

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 証 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. 癌原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. 癌原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

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

している。また、上記いずれかの試験で陽性となつ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つてゐる。

現在のところ、Ames テストで陽性となつたものには、酸化防止剤のエリソルビン酸、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ゐる。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ゐる。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つてゐる。

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 種類が陽性となつたが、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

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く）。

（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

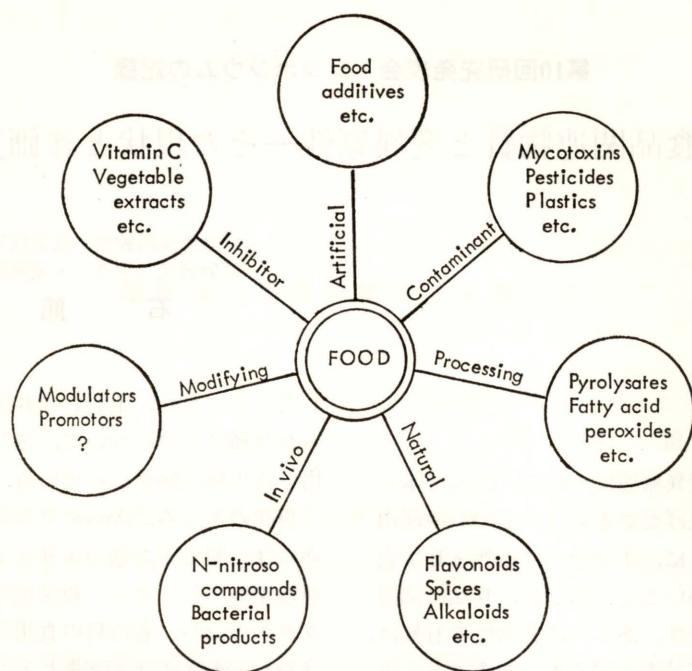


図 1 食物関連物質の種類

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、今までのところ、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 試験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つたが、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い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 試験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、スペイス、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 テストを行ってみると、その活性は調理時間（網焼き）につれて上昇していく。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 MeIQx 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 試験、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ル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シ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、コショウのペ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、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る。

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できる。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護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ふ。

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、さらに検討していく必要があろう。

(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、正当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ふ。

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つけるのは早計であるといふ。

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きなくなる。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、ある特定なマウスを使用する必要もなく、ラットその他の中性系統を用い、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き、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、卵母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、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ろう。

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。今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、今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様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、植物性纖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る。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る。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、問題提起に終ったが極めて複雑であるという印象を深くした。

Man—The Ultimate Test Organism

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.

クラスター分析と最小西乗法の組み合わせによる
突然変異毒性物質の分類

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つかしい。

—寺田寅彦—

1. クラスター分析と最小

突然変異原性物質の分類

滋賀医科大学・化学

今 村 詮

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の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る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つてことになる。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

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、人手を介せずに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としたこと。
 - 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、使い分けることができる。

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。

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（これを平方和といふ）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。今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所以、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ができる。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があるので、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に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見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 モデルで得られるボアソン分布の指數関数をティ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-反応曲線とともに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	Dose	0	250	1000	2500	5000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
Acetaminophen	6	Dose	0	250	1000	2500	5000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	137	123	125	113	118	118	(rev/p)
		1.000	0.898	0.912	0.825	0.861		
Saccharin sodium	6	Dose	0	500	2000	5000	10000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	94.5	103	96	96	96	96	(rev/p)
		0.917	1.000	0.932	0.932	0.932		
Barbital	4	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	94.5	89	97	107	94	94	(rev/p)
		0.883	0.832	0.907	1.000	0.879		
Urethan	4	Dose	0	500	2000	5000	10000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	133	120	129	150	128	128	(rev/p)
		0.887	0.800	0.860	1.000	0.853		
Thioacetamide	4	Dose	0	500	2000	5000	10000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	147.5	148	121	118	131	131	(rev/p)
		0.997	1.000	0.818	0.797	0.885		
Thiourea	4	Dose	0	500	2000	5000	10000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	147.5	173	163	136	141	141	(rev/p)
		0.853	1.000	0.942	0.786	0.815		
Fluorene	3	Dose	0	5	20	50	100	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	191.5	151	205	151	165	165	(rev/p)
		0.934	0.737	1.000	0.737	0.805		
Stilbene	3	Dose	0	10	40	100	200	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	191.5	171	203	217	179	179	(rev/p)
		0.882	0.788	0.935	1.000	0.825		
Aminopyrine	3	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	94.5	100	94	111	95	95	(rev/p)
		0.851	0.901	0.847	1.000	0.856		
Aniline HCl	4	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	191.5	139	179	141	178	178	(rev/p)
		1.000	0.726	0.935	0.736	0.930		
Epsilon - Caprolactone	6	Dose	0	0.5	2	5	10	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	114.5	131	115	114	119	119	(rev/p)
		0.874	1.000	0.878	0.870	0.908		
N-Methylurea	6	Dose	0	50	200	500	1000	($\mu\text{g}/\text{p}$)
	Revertant	96.5	86	101	86	95	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、厳密にいえば、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とには、 S の値だけでは判定できず、 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	Dose	0	10	50	100	200	(μ g/p)
4-Amino-biphenyl	1	Dose	0	101	295	2108	4212	3992 (rev/p)
		Revertant	0.024	0.070	0.500	1.000	0.948	
Nitrofurazone	5	Dose	0	0.25	1.0	2.5	5.0	(μ 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	(μ 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	(μ 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	(μ 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	(μ 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	(μ 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	(μ 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	(μ 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	(μ 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	(μ 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ういう特性をもっている物質の集合であるかを見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と、如何に大がかりに計算しても、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
2	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
	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
4	Nitrofurazone	5	0.052	0.040	-0.008
	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
5	4-Amino-biphenyl	1	-0.041	0.187	0.067
6	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、今まで河内らにより化合物

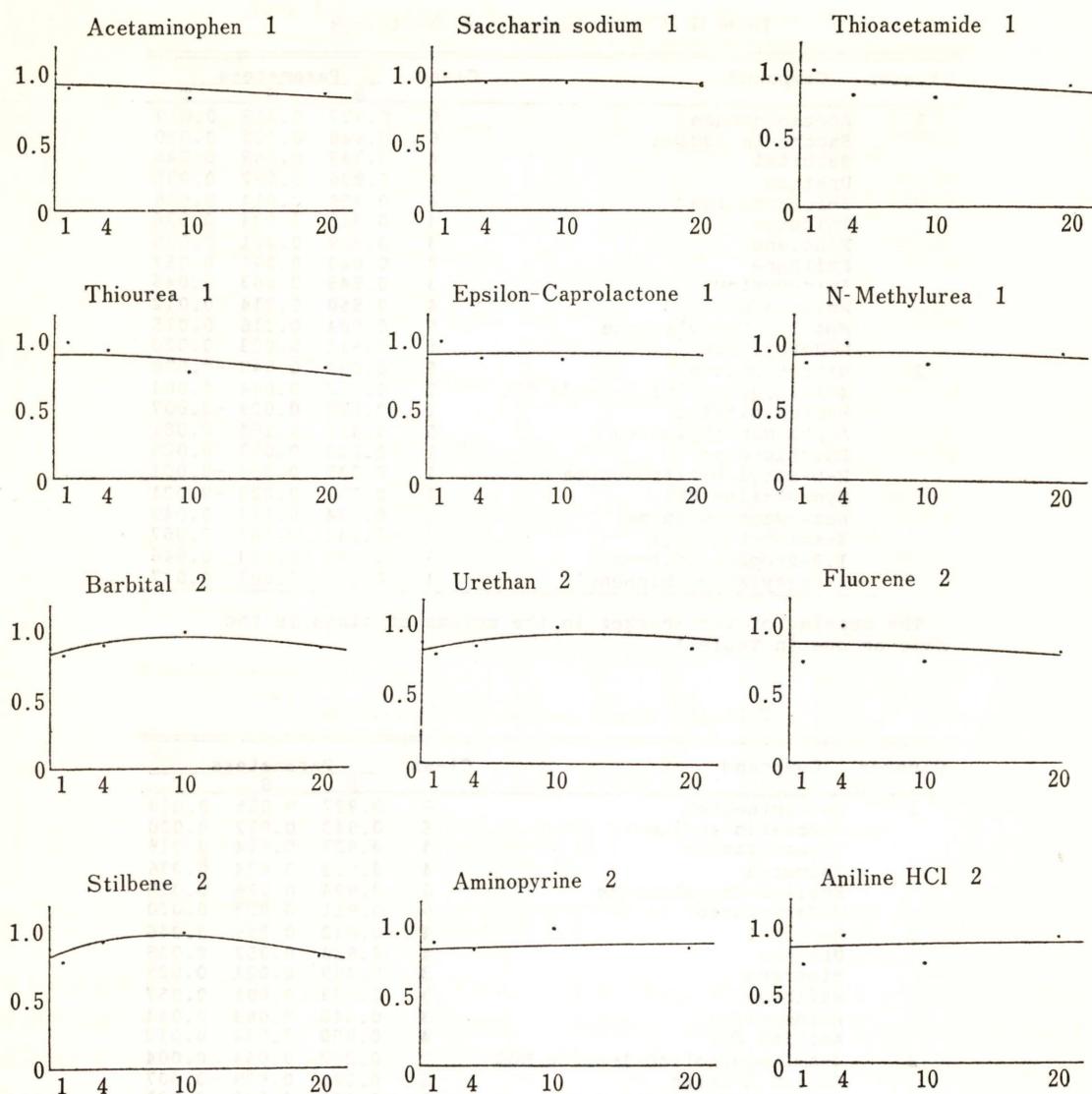


Fig. 1-1. Dose-response curve of compounds

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

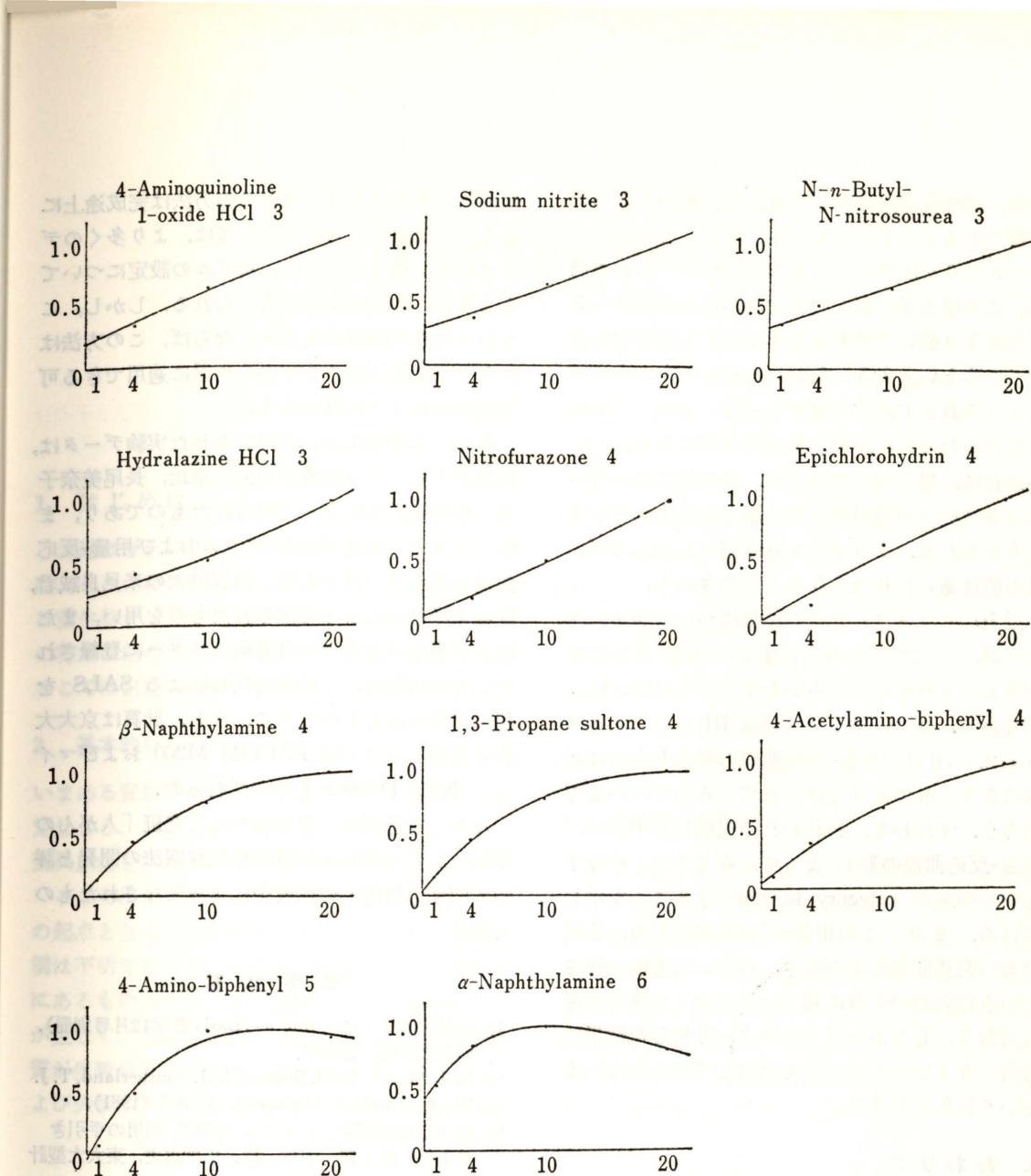


Fig. 1-2. Dose-response curve of compounds

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 の値のちがいによっている。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。いかえれば、現在のモデルでは、負の値になつてゐ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くば、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と思われる。

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、弾塙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

- 統計手法ア・ラ・カルト (Basis 数学12月号別冊), 現代数学社, 1979年。
- L. E. Myers, N. H. Sexton, L. I. Southerland, T. J. Wolff, Environ. Mutagen., 3, 575 (1981).
- 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、東大型計算機センター, 1979年。
- 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

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

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変化が生じて、これが子孫に伝わるために、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

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

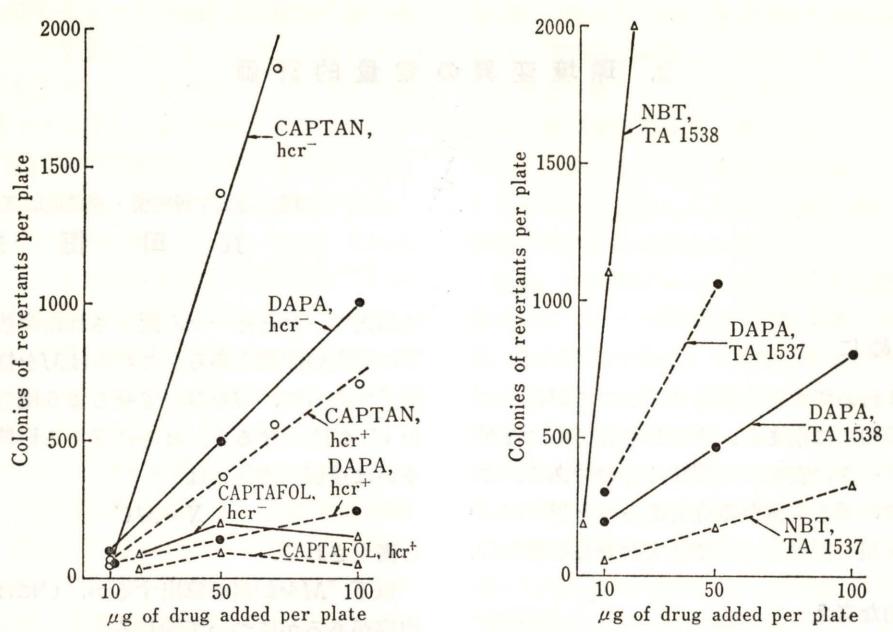


図 1 比活性の算出に利用されたデータの例 (Kada et al., Mutation Res, 26 : 243~248, 1974)

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 ⁺ 復帰変異体数 (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 10⁷ 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

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、異なる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 の総説で論じたが^{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⁾が著名なように、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、ヒスチジンなど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は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つ

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ことでなくてはならぬ。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、純粹に 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ることは、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述べたい。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。

終わりに

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、ある特定な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められよう。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・バンディン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

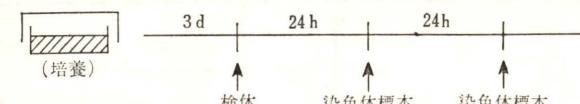
表 1 MNNG による染色体異常誘発性と染色体変異細胞の分離

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

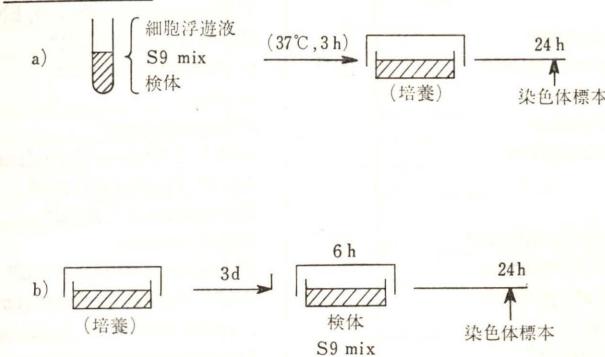


図 1 培養細胞による染色体異常試験
—CHL を用いる簡便法—

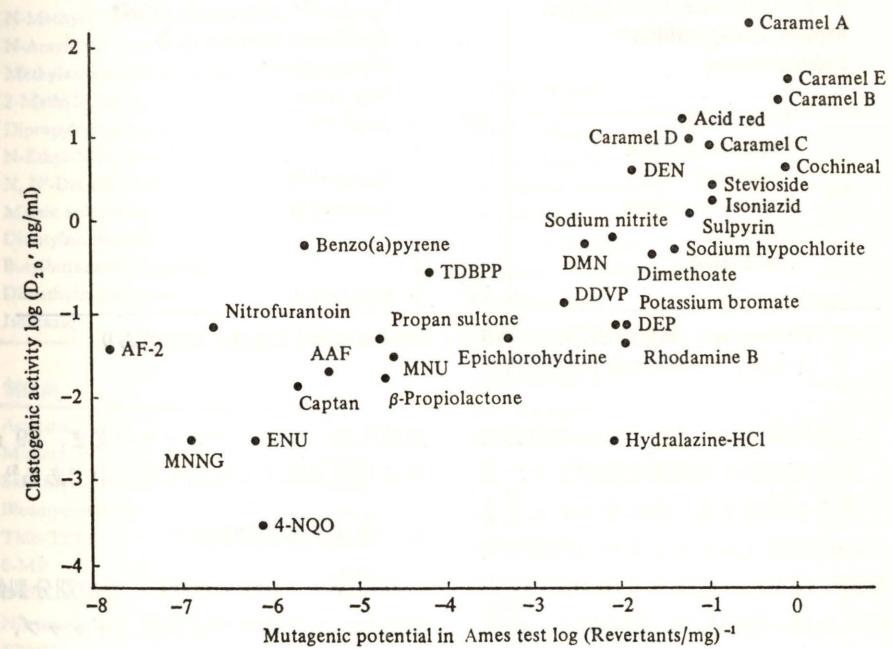


図 2 Ames 試験および *in vitro* 染色体異常試験で得られた強さの比較

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

 D_{20} (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)に細胞を採取し、塩化カリ(0.075M)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 D_{20} 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	Aminacrine-HCl
Trp-P-1 (a tryptophan pyrolysate)	42000
N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	9333
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	880
Hydralazine-HCl	583
Trp-P-2 (a tryptophan pyrolysate)	333
N-Methyl-N-nitrosourethane	260
β -Propiolacton	250
N-Butyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	233
N-Propyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	113
Styrene oxide	96
Butyl-(1-acetoxybutyl) nitrosamine	24
N-Amyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	23
N-Ethyl-N-nitrosourethane	21
N-i-Butyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	16
N-Butyl-N-nitrosourethane	11
Propan sultone	9
N-Methyl-N-nitrosourea	8
N-i-Butyl-N-nitrosourea	8
N-Propyl-N-nitrosourea	8
Rhodamine B	7
N-Butyl-N-nitrosourea	7
N-Methyl-N-acetyl nitrosourea	4
N-Amyl-N-nitrosourea	3
Methylazoxymethanol acetate	3
2-Methyl-DAB	3
Dipropylnitrosamine	3
N-Ethyl-N-nitrosourea	2
N, N'-Dibutyl-N-nitrosourea	2
Maleic anhydride	1
Dibutylnitrosamine	1
Butylbutanolnitrosamine	1
Dimethylnitrosamine	1
Isoniazid	1
工業用化学物質	
Ethylacrylate	3200
β -Propiolactone	2267
<i>o</i> -Phenylenediamine	2000
Styrene oxide	1567
<i>m</i> -Phenylenediamine	1267
2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	800
Formaline	733
Propan sultone	728
Acrylonitrile	600
Epichlorhydrin	576
Methylacrylate	533
Ethidium bromide	533
4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	267
4-AQO	205
THPC	200
TDCPP	96
Quinoline	47
TDBPP	0
制癌剤	
Actinomycin D	696000
Mitomycin C	470000
Safraamycin A	190000
Bleomycins-HCl	51000
Thio-TEPA	23200
6-MP	11000
5-FU	9280
Nitromin	7625
EBNU	7000
BCNU	6200
Busulfan (100倍液)	10
Cyclophosphamide	4

THPC: Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride

TDCPP: Tris-(2, 3-dichloropropyl)phosphate

TDBPP: Tris-(2, 3-dibromopropyl)phosphate

表 3 続き

農薬類	
Captafol	2500
Captan	933
Carbaryl (NAC)	500
Maneb	200
Sumithion	120
Malathion	112
DDVP	80
DEP	48
Dimethoate	37
MTMC	16
Simazine (CAT)	0
MPMC	0
Simetryne	0
Ametryne	0
Atrazine	0
Prometryne	0
Propazine	0

DDVP: 2, 2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate
DEP: 2, 2-Trichloro-1-hydroxyethyl dimethyl phosphonate
MTMC: 3-Methylphenyl-N-methyl-carbamate
MPMC: 3, 4-Dimethylphenyl-N-methyl-carbamate

農薬類のニトロソ化体

NO-MTMC	12267
NO-MPMC	5067
NO-NAC	4933
NO-CAT	2066
(NO) ₂ -Simetryne	1500
NO-Atrazine	1000
NO-Prometryne	0
NO-Simetryne	0
NO-Ametryne	0

食品添加物

Propyl gallate	275
Hydrogen peroxide	144
Potassium bromate	116

Sodium nitrite	52
Sodium hypochlorite	18
Riboflavin	13
Ethyl β -hydroxybenzoate	12
Food Red No. 2 (Amaranth)	8
Food Red No. 3 (Erythrosine)	5
Food Green No. 3 (Fast Green FCF)	5
Food Yellow No. 4 (Tartrazine)	5
Food Blue No. 1 (Brilliant Blue FCF)	3
Sodium nitrate	2
Sodium dehydroacetate	1
Disodium glycyrrhizinate	1
Food Yellow No. 5 (Sunset Yellow FCF)	1
Trisodium glycyrrhizinate	0.8
Sodium d-tartrate	0.8
Sodium 5'-inosinate	0.8
Sodium benzoate	0.5
Acetone	0.4
Potassium sorbate	0.3
Saccharin sodium	0.3
Ethyl acetate	0.3
Food Red No. 106 (Acid Red)	0.2
Propylene glycol	0.2
Sodium 5'-cytidilate	0.1
Sodium 5'-uridilate	0.1
Food Red No. 102 (New coccine)	0

天然物類

クルクミン	400
クエルセチン	217
カフェイン	35
ラッカイン酸	6
ステビオサイド	5
カカオ色素	3
コチニール色素	3
ラック色素液	2
カラメル	2
醤油	2
塩	1
砂糖	0

1) D_{20} 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、 D_{20} 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 D_{20} 値を表 2 に示す。

D_{20} 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(D_{20} 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(冰点降下法による)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る、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、 D_{20} 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うことができ

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、用量一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一効果曲線を、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一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で、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いく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にする。

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 $N = \frac{1}{124.16} \times \frac{1}{10} = 4.8 \times 10^{20}$ 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

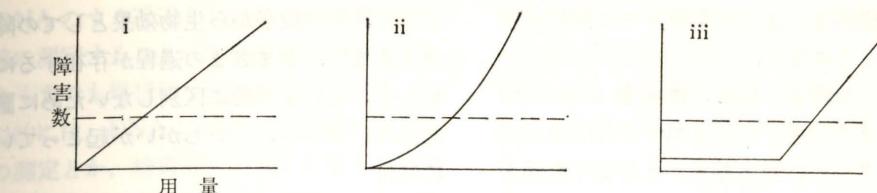


図1 変異原物質の用量と障害度との関係における3型

(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) 指数函数形を示す場合

(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るとはじめ障害が発現を見るようになるもので、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)とも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は可能であるが、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

化学変異原の用量一作用関係に關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、そのうち少數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つの異なる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の損傷だけが起こり、

第2の機構が働くかの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 に損傷が生じても、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と、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、实际上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、实际上、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、さまざまの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抽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こ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、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。ここ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來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ないであろう。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 porphyrin 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性化される。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、カイコ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一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つたとしても、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、程度こそ弱いが、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な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] ethyl-methanesulfonate. *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

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ぬようにするのが、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)には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かっている。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、次のようにかくことができる。

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

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:

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

制がん剤プロカルバジンをマウス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⁾:

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

マイトイシン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。

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

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

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。いかえれば、上述の x_{doub} 値で100ラドを割れば、

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。

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

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、マイトイシンCやENUの遺伝毒性の怖わざが、何となく肌でわかるような気持になる。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”的議論がなされている。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發揮するので、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ちじるしくゆがめる。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、前節に述べたマイトイシン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、自然率よりも有意に高く、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、少しづ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¹³⁾。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い。X線と化学物質によるDNA損傷の種類が違うので、そ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はなくて、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線のときは直線性

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¹¹⁾。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もわずかに高い。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とると、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のだから、マウスと同じ濃度の化学物質を摂取しても、性細胞が両者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

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とのとまどいとデラニーラー条項)

有名なデラニーラー条項は次のようにある:『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、デラニーラ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はじめポジティブになる、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 10^6 ものひらきがある。このような発癌物質をデラニーラ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。

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、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あるが、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りさせることができる。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

ントである。文献で見るかぎりでは、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」にとどまらない。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な：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。通常の発癌実験（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匹の大規模な実験でやっと有意に出る化合物は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」とする考え方がある。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 が小さくなつた時、 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、従つて、threshold level がある、といつている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つたものである。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。従つて、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つた。

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	$\Phi(\alpha + \beta \log_{10} d)$	($\beta > 0$)	—	$\beta > 0$
Logit	$[1 + \exp(-\alpha - \beta \log d)]^{-1}$	($\beta > 0$)	$\beta = 1$	$\beta > 1$
Weibull	$1 - \exp(-\lambda d^m)$	($\lambda, m > 0$)	$m = 1$	$m > 1$
One-hit	$1 - \exp(-\lambda d)$	($\lambda > 0$)	$\lambda > 0$	—
Multi-hit	$1 - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{(\lambda d)^i e^{-\lambda d}}{i!}$	($\lambda, k > 0$)	$k = 1$	$k > 1$
Multi-stage	$1 - \exp\left(-\sum_{i=1}^k \beta_i d^i\right)$	($\beta_i \geq 0$)	$\beta_1 > 0$	$\beta_1 = 0$

[†] 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.)

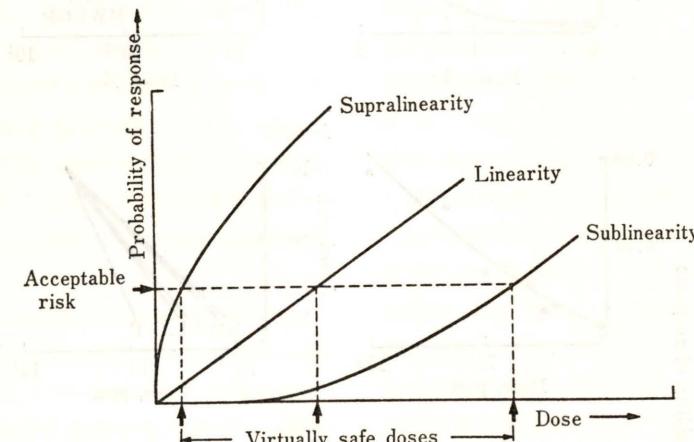


Fig. 1. Linearity, sublinearity and supralinearity at low doses.²⁰⁾

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（またはリセプター）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、リ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 の一般化であつて、response（発癌）の発現にはリ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

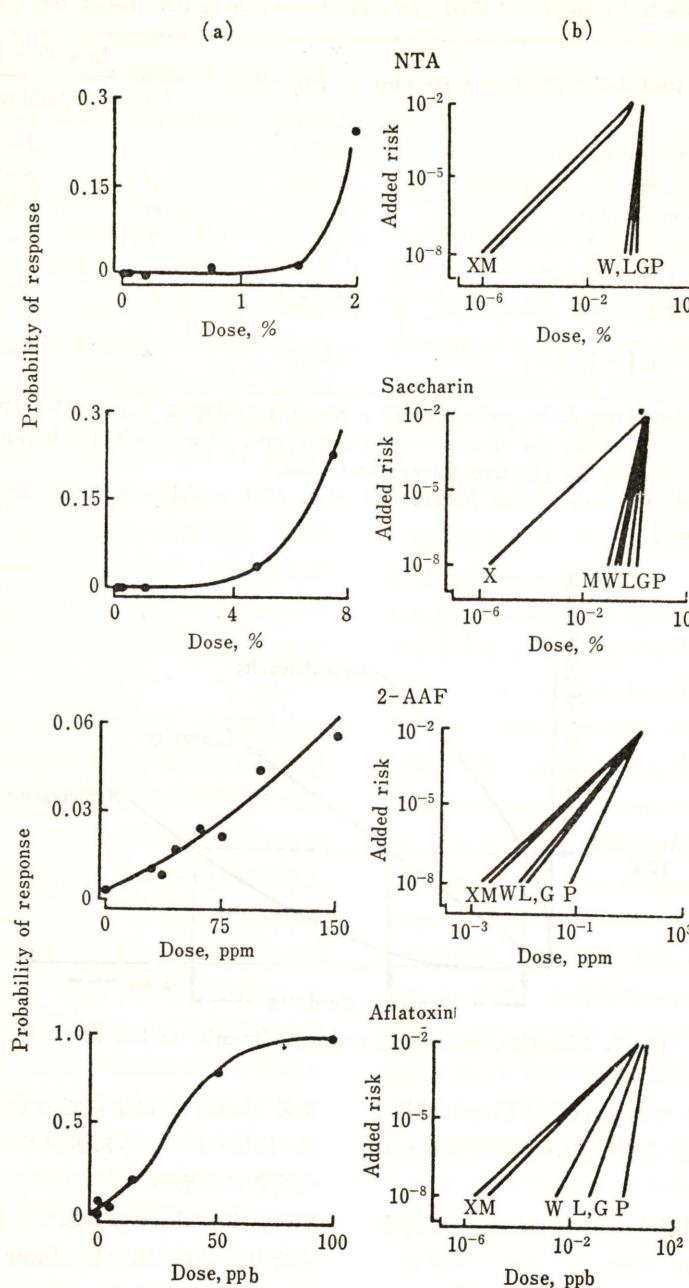


Fig. 2. (a) Weibull dose-response models fitted to the observed data for four compounds (nitrilotriacetic acid (NTA), sodium saccharin, 2-acetylaminofluorene (2-AAF) and aflatoxin) and (b) estimates of the added risk over background based on six extrapolation procedures: X—linear extrapolation; M—multi-stage 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にある。癌が発現したか否かという二分法的な (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別の 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 としたのには理由がある。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”的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 になるかというと：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）の場合には同じ 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。

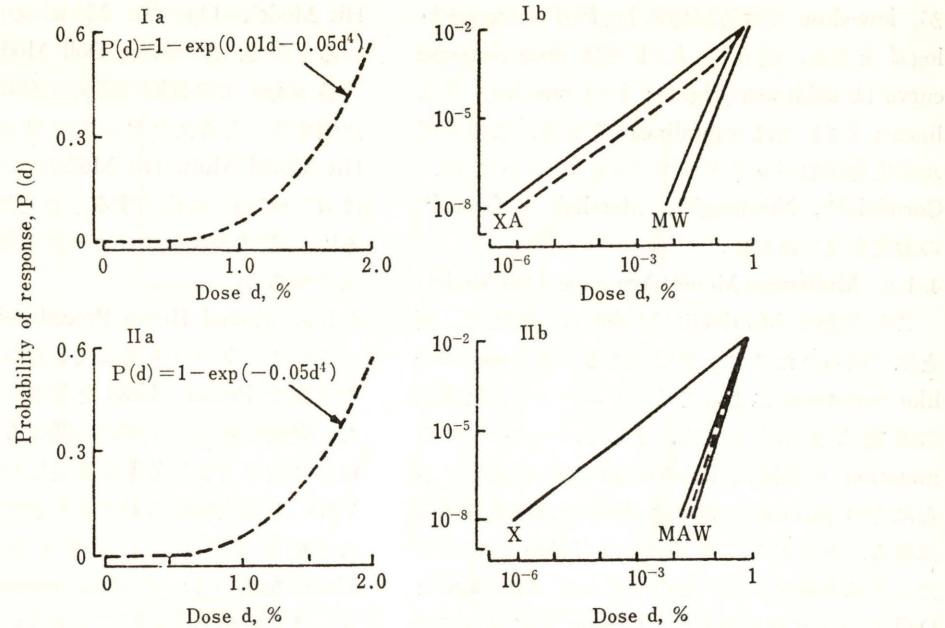


Fig. 3. Hypothetical dose-response curves (a), exhibiting (Ia) low-dose linearity and (IIa) low-dose sublinearity, together with corresponding estimates of added risk over background (Ib and IIb), based on three extrapolation procedures: X—linear extrapolation; M—multi-stage model; W—Weibull model; A—actual 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かしい。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ことに対し、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、この両者との間に納まる。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 を現実に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.

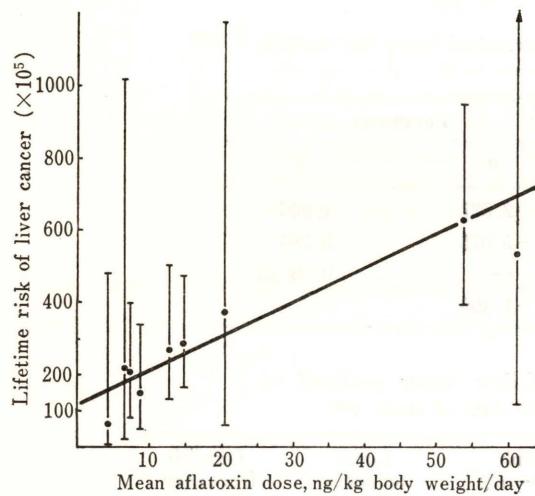


Fig. 4. The dose-response relationship between aflatoxin intake and lifetime risk of liver cancer in man, from epidemiological data.³⁰

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）のに對し、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, ケニア, 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にある (ただし、Mantel-Bryan の場合は 99% upper confidential limit): Probit Model, 0.054 ppb;

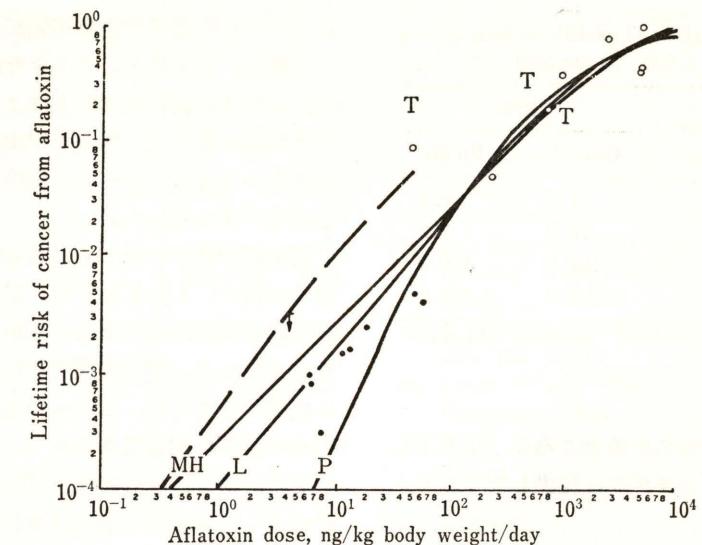


Fig. 5. Best estimates of the dose-response relationship between aflatoxin intake and risk of liver cancer in the rat using each of the models for all of the rat data combined: probit (P), logit (L), one-hit (H) and Mantel-Bryan (M). Observed data for rats (○); observed aflatoxin lifetime risks for man (●); 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ろう。

一つは、純粹に学問的な意味で、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すぐ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、防炎剤 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防炎加工が義務づけられており、Tris-BP で加工したポリエチレン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ないことになる。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されるべきことがらである、と思う。

また、定量的リスクア・セスマントのためには、

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數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

- N. Mantel and M. A. Schneiderman, *Cancer Res.*, **35**, 1379 (1975).
- Cancer Res.*, **38**, 877~885 (1978).
- EPA Preliminary List of Carcinogens Subject to TSCA Labelling Requirements, June 19, 1980.
- Chem. & Eng. News, July 31, p. 20 (1978).
- U. Saffiotti et al., *Science*, **201**, 1200 (1978).
- Scientific Committee, Food Safety Council, *Food Cosmet. Toxicol.*, **16** (Suppl. 2), 109~120 (1978).
- 藤井正美, *食品衛生研究*, **30**(11), 1002 (1980).
- 藤井正美, 第18回全国衛生化学会講演要旨, p. 18 (1981).
- N. K. Hooper et al., Progress Report for IARC/WHO Meeting, Oct. 1977.
- 石館 基, *食品衛生研究*, **30**(6), 557 (1980).
- L. Fishbein, "Occupational Cancer and Carcinogenesis" ed. by H. Vainio et al., Part VI, p. 355, McGraw-Hill Internat. Book Corp. (1981).
- FDA Advisory Committee on Protocols for Safety Evaluation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **20**, 419 (1971).
- T. Cairns, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **3**, 1~7 (1979).
- H. Druckrey, "Potential Carcinogenic Hazards from Drugs, Evaluation of Risks", ed. by R. Truhaut, p. 60~78, Springer-Verlag, 1967.
- NAS, "Drinking Water and Health", p. 19~62, Washington D. C., NAS (1977).
- Interagency Regulatory Liaison Group (IRLG), *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**(1), 241~268 (1979).
- J. Van Ryzin, *J. Occup. Med.*, **22**(5), 321~326 (1980).
- J. Van Ryzin and K. Rai, "The Scientific Basis of Toxicity Assessment", ed. by H. R. Witschi, p. 273, Elsevier, 1980.
- 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.
- I. C. Munro and D. R. Krewski, *Food Cosmet. Toxicol.*, **19**, 549~560 (1981).
- H. O. Halvorson and N. R. Ziegler, *J. Bacteriol.*, **25**, 101 (1933).
- 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.
- J. Cornfield, "Statistics and Mathematics in Biology", p. 123, Iowa State Univ. Press, 1954.
- C. O. Nordling, *Brit. J. Cancer*, **7**, 68~72 (1953).
- J. H. Marshall and P. G. Groer, *Radiation Res.*, **71**, 149~192 (1977).
- P. Armitage and R. Doll, *Proc. of 4th Berkley Symp. on Stat. and Prob.*, **4**, 19~38 (1961).
- K. S. Crump, H. A. Guess and K. L. Deal, *Biometrics*, **33**, 437~451 (1977).
- 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.
- J. C. Ramsey, C. N. Park, M. G. Ott and P. J. Gehring, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 411~414 (1979).
- F. W. Carlborg, *Food Cosmet. Toxicol.*, **17**(2), 159~166 (1979).
- EPA, "Water Quality Criteria: Request for Comments", *Fed. Regist.*, **44**, 15926 (1979).
- FDA, "Criteria and Procedures for Evaluating Assays for Carcinogenic Residues in Edible Products of Animals", *Fed. Regist.*, **42**, 10412 (1977).
- C. Brown, M. Schneiderman and K. Chu, "Estimates of Human Lifetime Carcinogenic Risk from Exposure to Tris", Report from NCI to CPSC, March 1977.
- 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うべき“Guidelines for Carcinogen Bioassay in Small Rodents”的立案者の一人である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」の試みの元になつてゐ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、かの有名なる米国の「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、発癌性が有りと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とは、未だ記憶に新しいところである³⁾。このような歴史的背景と共に、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

発癌性の評価を行つてゐるが、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關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しか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)生存率は充分に高いか、(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、順を追つて説明を加える(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. 不充分な条件の実験で、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ず、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い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
悪性腫瘍なし	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、種の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関してであるが、これ多くの発癌物質が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ることは自明であろう。

Factor C では、投与群で腫瘍発生の標的となつた臓器の、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と言うことが出来る。

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、時期を区切っての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年間での累積摂取量の大小により評価することにしている。

Factor E では、誘発された腫瘍の悪性度について述べている。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考え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-ジブロモプロピル)	90	1
ホスフェート(Tris)		
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、点数づけとランクが行われている。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 の方法によつ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、以下の方法に対する問題点についてふれてみたい。

先ず、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つ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、現時点では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つた場合、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ろう。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、例えは、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ところを感じる。何故なら悪性腫瘍の頻度を出すためにには、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因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。實に、「言うは易く、行うは難し」は、この Factor E についてであり、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ついての統一的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ら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 benzo(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, benzo(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、本会事務所に申込むものとする。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販布する。
3. 國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より若干名を指名し総会の承認を得て、評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

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

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

第10条 本会の事務執行機関は会長および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としました。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つてきました。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)1141

印刷所 サンコー印刷株式会社
〒112 文京区後楽2-21-8
TEL. 03(816)6881

