がん研究助成金による研究報告集 (1980).
- 7) Autrup, H. et al. Metabolism of bezo(a)pyrene by cultured tracheobronchial tissues from mice, rats, hamster, bovines and humans. Int. J. Cancer, 25, 293～300 (1980).
- 8) Autrup, H. et al. Metabolism of aflatoxin B1, bezo(a)pyrene and 1,2-dimethylhydrazine by cultured rat and human colon. Teratog. Carcinog. and Mutag., 1, 3～13 (1980).

日本環境変異原学会会則

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、特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、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、所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込みのうえ、入会の可否は評議員会において決定する。

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. Mutation Research 誌の特別巻を特価で購入配布する。
3. 国際環境変異原協会に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
4. 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 本会に次の通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、 会計監査 2名および評議員若干名。

評議員は全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から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2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 本会に名誉会員を置く。

附 記

1. 本会則は昭和53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1111番地に置く。
3. 正会員および賛助会員の会費はそれぞれ年額3,000円および1口20,000円とする。
ただし、Mutation Research 誌の特別巻の配布を希望するものは、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昭和57~58年度評議員名簿

(五十音順)

氏 名	所 属
石 館 基	国立衛生試験所
岩 原 繁 雄	食品薬品安全センター
賀 田 恒 夫	国立遺伝学研究所
河 内 卓	国立がんセンター研究所
菊 池 康 基	武田薬品工業株式会社中央研究所
黒 田 行 昭	国立遺伝学研究所
近 藤 宗 平	大阪大学医学部
杉 村 隆	国立がんセンター研究所
佐々木正夫	京都大学放射線生物研究センター
佐 藤 茂 秋	国立がんセンター研究所
白 須 泰 彦	残留農薬研究所
田 島 弥 太 郎	国立遺伝学研究所
武 部 啓	京都大学放射線生物研究センター
田ノ岡 宏	国立がんセンター研究所
土 川 清	国立遺伝学研究所
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
早 津 彦 哉	岡山大学薬学部
松 島 泰 次 郎	東京大学医科学研究所
村 上 昭 雄	国立遺伝学研究所
吉 川 邦 衛	国立衛生試験所

日本環境変異原学会入会申込書

昭和 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

フリガナ	
氏 名	印
ローマ字つづり	
生 年 月 日	年 月 日

貴学会に入会いたしたく必要事項を書き添え、評議員の推薦を添えて申し込みます。

勤務先および職名 (和)

(英)

〒

勤務先所在地 (和)

(英)

最終学校と卒業年次

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)

加 入 学 会 名 (本学会以外の)

研 究 領 域 (下記のあてはまる項の 2, 3 を○で囲んでください)

- | | | | |
|------------|-----------|----------|---------|
| 1. 変異原 | 2. 検出系 | 3. 毒 性 | 4. 発生異常 |
| 5. 汚 染 | 6. 疫 学 | 7. 遺 伝 | 8. が ん |
| 9. 微 生 物 | 10. 高等動物 | 11. 高等植物 | 12. 食 品 |
| 13. 気体・粉じん | 14. 医 薬 品 | 15. 農 薬 | 16. 代 謝 |
| 17. 分子機構 | 18. その他 (|) | |

ここに記入して下さい

推 薦 者 (日本環境変異原学会評議員)

勤務先および職名

氏 名 (署名)

印

入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

編集後記

東京・東條会館で開催されました第10回研究発表会は、会員皆様の御協力により多大の成果をおさめることができました。本来ならばシンポジウムの記録を中心に編集すべきところですが、今回は特に、変異原性試験結果をどのように定量的に取り扱うべきか、その試みに関する話題を中心に掲載させていただきました。従来、変異原性試験の結果を単に陽性であるか、陰性であるかという定性的評価に終る傾向がありました。しかし、多くのデータが蓄積した今日では、変異原性の強さには物によって100万倍あるいはそれ以上の開きがあることがわかってきました。この問題は恐らく発癌性の強さにも関連してくる重要な課題と思われます。この趣旨に基づき御多忙のところ、貴重な論文を寄稿下さいました諸先生に厚く御礼申し上げます。

(石館)

昭和57年9月25日 印刷
昭和57年10月20日 発行

編集責任者 国立衛生試験所
石 館 基
〒158 世田谷区上用賀 1-18-1
TEL. 03 (700) 1 1 4 1

印刷所 サンヨー印刷株式会社
〒112 文京区後楽 2-21-8
TEL. 03 (816) 6 8 8 1

