

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

昭和62年 7 月 3 号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

<第9回研究会>

シンポジウム

「実験動物における人畜共通寄生虫症」

司会：吉田幸雄（京府医大・医動物）	1
-------------------	---

1. はじめに	吉田幸雄
2. トキソプラズマ及びマラリア	松本芳嗣（京府医大・医動物）
3. 赤痢アメーバ及びその他の消化管内寄生虫	吉川尚男（京府医大・医動物）
4. ニューモチスチス・カリニ	塩田恒三（京府医大・医動物）
5. 犬猫蛔虫の幼虫移行	及川 弘（塩野義・油日）
6. 鞭虫及び糸状虫	山田 稔（京府医大・医動物）
7. 総合討論とまとめ	吉田幸雄

<第10回研究会>

学術講演会

「癌原性試験の現状と問題点」

林 裕造（国立衛試）	14
------------	----

関西実験動物研究会だより	55
--------------	----

総会・評議員会議事概要	56
-------------	----

会員の動き	58
-------	----

編集後記

シンポジウム

「実験動物における人畜共通寄生虫症」

1. はじめに

吉田 幸雄（京府医大・医動物）

人畜（獣）共通感染症 zoonosis（zoonoses は複数）というのはFAO（食糧農業機構）およびWHO（世界保健機構）の定義によると“ヒトと脊椎動物との間を自然に移行する疾病および感染症”となっている。従って原因となる病原体はウイルス、リケッチア、細菌、真菌、原虫、蠕虫、節足動物と多岐にわたり、合計122疾患がリストアップされているが、そのうち寄生虫性疾患は45と全体の1/3以上を占めている。ヒトが今後益々動物と共存し、これを利用してゆく上でこの疾患群は看過できない医学上のテーマである。

本日は関西実験動物学会が本テーマをとり上げ、主として実験動物を取扱っておられる会員に対し、主要な zoonotic parasites であるトキソプラズマ、マラリア、赤痢アメーバ、ニューモシスチス・カリニ、イヌ・ネコ蛔虫、鞭虫および糸状虫などについて最近の知見を述べ、意見交換する機会を作られたことは意義あることと考える。聴衆の方々の日常業務遂行上、少しでも裨益する所があれば望外の喜びである。

2. トキソプラズマ及びマラリア

松 本 芳 嗣（京府医大・医動物）

トキソプラズマ（Tp）症は最も代表的な人畜共通寄生虫症の一つである。特に、免疫のない妊婦に感染すると、新生児に重篤な先天性Tp症を引き起こすことがあり、妊婦が特に注意しなければならない疾病の一つである。最近ではAIDSの患者に本症が多発することが注目されている。病原体であるToxoplasma gondiiはネコ科動物を終宿主とするコクシジウムの一種であり、今日までヒトを含め300種に及ぶ哺乳動物、鳥類が中間宿主となることが知られている。我が国各地で実施された各種動物における調査では、フタ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ等が何れも高い抗体陽性率（20～50%）を示し、虫体分離率も同様に高いことが知られている。ヒトにおいては、世界全体で約5億人、即ち約13%が抗Tp抗体陽性であると言われている。我が国で若干の地域差があるものの13%～55%が抗体陽性であり、年齢が増すに従い陽性率も高くなることが知られている。職業別に見ると、動物特に食肉との接触の多い職業に抗体陽性率が高い。ところが実際臨床的にTp症と診断される例は極めて少ない。これは不顕性感染が非常に多いことと、発症しても症状が多彩なため診断が容易でないことによる。不顕性感染の場合でも、Tp虫体は嚢子を形成し永く組織内に留まり、日和見的に発症し宿主を死に至らしめることもあり、また、前述した如く初感染妊婦においては先天性Tp症の危険もある。Tpは非常に複雑な生活史を営むが、ヒトへの感染型として重要なのは増殖型虫体、嚢子、オオシストである。増殖型虫体は外界での抵抗性は極めて弱く、特殊な場合の感染型である。嚢子は増殖型虫体に比べると外界での抵抗性はやや強く、特にペブシン処理にはある程度抵抗性を示し、経口感染が可能である。我が国における市販の食肉、特に豚肉からは高率（10～30%）に虫体が分離されており、ヒトへの感染源として注意を要する。オオシストはネコ科動物の糞便内に排出される。排出時のオオシストは未成熟で感染力は無いが、25℃で2～3日経過するとイソスポラ型の成熟オオシストとなり、経口的感染が可能となる。我が国のネコの抗体陽性率は19～73%と高いにもかかわらず、Tpオオシストの検便による検出率は0～1%と低い。これはTpに既に感作されているネコは再度Tpの感染を受けても一般にオオシストを排出せず、初感染の場合にのみ、しかも1～3週間しかオオシストを排出しないためである。従って感染源としては6ヶ月齢～1才前後の幼ネコが重要である。オオシストは加熱処理（70℃、2分あるいは90℃、30秒）では死滅するものの、一般の外界での諸条件に対する低抗力は極めて強く、有効な消毒薬も知られていない。Tpの複雑な生態を充分理解した上で正確な予防策を講ずることが必要であろう。

マラリアにはヒト固有のマラリアとして四種類が知られているが、その他サルマラリアの人

体感染例が知られており人畜共通寄生虫症として重要である。サルマラリアとはヒト以外の霊長類におけるマラリアの総称で、全て *Plasmodium* 属原虫によって引き起こされ、蚊によって媒介される。これらサルマラリアの確実な自然人体感染例は未だ少ないものの、血液あるいは蚊を介しての実験的、あるいは治療的感染は多くのサルマラリアにおいて成功しており、実際にははるかに多数の感染例があるものと考えられている。我が国においては未だ確かな人体症例は報告されておらず、また我が国に棲息する蚊がこれらサルマラリアをヒトに媒介できるか未だ明らかにされていない。しかしアジアにおけるサルマラリア原虫の宿主には我が国で実験動物として用いられることの多いカニクイザル等 *Macaca* 属のサルが多く、実際我が国に輸入されてくるこれらのサルにはかなり高率にサルマラリア原虫が感染していることが知られている。感染サルの血液の取り扱い、特に汚染された注射針の取り扱いには充分注意する必要がある。

3. 赤痢アメーバ及びその他の消化管内寄生原虫

古 川 尚 男（京府医大・医動物）

I. 人畜共通の消化管内寄生原虫：

アメーバ類としては、Entamoeba histolytica（赤痢アメーバ）、E. hartmanni、E. polecki、E. coli（大腸アメーバ）、Iodamoeba buetschlii（ヨードアメーバ）、Endolimax nana（小形アメーバ）などが知られている。一方、鞭毛虫類としては、Giardia lamblia（ランブル鞭毛虫）、Enteromonas hominis、Chilomastix mesnili（メニール鞭毛虫）、Dientamoeba fragilis（二核アメーバ）、Trichomonas hominis（腸トリコモナス）など、鞭毛虫類として、Balantidium coli（大腸バランチジウム）、孢子虫類としてCryptosporidium muris、それ以外にBlastocystis hominis などがある。

II. ヒトへの病原性：

これらの原虫の中で、ヒトに病原性のあるもの、もしくはヒトの下痢便時によく検出されることから、下痢症の原因に疑われているものなどを含めると、赤痢アメーバ、ランブル鞭毛虫、二核アメーバ、大腸バランチジウム、Cryptosporidium、Blastocystis などがあげられる。この中で特に赤痢アメーバは、ヒトに感染した場合しばしば重篤な症状を示すことがあり、もっとも重要なものである。一方我々になじみのないCryptosporidium は、Levine(1984)によると、哺乳類に感染しているものは全て同一種ではないかと報告されている。我が国ではペットとして飼われていたネコから検出されており、今年始めてヒトの症例も報告された。またBlastocystis は、現在分類学上位置不明の寄生虫であり、最近の諸外国の報告ではヒトの下痢症の原因に疑われており、実験感染によりヒト由来のものがモルモットに感染することが確かめられている。

III. 実験動物の感染状況：

実験動物として飼育されている中で、ここに述べたさまざまな原虫がもっとも高率に感染し、またよく調べられているのは霊長類である。実験動物としてのサルは、ニホンザル以外はほとんど輸入されているのが現状であり、寄生虫学的検査なしで輸入されている現在さまざまな原虫に感染している可能性を考えなくてはならない。

実際に小山ら（1976）の報告から、輸入サルを対象にした人畜共通の消化管内寄生虫の調査結果を述べると、赤痢アメーバはマレーシアおよびインドネシア産カニクイザル52頭中31%、エチオピア産ミドリザル9頭中44%に認め、特にカニクイザルからは

病原性のあるランブル鞭毛虫、大腸バランチジウムなどがそれぞれ5.8%、9.6%に検出されている。またSano ら（1980）は、カニクイザル83頭中55%に赤痢アメーバを認めたと報告している。一方我国で飼育されていた輸入サルを対称として小山ら（1978）が調査した結果では、アカゲザル60頭中43%に赤痢アメーバを検出している。

IV. 感 染 防 御 :

原虫感染の予防には、感染源を絶つという手段と感染源からの感染を防ぐという手段の二通りがある。前者は、感染源となる実験動物に治療薬を投与し治療するという方法で、我国では小山ら（1978）が、さまざまな原虫に感染しているサルにカルバミジン粉末を一頭当り0.1g、10～11日間投与し治療効果を調べた報告がある。治療後1ヶ月目の検査から赤痢アメーバは検出されておらないが、他のアメーバ類の感染の継続が認められている。

一方ヒトへの感染は原虫の嚢子を経口的に摂取した場合に成立することから動物の糞便汚染の防止、手洗いの励行が望まれる。特に赤痢アメーバを例にとると、殺嚢子薬剤として、20倍希釈クレゾール15分、5%酢酸30℃下15分、1%カルボール酸30分及び50℃以上の温度処理などが知られている。

4. ニューモシスチス・カリニ

塩 田 恒 三（京府医大・医動物）

Delanoe夫妻は1912年にフランスのバリで、Trypanosoma lewisi をラットへ感染させて研究をしていたが、本虫陰性のラットの肺に、半月様分裂小体を8個有する嚢子様虫体を見出して、Pneumocystis carinii (Pc) と命名した。その後種々の動物から自然感染が見出されたが、いずれも大した病理変化を示さなかった。1940年代の世界大戦後のヨーロッパで本虫による小児の間質性形質細胞性肺炎が流行して多数の死亡者が出た。また、1960年頃より主に米国において、小児ならびに成人に対する抗癌剤、免疫抑制剤投与後の発症が頻発し、Pc はヒトの肺炎の病原体として注目され、研究が著しく発展した。しかし未だ全生活環境が解明されず、分類的位置も不明である。近年AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) の患者にも高率に併発し、諸外国では動物においてもヒト同様の重篤な肺炎を呈する症例報告が散見され、そのほとんどが死亡している。人畜共通寄生虫症として重要であり、吉田(1981)は本肺炎全般にわたる詳細な記述を著書「ニューモシスチスカリニ肺炎」で行っている。

Pc 宿主域の極めて広い寄生虫で、現在までに報告された自然感染動物は、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル類、ウシ、ウマ、ブタ等、10目、22科、41属、49種の哺乳動物にのぼる。筆者らの京都周辺と北海道の調査では、ハツカネズミ(40.0%)、ドブネズミ(18.1%)、クマネズミ(18.2%)、アカネズミ(7.7%)、ヒメネズミ(9.1%)、ハタネズミ(10.0%)、イヌ(3.7%)、タヌキ(25.0%)にPcの自然感染が認められ、副腎皮質ホルモン注射ネコ16頭中9頭にPcが証明された。実験動物の免疫抑制剤投与によるPc肺炎発症実験にはラット(Frenkel *et al.*, 1966)、モルモット、ウサギなどが用いられ良く発症するが、ハムスターのPc感染は不成功に終わっている。一方、ラットに無蛋白食を与えてPcの発生を誘発することが示され、またヌードマウスのコロニーでの自然発症例も報告されている(Ueda *et al.*, 1977)。Pcの寄生部位は肺胞内で、気道内にもしばしば認められ、感染経路は空気感染と考えられるが、未だ自由生活世代のPcは見出されていない。

Pcは直径2~8 μ mの栄養型と同4~8 μ mの嚢子に大別される。塗抹ギムザ染色標本と位相差顕微鏡によると、栄養型はアメーバ状を呈し、赤紫色に染まる1個の核と、青染する細胞質に数個の空胞を有する。運動性は認められない。未熟嚢子内では核の2分裂が3回行われて8個の核が形成される。これらの核は嚢子内容物と共に新生した膜で個々に取り囲まれて、8個の嚢子内小体(娘細胞)を形成する(成熟嚢子)。嚢子内小体は球状、アメーバ状、バナ

ナ状等多形性を示す。脱嚢は嚢子壁に開いた穴より1個ずつ行われて空の嚢子が残る。一般に嚢子壁はギムザで染まらないが、Chalvardjian's toluidine blue-O (TBO) 染色では紫色に、Gomori's methenamine silver nitrate (GMS) 染色では黒褐色に染まる嚢子壁に加えて、Pc に特有の括弧状構造物も同様に染め出され、両方法は嚢子染色法としてPc の検出によく用いられる。なお軽感染肺組織からの嚢子検出には集シスト法(猪飼ら, 1977)が用いられ、高い検出率が得られている。

Pc 肺炎は日和見感染症の1つであり、宿主が何らかの原因で免疫不全状態に陥った場合に肺胞内ではげしく増殖し、このため放置すると宿主は酸素欠乏を来して死亡する。TB-4 樹脂包埋準超薄切片ギムザ染色標本によると、まず軽度感染肺では少数の栄養型および嚢子がI型肺胞上皮細胞に接着して寄生し、次第に感染が進むとPc の数が増し、組織の変化、とくに肺胞毛細血管の減少が認められる。重度感染肺では肺胞は多数のPc 宿主細胞の残屑、肺胞マクロファージなどで埋めつくされ、air-space はほとんど見られず、毛細血管も著しく減少し、ガス交換能の著名な低下が明らかである(Shiota, 1984)。パラフィン切片HE染色標本では、これらの肺胞は蜂窩状泡沫物質で充満した像として観察され、本肺炎の特徴的所見である。

Furuta *et al.* (1985) は正常ヘテロマウス(nu/t)の脾細胞をPc 感染ヌードマウス(nu/nu)に静注することにより肺炎の治癒および抗体の産生を認め、またPc 感染マウスの脾細胞を正常マウスに静注して遅延型アレルギー反応および受動免疫が伝達することなどから、マウスのPc 感染防御機構に細胞性免疫が重要であると述べている。ラット、ネコ、イヌ等のPc 感染肺において肺胞マクロファージと好中球によるPc の貪食像がしばしば認められる。

本肺炎の予防と治療には trimethoprim - Sulfamethoxazole がよく用いられる。なお、Pc 肺炎は空気感染と考えられるので、アイソレーター内飼育や、フィルター濾過した清浄な空気を使用することで個体間の新たな感染は予防できると考えられる。

5. イヌ・ネコ蛔虫の幼虫移行

及 川 弘（塩野義・油日）

イヌとネコは実験動物としてあるいはペットとして人間生活に身近にいる動物であるが、イヌやネコの寄生虫には人畜共通のものが多い。とくに、近年イヌ蛔虫とネコ蛔虫の幼虫移行症が注目されているので、その概要を考察する。

イヌ蛔虫とネコ蛔虫はともに *Toxocara* 属に属し、前者は *T. canis*、後者は *T. cati* または *T. mystax* という学名が与えられ、それぞれイヌとネコを終宿主とする。成虫と虫卵ともにイヌ蛔虫の方が大きい、大まさでの区別は困難であり、虫体の頭部にある顎翼の形で区別できる。

イヌ蛔虫のイヌにおける感染様式は大別して、経胎盤感染、経乳房（介乳）感染および離乳後感染の3通りである。生後5ヶ月齢頃までに感染した場合、幼虫は幼犬の体内で通常の移動形式を取り、気管を経て消化管腔内に至り、成虫となって産卵する。虫卵は糞便とともに仔犬の体外に排泄される。仔犬の成長とともに年齢抵抗性が現われ、腸管内の虫体は自然に排出され、1～2才以上のイヌでは腸管内の寄生は認められなくなる。生後5ヶ月齢頃を過ぎて感染した場合、幼虫は体組織内に潜伏して、腸管腔に出ることはなく、したがって成虫になることはない。雌イヌが妊娠すると体内に潜伏した幼虫は胎盤を通して胎仔へ移行（胎盤感染）する。集団飼育での観察によると、イヌ蛔虫の経胎盤感染は通常2産目まで認められる。

ネコ蛔虫では経胎盤感染はないが、介乳感染はあるとされる。生後はどの月齢でも感染し腸管腔内で成虫となり虫卵を排泄する。イヌでは哺乳中の雌イヌを除いて成犬は虫卵を排泄しないが、ネコでは幼猫も成猫も虫卵を排泄する点が重要な相違点である。

ノライヌにおけるイヌ蛔虫の腸管内寄生率は幼犬ほど高いが、年齢とともに低下し、2才以上では0%となる。他方ノラネコでは、ネコ蛔虫は成幼にかかわらずどの年齢でも寄生が認められ、24～65%の寄生率が報告されている。都市の街路に遺棄されているイヌ糞便中のイヌ蛔虫卵の検出率は7%前後であるが、公園の砂場では87%の高率を示す例もある。他方ネコについては排便行動の特性から、野外で糞便を収集することは困難である。

ヒトにおける幼虫移行症は皮膚、内臓、眼の3型があるが、イヌ蛔虫の幼虫では内臓移行と眼移行であり、ネコ蛔虫の幼虫では内臓移行である。内臓移行症では幼虫は肝臓、肺、腎臓、筋肉、脳などに侵入して、発熱、肝腫脹、好酸球増多、栄養低下、喘息、神経症などの症状を呈する。幼児に多く、米国で1969年までに200例以上、日本で1983年までに8例報告されている。眼移行症では幼虫は眼球に侵入し、ブドウ膜炎、視力障害などを起こし、最悪のときは失明に至る。米国では5～6才児に多く、1950年から20年間に254例報告さ

れている。日本では成人にも多く、1983年まで20例、1984年に7例報告されている。

診断は免疫学的方法と臨床所見によるもので、幼虫の検出されたのは日本では眼移行の1例だけである。最近免疫学的診断法の進歩により陽性患者の検出が多くなっているので注意を要する。

発症と動物飼育経験の有無とは必ずしも関連せず、イヌやネコの排糞行動からみて、ヒトの生活環境は到る処虫卵で汚染されていると考えられるので、イヌ・ネコ飼育者の公衆衛生思想の向上が望まれる。症状の重篤度からみるとイヌ蛔虫が重視されるが、虫卵の散布度からみるとネコ蛔虫が重視される。

マウスにイヌ蛔虫またはネコ蛔虫の仔虫包蔵虫卵を経口接種すると、幼虫はヒトの場合とよく似た移行態度を示す。またカンクイザルに接種した場合もヒトに似た移行をするので、マウスやサルは幼虫移行症の動物モデルとして好適である。マウス、サル、ヒトはイヌ・ネコ蛔虫の待機宿主 (paratenic host) といわれる。

消化管内成虫に対しては市販の駆虫薬で良好な効果が得られる。移行幼虫に対しては diethylcarbamazine や thiabendazole 等が有効とされるが、マウスの実験では効力の不確実なものもあり、今後の検討が望まれる。

最後に、幼虫移行症対策は ①イヌ・ネコの虫卵検査と駆虫薬の投与 ②イヌ・ネコの糞便の処理 ③免疫学的診断法の向上と検査の実施 ④幼虫駆虫薬の開発 ⑤飼育室での対策（検査と投薬、器具の熱処理） ⑥手洗いの励行、などである。

6. 鞭虫と糸状虫

山 田 稔 (京府医大・医動物)

A. 糸 状 虫

I. 人体寄生の糸状虫： 主要な糸状虫には、バンクロフト糸状虫 Wuchereria bancrofti (W. b.) マレー糸状虫 Brugia malayi (B. m.)、回旋糸状虫 Onchocerca volvulus (O. v.)、ロア糸状虫 Loa loa (L. l.)、常在糸状虫 Mansonella perstans (M. p.) がある。成虫は細長く白い虫で、W. b.、B. m. はリンパ節、リンパ管、O. v.、L. l. は皮下組織、M. p. は腹腔に寄生し、産生されたミクロフィラリア (幼虫) は、昆虫 (カ、ブユ、アブ、ヌカカ) に吸血されるとその中で感染幼虫に発育し、昆虫が再び新しい宿主を吸血した際、感染幼虫は血中に入り宿主体内で成虫となる。W. b. は米国、中国で皮下、肺、乳房寄生が報告され、B. m. でも肺寄生例がある。

II. イヌ、ネコ、サルの糸状虫： (1) イヌイヌ糸状虫 Dirofilaria immitis (D. i.) が心臓の右心室、肺動脈に寄生する。その他、Dirofilaria repens (D. repens)、B. m.、B. pahangi、B. patei、Dipetalonema reconditum が寄生している。
(2) ネコ—D. i.、D. repens、B. m.、B. pahangi、B. patei が寄生する。
(3) サル—B. m.、B. pahangi、B. patei、M. p.、種々の Dipetalonema、その他 L. l.、D. i. が寄生する。これらのうち、D. i.、D. repens、B. m.、B. pahangi、その他 Dirofilaria tenuis (D. tenuis、アライグマに寄生)、Dirofilaria ursi (D. ursi、クマに寄生) がヒトに寄生する。

III. 動物由来糸状虫とくに Dirofilaria による人体例： (1) D. i. —我が国を含め人体例が多い。肺、皮下、時に乳房、胸壁、腹腔、網膜に寄生し、他の糸状虫との鑑別が必要である。右肺特に上、下葉に多く、症状として Coin lesion (銭型陰影) が胸部X線で見つかることが多い。肺癌と誤診されることもあり、病理学的には肺硬塞像を示す。(2) D. repens —人体例増加。皮下、胸壁、眼、舌、陰囊、腹腔、胸壁、肺に寄生。(3) D. tenuis —眼、胸壁、皮下に寄生。(4) D. ursi —世界で2例報告あり。共に胸壁に寄生。(5) その他—米国では動物由来 Dipetalonema の人体例あり。我が国では最近 Ando et al. (1985) が Dipetalonema の一種による皮下寄生例を報告した。

IV. 予防対策： ①カなど媒介昆虫の撲滅。②イヌなどにおける糸状虫感染予防。③成虫、ミクロフィラリアの殺滅。④ヒトを含む宿主がカなど媒介昆虫に刺されないようにする。

B. 鞭 虫

I. 鞭虫： 鞭虫 Trichuris trichiura (T. trichiura) は世界に広く分布し、その形態は細長く食道（前体部）はなお細い。体長は4～7cmで体の3/5は細い食道が占め、その角皮下には bacillary band（顆粒状靱帯）、食道を囲む stichocyte がみられる。主に盲腸に寄生し、糞便内の単細胞卵は外界で3週間で含子虫卵となりヒトに飲み込まれると3ヶ月で成虫となる。虫卵の大きさは $50-54 \times 22-23 \mu\text{m}$ である。成虫は盲腸粘膜内に深く穿入し、出血を伴う下痢、腹痛、体重減少をおこす。糞便内には典型卵以外に大型卵（ $70-80 \times 30-42 \mu\text{m}$ ）がみられることがある。

II. 動物の鞭虫と人畜共通鞭虫症の問題点： ブタの鞭虫（T. suis, 虫卵 $60-68 \times 28-31 \mu\text{m}$ ）はヒトと交叉感染し（Beer, 1976）、サル（T. trichiura, 虫卵の大きさは人と同じ）も最近ヒトに寄生することがわかった（Horii & Usui, 1985）。パハマでネコの鞭虫のヒトへの感染の可能性も指摘された（Wagner, 1979）。イヌの鞭虫（T. vulpis, 虫卵 $70-80 \times 37-40 \mu\text{m}$ ）はイヌに広く寄生し、人体例が最初 Hall and Sonneberg（1956）により報告され、その後 Kenney et al.（1980）その他により30例報告がある。ヒトでみられた大型卵をイヌ鞭虫とする彼ら以外に、Little（1968）、Correa et al.（1980）はヒトの鞭虫の雌子宮内に典型的な卵以外に大型卵を見出したことからこの問題を抱いている。

III. 予防対策： 糞便を介して感染するため、手指の洗滌に心がける。とくにブタ、サル、イヌを世話するヒトは便の始末をきちんとしてすることが大切である。

7. ま と め

吉 田 幸 雄（京府医大・医動物）

ヒトにおけるトキソプラズマ症の発現は大まかに2つに分類される。1つは初感染を受けた妊婦から出生する先天性トキソプラズマ児であり、もう1つは潜在感染の顕性化、すなわち免疫不全、AIDSなどに合併してしばしば全身感染、脳症などの発症をみる。主要な感染源は獣肉中のシスト、固有宿主であるネコの糞便中のオーシストであるが、同じネコでも生後1年未満の若いネコに限られ、オーシスト排出期間もせいぜい3週間、といったことが案外知られていないように思う。質問にもあったが本症の血清診断の結果と疾病との関係は複雑で、個々のケースについて専門医の判断に頼らざるを得ない。

本来サルに感染しているマラリアがヒトにも感染することが外国で知られている。しかし日本国内では蚊を介しての伝播は不可能に近く、感染するとすれば採血時、注射針刺傷によることが考えられ、このことはマラリアに限らずウイルス感染の危険もあり、日々の業務上注意を払う必要がある。

赤痢アメーバ症は法定伝染病であり、重要な寄生虫性疾患である。最近、患者が著しく増加している。外国人症例、海外旅行後の発病が増えているが依然として国内感染例もある。一方、カニクイザルなど輸入ザルに高率に本虫の感染がみられるが、これからヒトが感染したという明らかな証拠はない。しかし糞便処理が適切でないと周辺汚染が生ずる。実験用サルなどは駆虫をしておくのが望ましい。この治療法や効果判定、培養法に関する質疑応答が行われた。

ニューモシスチス・カリニは癌患者や免疫抑制剤を投与されている患者、またAIDS患者などに重篤な肺炎を引き起こし、これを死に至らしめる。米国では全AIDSの60%に本肺炎が発症している。本肺炎はわが国では1984年末までに1038例が登録されている。この原虫はヒトの他に多くの哺乳動物から見出されており、現在の知見によれば、それらは同じ種類であろうと考えられている。しかし正常な免疫能を有するヒトでは、たとえ本原虫に感染しても発症することはまずないので、むやみに恐れる必要はない。

イヌ蛔虫およびネコ蛔虫はヒトの家族の一員となっているイヌ・ネコの寄生虫である所から、ヒトの生活環境は絶えずこれらの虫卵で汚染されている。これらの幼虫によって起こる幼虫移行症は、その診断の困難な所から確証された症例はそんなに多くないが、小児における発症がとくに重視される。イヌ蛔虫は特殊な例外を除き、幼犬のみにその成虫が寄生し、ネコ蛔虫は幼猫・成猫ともに成虫が寄生することに留意し、このような飼育動物は適切な駆虫を施すのが好ましい。

鞭虫の問題で、イヌ鞭虫はヒトの鞭虫に比し虫卵が極めて大きいので区別できる。時々ヒトからこのような大型卵がみつかってイヌ鞭虫の人体寄生として報告される。しかし我々の所でヒトを駆虫して得た鞭虫の子宮内卵をしらべてみると大・小2種の卵がみられ、あながちイヌ鞭虫の感染と早合点するわけにはいかないことがわかった。

フィラリアで最近問題になってきたことはイヌ糸状虫の人体感染である。わが国で現在までに確実な症例が35例報告されている。寄生部位は肺が最も多く、ついで皮下、腹腔、子宮などである。外国では数百例が知られている。これらは蚊を介しての感染と考えられる。

上記の他にもまだ種々の人畜共通寄生虫病が存在するが、要は単に恐れるだけでなく、それらの生態をよく知り、適確な感染予防策を進め、問題を克服してゆくのが賢明であろう。

〈 第 10 回 研 究 会 〉

学術講演会

演 者： 林 裕 造

（国立衛試・安全性生物試験研究センター病理部長）

演 題： 癌原性試験の現状と問題点

日 時： 昭和61年 7 月 3 日（木曜日）

場 所： 京 大 会 館

山田淳三（京大・医）： 今日国立衛生試験所の病理部長であります林 裕造先生をお招きし、癌原性試験の現状と問題点と題してお話しを伺うことにします。

申すまでもなく、われわれ動物を扱う者にとって癌原性試験は年余にわたるもっとも長期の動物実験であり、それだけ実験計画の立案から実施、data の解析など、通常の実験とは違った複雑な問題をかかえております。そこで今日は、この分野の第1人者であります林先生に専門家の立場からいろいろと御教示を受けたいと思います。司会は、現場の立場からこの分野に経験の深い武田薬品・中研の宮脇先生をお願いします。

宮脇宏彰（武田薬品・中研）： 林先生は非常にお忙しい方ですが、今日は大変無理なお願いをして、貴重なお時間をいただくことにしました。御講演時間は約1時間で、次いで質疑応答ですが、十分な時間をいただけることですので諸先生方の積極的な御発言を期待します。まず、御講演内容を3つにわけまして、はじめに癌原性試験の現状についてお話しいただき、ついで癌原性試験の際に遭遇する自然発生腫瘍の具体例をお示しいただき、最後に癌原性試験の今後の問題点についてお話しいただくことにします。

それでは林先生よろしくお願いします。

林 裕造（国立衛試・病理）： 今日はお招きいただきましてありがとうございました。宮脇先生から御紹介にありました課題を3つに分けてお話ししたいと思います。まず、ガイドラインというものを通じて、現状の癌原性試験を実際の医薬品の開発研究の中でどのようにやったらいいか、どのように評価したらいいかということをお話しして、次に癌原性試験の際に遭遇する具体的な自然発生腫瘍の病理像をスライドでお示しし、最後に将来、癌の一次予防ということ考えた場合に、発癌の研究はどうあらねばならないかということをお話しすることになります。

毒性、安全性の検討を目的とする各種動物試験の評価

1. 評価が可能な試験であるか否かの評価（技術面の評価）
2. 試験成績の評価（動物実験レベルでの評価）
3. 関連データを含めた総合評価（人への外挿を指向した評価）

癌原性試験だけではなく、毒性試験あるいは安全性の検討を目的とする動物試験を評価する場合には3つのレベルからみる必要があります。最初はその試験結果が、評価可能な試験であるかどうかという評価です。いうなれば技術面の評価です。

2番目は、動物試験で得られた成績を動物実験レベルで評価しようとする評価です。

3番目は、そういうものを全部含めて、あるいは関連データを全部含めて、総合的に評価するということで、これは、人への外挿を指向した評価です。このような3つのレベルからの評価は癌原性試験を含めて一般の毒性試験すべてに共通であると思います。薬理試験も同様です。

技 術 面 の 評 価

1. 試験計画が適切にたてられているか？
2. 施設、人員を含め、試験の実施が適切であるか？

最初に技術面の評価ということです。この場合すぐに、これはガイドラインにあっていとか、GLPに適合しているかということになりますが、そうではなくて、今問題にしているある薬の candidate の化学的性質、生物学的性質あるいは人への投与ということ考えた場合、目的に照らした試験計画が、適切に立てられているかどうかという評価です。ある面ではガイドラインというものを含めていますが、もっと深い意味があるわけです。もう一つは、やはり施設とか人員とかを含めて、その試験の実施が適切であるかどうかの評価も含まれます。動物試験というものは、人によっては非常に重要視されますが、人によっては、たかが動物じゃないかという考えが先に立ち、とにかく規則に従ってやればよいという様にとられる事もあるので、少し余計なお話をする訳です。

試験動物の選択

1. 2種、両性

被験物質に対する生体の反応性に種差、性差がありうる

2. 入手しやすさ、寿命、サイズ

3. 系統の選択

寿命、自然発生腫瘍、既知発がん物質に対する感受性

代謝の問題、実験開始： 通常6週齢

特に癌原性試験というものは2年とか3年にわたる長期の実験でありますので、最初の試験計画をきっちりやるかどうかで後の評価が非常に変わってまいります。そういう点で、どうしても考えておかなければならないことをいくつか表にまとめてみました。最初は試験動物の選択ということです。ガイドラインの中にありますように、被験物質に対する生体の反応に種差や性差がありうるから、2種類の動物の両性を使うということが原則であります。これは、日本だけではなくて国際的にも明記されております。動物に何を使ったらいいかという事ですが、人間と同じような反応性を示す動物がいいというのは当然ですが、そういう理想的な動物は実際にはなかなかいないということで、やはり入手し易いということと、適切な寿命を持っているということで決められます。寿命があまり長すぎると実験になりませんし、サイズの点で使い易いものでなければならないということで、ラット、マウス、ハムスターの3種が、癌原性試験のような long-term の実験に最もよく使われます。系統の選択は非常に大事なことで、まず寿命がある程度長くなければガイドラインに沿った試験が出来ません。化学物質によってできてくるかも知れないような腫瘍が自然発症してくるような strain を使いますと最終的な評価が難しくなりますので、これも問題になります。

それから、既知発癌物質に対する感受性の問題も考慮しなくてはなりません。できれば、自然発生腫瘍が少なく、既知発癌物質に対する感受性が高いような系統を選ぶのがいいということです。それから、実験開始はできれば若ければ若い方がいいということですが、あまり若いと健康の上で適切でない動物が入りこむ可能性もありますので、通常生後5週から6週齢で使うというのが原則になっています。では何匹ぐらい動物を使ったらいいかということですが、

ガイドラインでは1群50匹ということになっています。その理由は、1群の数が40匹あれば、対照群と実験群の間で腫瘍の発生率に10%以上の差があったときに、95%の信頼限界で発生率に有意差があったと言えるので、だいたい50匹あればよいと言っているわけです。もし1%の差で何かものを言おうとすれば、1群1100匹使わなければいけませんし、0.1%では、1群1万何千匹ということになると思います。いうなれば、1群50匹の動物を使うということは、だいたい10%の変化でものを言うということで、設定されたものです。

被 験 物 質 に つ い て

1. 純 度 と 安 定 性
2. 飼 料、水あるいは担体中での安定性
3. 所定量が所定期間動物に与えられていたか？ もしくはどの位の量が所定期間動物に与えられたか？ についてのデータが必要

私達、動物をあつかう人間は、あまり被験物質に注意をはらわないようです。実際問題としてWHOとかIARCの会議で、色々な所から提出されてきた癌原性試験の論文を評価する場合、まず、その論文の中に被験物質についての記載がしっかりしていないものは、どうも評価のランクが低くなってしまいます。どうすればいいかというと、たとえば、バルクについて純度と安定性をきちっと記載しなければいけないということです。melting point やその他の物性もいちおう書かなくてははいけません。specification をきちんと書くことが大事だということです。それからもう一つは、癌原性試験ですと多くの場合、飼料に混ぜたり、水に混ぜたり、あるいは適切な担体に混ぜて動物に投与することになりますが、その時の担体中あるいは飼料中の安定性を示すデータを記載しておくことが要求されています。

それから一番大事なのは検体の所定量が、所定期間動物に与えられていたかどうかということを示すデータが欲しいわけです。あるいは、どの位の量が所定期間動物に与えられたかということですね。いうなれば、検体が担体中でどの程度安定であるか、何%の割合で担体中に含まれているか、そして動物がどの位摂取したかが分ればよいということです。

投 与 経 路 の 選 択

1. 人における臨床適用に準じた経路

経口投与、皮下注射、皮膚塗布等

2. 1. が技術的に困難な場合には、各検体の体内動態からみて当該投与経路を採用する

静注→腹腔内、筋注→皮下注

臨床適用経路と異った方法を用いて試験を実施する際には、変更した経路によっても目的にそった結果が期待されうる科学的根拠を明確にしておく要あり

その次に投与経路の選択です。これはやはり人における臨床適用に準じた経路を使うということです。しかし経口投与とか、皮下注射とか、皮膚塗布ならば、これは実験上あまりさしつかえないので問題ないが、中には技術的に困難な場合があります。そういう場合には、各検体の体内動態という立場から見て投与経路を決めるということが、原則になっております。たとえば、静脈注射を2年間続けるのが難しいとすれば、腹腔内投与にするとか、筋注はピッコになるから皮下注射にするとかというようなことです。この場合特に重要なのは、臨床適用経路と異なった経路によっても目的に沿った結果が期待されるという scientific な根拠を明確にしておくことが必要です。例えば論文を書かれる場合にもこういう理由でこういう投与方法に変えたということが、きちっと書いてあればいいわけです。昔、何はともあれ動物に癌を発生させる物質をすべて発癌物質だといった時代がありました。たとえば、皮下注射を毎日やったらそこに sarcoma ができたという場合です。たしかに薬物を皮下注射すると、癌を作ります。蒸留水でも皮下注射をずっと続ければ癌ができますし、オリーブ油でもそうです。そういうことで、皮下注射、特にラットを使った皮下注射による局所の腫瘍発生の評価には問題がある事がわかり、それ以来、投与経路に関する問題は非常に重視されているわけです。ただし、皮下投与でも水とか蒸留水とか、オリーブ油とかではなくて、あきらかに発癌性を示すという場合がありますので、そのような試験結果をどうするかということについては、あとで質問があればお答えします。

投 与 量 の 設 定 (1)

発癌性試験に、何故、最大耐量 (MTD) というような大量の投与がおこなわれるか？

1. 発がん率は全投与量に、発がんまでの時間は1日当りの投与量に依存する。従って、投与量を大にする方が試験の感度が高くなる。
2. 前臨床試験として実施される発癌性試験は、既知発がん物質を使用する実験とはことなり、被験物質の非発がん性もしくは微弱発がん性の認定を目的とする場合が多い。従って、出来るだけ試験の感度を高くする必要がある。

MTD： 亜急性試験の結果から決定

癌原性試験の場合には、何ととっても重要なのは、投与量をどの位にしたらいいかということが一番重要な問題になります。他の毒性試験でもそうですが、特に、癌原性試験は投与量の決定であとの試験結果の良し悪しが、ほとんど決まってしまうというくらいです。ガイドラインを見ますと、日本ばかりでなく、FDAでもOECDでも必ず動物が耐えうる最大耐量を使えというようなことが書いてあります。なぜ最大耐量を使わなければならないかということが一つの大きな問題になるわけです。これを少し説明しますと、これは非常に古くからの実験ですが、典型的な発癌物質を使って実験していますと、最終的に見たある特定の癌の発生率は全投与量に大体 depend するということです。また、発癌までの期間が大体1日当りの投与量に depend するということです。そういたしますと、たとえば、1日当りの投与量を大きくする方が試験の感度を高くすることになるというわけです。そこで今、ある薬の癌原性試験を実施しようという場合に、どういう前提があるかといいますと、nitrosamine のような既知の発癌性物質を使用する実験とは全く異なった性格を持っているのです。一般的にはこれから検査しようとする薬物はたぶん発癌性がないんじゃないか、たとえ、あったとしても非常に弱いんじゃないかということをおあらかじめ頭に入れて実験を組むわけです。そうしますと、発癌性がないか、あるいは非常に弱いということを使うわけですから、できるだけ試験の感度を高くする必要があるわけです。そのために癌原性試験の場合には、最大耐量というような大量を使う

ことが行われているわけです。では癌原性試験の最大耐量（MTD）をどうやって決めるかということですが、これはガイドラインに非常に詳しく書いてありますので、詳しく説明する必要はありませんが、2カ月とか3カ月とか、もっと長くてもいいですけど、そういう亜急性毒性試験をやって、それによって動物が死なないとか、非常に強い毒性がないとかの手掛りをつかんで癌原性試験の最高用量を決めようということです。

用 量 の 設 定 (2)

MTD, $a \cdot \text{MTD}$, $a^2 \cdot \text{MTD}$, $a^2 \geq 0.1$

MTD: 実験値～(MTD) a : 公比

何故 $a^2 \geq 0.1$ か?

1. MTD > (MTD)

MTD群死亡、 $a \cdot \text{MTD}$ と $a^2 \cdot \text{MTD}$ 群に腫瘍発生ない場合

1) $a^2 \geq 0.1$ ならば、発がん性なしと言える

2) a が小さいと、発がん性なしと言い難い

2. 微弱発がん性の場合

1) $a^2 \geq 0.1$ ならば、用量反応の検討が一般に可能

2) a が小さいと $a \cdot \text{MTD}$ 以下の群は発生率0となり評価が困難になる

癌原性試験の最高用量が決まったとしますと、では中用量とか低用量とかをどうやって決めたらいいかということが問題になります。一般的には公比 a を作って、 $a \cdot \text{MTD}$ を中用量、 $a^2 \cdot \text{MTD}$ を低用量とするというようなことが、ガイドラインに書かれているわけですが、この場合に問題になるのは、原則として、最低用量は最高用量の $1/10$ 以下であっては困るということです。何故 a^2 は 0.1 よりも大きいとか等しいという規定があるかということですが、今、MTDを3カ月か4カ月の実験で決めたとします。これがその時点では、MTDに近い値だと判断されたのですが、実際には本来のMTDよりも大きかったということがあり得るわけです。

こういう場合には、動物は癌原性試験の途中でバタバタと死んでいくということになります。
 もしも、MTDの最高用量群がほとんど死んでしまって、中用量、低用量は生き残ったけれども significant な腫瘍の発生がなかったとします。この場合、もしも a^2 が 0.1 よりも大きい、等しいとすると、MTDとこの用量の間に $1/2$ とか $1/3$ とかそういう値になり、MTDとの間がそれ程離れていないことになり、たとえ MTD の用量で動物が死んでしまっても、次の用量をこれに代用しうるかも知れないということが考えられるわけで、この場合には発癌性がないということが言えるんです。ところが a が非常に小さいと、たとえば、0.1 ということになったとしますと、MTD 群が死んで次の用量の動物が生きたけれども癌がなかった場合、もしかすると、その上の用量で癌がみられた可能性がありうるので、発癌性がないとは言えないんじゃないかということです。これが一つの理由です。もう一つは、もし非常に微弱な発癌性がある場合、たとえば、最高用量群にある特定の癌が 20% 出たとします。20% というのは発癌性の判定にとって非常にたよりない数値なのですが、そういう場合に、もし a が大きくて $1/3$ とか $1/2$ とかになりますと、中用量でも 10% ぐらい癌がみられ、その結果、全群を通してみると一定の用量関係が見られる事になります。用量関係が見られると、発癌性があるかも知れないということが言えるわけです。ところが a が非常に小さいと、MTD で少し癌が出るという程度では、それ以下の群ではたぶん発生率は 0 になり、評価が非常に難しくなるということになります。そういう理由で、この規定が書かれているのです。
 ただし、あらかじめ発癌性があるにちがいないか、あるいは発癌性があることがわかっているけれども、有用性から考えて、どうしても開発に結びつけたいというような物質を対象とする場合には、はじめから別の方法を考えてもかまわないということです。

投 与 期 間 と 試 験 期 間		
投 与 期 間	ラット	24-30カ月
	マウス	18-24カ月
	ハムスター	
試 験 期 間		30カ月まで

その次は、投与期間と試験期間です。投与期間と試験期間と同じじゃないかと言う人もあると思いますが、投与期間は、ラットの場合には24～30カ月とか、マウスあるいはハムスターでは18～24カ月ということになっています。これは、あまり短かいと出るべきものが出ないかも知れないし、あまり長いと自然発生腫瘍のノイズが入って解析が難しくなるということで、こういう風に決められているわけです。また中には、投与を終わってすぐ屠殺してしまうこともあり、その場合には投与期間＝試験期間になりますけど、中には1カ月から2カ月おいて屠殺しようという場合もあるわけです。その場合には、試験期間と投与期間は違ってくるわけです。いずれにしても、全試験期間は30カ月を越えることは望ましくないということです。

試験期間中の検査項目にはいろいろありますが、最終的な評価の助けになり、これだけはやってほしいものについて触れたいと思います。まず体重です。著しい体重抑制があるかどうかということが非常に重要となってくるわけで、もし体重減少が腫瘍の発生に伴うものだとすると、あとの動物の care をどうしたらいいかという問題に結びつきます。腫瘍発生とは無関係に体重がどんどん減っていくとなると、これは dose 設定が悪かったのではないかということになります。死亡率は非常に大事で、一般的には、腫瘍によらない死亡率が50%をこえてはならないということになっています。ラットでは24カ月時点、マウス、ハムスターでは18カ月時点で50%を越えてはならないということですが、これは最終的な評価の統計解析のときに評価に使える動物が40匹ぐらいはほしいということなんです。ですから、41%でもいいですし、52%でもいいですけど、だいたい50%が原則ということですね。それから、一般状態の観察所見ならびにそれに随伴する検査、たとえば、貧血があるかどうかということは白血病の類推に非常に大切です、白血球の counting なんかも非常に重要です。それから何はともあれ、重要なのは、被験物質の摂取量を計算できるようなデータはどうしてもとってほしいということです。

病 理 学 的 検 査 の 前 提

1. 共喰いや、自己融解等のために十分な病理学的検査がおこなえない例数が全例の10%をこえてはならない
2. 注意深い肉眼観察
3. 肉眼所見と組織学的所見との対応

癌原性試験の最終的な評価は、1匹1匹の動物を解剖して、その組織検査を行うことが基礎になるものですから、やはり病理検査は十分にやらなければなりません。病理組織学的検査が充分に行われるためには少なくとも共喰いや、自己融解などのために十分な病理学的検査が行えない例数が全体の10%をこえてはならないという規定が書かれています。この点についてはOECDの規定はもっときびしいのです。次に剖検時の注意事項として、注意深い肉眼観察をせよということですが、これははっきりした癌が出ていればいいのですが、中には小さいものもあるわけです。癌というのはできあがってしばらくの間は発育速度が非常に遅いように見えるのですが、ある時期になると非常に速くなるのが普通です。たまたま2年目が小さいものが出た時期であったということもありうるので、見逃すこともあるわけです。ですから、注意深い肉眼観察をしてマクロの所見をきっちり書いておくということが大事だと思います。その次に大事なことは、肉眼的に認められた部分がはっきりと組織標本の中に組み込まれるような注意を払うということです。これがないと、たとえば京大の先生に組織所見を見ていただくとしても、見えないものは見えないということで、やはりこれだけはきちっとやっていただきたいと思います。

病理組織検査における注意事項

1. 診断基準を明確にする
 - 1) 過形成と腫瘍
顕微鏡でみとめられる程度の小さな結節性病変でも、周囲への圧排像があれば腫瘍の部類に入れる？
 - 2) 良性と悪性
細胞異型、組織異型のみで悪性とする？
浸潤像、遠隔転移を悪性の根拠とする？
2. 個々の腫瘍について、組織型や構成細胞の記載を必要とする事もしばしばある

その次に、病理組織検査を実施する際の注意事項をいくつかまとめてみました。大切なのは診断基準を明確にしておくということです。特に大切なのは、過形成であるか腫瘍であるかを区別するということです。過形成となりますと、これは非腫瘍性病変であります。これは、人によっていろいろ判断が違ふ場合があるわけです。たとえば、顕微鏡でやっと認められるような小さな結節性の病変であっても、周囲への圧排像があれば腫瘍の部類に入れるかたもいるわけです。これは、間違いじゃないんで、こういうかたもいるということで、これは一つの診断基準になるわけです。ただ中には、そういうものは過形成にいれて、あきらかな腫瘍と思われる像がほかの例にあって、そういうものと比較してあきらかな移行像が見られるというものだけを腫瘍の中に入れるという人もいるわけです。それはそれで一つの診断基準ですからいいと思うんです。それをばらばらにすることがいけないのです。一人の人が見るという場合には診断基準がバラバラであるということはないと思いますが、複数のかたが見るという場合に、それぞれ別の診断基準に従うということになりますと、最終的な table がおかしくなるので過形成と腫瘍との鑑別診断基準はきっちりとしておいた方がいいということです。もしも、ある一定の診断基準で書かれていたとしますと、例えば、レフェリーとかその論文を読んだかたが、別の意見を持っていたとしても適切な訂正ができます。ですから診断基準を明確にして、それを論文とか、報告書の中にきちっと書いておくということが大切です。それから良性とか悪性とかということ、これも非常に大きな問題です。中には細胞異型とか組織異型のみで悪性とする方もおられます。ご存知と思いますが、動物の場合なかなか転移とか invasion とかが

見られない場合がありますが、細胞異型ははっきり見られることが非常に多いのです。ですから、これを中心に判断する方がおられるわけです。中には浸潤像とか遠隔転移がはっきり見られなければ悪性とするのはおかしいという非常に conservative な診断をつけられる方もいるわけです。しかし、基準が明確に記載してあって、基準に従って診断さえすればいいということで、3番目の標本と、5番めの標本で基準がちがうというのでは困るわけです。それから、もう一つの問題として顕微鏡で見る時に、これは胃癌だとか、大ざっぱなとり方をする場合があります。一般に、動物実験では人体の病理と違って、案外大ざっぱな分け方をする場合が多いのですけれど、やはり組織型とか構成細胞の種類についての記載を必要とする事がしばしばあります。こういうことをきちっと書くことを習慣づけることは実験病理についても非常に必要なんじゃないかということです。例えば、下垂体の腫瘍などは control でも非常に高率にみられ、多くのものは、免疫組織化学などを使わない限りはほとんど chromophobic adenoma と診断されます。ところが、ある種の化学物質を使いますと塩基好性の adenoma が非常に高率に出る場合があるわけです。そういう場合には下垂体の腫瘍、下垂体腺腫として集計しますと、対照群と実験群の間に差がないということになりますが、特殊な性格の腺腫ということになりますと差が出てきます。全てそうなるとは限りませんが、やはり、組織型とか構成細胞の記載を考える必要があると思います。そのほかに、腫瘍発生部位も大切です。例えば、胃の前胃と腺胃は当然違いますし、腺胃の中でも、どの部位かということをはなるべく記載しておいた方がいいということです。もっとも、最終的な統計計算をする時にそれが不要でなくなる場合も多いですが、やはり検査している時にはなるべく細かくやっておいた方がいいということです。

発癌性試験の判定基準（１）

化学物質の生物作用に関する検索結果を判定する手順として、一般的には、検体に対する生体反応を数量的なデータで表し、次にそれらの数値について統計学的解析を行って対照群と実験群の差あるいは用量作用関係が検討される。発癌性の検索においても、原則的に1例1例の病理検査成績に基づいて各群について何らかの数量的データ、例えば発癌率あるいは癌発生までの平均期間などが算出され、それについて統計学的解析が実施される。

その次に組織検査も終わって、試験データのtable もできたとして、さて、どうやって評価したらいいかということが問題になります。まず、化学物質の生物作用に関する検査結果を判定する手順ですが、これはどんな場合でも同じで、検体を投与したことによる生体反応を何らかの数量的データで表わして、次にその数値について統計解析を行なって対照群と実験群との間で差があるかどうか、用量／作用関係があるかどうかということを見るのが 一般的な原則です。癌原性試験の場合でも同じことなので、1例1例の病理検査成績に基づいて各群について何らかの数量的なデータを出します。ある特定の腫瘍の発生率あるいはその腫瘍の発生するまでの平均期間、このようなものが数量的なデータになるわけです。こういうものを集めて、それについて統計学的な解析をするのが一般的な方法です。発生率に差が出た場合に、どういう統計学的手法を用いたらいいかということです。これは、私たちよりもみなさまのほうが専門だと思いますので省略しますが、例えば、分散分析の方法もあります。ただここで問題になるのは、対照群と実験群との間にかなり死亡の経過が違ってきた場合に統計学的処理がやりにくなるわけです。そういう場合には、どうしても age を adjust するような統計解析法を使う必要があるわけで、例えば、IARCの1979年の monograph の中に癌原性試験の統計解析法という chapter があって、その中に Peto が書いた論文があります。あれが非常に参考になると思います。

発癌性試験の判定基準（2）

WHO Tech. Rep. Ser. 426 (1969) では、検索結果に統計学的解析を行い、次のような形式の反応がみられた場合に発癌性が陽性と判定されると述べている。

- 1) 対照群にみられないタイプの癌の発生があった場合
- 2) 対照群にもみられる癌が実験群により高率に発生した場合
- 3) 対照群に比べて、より多種類の臓器・組織に腫瘍の発生がみられた場合
- 4) 実験群と対照群の間で発癌率の差はみられないが、実験群における癌の発現が対照群に比してより早期な場合

統計解析が終わりますと、次にはその結果からどういう場合に発癌性があると判定したらいいかということを考える段階に入ります。ただ、ここでちょっと注意しなくてはいけないのは、従来、発癌性があるというのは、体細胞の遺伝子に影響が与えられて癌細胞になったという場合を指しましたが、ここではそういう判断じゃないんです。その薬を投与した群において、ある特殊な腫瘍の発生率が対照群よりも高かったとか、あるいは、でき方が早かったというものを全て発癌性があると定義しようというとり決めをしているわけです。まず、対照群に見られないタイプの癌の発生があった場合に、これを発癌性があったと考えようということです。第2番目は対照群にも癌の発生が見られるけれども、実験群の発生率の方がより高率であった場合、3番目は対照群に比べてより多種類の臓器あるいは組織に、腫瘍の発生が見られたという場合です。もう一つは、実験群と対照群の間で最終的には発癌率に差はなかったけれども、実験群での癌の発現の時期が対照群に比べて早かったという場合、これも発癌性があるという範疇に入れようということです。これはWHOの technical report シリーズの1969年に出的もので、いまでもこれが、いちおうの基準になっているわけです。とにかく対照群よりも実験群の方に癌がより多くできたとか、あるいはより早くできたときに、すべて発癌性があると見做そうということであって、そういう作用をもつ物質の全てが遺伝子を障害して、正常細胞を癌にする物質であるとは限らないのです。

発癌性試験の判定基準（3）

化学物質に対する一般の生物反応に比べて発癌の過程は極めて複雑なので、単純な統計学的解析だけでは誤りを招く危険もある。例えば、明らかに癌とみなしうる病変の発生率が低く、対照群と実験群との間に統計学的有意差が認められなくても、同じ臓器にいわゆる前癌性変化あるいは癌の発生母地と思われる病変が高率にみられる例では、検体のその臓器に対する発癌性の疑いは濃厚である。

今ここで大事なのは、発癌物質に対する生体反応を考えていきますと、急性毒性試験とか、あるいは薬理試験の場合には非常に短期間で勝負がつくわけです。ところが、癌原性試験の場合には非常に長期の実験になるわけで、その過程は非常に複雑なんです。だから、単純な統計学的解析では、あやまりを招く場合があると考えられます。例えば、明ら

かに癌と考えていい病変の発生率は高くないし、統計学的に対照群と実験群の間で差はなかったとします。しかし、組織学的に検査しますと、同じ臓器、例えば、肝臓の中に結節性肥大とか肝硬変があり、いわゆる前癌性病変と見做しうる変化や、癌の発生母地と思われるような病変が対照群に比べて significant に高率に見られたという場合です。しかも、わずかに癌の発生が高かったという場合には、確かにこの end point だけから考えると、統計学的な有意差はないんだけど、その背景病変を考えると確かに発癌性を疑った方がいいんじゃないかということになるわけです。また逆に、自然発生と考えられる腫瘍が対照群では低かったけども、高用量と中用量では非常に高かったということも起こるわけです。その場合、対照群が通常に比べて非常に低かったために、一見高く見えるということもあるわけです。そういう時には historical control を考えますと、どうもこれは実際に薬によってできたのではなくて、たまたま対照群が incidental に低かったためであるということになるわけです。この場合には、発癌性の疑いは非常に少なくなってくるわけです。だから、いずれの場合にもプラスの方向にもマイナスの方向にも、統計学的解析だけではあやまりを起こすことがあるということで、やはり、全体を充分に見なくてはならないということになるわけです。

発がん性試験での結論をいかに評価するか？

発がん性がみられなかった場合
強力な発がん性がみられた場合
軽度な発がん性がみられた場合

次に、癌原性試験での結果をいかに評価するかという問題です。手短かに言うと、この薬を人に使っていいか、いけないかということです。発癌性がなかったという結果が得られた場合には、もちろん問題ないわけです。他に毒性があった場合には別ですが、発癌性に関する限りは問題がないわけです。それから、非常に強力な発癌性が見られたという場合、これもやはり薬としては不適當ですので、一般的には問題にならないわけです。もちろん強力な発癌性はあるけれど、どうしても薬として使いたいということがあるかも知れませんが、一般的にはありません。実際に評価上問題になるのは、軽度な発癌性が見られた場合どう考えるかということです。

発がん性の質的評価

1. Genotoxic carcinogen (primary carcinogen) ?

変異原、標的細胞に対するDNA 障害を示唆する所見、
化学構造、代謝活性化による electrophilic intermediates の
生成の可能性等

2. Epigenetic carcinogen ?

上記条件の否定

1) Secondary carcinogen

内分泌環境、代謝環境等への影響を介して生体のどこかに腫瘍が発生
しやすい場をつくる

2) プロモーター

自然発生腫瘍の促進等

ある薬が、標的細胞の遺伝子を直接に障害して、あるいはその薬の active metabolite がその標的細胞の遺伝子を障害して癌化させるようなタイプの発癌物質であるのか、あるいは、全然別個の作用で、たまたま癌を誘発するのかということによって評価が変わってきます。genotoxic carcinogen であるのか epigenetic carcinogen であるのかという2つを区別するということが大事なわけです。前者と後者とでは非常に取り扱いが変わってくるということになります。まず、genotoxic carcinogen であるにしてもないにしても、それを示すためにはそれなりのデータが必要です。一般の癌原性試験では、こういうものは区別できないわけで、とにかく癌をつくったかつくらなかったかということだけです。これは別の方法で考えなければ解決できないことです。例えば、変異原性を見るということが必要でしょう。ただし、変異原性を見たからといって、本当にこれが生体に働いて癌をつくったという証明にはならないわけです。たまたま、こういった作用があったというだけの話ですから。大事なのは、通常の癌原性試験で癌が見られた部位の標的細胞に対してDNA障害を示す所見があるかないかということをはっきり見極めることです。また化学構造である程度類推することも必要ですし、代謝活性化によって類推する、例えば Electrophilic Intermediate の生成が可能かどうかの類

推も非常に重要な項目になるわけです。このようなことで、genotoxic carcinogen であるかないかを決めるということです。それから epigenetic carcinogen の評価については、まず、genotoxic carcinogen であるということを否定することと、どういうメカニズムで癌ができるかということを積極的に決めるということが必要なわけです。例えば、内分泌環境を変えたり、代謝環境を変えて、生体のどこかに腫瘍が発生し易い場を作るということがあるわけです。内分泌環境の問題としては、estrogen や prolactin を上昇させるというような作用があげられます。例えばトランキライザーは直接に乳腺に癌を作るわけではなくて、やはり prolactin が影響していると考えられる場合があるわけです。このように直接標的細胞に作用するのではなくて、内分泌環境とか代謝環境の影響を介して生体のどこかに腫瘍が発生し易い場を作っているということをはっきり決めればいいわけです。それからもう一つは、プロモーターということが考えられるわけです。これは実際にはその物質が正常細胞を癌化したのではなくて、ただ単に自然発生の腫瘍の発生を促進しただけであるということもあるわけで、それならそうで、きちっと証明することが大事なわけです。

動物で発がん性が認められ、かつ
人への使用を考える際の対策

Genotoxic carcinogen

臨床用量を基礎にした低用量を含む dose-response study

人での投与期間 }
risk-benefit } を考慮して判断

Epigenetic carcinogen

genotoxic carcinogen ではないことを十分に確かめる

腫瘍の誘発に通ずる作用の程度を調べる

では具体的に動物で発癌性が認められたが、その薬を人に使用したいというような時にどういうことを考えたらいいかということです。これはやはり case-by-case で考えなければなりません。一般論としては、もしも、その物質が genotoxic な carcinogen であるということがわかっていて、動物での癌原性試験で発癌性が認められ、いろいろなテストをしてみて、やはり epigenetic ではなくて genotoxic だけれども人に使いたいという場合、実際には抗癌

剤によくあるわけですが、そういう場合には、臨床用量を基礎にした低用量の実験を含めた dose-response study を行って、その結果と人での投与期間あるいは投与量に基づいて risk と benefit を考慮して判断するということになるわけです。また、逆に発癌性はあるが、どうも genotoxic ではないと考えられる場合には、genotoxic な carcinogen でないということを十分に確かめるということが必要なわけです。たとえば、トランキライザーで乳腺に癌ができたという場合に、やはりラットだからプロラクチンが関係しているのだろうと考えるのが普通で、調べれば確かにプロラクチンが上昇しているのかも知れないけど、もしかすると、その物質が direct に作用している事もあるかも知れないのです。だから、そうでない事をはっきり確かめることが大事です。また、もし genotoxic でないということがわかった場合には、腫瘍の誘発に通ずる作用、例えば、トランキライザーが、プロラクチンを上昇させる作用や、甲状腺とか下垂体の腫瘍発生の場合には TSH を上昇させる作用がどの程度のものかということ調べた上で risk-benefit を考慮して判断するということが大切です。

次に F344 ラットの比較的珍しい自然発生腫瘍についてお話しします。まず、

- 1) 包皮腺腫瘍および陰核腺腫瘍です。Wistar ラットでもみられることがあります。腫瘍細胞はカリフラワー状に増殖しますが、なかには異型度が強くて腺癌といえるものもあります。組織学的には皮脂腺に似ています。
- 2) 中皮腫は自然発生でもおこりますが、メチルニトロソウレアなどのような発癌剤で発生率が高まるので注意が必要です。発生部位は精巣周囲です。
- 3) 精巣間細胞腫に合併してみられる腺腫様病変は、起源が必ずしも明らかではありませんが、精細管の変性に起因するセルトリ細胞からの化生が示唆されています。
- 4) 悪性組織球腫は Donryu ラットに見られます。
- 5) 顆粒細胞腫は脳の表面に発生し、髄膜を起源とすることが示唆されています。
- 6) 育索腫の実験動物での発生は極めて稀ですが、組織学的には担胞細胞が特徴的です。
- 7) 前立腺の増殖性病変は前立腺の腹葉に発生し、過形成または腺腫が意外に多くみられます。

〈 癌 原 性 試 験 の 今 後 の 問 題 点 〉

— 低濃度発癌実験を中心として —

癌原性試験の究極の目的は人間の癌の一次予防のために必要なデータを提供する事であります。勿論通常の癌原性試験を漫然とやればよいというものではありません。そこで、疫学、病理、分子生物学、放射線、統計学などの専門研究者から御意見を伺い、今後の問題点を検討してみました。

検 討 の 目 的

発がん物質の人に対する危険度を評価するために、今後どのような研究もしくは技術の開発が必要になるかを、低濃度投与実験の問題を中心に病理学、生化学、内分泌学、疫学等の各専門的立場から総合的に検討することを目的とする。

まず、検討目的についてですが、発癌物質のヒトに対する危険度を評価する為に、具体的には人癌の第一次予防を実施する為に、今後どのような研究もしくは技術の開発が必要かを、低濃度投与実験の問題を中心に総合的に検討してみたいというのが目的です。

検 討 理 由

1. 環境発がん物質への暴露が人がんの発生に大きく関与している、従って、
2. 人がん一次予防のStrategy の設定には、環境発がん物質を対象とした、人での暴露条件（低濃度暴露条件）における発がんリスク評価のデータベースの作成が必要である。
3. データベースの作成にあたり、その方法論ならびにデータベースとして必要な研究項目の検討が先ずなされなければならない。

何故このような検討をしたかということですが、現在、疫学的に環境発癌物質への暴露が、人癌の発生に大きく関与しているという調査報告があります。もしそういう調査報告が本当であるとしますと、人癌を予防するための strategy を設定する為には、まずはじめに、そういう環境発癌物質を対象としたヒトでの暴露条件における発癌リスク評価のデータベースをつくる

という事が必要になってくるわけです。とすれば低濃度暴露条件で、いろんな物質のデータベースをつくるという事が必要です。そのデータベースを作る為には、その方法論を考えなくては行けない。或いは、データベースとして必要な研究項目を検討する必要があるわけです。その為に、低濃度発癌実験というものを取り上げて、いろいろ検討しようという事になったわけです。

検 討 項 目 (1)	
発がんリスク評価の現状と問題点	
Carcinogenic Risk Assessment	現 状
<u>1st step: Hazard identification</u>	
生体のがんを誘発する作用があるか (癌原性試験)	方法ほぼ確立 実施中
その作用は人にもあらわれうるか (代謝を含む機序の研究)	基礎研究あり、外挿を指向 した研究成果の整理と補強
<u>2nd step: Exposure assessment</u>	
環境中の存在実態	方法ほぼ確立
人への暴露状況	研究段階
<u>3rd step: Dose-response assessment</u>	
低濃度投与を含む動物実験と解析	既存理論を用いた試行錯誤 の段階
<u>4th step: Risk characterization</u>	
1. 2. 3. の総合評価	行き詰りの状態

ある化学物質の発癌性のリスクをどう評価するかといいますと、現在4つの段階で行われています。最初の段階は hazard identification 有害性の認識ということです。その物質が生体に対して癌を誘発するような Potential を持っているかどうかを見つけるという事です。これは、癌原性試験で見つけられるわけです。次にそういう作用が人にも現われ得るかということを見るために、代謝を含むいろんな機序の研究がおこなわれます。

第二段階は、そういう物質がどのくらい人に expose するかということです。これを exposure assessment 或いは、暴露評価と言っています。この中には、環境中の存在実態を調べることも1つですし、人にどのくらい暴露しているのかを調べるのも1つの方法です。

第三段階は、dose response assessment 或いは、これを hazard assessment という人もいますが、ここで低濃度投与を含む動物実験の解析という問題が浮かんできます。

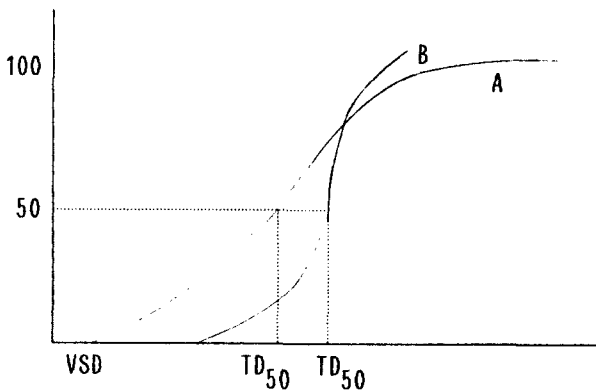
第四段階が risk characterization という事で、1. 2. 3 の過程全てを総合評価してヒトへはどうかという事を見るのが第四段階です。Carcinogenic risk assessmentを正しく実施するには我々の知識と経験は未だ十分とは言えません。そこで、これまでの発癌研究の成果をふまえてどの部分が足りないかを考えてみます。まず癌原性試験をみますと、方法論的にはかなり確立している。現在いろんな所で実施されており、細かい面ではいろいろ問題があるかもしれませんが、基礎的にはいいだろうという事です。代謝を含む機序の研究という事を考えてみますと、いろいろな基礎研究がやられているが、残念なことにヒトへの外挿という面で研究成果がまとめられていないというのが現状です。ですから、今までの成果をまずヒトへの外挿という観点から、整理する必要がある。そして足りない点は、補足する必要があるだろうと思います。先に示した 1st step の hazard identification の機序の部分がこれから大きなプロジェクトになり得るだろうという事です。2nd step の exposure assessment という点では、まず、環境中の存在実態については方法論的にほぼ確立しているが、新しい分析化学の技術の進歩をその時代ごとに取り入れていくという事が必要だと思います。また、ヒトへの暴露状況について見ますと、色々な方法がありえます。例えば、ヘモグロビンの様な高分子に対するある特殊な発癌性と思われる物質のアダクトを調べるという方法もありますし、或いは染色体異常を見るとか、或いは、フラジアル・サイトとか、そういう様な手法による population monitoring をもっと強化していくという事が必要です。

それから 3rd step の dose response assessment になりますと Mantel-Bryan 以来非常によくやられている様にみえますが、実際よくみると、ただ単に既存の統計学的議論を用いて試行錯誤している段階であるように思われます。今後大いにやらなくてはいけない事です。4th step としてこういうものをつかまえて、データを総合評価しようという事です、これは国際的にもいろんな所でよくやられています。ところが、やはり充分でないところがあって、論理的には行詰まりの状況にあるというのが現状ですが、基礎から考えなおすと意外に道が開かれてくるように思われます。

検 討 項 目 (2)

低濃度発がん実験について (i)

1. NOEL は閾値とみなしえない
2. TD_{50} とVSD



そこで、最初の低濃度発癌試験、先ほど言いました3番目の dose response assessment をどうしたらいいかという事を考えてみましょう。現在の癌原性試験でその物質の発癌性リスクを定量的に評価するには、どうしたらいいかという問題です。

まず、最初にNOELですが、NOELというのはある癌原性試験を行って、たまたま発癌率が0である様な用量が見つかる。それを、NOEL (non-observable effect level) という訳ですが、これは決して閾値ではないのです。次に発癌性を定量的に評価するのに一番簡単なのは、 LD_{50} とか ED_{50} に相当する TD_{50} を考えることです。これは、50%の動物に癌を発生させる量という事です。この値はAとBとでどちらが強いかという事をみるにはいいかもしれないが、実際に危険度というのは、どのくらい安全かという事にもなる訳ですから、AとBでは、 TD_{50} はそれほど変わらないかもしれないが、低濃度での危険度は案外差がある事もあり、逆に TD_{50} では、発癌性が強いが低いDoseでのリスクが低いという事もある。やはり、安全性の評価或いは、リスク評価という事を考える場合には、低い濃度での評価が大切です。例えば、1つの方法として 10^{-6} とか、 10^{-8} の危険率或いは発癌率で癌を発生させる量、そういうものをみるのが危険度の評価には非常に重要なのです。これを、実質安全量 virtually safe dose (VSD) と言います。これが、リスク評価の場合には非常に重要であります。

低濃度発がん実験について (ii)

VSDを算定するための低濃度実験を実施する際の問題点

1. 動物実験には技術的な問題は少ない
2. 統計理論の実験データへの適用に検討すべき事項がある
 - a) 用量の設定：VSDの値と精度
 - b) 数理モデルの選択：
 - 統計学上の適合度によって選択
 - 作用機序によって選択 (Mechanistic model)
 - 体内動態を考慮に入れる (Pharmacokinetic model)

VSDを算定するにはいろいろ方法があります。dose response を求めてそれを低濃度に外挿して低いところの値を算出すればよい訳で、理屈としては非常に簡単です。ところが、いくつかの問題があります。動物実験そのものは、技術的にとくに問題は少ない。実験的には普通の癌原性試験と変らない。ところが、第2番目の統計理論を実際の実験データに適用してVSDを求める段階になると、いくつかの問題があります。その1つは、用量設定です。用量設定が悪いとVSDの値がバラバラになって、その精度が悪くなる。もう1つは、どういう数理モデルを適用するのがよいか。例えば、統計学上の適合度がいいという事で選ぶのも良いだろうし、或いは、作用機序によって数理モデルを選択した方がよい場合もあるでしょう。この場合は、mechanistic model と言います。例えば、この物質はこういう作用機序で癌を起こすから、こういうモデルを用いるべきであろうという考えで、モデルを選ぶ訳です。もう1つは、体内動態によってモデルを選べば良いと考えられます。

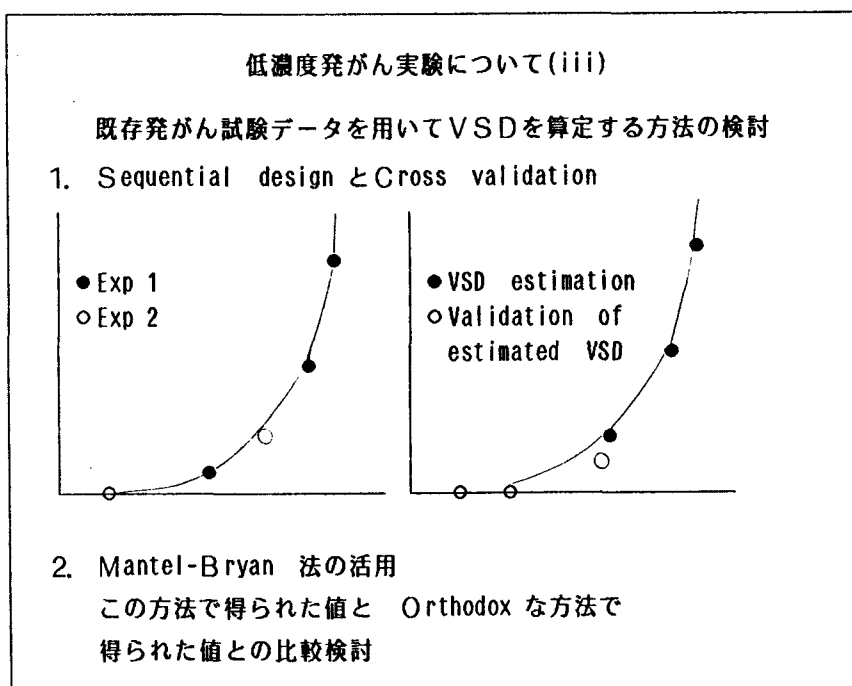
pharmacokinetic model これは非常に良いが、残念ながらこのモデルを使うほど、体内動態のデータがそろっていないので、これは使えないというのが現状です。

TD₅₀ and VSD at 10⁻⁶ Risk Level of Various Cancer-Inducing Substances

Compounds	TD ₅₀ (mg/kg/day)	VSD (mg/kg/day)	TD ₅₀ /VSD
Aflatoxin B ₁	0.8×10 ⁻³	1.6×10 ⁻⁷	5×10 ⁵
ENU	0.2×10 ⁰	3.5×10 ⁻⁶	6×10 ⁴
DMNA	0.6×10 ⁰	3.5×10 ⁻⁵	1.5×10 ⁴
Potassium bromate	0.6×10 ¹	3.8×10 ⁻³	1.6×10 ³
Saccharin-Na	0.9×10 ⁴	2.1×10 ¹	4.3×10 ²

先ほどTD₅₀とVSDとの関係で、TD₅₀は発癌性の強さの比較には便利であるが、用量反応曲線のスロープによってリスク評価での意味合いが物質ごとにちがってくるという事を言いました。

表は、aflatoxin B₁、ENU、DMNA、potassium bromate、saccharin-NaのTD₅₀とVSDを求めたものです。aflatoxin B₁では 0.8×10^{-3} がTD₅₀、VSDは 10^{-6} のリスクレベルでのVSDですけれども、 1.6×10^{-7} 、一方、potassium bromateですと 0.6×10^{-1} がTD₅₀、VSDは 3.8×10^{-3} mg/kgです。そうしますと、TD₅₀の低いものはVSDも低いし、TD₅₀の高いものはVSDも高く、一見これで良いのではないかと思います。ここでTD₅₀/VSDの値を見てみますと、aflatoxin B₁の場合には 5×10^5 、saccharin-Naでは400です。という事を考えますと、やはりTD₅₀だけではダメでVSDがリスク評価には重要であるという事がわかります。



VSDの算定には、技術的に多くの問題があると言いましたが、これらの事がすべて片がついても更に大きな困難があるのです。それは動物実験の実施の問題です。癌原性試験だけでも大変な実験であるのに、その癌原性試験が終わった後に、更に、低濃度実験を大規模に行うという事は実際問題として困難なことです。ある企業がある特定の物質についてのみ行うというのであればいいですけど、癌の一次予防という観点から多くの物質を対象とする場合には、多

くの実験を何回も行うというのは難しい訳です。従って、既知の発癌物質の実験データを最大限に利用してVSDを求めるにはどうしたら良いかという事を検討しました。先ず、東大の数学の先生から提案されたのですが sequential design を考えたら良いのではないかという事です。最初にある実験があり、これだけではVSDの算定に十分なデータでない場合に、別のデータを combine してそこからVSDを求めれば良いという方法です。この場合には、最初の実験と次の実験とのあいだに、どういう条件があれば combine しても良いかを考える必要があります。もう1つの方法は、ある高用量の実験で得られたデータに基づいて、強引にVSDを求めることです。そして、別に低用量での実験で求められたVSDの validation を行う cross validation という方法です。もう1つはMantel-Bryan の方法、これは昔からありまして実際よりも非常に低い値を出してしまうために、あまり使われていないのですが、この方法をもう1回見直す必要があるだろうという事です。これならば、1点でもって何かものが言えます。しかし、この方法で得られた値と、orthodox な方法で得られた値との比較検討が先ず重要です。

検 討 事 項 (3)

人 へ の 外 挿

1. 作用機序の検討: genotoxic or epigenetic ?
 - 1) 従来のIn vitro 実験の他に、その物質のgenotoxicityが実際の標的細胞にあらわれるかを調べる In vivo
実験法の開発: P³²ポストラベル法が有望
 - 2) プロモーターについて蓄積された基礎データの整理と補足
2. 実験動物について
被験物質に対して人と類似した反応を示す実験動物の開発よりも、実際に使用可能な動物でのデータを人に外挿する方法、理論をもつ方が実際の。
代謝活性化、DNA 修復、ホルモン環境等のデータを種間比較の観点から整理・補足

まず低濃度実験だけでは、動物からヒトへ外挿することはできません。低濃度実験の中の数理モデルには種差という様なFactor は全く取り入れられていないので、ヒトへの外挿を考えるには、低濃度実験以外の事をやらなくてはなりません。

先ほど、hazard identification という risk assessment の 1st step で、この問題を

取り上げなくてはならないと言いましたが、具体的にどういう問題点があるかを考えてみます。まず、作用機序の検討で genotoxic か又は、epigenetic かという事を決めなくてはなりません。genotoxic であるという事を認定するには、或いは、そうでないという事をいうには、従来の in vitro での mutagenicity test の他に、その物質の genotoxicity が実際の癌原性試験でみられた標的細胞に現われるかどうかを調べる為の in vivo での実験方法の開発が必要です。その為には、1つの例として P^{32} ポストラベル法が非常に有望です。実際には 10^9 コの塩基の1つにある薬がアダクトしますと、それが検出できる。最近では 10^{10} コのうちの1つでも検出できると言う人もいます。プロモーターにつきましても、プロモーターであるからいいとかいう事もありますけど、これまで非常に蓄積されたデータがあるにも拘らず、ヒトへの外挿という立場で整理されていないように思います。

次に、実験動物について考えてみます。被験物質に対して、ヒトと類似した反応性を示すような実験動物を用いるべきであると言われていています。そういう動物を開発できれば願ってもない幸いです、実際問題としてなかなかできない。しかも発癌性研究は緊急の課題でもあるので30年も40年も待ってられない。だから、実際に我々が現時点で利用できる動物でのデータを、ヒトに外挿するための方法論、理論を持つ方が、現時点では实际的であるという事です。その為には、代謝活性化とかDNA修復、ホルモン環境とかのデータを種間比較の立場から、整理補足する必要があります。

検 討 事 項 (4) 内 因 性 物 質 の 関 与

内分泌環境、胆汁酸、プロスタグランジン代謝、活性酸素等の内因性要因と発がんとの関係

発がんにおける活性酸素の意義を検討する IN VIVO 実験は人への外挿を考える上で特に重要

$KBrO_2$ 、NTA-Fe complex、 H_2O_2 、

Peroxisome inducers 等による発がんもしくは発がんの促進に活性酸素がどの程度関与しているか？

次に、ヒトへの外挿という観点から、内分泌環境、胆汁酸、プロスタグランジン、活性酸素などの内因性要因と発癌との関係を、もっとガッチリと見る必要があります。それぞれについて多くの実験が行われていますけれどもやはり、十分に整理されていないのが現状です。

検 討 事 項 (5)
複 合 影 響 に つ い て

1. 人がんの発生には複数要因が関与
2. 複合影響には様々な可能性があり、系統的解析法が確立されていない

同時暴露、継時暴露

相乗、相加、抑制、Co-initiation, promotion, Co-promotion 等

3. 検討すべき事項：複数モデル化合物について同時及び継時投与実験をおこない、複合影響の形式、程度を調べる→複合影響がおりうる物質の組合せ類推するよりどころ

付 50種の発がん物質（各1/10TD₅₀）の同時投与実験が進行中

次に大事なのは、我々が癌原性試験を行う場合、特定の単一化合物についての評価をしているにすぎない。ところがヒトの場合、特殊な職業癌を除いて、多くのヒトの癌の発生には複数の発癌の要因が関与していると考えられます。そうしますと、やはり複合影響を解析する方法を作らなくてはなりません。今のところそういうものはありません。何故なら複合影響には、投与だけでも同時投与があり、継時暴露があります。その作用の現象面でも相乗、相加、抑制があり、そのメカニズムについても co-initiation, promotion, co-promotion などがあります。従って、現時点では、その解析方法はあります。当面やるべき事は、複数のモデル化合物について同時投与、継時投与によって実験を行って、どういう複合影響が現われるか、その形式や程度を調べる事であり、そのデータから複合影響が起りうる物質の組み合わせを類推する為の、よりどころをつくるのが重要ではないかと考えられます。

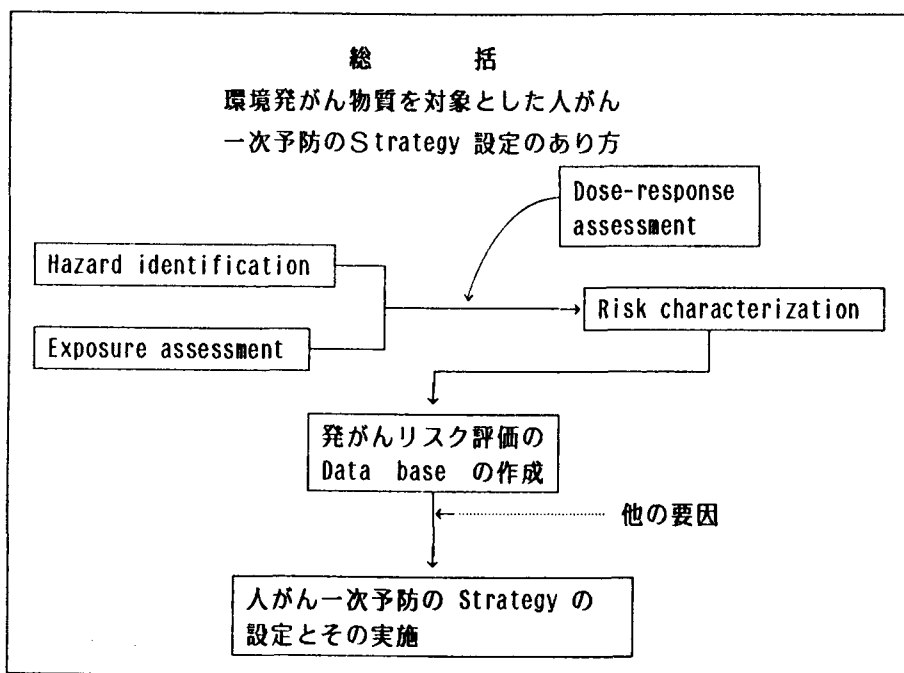
現在50種類の発癌物質を、各々1/10のTD₅₀の量で同時に2年間投与する実験が行われているとの事で、その結果が期待されています。

検 討 事 項 (6)

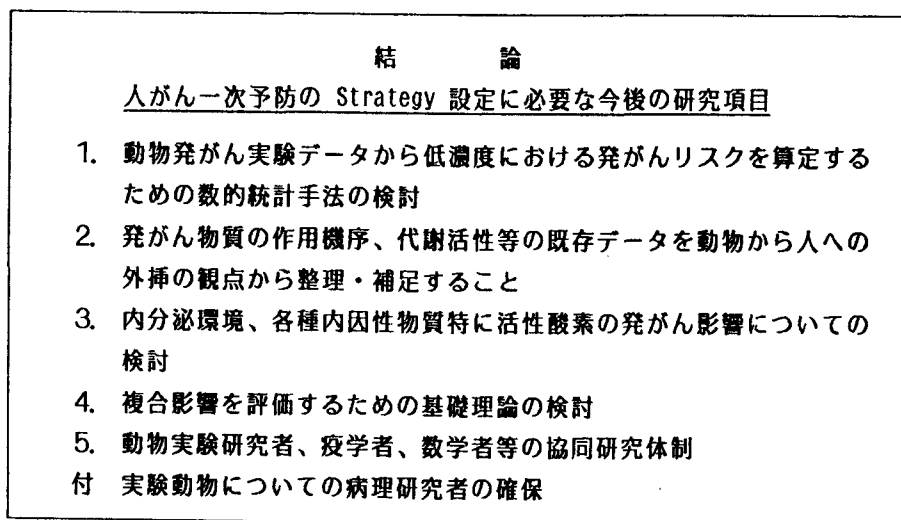
疫 学 の 関 与

1. 疫学調査成績との比較による動物実験の手法及び評価法の
Validation
 2. 検討すべき物質の選択
 3. 動物実験から疫学へ
アミノ酸加熱分解物等についての、人での摂取実態の調査等
- 付 発がん物質生体高分子付加体、染色体異常、FS 等をマーカーとした population monitoring の強化

動物実験の結果とヒトでの疫学調査とくらべる事も大切です。動物での発癌研究の意義づけの為にはもっと疫学者に加わってもらう必要があります。疫学調査成績と動物実験成績とを比較して、動物実験の手法とか評価法の validation をする必要があります。今後、動物実験でどういうものを検討しなくてはならないかという場合に、疫学的なデータからその物質を選択する必要もあるでしょう。また逆に、動物実験でこれは発癌性が強いという様な生活関連物質を選びまして、疫学者に調査をしてもらう必要もあります。その例として、アミノ酸加熱分解物についてのヒトでの実態調査とか、ヒトでの暴露状況などを調べることも今後必要になります。こういう事をやる為には、先ほど述べました様な、色々な biochemical な cytological な marker を使った population monitoring をさらに強化する必要があります。



最終的に環境発癌物質を対象として、人癌の一次予防の strategy を説定する場合、そういう物質の発癌リスク評価についてのデータベースの作成が必要です。その為には、先ほどの hazard identification とか exposure assessment などのデータを総合評価する必要がありますし、その中には当然 dose response assessment、低濃度発癌試験のデータを取り込む必要があります。



今までの様なプロセスをスムーズに流して行く為には、次の様な事が今後必要です。

第1番目は、やはり動物発癌実験データから、低濃度における発癌リスクを算定する為の数理統計手法の検討です。

2番目に、発癌物質の作用機序、代謝活性等の既存データを動物からヒトへの外挿の観点から整理補足する必要があります。

それから3番目に、内分泌環境、各種内因性要因、特に活性酸素の発癌影響について整理して検討する必要があります。

4番目に、複合影響を評価する為の基礎理論の検討、5番目に、動物実験研究者、疫学者、数学者等の協同研究体制が確立が挙げられます。

最後に、1つだけ別に提案した事があります。先ほど、動物癌原性試験については技術的には問題は少ないのではないかとはいいましたが、1つ問題があります。それは、実験動物についての病理研究者の数が少なくなりつつあるという事です。医学部に関しては病理研究者のうち、癌を勉強しようとする多くの研究者の interest が病理形態学から oncogene , 生化学、免疫学の方に移っていく傾向があります。そのために、医学部出身の病理研究者で癌原性試験にたずさわる人は将来非常に少なくなると思われます。

獣医をみますと、日本の獣医学部は医学部に比べて非常に小さい。医学部ですと病理学教室は1つの大学に3講座くらいあり、1つの講座の教室員の数も多いのですが、獣医では、1つの大学に1講座しかなく、教室員の数も少ない。従って獣医学部からの人材も限られます。将来を考えて何とかしなくてはならないという事で、敢えてつけ加えた次第です。

〈 質 疑 応 答 〉

宮 嵐： 先生の御講演が終了しましたが、いろいろ御質問があると思います。一応整理してお受けすることにします。まず、癌原性試験の適用範囲についてどなたか御質問はありませんか。

Q ： 抗癌剤の癌原性試験をどの程度やればよいかということをお伺いします。

林先生： 抗癌剤について、なぜ試験をやらなければならないかといいますと、二次発癌ということが問題になっているからです。癌は治ったけれど、抗癌剤によってまた癌ができた、というような例が最近でてきているわけです。そういうものについては、危険性があるから癌原性試験をやれということなのです。ところが、ここで考えなければならないのは、どういう抗癌剤については癌原性試験をやり、どういうものについてはやらなくていいかということです。一般には、癌に対して非常に有効なものは、結局やった方がよいということです。あまり有効でないものだったら、二次発癌はおこらないんです。非常に有効な抗癌剤であるという場合には、やった方がよいと思います。一方、非常に類似したものについてのデータが予めあって、それから容易に類推できるという場合にはやらなくて良いかもしれません。

宮 嵐： それでは、2年前に施行されました癌原性試験のガイドラインを中心に、質疑を進めていきたいと思います。まず、癌原性予備試験についてどなたか御質問はありませんか。御承知のように、癌原性予備試験は癌原性試験に用いる投与量を決定するための試験です。現場の方々にはいろいろ御苦労がおりだと思いますが。

Q ： WHOの1969年のガイドラインを参考にして癌原性試験のガイドラインが出来上ったと思いますが、その後WHOは1980年、IARCは1979年にsupplement 2が出ており、その中には癌原性試験のガイドラインにはあまり細かく言及していないような、統計や動物の飼育などについてこまごまと書き込まれているように思いますし、FDAのガイドラインについても、同じようにいろいろなchoice ができるような形でこまごまと書かれている。そこで、日本のガイドラインを運用していく上で、例えば、IARCをできるだけ参考にしたらいいとか、あるい

は、この外国のガイドラインを参考にしたらいいというようなものがありましたら、お聞きかせ下さい。

林先生： 1969年のWHOが参考になってガイドラインができていて、というのは思いちがいだと思います。試験結果を評価する上の基本的な principleは、WHOの1969年のガイドラインと変わらないと思います。参考にするんでしたら、IARCの1979年が一番良いと思います。しかし、OECDも似たようなものです。日本のガイドラインは、だいたいIARCとOECDを参考にして作ってあるんです。細かい点になりますとIARC、OECD、FDAそれから British のガイドラインなど、全体を含めて最大公約数みたいなものを日本のガイドラインはとり入れていると思います。

Q： ガイドラインには最高用量は対照群に比べ体重増加抑制が10%以内でかつ死亡例がなく、著しい症状の変化がない量、と書かれているんですが、病理学的変化については記載されておりませんので、お聞きしたいんですが。

林先生： 非常に難しい問題だと思います。3カ月の実験で2年間の結果を推測しようとする訳ですから、病理学的な変化では時期が違うのでなかなか推測が困難です。結局、大切なのは2年間の実験が成立するかしないかということを推測するための判定なんです。だから、病理検査で、例えば肝臓の壊死が強くおこっているような dose は避けた方が良いと思います。このような dose だったら、たぶん2年間やったら動物はほとんど死んでしまうであろうということで、避ける必要があります。

Q： 逆に、例えば臓器重量だけが上って組織所見が何もなかったとか、臓器重量が上って組織所見はあったが、いわゆる変性的な変化ではなくて細胞の肥大程度の変化であった、という場合の用量設定はどのようにしたらよいでしょうか。

林先生： そういう条件で、投薬を続けた場合には動物が死んでしまうか、著しく衰弱してしまうかを予想することが大切です。もしそれで死亡するということが推測されれば、避けるべきだと思います。たぶん、今の例では何も著しい serious なことはおこらないと思います。やはり、予備試験で認められた病変の延長線上に死につながるような何がおこるかということの予測が大切な問題だと思います。

Q : MTDという考え方からいいますと、もっと大量に投与して耐えられるという量を考えた方が良くと思いますが。

林先生 : MTDをそのように考える場合が一般的ですが、今の場合はこれから実施しようとする長期試験での最大用量を決定するための目安という事なので、意味合いがかなり違います。

Q : 毒性が全く出にくい物質の場合ですが、例えば、ホルモン様物質のような場合には毒性量が決まらずに生理作用とか薬効ばかり現われて、投与技術限界量で最高投与量を決めざるを得ないと思うんです。混餌の場合は濃度5%を最高にという上限があります。例えば、ECのガイドラインでは臨床予定投与量の100倍を最高用量にしていますが、そういう低毒性物質の場合にはどのように用量設定したらよいのですか。

林先生 : 非常に難しい問題なんです。結局、低毒性でも5%まぜたりすることができるような物質なら、それでやれば良いと思います。しかし、ホルモンのような場合は非常に難しいと思います。ところが、よく考えてみると大切なのは何%混ぜれば良いかということではなく、発癌性があるかどうかを評価できるかという問題なのです。いわゆる、ホルモン作用以外には障害がないとすれば、あまり大量に投与しても仕様がないうえ、この場合には、そういうホルモン作用の延長線上には何があるかということを調べなければいけないし、同時にホルモン作用以外にはあまり毒性が無いんだということをはっきり決めなければいけないんです。それが前提になるわけです。大切なのは、ホルモンについての用量設定の原則ではなくて、これから試験しようとするホルモンの用量を科学的に決めるためにはどうすれば良いかということを考えることであると思うんです。だから、ECが臨床予定投与量の100倍とか200倍でいいというのは、色々な実例をふまえて考えてみると大体そのあたりの見当になるだろうと言っているだけなのです。一方、日本やアメリカは各検体ごとに試験計画の原点に立ち戻って、研究者が用量を科学的に決めてほしいと要望しているのです。

Q : MTDの問題ですが、どのように発癌性を評価するかということで、体重の変化も考えれば良い訳ですが、例えば、WHOの場合だと10%以上、10%以下というような特殊な基準なしに設定されています。これは要するに、あまり体重が下がるとえさ

を食べていないわけですから、かえって寿命が延びるということと、自然発生癌が非常に少なくなることと関係があるわけです。10%が例えば20%だったら相当餌を食べない結果として前述のような評価ができると思うのですが、その10%をどのくらい越えたら妥当な評価ができなくなるかという点について御意見をお伺いします。

林先生： あまりそういうことは大きく考えていないと思います。10%であっても20%であってもかまわないと思います。対照を含めて4群の実験をしているのですから最終的には試験全体で判断すればいいのです。例えば40%や50%も体重が減りますと死にもつながるので問題になります。10%というのは絶対的な基準じゃないんです。2年間の投与が reasonable に行えるか、行えないかということのメルクマールとしてほしい10%ぐらいの下がりならいいだろうということです。ガイドラインというものは一般的な方針を示しているだけです。体重抑制が18%になろうと、24か月目の死亡率が50%以内であることが必要であるけれども、それが55%であっても最終的に評価できればいいということです。長期の動物実験をやっておられる方ならば、大体のニュアンスはおわかりになると思うんです。

宮 嵩： では、次に癌原性試験の動物の選択、動物数の問題についてはいかがでしょうか。

Q : ラットとマウスの系統のことでお伺いします。アメリカのガイドラインではF344ラットとB6C3F₁ マウスを推薦していますが、日本としては一般的にどういう系統がよろしいとお考えですか。また、一般毒性試験を参考にして最大耐量を決めるわけですが、その際、系統差をどのように考えたらいいのでしょうか。

林先生： F344ラットとB6C3F₁ マウスが推薦されたというのは古いガイドラインです。あの頃はラットで2年間、マウスでも2年間だったんですが、その期間を生かすための strain というものは少なかったんです。また、自然発生腫瘍が少ない系統を選んだ結果がF344とB6C3F₁ だったんです。ですから、その当時はそれがベストであると思われていたわけです。現在では、F344についてはそれほど悪くはありません。精巣の腫瘍ができるけれどもあまり問題にはならない。ところが、B6C3F₁ マウスについては長く生きるのはいいい点ですが、しかし、人によってはいろいろと違った評価をします。扱いやすさの点でも合格です。しかし、自然発生腫瘍になりますとB6C3F₁ にはC3Hの血が入っているので、肝腫瘍の自然発生が

多いのです。肝腫瘍発生を考える場合には、まずい場合もあります。しかし、寿命をマーカーにしてそれでちゃんとした実験が成立するというためにはB6C3F₁はいいということです。その意味でB6C3F₁はchoiceに入るstrainです。肝臓癌をさけるために他のstrainを使う事も考えられます。しかし、ここにも問題があります。例えば、BDF₁を使いますと腸に変なものができてきたりするんですね。やはり、一長一短はあるんでどういう系統の動物を使うべきだということは一概には言えないのです。subacute testで癌原性試験のdoseを決める場合の系統の問題ですが、例えば、F344ラットで癌原性試験をやりたいというのに、SDラットで実施した試験結果を利用してよいかという事です。正直に言って参考にはなるけれども、すこしまずい場合があると思います。やはり、strain差がありますから。だから、予備試験をちょっと手抜きすると、本試験の時にわからないことがでてくるので予備試験は慎重にやった方がいいと思います。たとえば、予備試験ではgavageでやって、本試験では混餌で試験すると結果がだいぶ違ってきます。ですから、少なくともstrainはやはり同じようにした方がいいと思います。

宮 嶌： 投与経路について御質問ありますか。

Q : 強制経口投与の場合には、検体の濃度が高いと、投与部位に癌ができることがあり、あまりchoiceとしては良くないと言われていますが、いかがでしょうか

林先生： 強制経口投与の場合には、localのconcentrationが高くなるから避けるべきであるということがあります。また、強制経口投与をしますと吸収のピークが高くなります。だから、発癌ということではなくて、他の薬理作用で動物に影響を与える可能性が強い訳です。そのために、大量は投与できない訳です。だから、混餌の方がわりあい大量をincorporateできるという利点があります。ただし、混餌の場合には餌の中で安定でないといけな。純度や交雑物の分析など全部クリアできれば混餌の方がいいということです。

宮 嶌： 用量段階、投与期間及び試験期間についてはいかがでしょうか。

Q : 今、評価の方で質的な面を非常に重要視されてお話しになりましたが、例えば、発癌

性があると評価された場合に、実際の使用量が安全量と思われる量の場合ですが、それが少量であっても発癌の危険があるとみるのか、それとも、そういう評価に量的な考慮を払うのか、その点はいかがでしょうか。

林先生： 一般の癌原性試験の投与量は最大耐量と、それからいちばん下が、その1/10以上になるんです。ですから、出るべきものは全部出ちゃうわけです。すると、そこではどのくらいの低い濃度でなら大丈夫かというリスク評価はできない訳です。そのような場合には低濃度試験を追加してリスク評価をして、だいたいどの程度ならいいとか悪いとかを決めて、その上で実際の臨床用量とか臨床の投与期間とかを考慮して決めるということです。やはり、genotoxic な carcinogen の場合には、質的の他に量的なものを加味した判定方法をとるのがいいんじゃないかと思います。例えば、50mg/kgの用量で発癌性がみられたとします。その物質の臨床用量が仮に1mgとしますと、50mgで発癌性があつたけれども1mgではどうかということが問題になります。これはものによってはだいぶんちがいます。用量反応曲線が急なものもありますし、ダラダラとゆるやかなものもあります。これらのデータと実際の臨床用量と benefit、有用性を考えて case by case で評価することが大切だと思います。

Q : 用量設定に関してですが、公比3で dose をハイレベルから低レベルまで決めていきまして、低用量のところが、薬効と比べて非常に差が大きくてきたという場合、どのように対応したらよろしいでしょうか。

林先生： 一般の癌原性試験というのは、最初から発癌性が無いということを考えてやるわけです。ですから、発癌性が無いとか、あるいは非常に弱いということを想定して組むのがふつうです。だから、3つの群を高用量にしているのです。だから、最初からある程度発癌性があるんじゃないかというような予想が立ち、しかも、最大耐量と臨床投与量が実際に差がある場合には最初から下の方は臨床用量の10倍とか20倍に設定するのはかまわないわけです。

宮 嶋： 先生は、癌原性試験の検索には体重の変化、一般状態、病理検査が非常に重要であるというお話をされましたが、検査項目について何かご質問ございますでしょうか。

Q : 試験期間、投与期間についてお尋ねします。マウスでは18から24か月ということ

になっています。アメリカで癌原性試験の委託試験をやっておりますと、まだFDAのガイドラインにはそれほどはっきり書かれていないにもかかわらず、近頃FDAの1つの指導として10%とか20%が18か月でまだ生きているときは、期間を延長するようにと強く recommend しているようですが、日本のガイドラインにある18から24か月の期間は、死亡率との関わりで運用するという点でどのようにお考えですか。

林先生： あのガイドラインを作った時は、いいマウスが入手しにくい時代でした。。それに、マウスの寿命が短いだろうと考えてた時期もあったのです。しかし、現時点ではマウスとラットを区別する理由はそれ程はっきりしません。又、18を24か月にしなけりゃいかんというようなことはFDAでもはっきりとは出されていないし、日本でも今のところそのような動きはありません。ただ、私としてはマウスは24か月の方がいいんじゃないかと思っています。死亡率との関係からいいますと、マウスの方が早く死ぬということはありません。例えば、B6C3F₁ を使う限りは、30か月くらいの実験でも十分使えるんで、マウスはラットよりもむしろ長生きするくらいです。だから、mortality の影響というのはないと思います。18か月にしたのは、自然発生腫瘍が高いんじゃないかということも関係していると思います。24か月なければならぬという強い recommendation があるという情報は得てないけれども、僕自身はやはり24か月の方がいいんじゃないかという感じはもっています。

Q : ガイドラインによると、マウスでは18か月で腫瘍以外の死亡が50%以下でないといけないと書いてありますが、試験期間を延ばしていきますと、当然死亡率は、上がってきます。けれども、非腫瘍性の死亡率が50%に達した時点で試験をうちきった方がいいのか、それとも、60%ぐらいまでになってもいいから24か月まで予定どおり行った方がいいのかそのへんをお伺いします。

林先生： ガイドラインでは、マウスの場合は18か月の時点で50%です。それから、ラットでは24か月の時点で50%です。さらに、最終的には全死亡率が75%になった時点で中止しろと書いてあります。だから、そこまではいいわけなんです。死亡率75%というのは非腫瘍性と腫瘍性の全部ですね。50%というのは非腫瘍性の場合ですね。

Q : 餌の摂取量の測定頻度の問題ですが、ガイドラインでは、はじめの3か月は週1回、あとは3か月に1回以上ということになっていますが、例えば、FDAやWHOでは1か月に1回という頻度になっています。検体の投与量をトータルとしてきっちり算出するという目的からみると、えさの摂取量の測定を3か月に1回ではなくもう少し頻回に測定する必要があるように思いますが。

林先生： 1か月に1回と書きますと、1か月に1回やらなきゃいけないことになります。ところが、2か月に1回しか測定していない試験がある場合もあるんです。3か月に1回という人もあるわけです。その時に、1か月に1回ということを、明記しちゃうと、受理できない試験がかなり出てきます。だから、もし研究者が1か月に1回でなければ絶対にダメだとお考えになればやっていただければいいんで、だから、ガイドラインには1回以上と書いてある訳です。3か月に1回とは書いてないんです。だけど、結局は3か月に1回ぐらいはやってくれないと困るわけです。実際問題として、せっかく2か月に1回やってあるのをそういう規則だけで評価できないとしてしまうということは、研究者にも申しわけないし、実際問題として貴重な資料がそのために失われてしまうことにもなるんです。

宮 嶌： ガイドラインに関する御質問はこのくらいにして、次に先生にはF344のいろんな珍しい症例をお示しいただいたわけですが、病理の方もおられるとは思いますが、そのことに関しまして、何か御質問がございませんか。

では、その次に先生は、文部省のがん特別研究班の低濃度における癌原性物質の評価ということで最近の情報をお示ししていただいたわけですが、それも含めまして何か御質問はありませんか。

Q : 我が国は発癌研究が非常に盛んで、そういうデータが信頼できるというところに来ていと思いますが、一方、プロモーターの研究がでできますと、当然その反対としてインヒビターの研究もおこってしかるべきだと思うんです。制癌の最善の方法はcarcinogenを除くということだと思うのですが、どうしても除けないものについてはやっぱりインヒビター的なものが存在するかもしれないという研究も必要じゃないかと思います。バターイエローの時代はそういう研究もありましたけれども現在そういう研究がなくなっているのは、学問的に意味が無いということなのでしょうか。

林先生： そのような研究はあります。複合影響の研究には、抑制効果も含まれています。

Q： 実験動物では生涯同一の飼料を摂取していますが、人間の場合は小児期、成人期、中年期にはいりますと食事の内容が変わりカロリー数でもかわってきます。1940年代の文献を読みますと、たしかにカロリーや蛋白と発癌という問題について、相互に非常に深く関与があるということがいわれています。だから、現在の癌研究の中でカロリーあるいは食餌の影響をどのように考えればよいのでしょうか。

林先生： 食餌の影響とか飼料の影響とかは発癌研究の中で最も重要な課題ですし、当然発癌試験の中で考慮すべき事項です。一方、日常の癌原性試験となると話が少し変わってきます。癌原性試験といのは極端に言えば癌原性試験の2年間の動物実験によって、その物質を発癌性の立場からどういうものであるかをふりわけけるための作業なんです。そのためには、実験条件を非常に simplify した方がいいわけです。栄養の問題はスクリーニングとは別個にとりあげるべき問題だと思います。私達の研究室でも、栄養成分とか、カロリーの影響について日常の癌原性試験とは離れて研究しています。大切な事は研究の成果を日常の試験に反映させ、試験法の改良をはかる事であると思います。

宮 嵐： 先生の御講演の全般を通して何かご質問はありませんか。

Q： GLPとの関連でおききます。一つは剖検の所見は病理の所見をみるときに pathologist に available であるということですが、外国への委託試験をする場合に、pathologist が立ち合っていない場合があります。そういう場合に sponsorが pathologist の立ち合いをもとめたら立ち合わせて、もとめないなら立ち合わせないという choice がある。本来は我々は pathologist が立ち合っその人たちの目で病理のスライドを読んでほしいところですがそれをどういうふうにお考えになりますか。

林先生： 癌原性試験は2年間かかるわけです。それで最後には仕上げまでいれて3年間かかり、その上、ものすごい莫大な費用がかかります。しかも、病理検索というものが、その中心になります。従って剖検の時に病理学者を立ち合わせないような受託試験機関にはたのまない方がいいと思います。2億のお金と3年間の期間を棒にふるような、そ

ういう risk は冒さない方がいいと思います。だから、もし立ち合うか、立ち合わないかという choice があるとすれば、立ち合えと言うのが当然です。

Q : 病理の生データの問題ですが、これは必ずしも癌原性試験だけに対する質問ではありません。病理の生データは、これまでのところスライドであるという見方もありますし、一番初めに病理の人が見て、あるところまでいって fix したとして、その点を生データとして、そこから後に変更した場合には、生データとしての変更手続きをとる。ある時点で fix するまでは生データ扱いではなく、変えてもいいという、そういうぐあいに運営してきましたし、それで今までFDAにも通っておったんですが、その考え方に近頃変更があるような気がします。ちょっとゆれているような感じがします。それに関するお話をおきかせ下さい。

林先生： ゆれているという意味がよくわかりません。

Q : はじめにスライドを読んだところから、もう生データ扱いに下さいという意見と、これまで通り、ある所で fix した、その後を生データとするという二つの考え方が両方とも平行してあるような気がするんですが、日本の場合にはどのような見解をとられるかということをお聞きしたいのです。

林先生： それはGLPの問題というよりも、その研究所の病理学研究室でどういうように病理学的検査をやっているかということに関係があると思います。例えば、最初に fix するか fix しないかということは非常に難しい問題です。これは顕微鏡的でも肉眼的でも同じことです。肉眼的所見で、例えば腎臓をみて表面が黄緑色を呈していて、細かい顆粒状があったという記載があるとしめすと、その記載は変わらないわけです。ところが、それを chronic nephropathy の grade のいくつにしたということには、主観がはいります。最初の生データは客観的な記載だけですから、これは変わらないのです。これが生データだと思います。一方、グレードの1にするか2にするかということは、criteria があるかもしれないけれども、主観がはいるかもしれないので、変わるかもしれないと思うんです。同じことが histology でも言えるわけで、例えば肝臓のどこそこに小円形細胞浸潤があったと書いたとします。これは変わらないわけです。それを何とか肝炎の grade 2 にするとかしないとかの判断になりますと主観がはいる可能性があります。だから、主観の入る部分は変わる可能性はあるのですが、

客観的記述は変わるということはないと思うんです。客観的な記述のとりちがえが多いということがあったとすれば、それは、検査する人がまだ未熟であるからだと思うんです。腫瘍について良性か悪性かを決める時に、例えばどこそこの細胞の何%ぐらいにこのような異型があったと書いたとしますと、これは客観的な記載です。ところが、それを悪性腫瘍とみなすか良性と決めるかは判断基準によってちがうわけです。所見の客観的な記述というのが生データです。それについてはFDAの見解も変わらないと思います。

Q : ガイドラインによりますと、共食い死亡例で病理組織学的検査の不能例が10%を越えたと試験が成立しないとなっています。その10%というのは各群について10%なのか、あるいは個体全体の中で10%なのかをお伺いします。また、死亡例が出た場合、死後変化がある臓器と、死後変化が無い臓器というものがあります。この場合は臓器ごとに10%として取り扱ったらいいかどうかをお伺いします。

林先生： 10%というのは、海外のガイドラインに10%を越す群があってはならないと書いてあるのです。むこうは非常にきびしいんです、ところが、たまたまある1群の死亡率が12%になった場合、せっかくの実験が成立しなくなり、ほかのところは全部うまくいって、たまたま1群にそういうことがあってダメになってしまうということがあってもったいない訳です。だから、日本のガイドラインはそれを、全群に置きかえてるんです。本当ならば、1群ということだと思いますけれど、その方が論理的には正しいのかもしれないと思います。次に、死亡例の臓器の取り扱いですが、検索の対象のorgan がだめだったらもうだめですね。例えば、どうしても肝臓というものが大事であるということがわかっていた場合に、その動物の肝臓がダメだったらダメで、他のところはいくらうまくいっても肝臓がみられなければ死後変化として使えないものにならない内容であるということになります。

宮 嵐： それではどうも、林先生には大変お忙しいところを、我々のために貴重な時間を費していただきまして、しかも2時間半にわたる非常に長い時間を極めて primitive なお話から、最近の情勢に至るまでわかりやすく我々のために御説明いただきまして、まことにありがとうございました。では、以上をもちまして第10回の関西実験動物研究会を終了いたします。どうも先生ありがとうございました。

関西実験動物研究会だより

関西実験動物研究会会報2号に掲載した第9回研究会以後、以下の研究会が開催された。

1) 第10回研究会(昭和61年7月3日 京大会館)

学術講演会

癌原性試験の現状と問題点

林 裕造(国立衛生試験所)

2) 第11回研究会(昭和61年10月3日 京大会館)

シンポジウム

哺乳動物卵及び胚取扱いに関する最近の進歩

1. 初期胚のmicromanipulation

入谷 明(京大 農学部)

2. 哺乳動物卵細胞の成熟培養

細井美彦(京大 農学部)

3. 卵子と胚の凍結保存

内海恭三(京大 農学部)

3) 第12回研究会(昭和61年12月12日 おおみ荘)

会員の研究発表(11題)

4) 第13回研究会(昭和62年3月14日 京都教育文化センター)

講演会

1. ハルビン医科大学における実験動物事情

柳 英快(ハルビン医大)

2. 中国実験動物の現況

中村信議(生物科学開発)

5) 第14回研究会(昭和62年6月12日 大阪科学技術センター)

学術講演会

移植免疫、癌免疫の制御へのアプローチ

1. 移植免疫

藤原大美(阪大 医学部癌研)

2. 癌免疫

濱岡利之(阪大 医学部癌研)

総会・評議員会議事概要

1) 第4回 総会概要(昭和62年 3月14日 於 京都教育文化センター)

- (1) 役員の改選(第5回評議員会議事録参照)について報告され、承認された。
- (2) 昭和61年度決算が報告された。
- (3) 昭和61年度事業報告が行われた。
- (4) 昭和62年度予算が報告され承認された。
- (5) 昭和62年度事業計画が報告され承認された。

2) 第5回 評議員会議事概要(昭和62年 3月14日 於 京都教育文化センター)

出席: 内海、海野、及川、岡庭、笹川、佐々木、芹川、高折、高木、高島、
鳥居、新谷(聴)、宮嶌、村上、森岡、山田、山中、黒澤 (18名)

1. 議 事

(1) 昭和61年度事業報告

及川幹事(集会)及び宮嶌幹事(編集)よりそれぞれ昭和61年度事業報告が行われた。

(2) 昭和61年度会計報告

芹川幹事より昭和61年度会計報告が行われ、佐々木監事より監査の結果適正であった事が報告された。

(3) 役員の改選について

1. 評議員: 新谷茂、山崎恒義、丹羽皓二、竹岡成評議員の辞退が承諾され、新たに増岡通夫、小林清隆、戸田昇、黒澤努の4氏が評議員として選出された。新たな評議員、及び再任の評議員は改めて承諾書を送り、承諾の得られた会員を評議員とすることとなった。
2. 会 長: 会長は山田淳三氏が再選された。
3. 監 事: 佐々木弘氏、増田恭造氏が再選された。
4. 幹 事: 集会担当として内海健二郎氏、海野隆氏、黒澤努氏、編集担当として新谷聡氏、宮嶌宏彰氏、山中久氏、会計・庶務担当として芹川忠夫氏が選出された。

(4) 昭和62年度事業計画案について

及川幹事より第13回、第14回、第15回、及び第16回の研究会について計画案が提出され、承認された。新谷幹事より本年度会誌の発行を2回予定しているこ

とが報告され、承認された。

(5) 昭和62年度予算案について

芹川幹事より昭和62年度予算案について説明が行われ、承認された。

会員の動き 関西実験動物研究会

◇ 入会者 ◇

江見 明雄
 本田 良也
 小松 正美
 柴生田 正樹
 森 聖
 伴野 高彦
 川添 勝義
 青木 泰啓
 小泉 勤
 樽見 千利
 塚原 清志
 三日月 幸治
 坂本 雄二
 黒澤 努
 有行 史男
 浅野 裕三
 上島 育二
 岩田 四郎
 西田 伊久男
 小林 清隆

藤沢薬品工業(株) 中央研究所
 参天製薬(株) 動物管理室
 日本農薬(株) 安全性研究所
 武田薬品 中央研究所
 塩野義製薬 油日ラボラトリーズ
 新日本ラボラトリー
 武田薬品 中央研究所
 大日本製薬(株) 総合研究所
 金沢大学・医・動物実験施設
 三共(株) 安全性研究所
 塩野義製薬 油日ラボラトリーズ
 塩野義製薬 油日ラボラトリーズ
 千寿製薬
 大阪大学・医・附属動物実験施設
 田辺製薬(株) 安全性研究所
 田辺製薬(株) 安全性研究所
 藤本製薬(株)
 金城学院大学
 (株)環境保健生物研究センター
 日本チバガイギー

◇ 退会者 ◇

前川 啓子
 田村 洋平
 中川 一秋
 佐藤 義範
 杵川 文彦
 野村 正行
 中野 大助
 四谷 収一
 小嶋 康義
 大幡 勝也
 山崎 恒義
 伊丹 孝文
 谷口 雄三
 平松 幸一

日本バイオリサーチセンター
 生産開発科学研究所
 藤本製薬(株) 学術部
 カッター・ジャパン
 日本ベーリンガー インゲルハイム(株)
 参天製薬(株) 中央研究所
 石原産業
 石原産業
 塩野義製薬 油日ラボラトリーズ
 京都薬科大学
 日本チバガイギー
 国立衛生試験所

 日本ベーリンガーインゲルハイム(株)

昭和62年4月10日現在

編集後記

4度目の夏が巡って来た。この間、12回の研究会を数え、関西実験動物研究会の名は講師の先生方の御協力、担当幹事ならびに会員諸氏の御協力により、今や日本中に伝わり、その存在が認められるようになった。しかしながら、会誌発行において手際の悪さ、システム化の不備などにより会員各位には御迷惑を掛けていることに編集委員一同心痛の至りである。

さて、本号には医薬品開発に携わる人達にとって有用な示唆を与えて頂いた林裕造先生の特別講演と、折しも社会問題に発展したAIDSとも関連あって改めてその怖さと治療・予防の研究の重要性を感じさせられた吉田幸雄先生一門のparasitic zoonosisの掲載となった。御感想、編集への御意見・御批判を待ちたい。

— H・Y生 —

昭和62年6月30日 印刷
昭和62年7月3日 発行

編集兼発行者 山田 淳 三
発行所 関西実験動物研究会
〒606 京都市左京区吉田近衛町
京都大学医学部附属動物実験施設
印刷所 関西ナショナル印刷株式会社
〒532 大阪市淀川区十三本町3-4-23