

発がん性評価の加速化

中期発がん性試験：二段階発がんモデル

日本バイオアッセイ研究センター
福島昭治

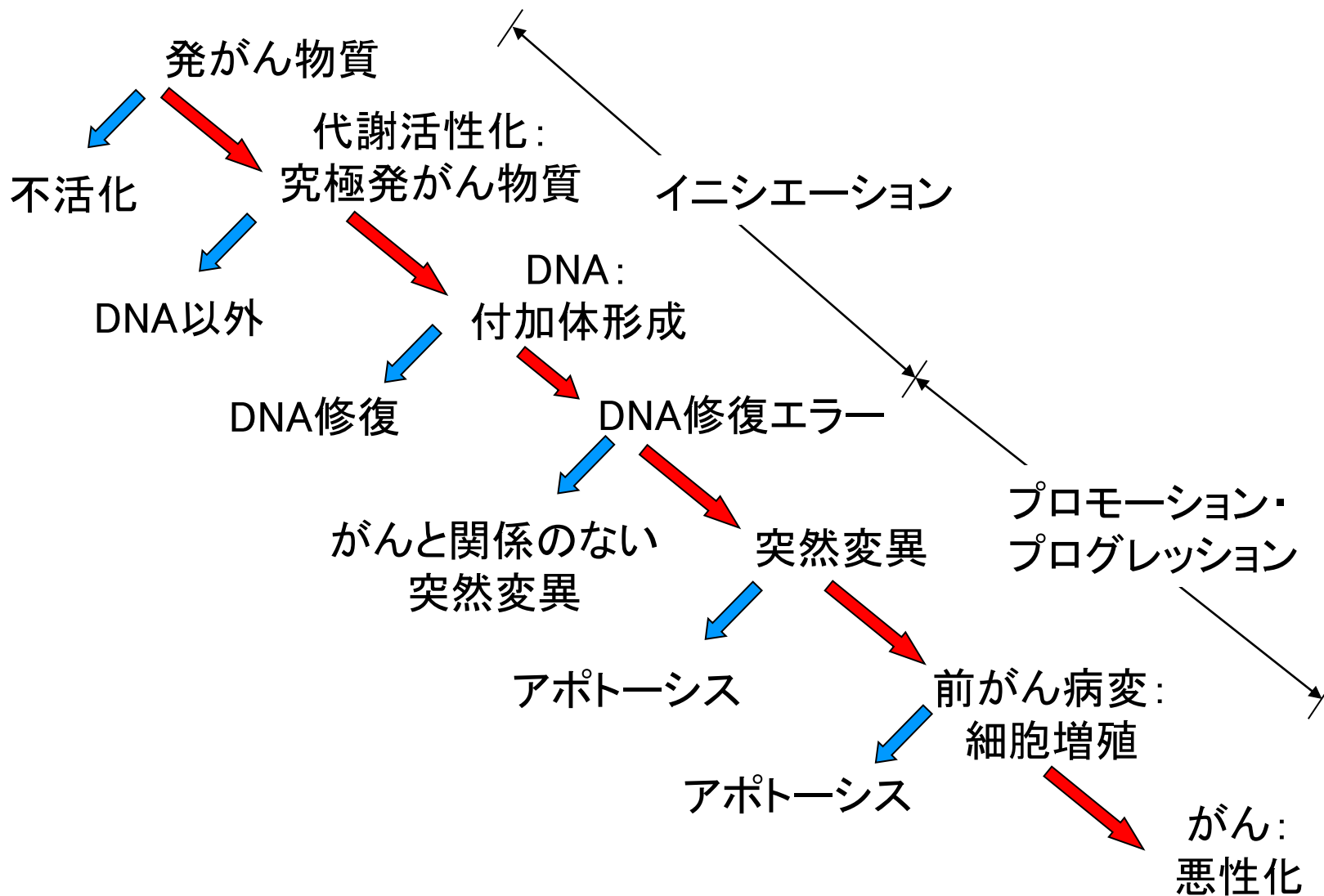
はじめに

- 医薬品、農薬、食品添加物等の開発にあたって、新規化合物の発がん性確認は極めて重要である。
- すべての新規化学物質の発がん性を、腫瘍を指標とする長期発がん性試験で検討することは時間的、経済的観点より困難である。
- ICH(日米EU医薬品規制調和国際会議、1997)では、「従来からの2種類の長期試験の実施の代わりに1種類の長期試験(通常はラット)に加え、もう1つの試験は短期・中期の代替試験を用いる」を策定した。

短期・中期の代替試験

- イニシエーション・プロモーションモデル(二段階試験法)
- 遺伝子改変動物を用いた短期発がん試験
- 新生仔動物モデル

化学発がんのメカニズム



発がんの二段階説

イニシエーション

発がん物質→標的細胞
→DNA損傷、突然変異など
→変異細胞



プロモーション

変異細胞が増殖→前がん細胞巢
あるいはがん細胞巢

遺伝毒性発がん物質はイニシエーション作用とプロモーション作用を併せ持つ。

非遺伝毒性発がん物質はプロモーション作用を持つ。

中期二段階発がん試験法(8-30週間) 前がん病変/がんを指標とする

既知発がん物質	被験物質
---------	------

- 発がん二段階説に基づき開発されたモデル。
- プロモーション期に被験物質を投与し、対照群との前がん病変あるいは腫瘍発生と比較することにより、化学物質の発がん修飾作用を検討する試験法である。
- 単一臓器二段階発がん性実験法(例:ラット中期肝発がん性試験法)とラット中期多臓器発がん性試験法などが開発されている。

肝臓を標的とする発がん物質数

出典	検索 化合物質	発がん物質	
		総数	肝臓標的数
IARC	587	147	87 (59%)
NCI/NTP	224	149	80 (54%)

IARC Monographs, Supplement 7, 1987
E. Zeiger, Cancer Res., 1987

ラット中期肝発がん性試験法(伊東法)



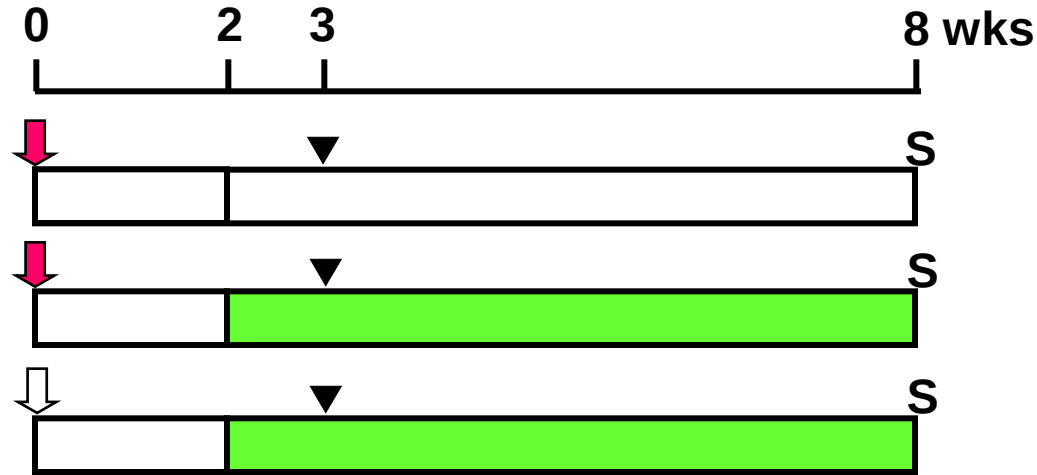
Animal: Male F344 rats, 6-week-old

▼: DEN 200 mg/kg, i.p. ↓: 2/3 partial hepatectomy.

肝GST-P陽性細胞巢

v.s. 対照群: 増加→促進作用あり

v.s. 対照群: 減少→抑制作用あり



Animals : Male F344 rats, 6 weeks of age



: Vehicle



: Test chemical



: DEN, 200 mg/kg BW, ip injection



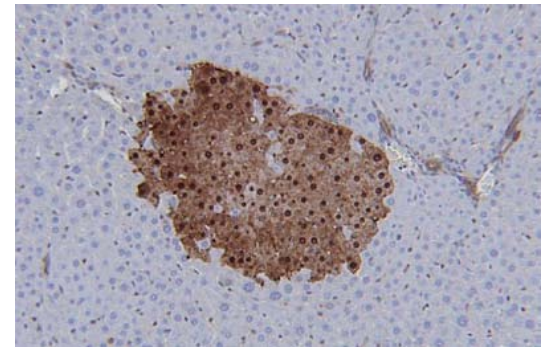
: Saline, ip injection



: Two-thirds partial hepatectomy

S

: Sacrifice for GST-P immunohistochemistry



Protocol of the Medium-term Liver Carcinogenesis Bioassay (Ito Test)

Results for 327 Compounds in the Medium-term Liver Carcinogenesis Bioassay

Carcinogenicity of Test Compounds	Positive/Examined (%)			
	Mutagenicity (Ames test)			Total
	Positive	Negative	Unknown	
Liver	31/32(97) ^a	29/ 33(88) ^b	1 /1(100)	61/ 66(92)
Other than liver	7/26(27)	2/ 15(13)	1/ 2(50)	10/ 43(23) ^d
Not carcinogenic	0/ 6(0)	1/ 42(2) ^c	0/ 2(0)	1/ 50(2) ^d
Unknown	4/14(29)	32/ 90(36)	15/64(23)	51/168(30)
Total	42/78(54)	64/180(36)	17/69(25)	123/327(38)

a, Negative; 4,4-Diaminodiphenylmethane

b, Negative; Clofibrate, Di(2-ethylhexyl)adipate, Di(2-ethylhexyl)phthalate, Trichloroacetic acid

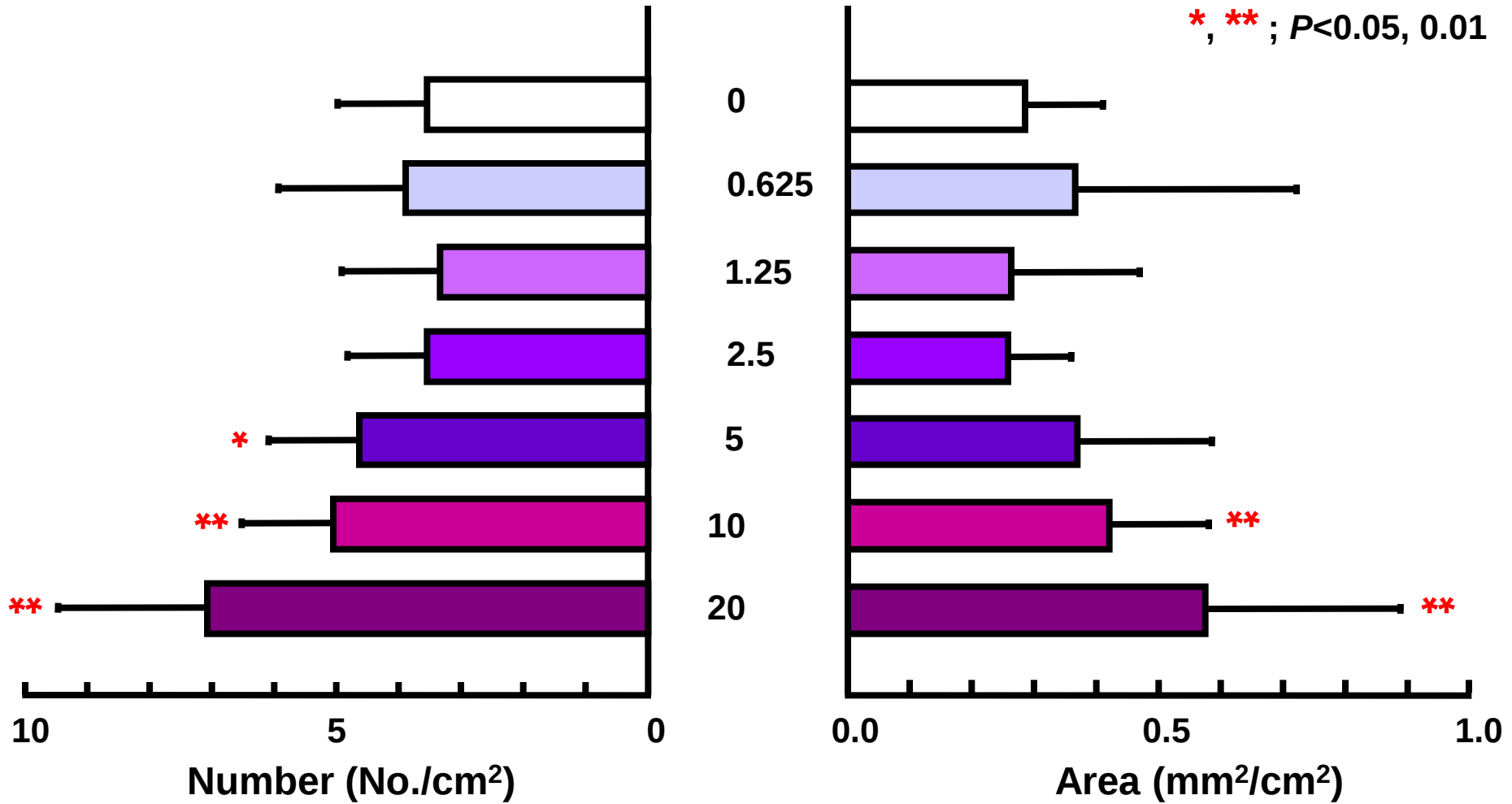
c, Postitive; Malathione

d, A total of 11 chemicals were positive in this model although hepatocarcinogenicity is not apparent.

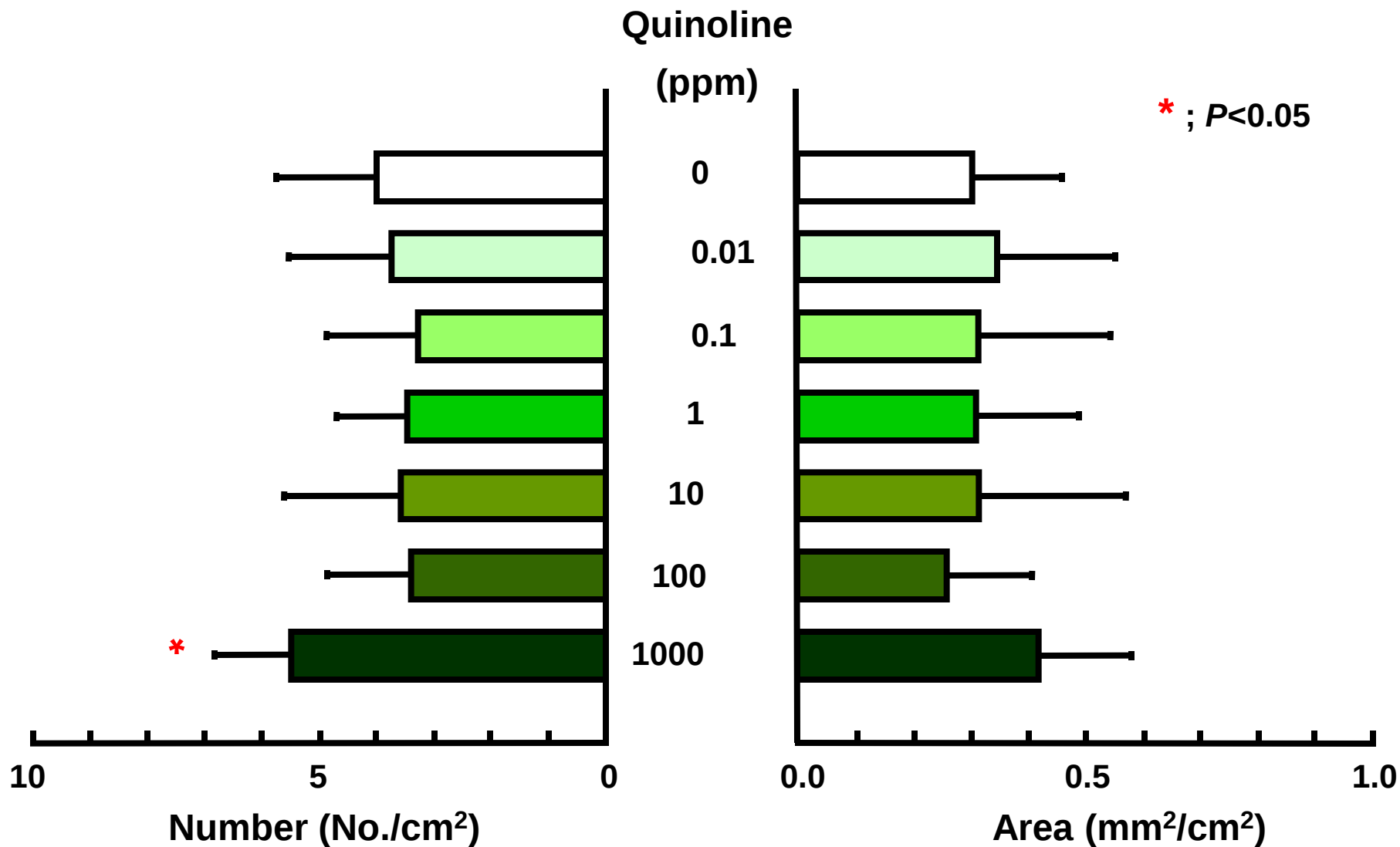
List of the Test Compounds on Ito Test

	Compounds	Ames Test	Hepato- carcinogenesis	Use
1	2-Nitropropane (2-NP)	+	+	Solvent, Component of Ink and Paint
	1-Nitropropane (1-NP)	—	—	Gasoline additive, Intermediate for chemical
2	Quinoline	+	+	Solvent, Dye, Source for pharmaceutical
3	Hexachlorobenzene	—	+	Fungicide
4	Di-(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)	—	+	Plasticizer

2-Nitropropane (mg/kg)



**Numbers and Areas of GST-P-positive Foci in the
Livers of Rats**



**Numbers and Areas of GST-P-positive Foci in the
Livers of Rats**

中期肝発がん性試験法(伊東法)の利点

1. 長期がん原性試験の結果と一致する。
2. 用量反応関係が明確であり、肝発がん性あるいは促進作用強度の推定が容易である。
3. 非遺伝毒性発がん物質での肝発がん性も検出できる。
4. 被験物質が少量で済む。
5. 開発経費(時間、動物等)を削減できる。
6. マウスにのみ肝発がん性を示す物質も検出可能であるため、げっ歯類を代表できる肝発がん性検出法である。
7. 発がん性および発がん促進作用だけでなく、抑制作用を評価することが可能である。

中期多臓器発がん性試験法の必要性

- すべての臓器についてそれぞれの二段階発がん実験は不可能
- 時間、コストの軽減が必要
- 主要臓器についてのスクリーニングが必要



Animals : Male F344 rats, 6 weeks of age

 : Vehicle

↓ ↓ : Saline

 : Test Chemical

 : DHPN, 0.1% in drinking water

↓ (red) : DEN, 100 mg/kg BW, ip injection

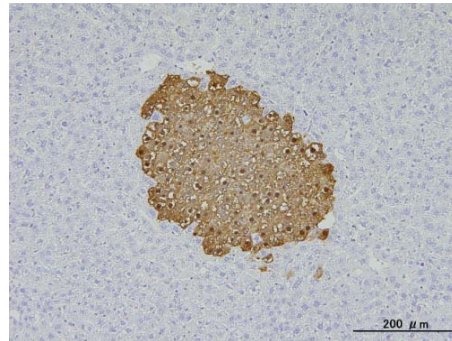
↓ : MNU, 20 mg/kg BW, ip injection

S : Sacrifice

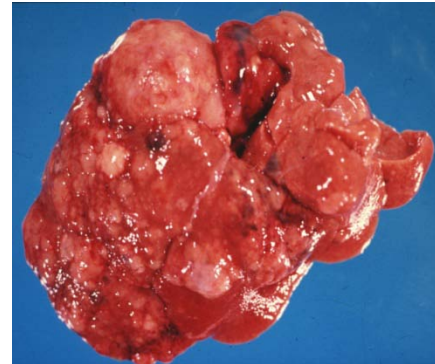
Experimental Design of the Medium-term Multi-organ Carcinogenesis Bioassay (DMD model)

正常 → 前がん病変 → 良性腫瘍 → がん

肝臓

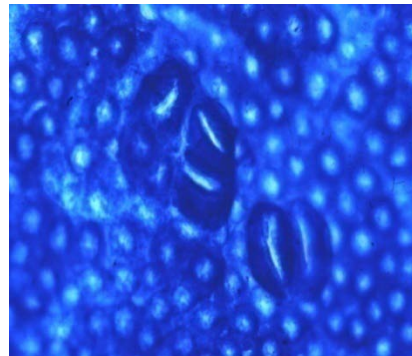


GST-P 陽性細胞巢



肝臓がん

大腸



変異クリプト巢 (ACF)



大腸がん

GST-P 陽性細胞巢: Glutathione S-transferase placental (GST-P) positive foci

変異クリプト巢: Aberrant crypt foci (ACF)

Results for 65 Compounds in the Medium-term Multi-organ Carcinogenesis Bioassay (DMD/DMBDD method)

Carcinogenicity of Test Compounds	Positive/Examined (%)			
	Mutagenicity (Ames test)			Total
	Positive	Negative	Unknown	
Liver	12/12(100)	5/ 5(100)	0/0(0)	17/17(100)
Other than liver	10/11(91) ^a	8/10(80) ^b	1/1(100)	19/22(86)
Not carcinogenic	0/ 1(0)	0/ 4(0)	0/0(0)	0/ 5(0)
Unknown	0/ 1(0)	8/13(62)	3/7(43)	11/21(52)
Total	22/25(88)	21/32(66)	4/8(50)	47/65(72)

^a, Negative; B[a]P

^b, Negative: Sesamol, Daminozide

ヒ素の発がん性の実験的証明

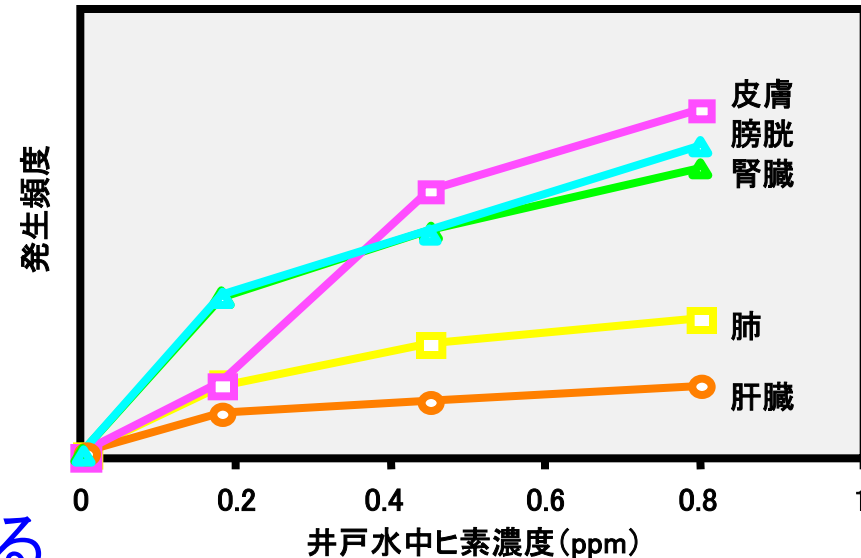
疫学的にヒ素曝露と発がんの
因果関係は明確である。

IARC、1987年

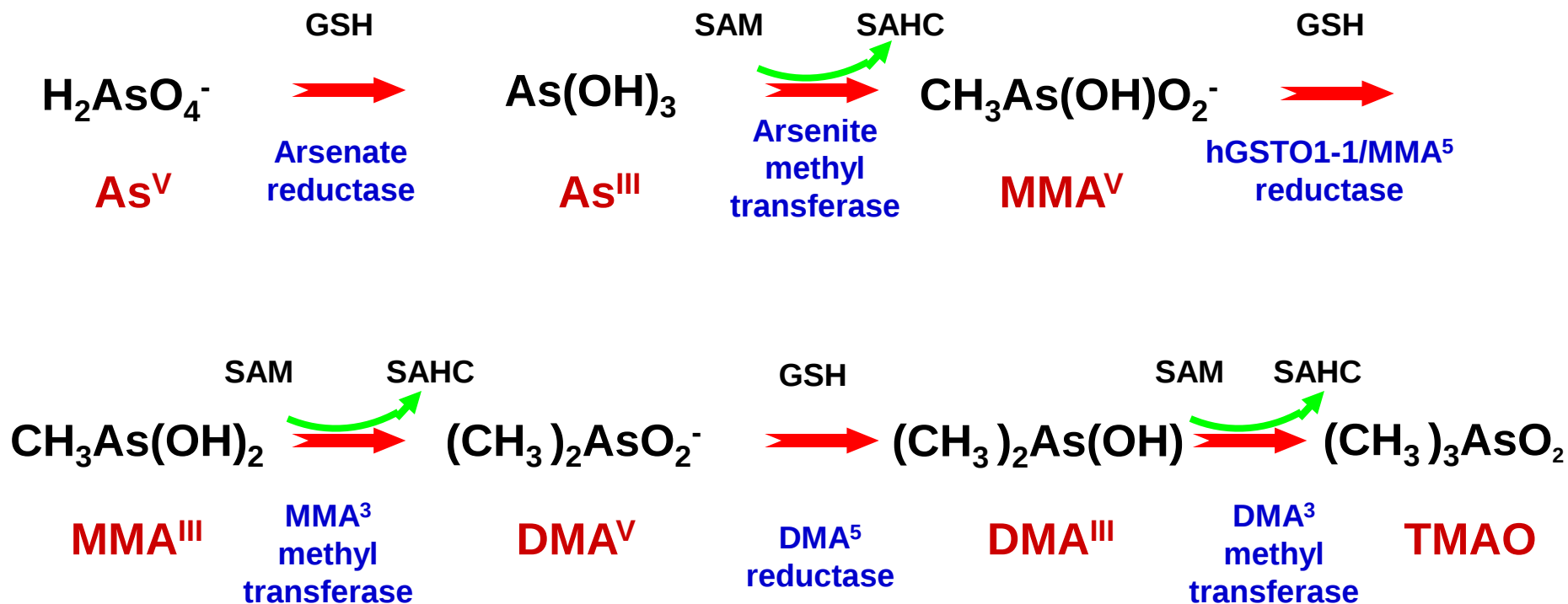
(WHO, International Agency for
Research on Cancer)

無機ヒ素とヒトの皮膚および
肺がんとの因果関係を認める

実験動物におけるヒ素の発がん性は
未だ明確ではない。



台湾の高濃度ヒ素を含む井戸水地域に
おけるヒ素濃度と発がんとの関係



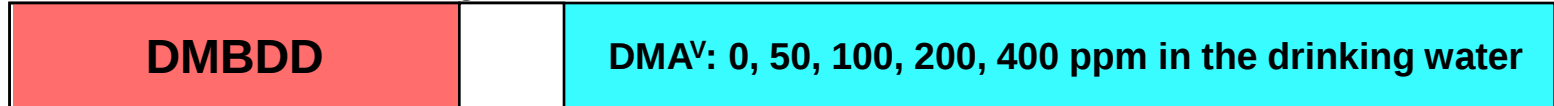
As^{V} : arsenate As^{III} : arsenite MMA^{V} : monomethylarsonic acid MMA^{III} : monomethylarsonous acid
 DMA^{V} : dimethylarsinic acid DMA^{III} : monomethylarsinous acid TMAO: trimethylarsine oxide
 SAM: S-adenosyl-L-methionine SAHC: S-adenosyl-L-homocysteine hGSTO1-1: human glutathione S-transferase omega 1-1

Pathway of arsenic metabolism

DMA^Vの発がん修飾作用の検討 (ラット多臓器中期発がん性試験法)



Initiation with five carcinogens

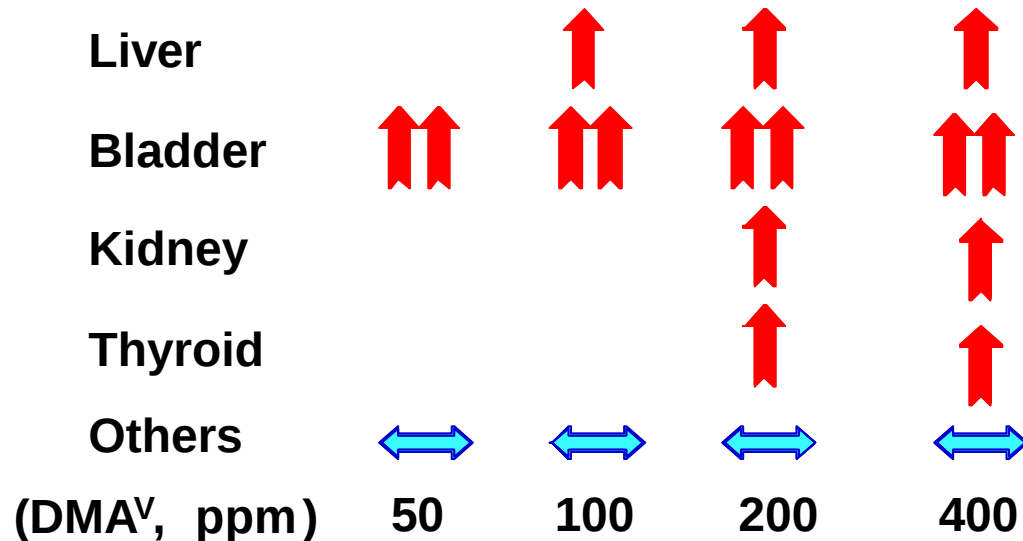


Target organs of DMBDD (DEN, MNU, BBN, DMH, DHPN)

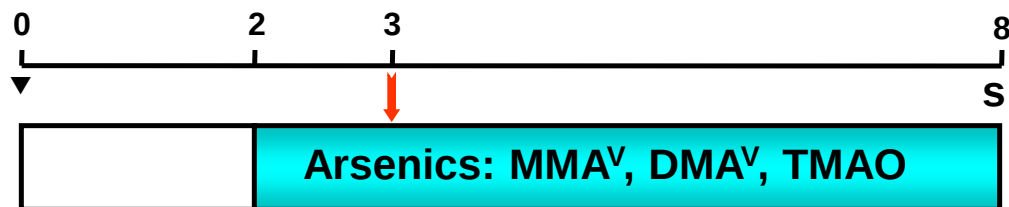
DEN: Liver, kidney; MNU: Forestomach, mammary gland, urinary bladder, thyroid

BBN: Urinary bladder; DMH: Intestinal tract; DHPN: Lung, kidney, thyroid

Enhancement of carcinogenesis by DMA^V (v.s. 0 ppm DMA^V group)



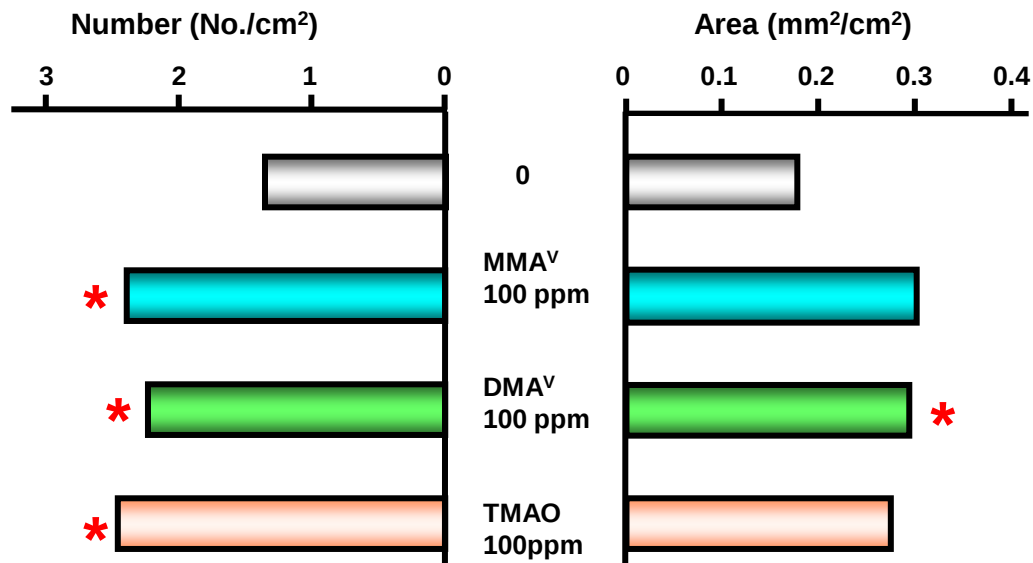
有機ヒ素化合物の肝発がん発がん修飾作用の検討 (ラット肝中期発がん性試験法)



Animal: Male F344 rats, 6-week-old, 20 rats/group.

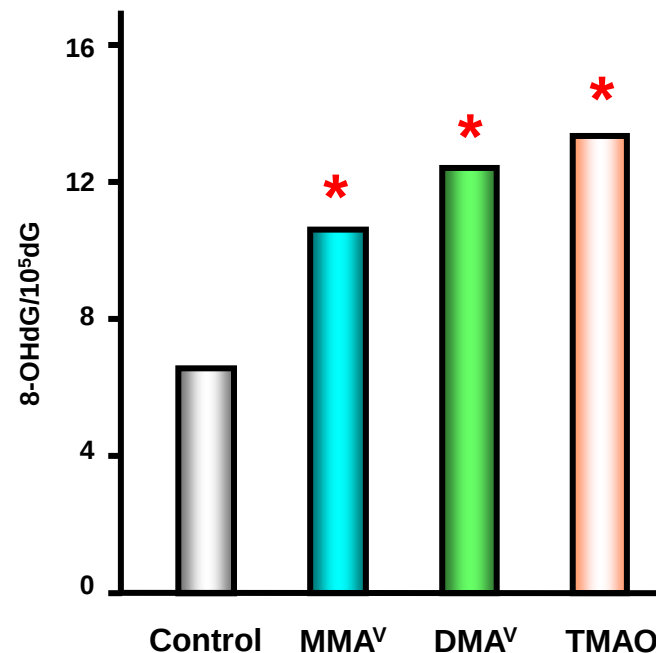
▼: DEN 200 mg/kg, i.p. ↓: 2/3 partial hepatectomy. S: sacrifice

GST-P-positive foci

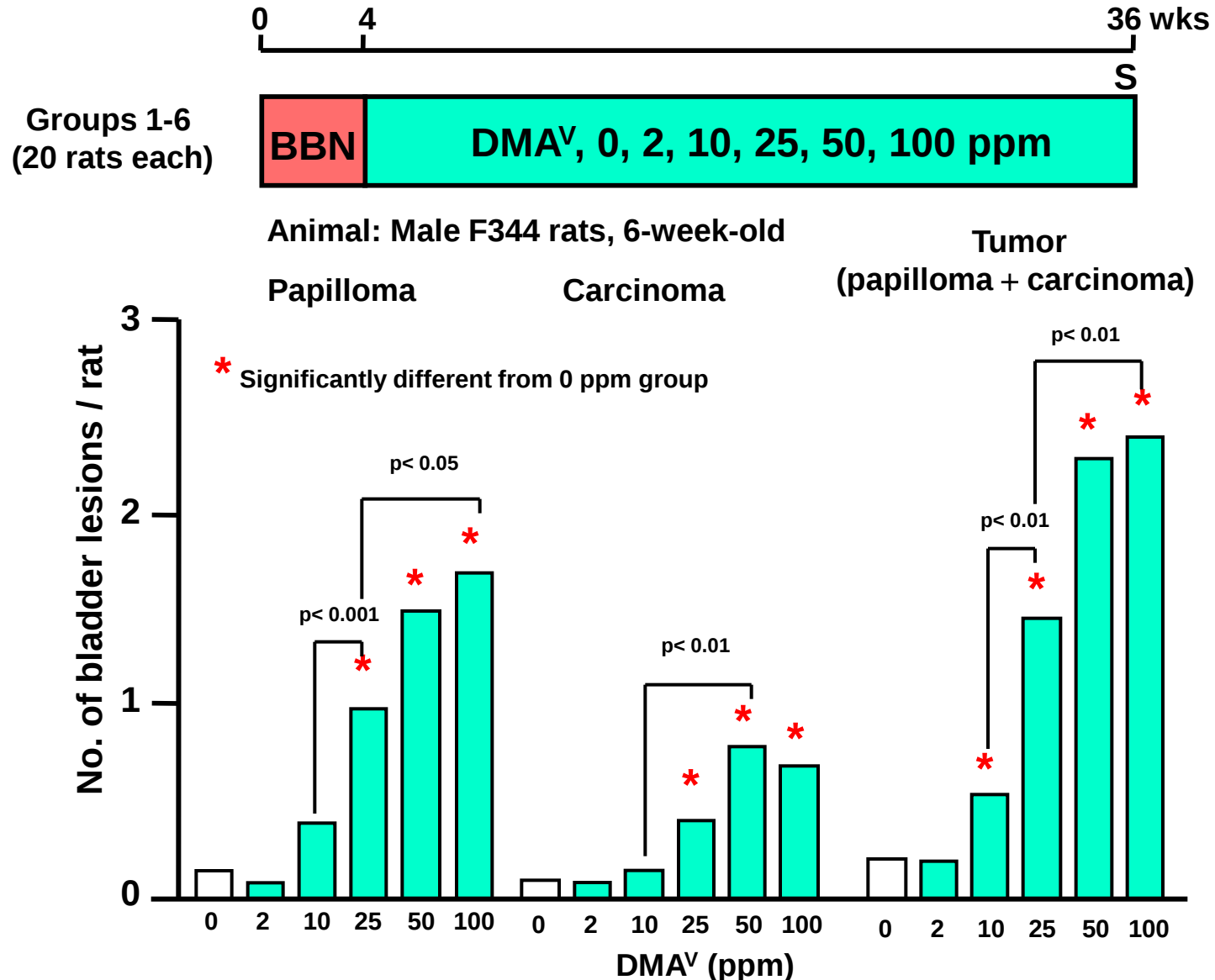


*: Significantly different from 0 ppm group.

8-OHdG formation



DMAの膀胱発がん修飾作用の検討 (ラット二段階膀胱発がんモデル)



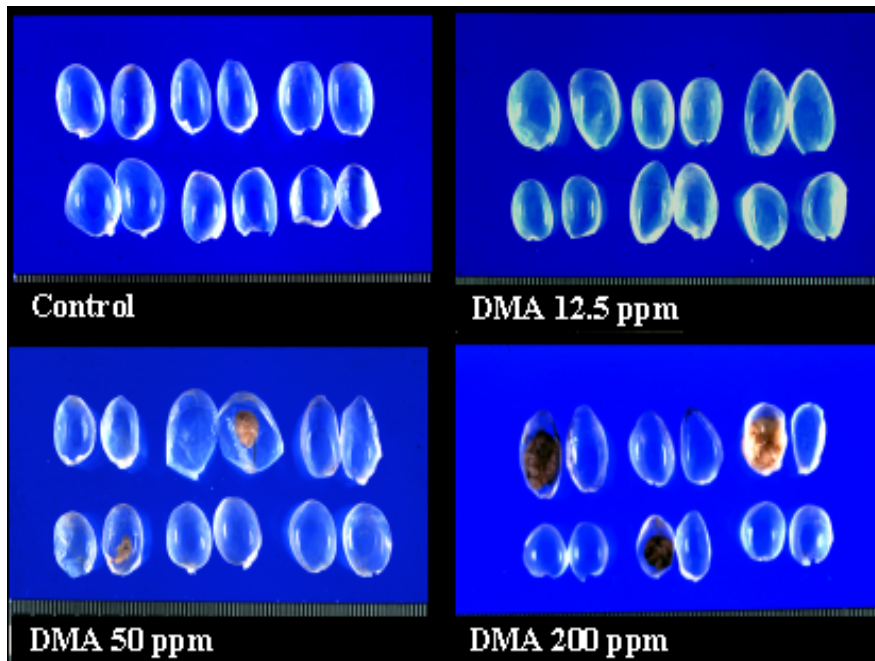
DMAの2年間ラット発がん性試験

0

104 Wks

DMA^V (0, 12.5, 50, 200 ppm in drinking water)

Animal: 10-week-old, 144 male F344 rats



Macroscopic view of urinary bladders

Incidence of urinary bladder tumors

DMA ^V (ppm)	Incidence(%)		
	Papilloma	Carcinoma	Total
0	0	0	0
12.5	0	0	0
50	2 (6)	6 (19)*	8 (26)*
100	2 (6)	12 (39)*	12 (39)*

*: Significantly different from 0 ppm group.

まとめ

1. 中期肝発がん性試験法(伊東法)では、肝臓発がん物質をほぼ100%の確率で検出でき、しかも偽陽性や偽陰性になる確率が極めて低く、信頼性の高い試験法である。
2. 中期多臓器発がん性試験法では、全身諸器官における発がん性を1個体で総合的に検索して臓器標的性を明らかにできる、極めて有用な試験法である。
3. 化学物質の発がんリスクを評価するには、用量反応性など様々な角度からの検討が必要であり、これら中期発がん性試験法は発がんリスクの評価上、重要な試験法となる。