

## 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

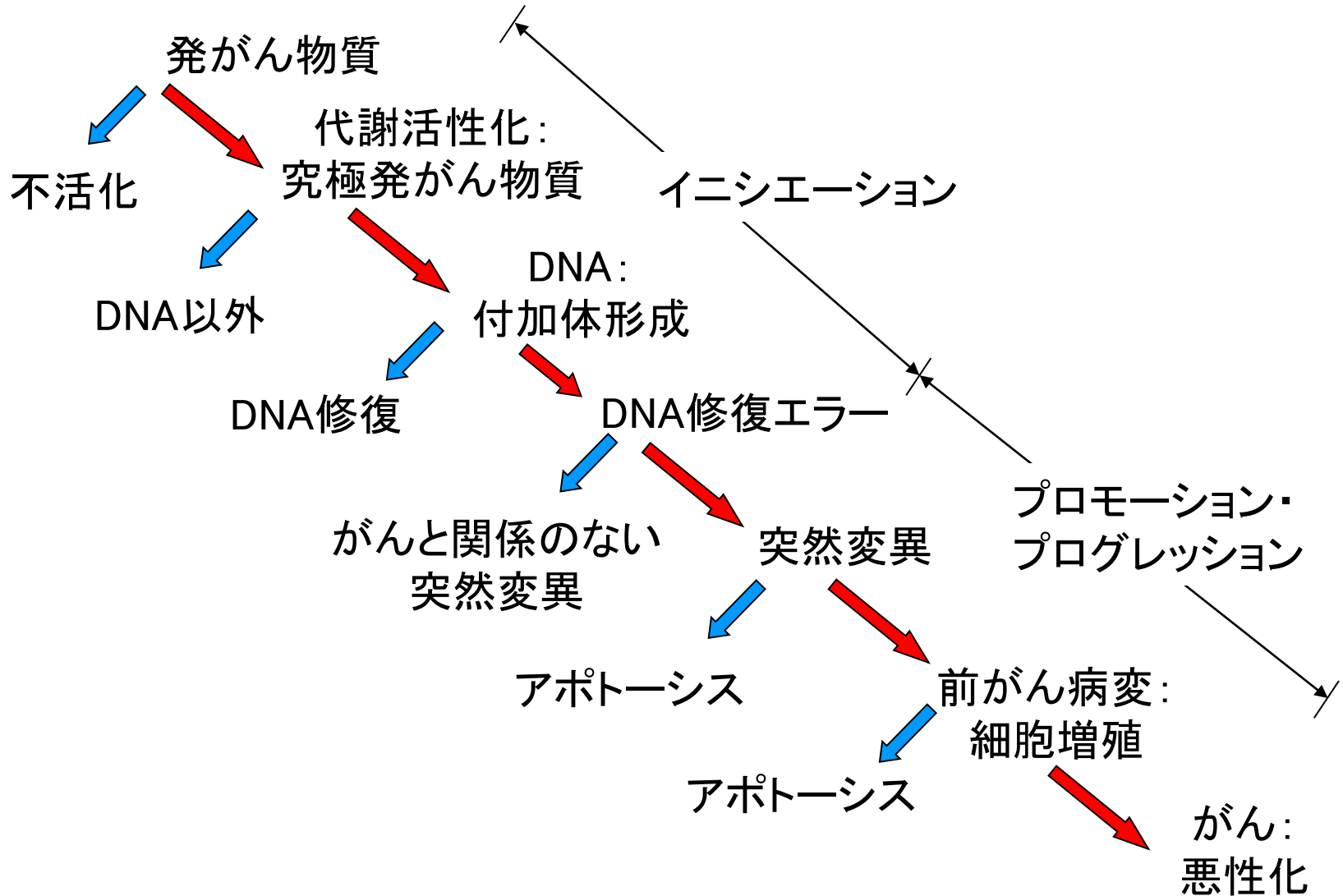
# はじめに

- 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)



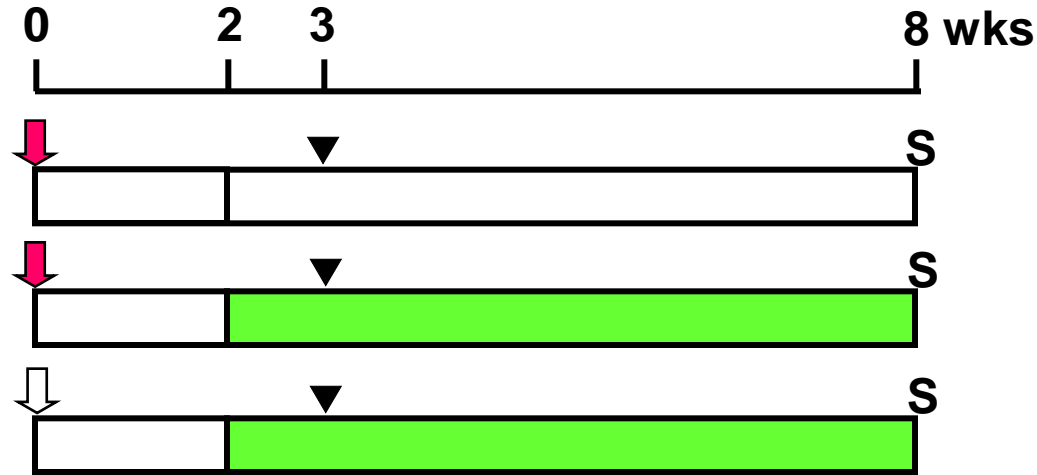
Animal: Male F344 rats, 6-week-old

▼: 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



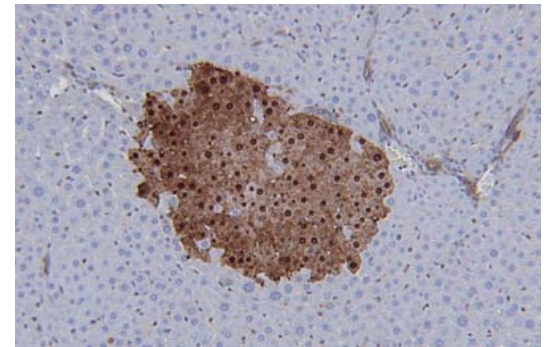
: Saline, ip injection



: Two-thirds partial hepatectomy



: 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) <sup>a</sup>	29/ 33(88) <sup>b</sup>	1 /1(100)	61/ 66(92)
Other than liver	7/26(27)	2/ 15(13)	1/ 2(50)	10/ 43(23) <sup>d</sup>
Not carcinogenic	0/ 6( 0)	1/ 42( 2) <sup>c</sup>	0/ 2( 0)	1/ 50( 2) <sup>d</sup>
Unknown	4/14(29)	32/ 90(36)	15/64(23)	51/168(30)
<b>Total</b>	<b>42/78(54)</b>	<b>64/180(36)</b>	<b>17/69(25)</b>	<b>123/327(38)</b>

a, Negative; 4,4-Diaminodiphenylmethane

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

c, Postitive; Malathione

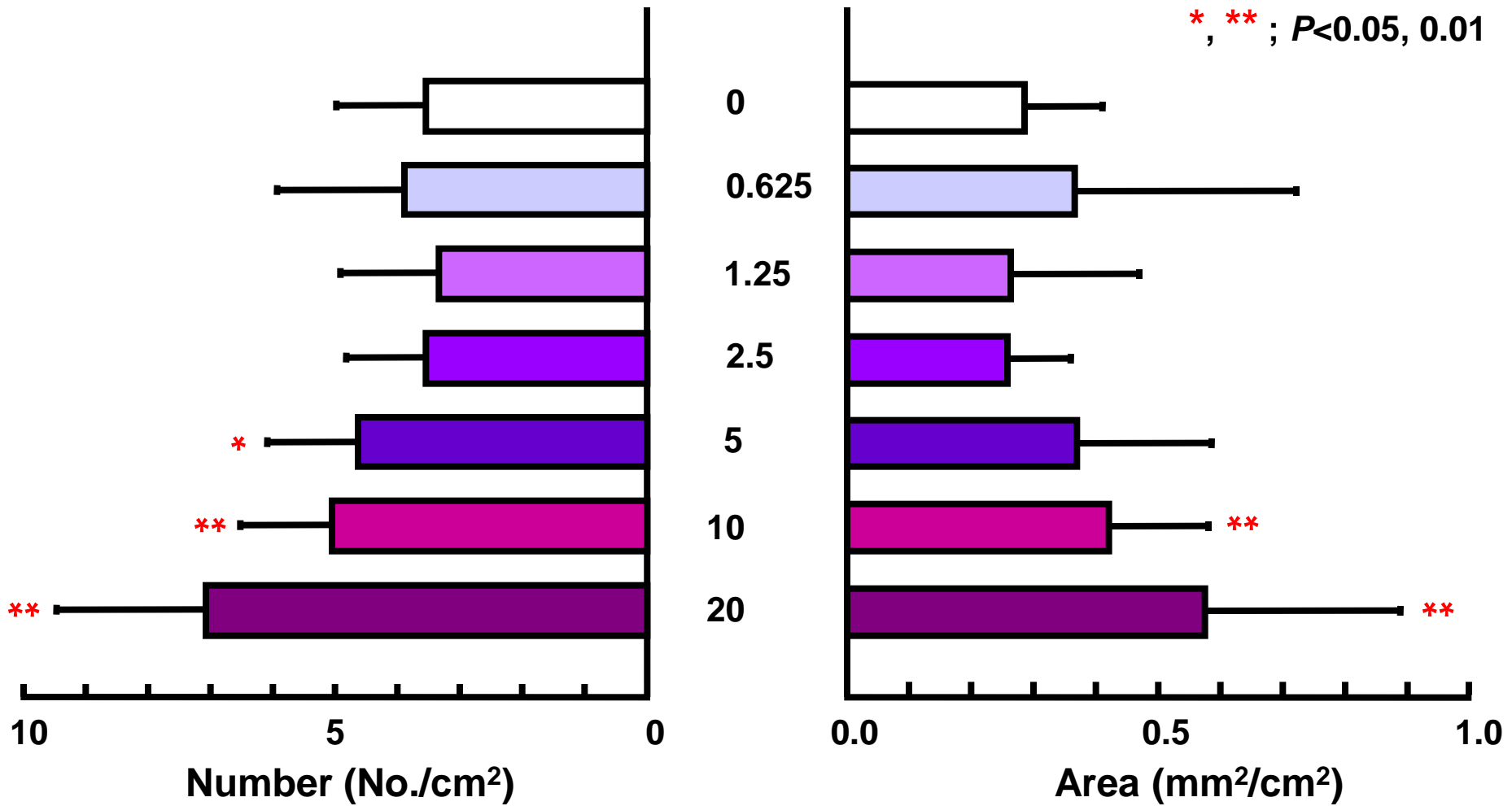
d, A total of 11 chemicals were positive in this model although hepatocarcinogenicity is not apparent.



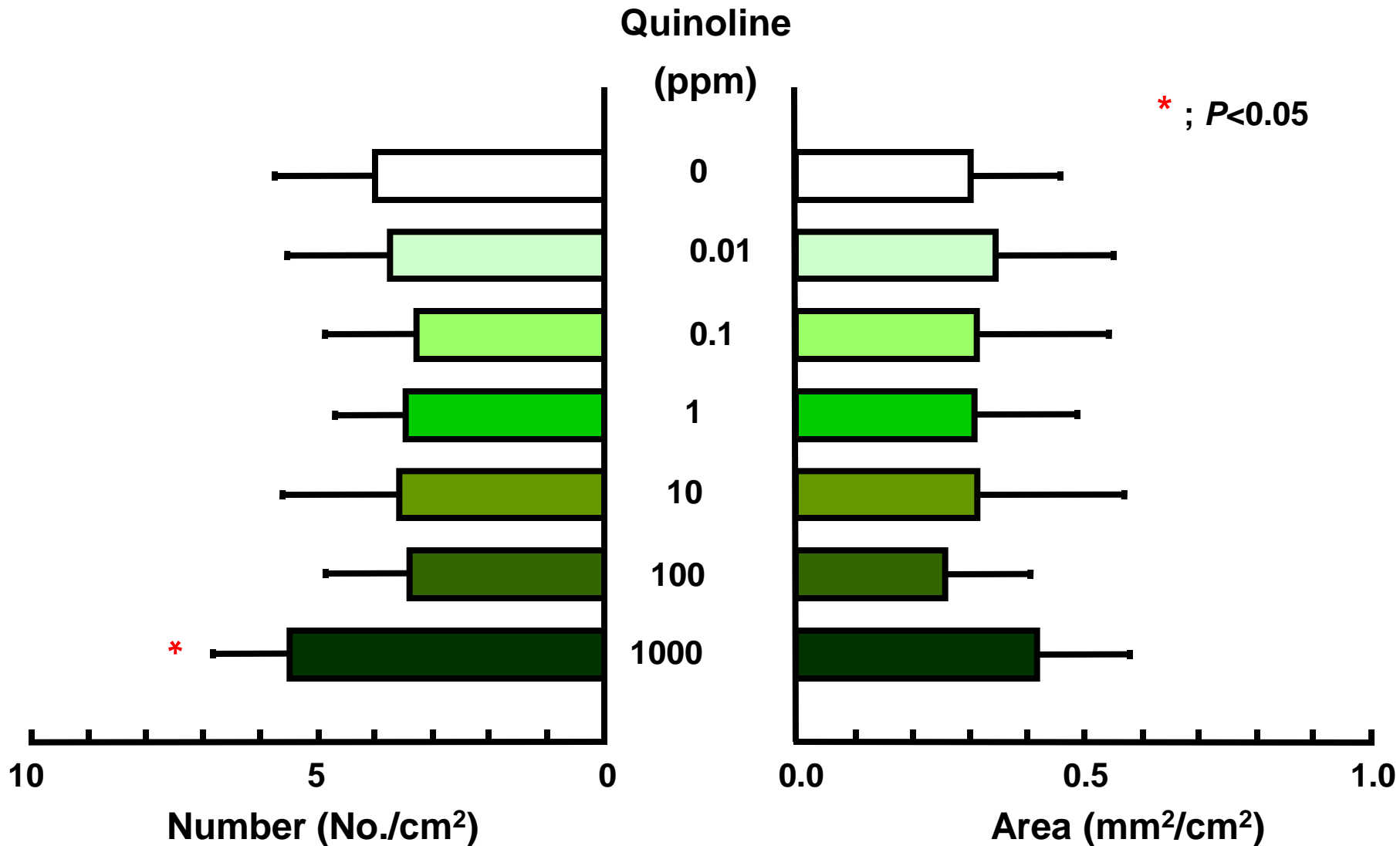
# List of the Test Compounds on Ito Test

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

## 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


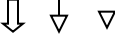






 : DEN, 100 mg/kg BW, ip injection

 : MNU, 20 mg/kg BW, ip injection

**S** : Sacrifice

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

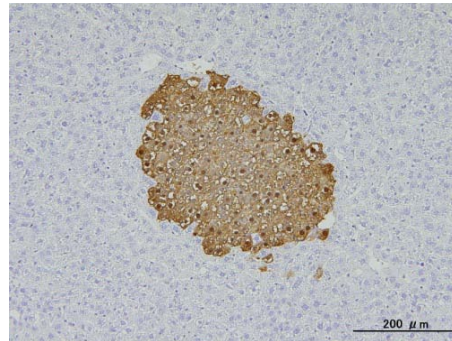


- Animals** : Male F344 rats, 6 weeks of age
-  : Vehicle
  -  : Saline
  -  : Test Chemical
  -  : BBN, 0.05% in drinking water
  -  : DHPN, 0.1% in drinking water
  -  : DEN, 100 mg/kg BW, ip injection
  -  : MNU, 20 mg/kg BW, ip injection
  -  : DMH, 40 mg/kg BW, sc injection
  - S** : Sacrifice

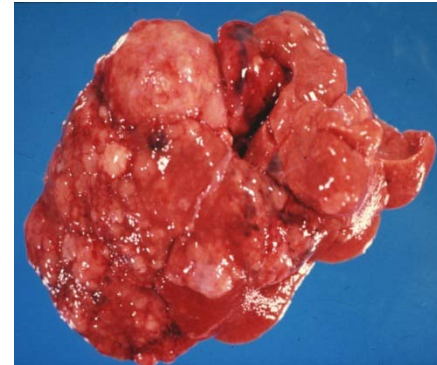
## Experimental Design of the Medium-term Multi-organ Carcinogenesis Bioassay (DMBDD model)

正常 → 前がん病変 → 良性腫瘍 → がん

肝臓

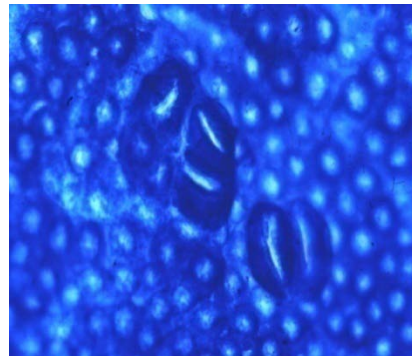


GST-P 陽性細胞巢

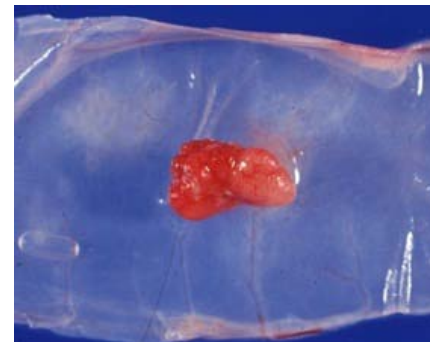


肝臓がん

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)			
	Positive	Negative	Unknown	Total
Liver	12/12(100)	5/ 5(100)	0/0( 0)	17/17(100)
Other than liver	10/11(91) <sup>a</sup>	8/10(80) <sup>b</sup>	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)
<b>Total</b>	<b>22/25( 88)</b>	<b>21/32(66)</b>	<b>4/8(50)</b>	<b>47/65(72)</b>

<sup>a</sup>, Negative; B[a]P

<sup>b</sup>, Negative: Sesamol, Daminozide

# ヒ素の発がん性の実験的証明

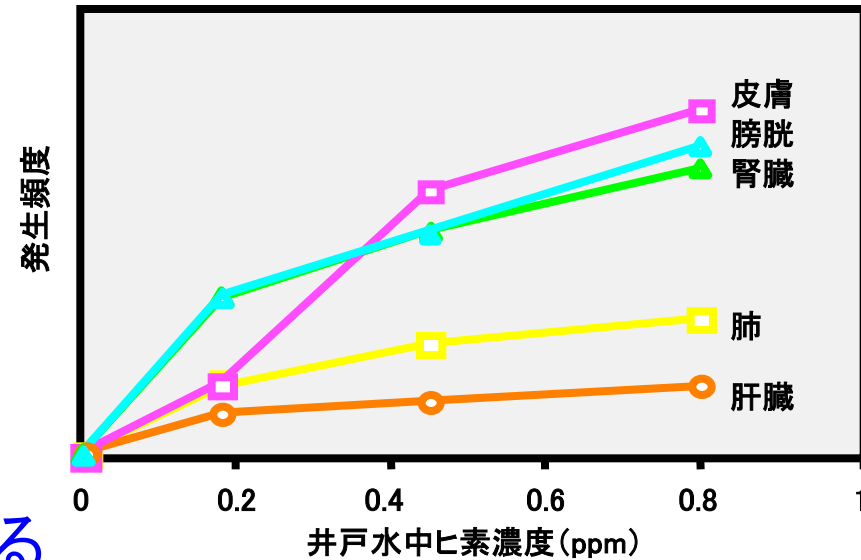
疫学的にヒ素曝露と発がんの因果関係は明確である。

IARC、1987年

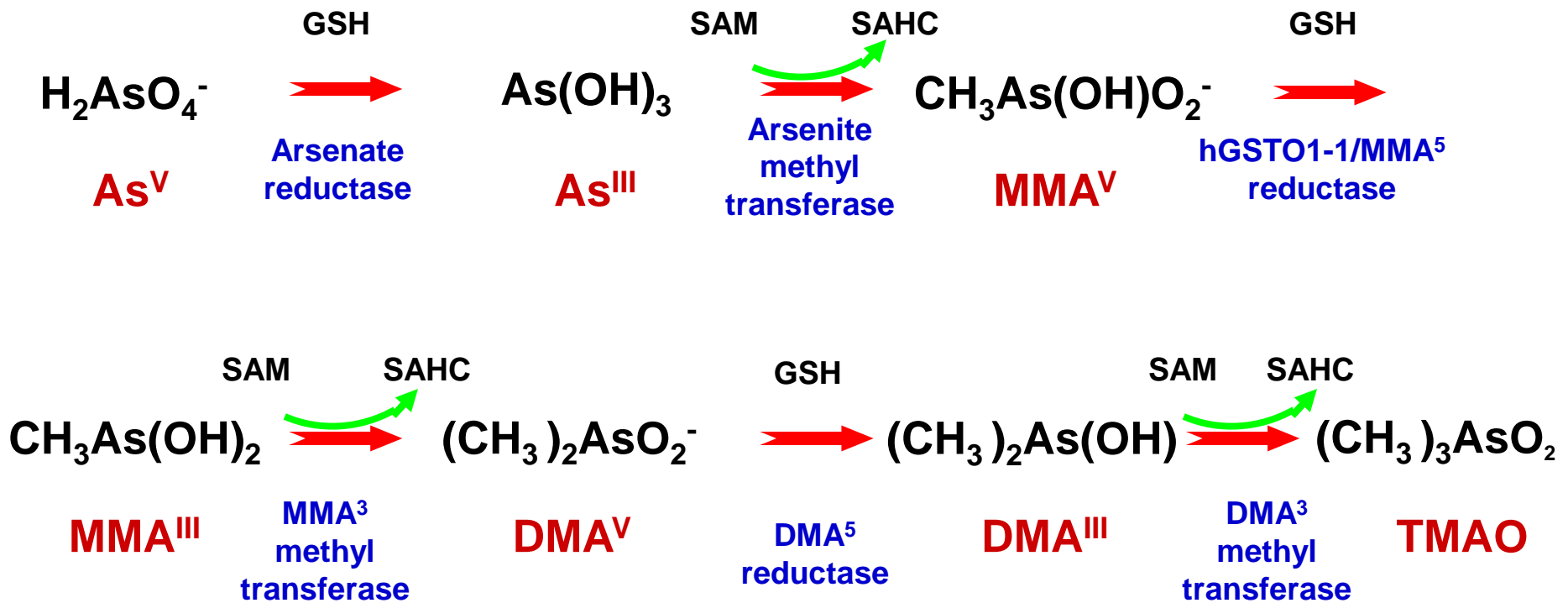
(WHO, International Agency for Research on Cancer)

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。



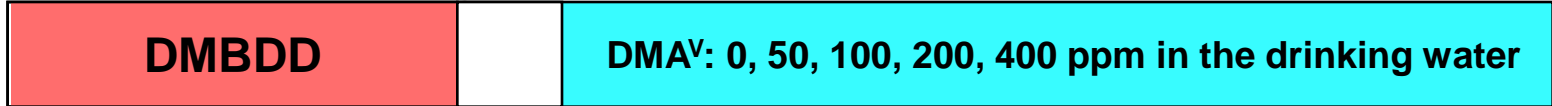
台湾の高濃度ヒ素を含む井戸水地域におけるヒ素濃度と発がんとの関係



$\text{As}^{\text{V}}$ : arsenate       $\text{As}^{\text{III}}$ : arsenite       $\text{MMA}^{\text{V}}$ : monomethylarsonic acid       $\text{MMA}^{\text{III}}$ : monomethylarsonous acid  
 $\text{DMA}^{\text{V}}$ : dimethylarsinic acid       $\text{DMA}^{\text{III}}$ : 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<sup>V</sup>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)

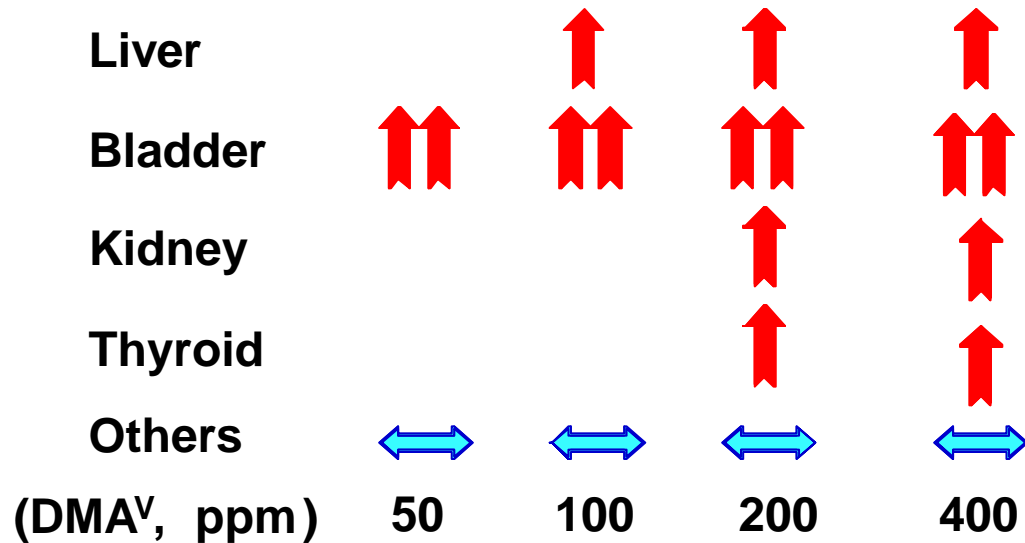


Target organs of DMBDD (DEN, MNU, BBN, DMH, DHPN)

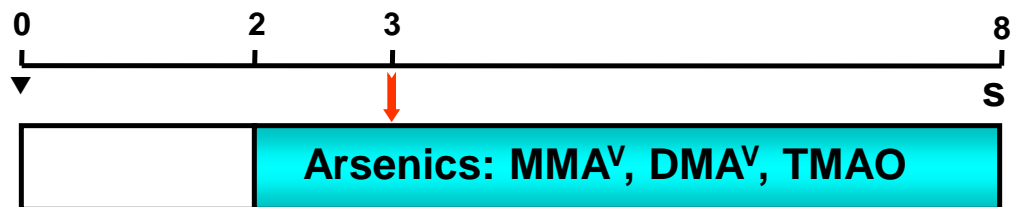
DEN: Liver, kidney;      MNU: Forestomach, mammary gland, urinary bladder, thyroid

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

## Enhancement of carcinogenesis by DMA<sup>V</sup> (v.s. 0 ppm DMA<sup>V</sup> group)



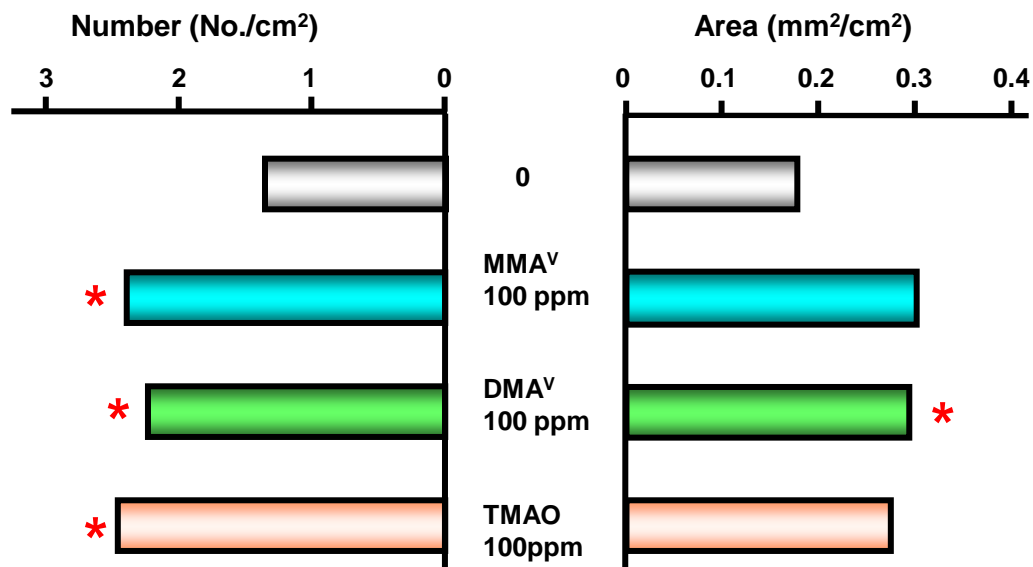
# 有機ヒ素化合物の肝発がん発がん修飾作用の検討 (ラット肝中期発がん性試験法)



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

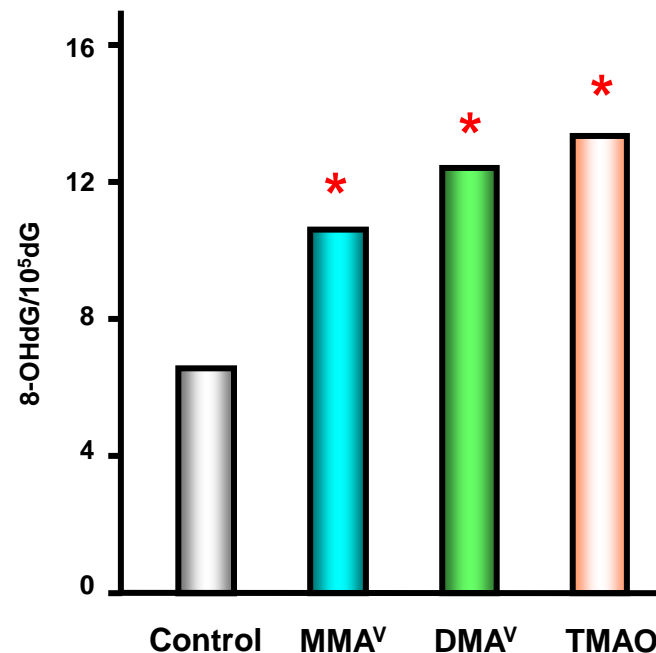
▼: DEN 200 mg/kg, i.p.    ↓: 2/3 partial hepatectomy.    S: sacrifice

## GST-P-positive foci

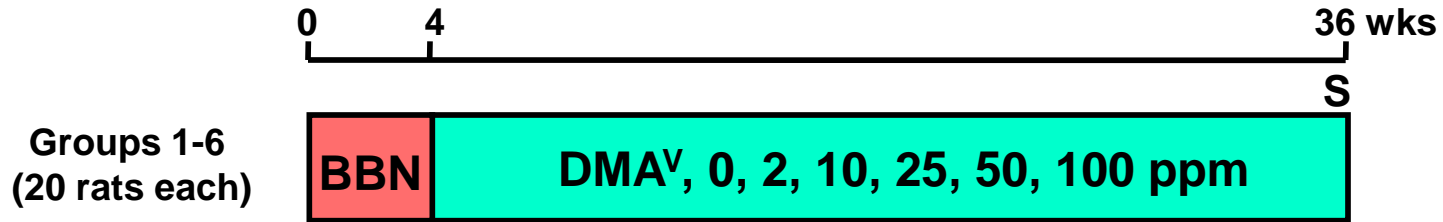


\*: Significantly different from 0 ppm group.

## 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)

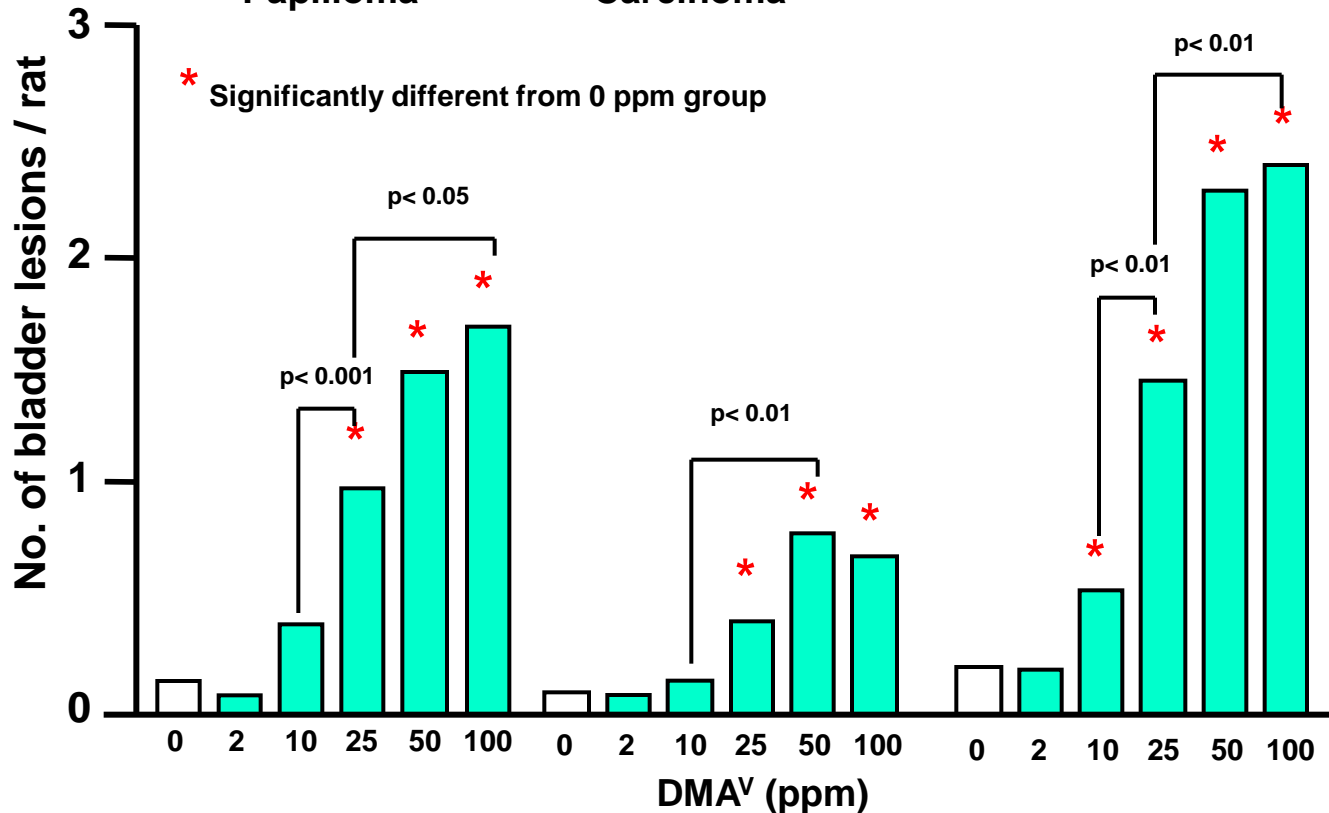


Animal: Male F344 rats, 6-week-old

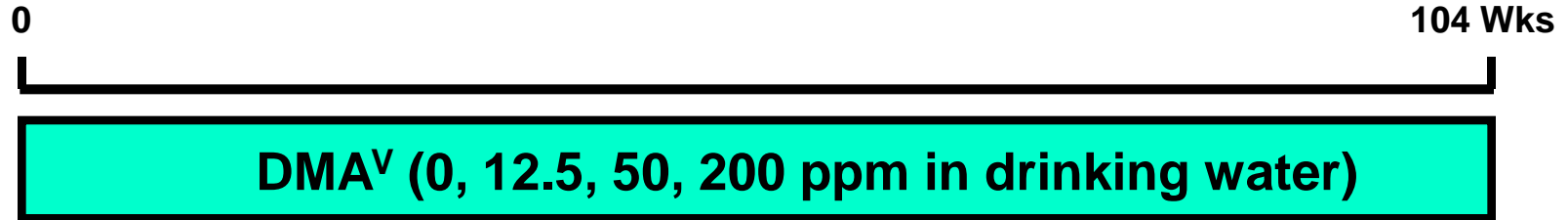
Papilloma

Carcinoma

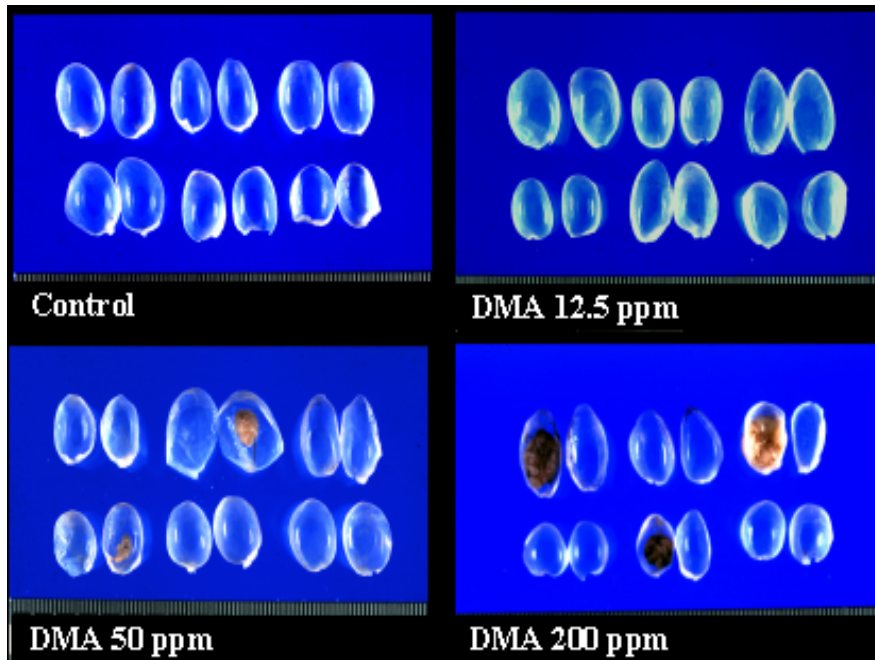
Tumor  
(papilloma + carcinoma)



# DMAの2年間ラット発がん性試験



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



Macroscopic view of urinary bladders

## Incidence of urinary bladder tumors

DMA <sup>V</sup> (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。