

平成25年度  
国立医薬品食品衛生研究所 シンポジウム

化学物質の安全を科学する -リスク評価の新たな流れ-

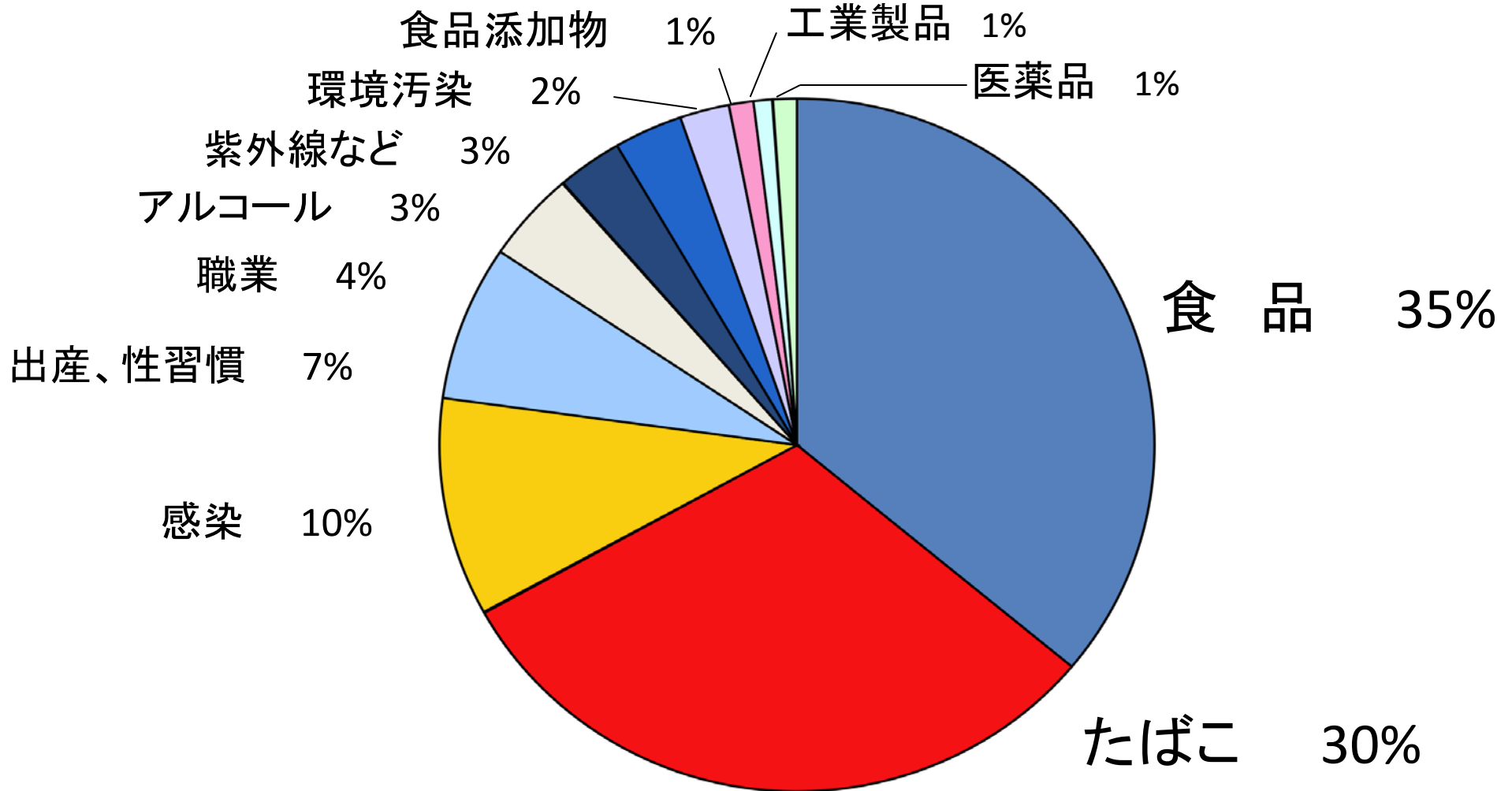
---

## げっ歯類を用いたがん原性試験の将来像

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター  
病理部 小川久美子

平成25年7月26日

# がんの原因

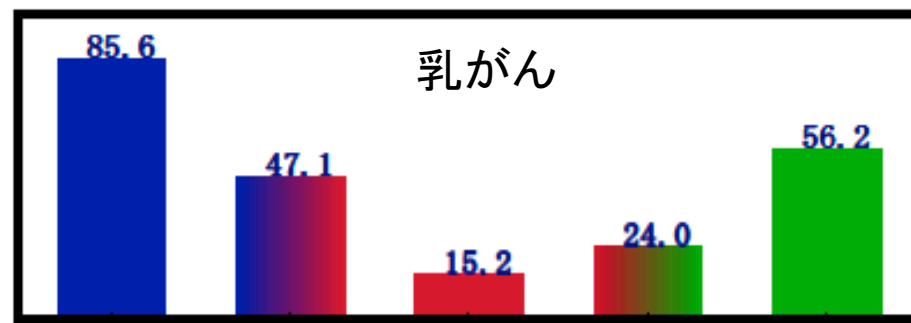
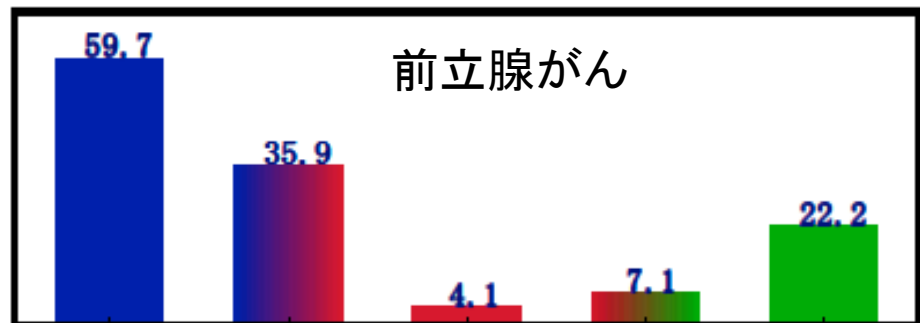
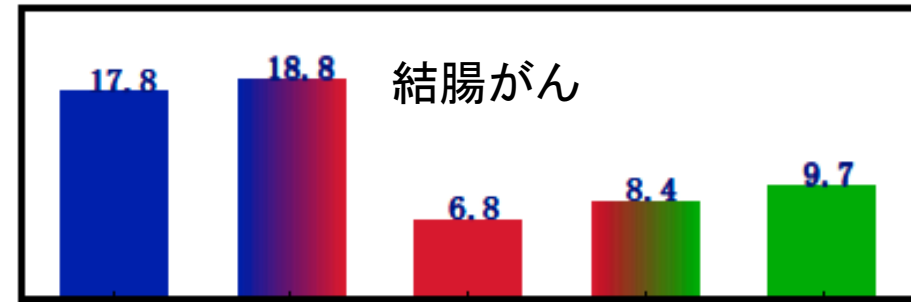
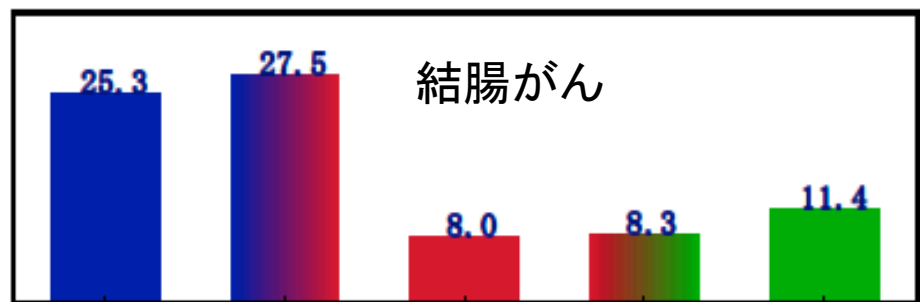
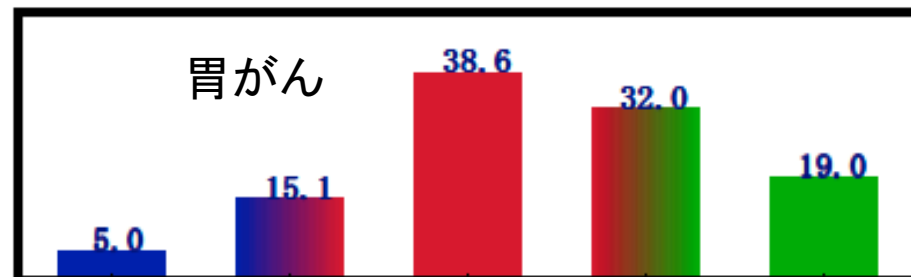
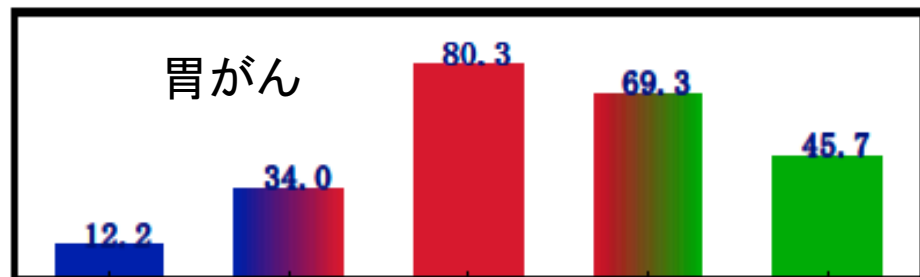


Doll, R. and R. Peto, The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, J. Natl. Cancer Inst. 66, 1192 (1981)

# 日系移民のがん発生率の変化-年齢調整がん罹患率

男性

女性



ハワイ      ハワイ  
日系人      日本      サンパウロ  
日系人      サンパウロ

ハワイ      ハワイ  
日系人      日本      サンパウロ  
日系人      サンパウロ

# 発がん性・発がん物質とは

---

## 発がん性

: 生体に作用して悪性腫瘍を発生させる作用

## 発がん物質

: 発がん性を有する物質

# 化学発がん研究の歴史

- Pott, P. (1775)  
煙突掃除人陰嚢癌多発と石炭タールの関係
- Yamagiwa, K., Ichikawa, K. (1915)  
石炭タールによる皮膚癌発生の実験的証明
- Kennerway, E.L. (1924) 、 Cook, C.W. (1933)  
石炭タール中からベンツピレン、ジベンズアントラセン、  
メチルコラントレンを分離・同定
- Sasaki, T. et al. (1932)  
アミノアゾトルオールによるラット肝発がん
- Berenblum, I. (1941)  
イニシエーターとプロモーターによる二段階発がん説
- Miller, J.A. and Miller, E.C. (1950年代)  
発がん物質が生体内で代謝活性化され生体高分子と結合する  
ことの証明

# 癌出来つ 意気昂然と 二歩三歩



山極勝三郎先生 1863 - 1930



市川厚一先生 1888-1948



コールタールによって  
がんのできた兎の耳



佐々木隆興先生と吉田富三先生

「オルト・アミノアゾトルオールを経口投与による肝臓癌発生の実験的研究」

ラット腹水がん「吉田肉腫」と「腹水肝癌」の発見

時事新報

# 人工癌の生成大研究

## 佐々木博士に恩賜賞

### 學士會今年度受賞者決る

東京大學の佐々木博士は、人工癌の生成に大なる功績を挙げ、今年度の恩賜賞を受賞することになった。佐々木博士は、約七年前から駿河台佐々木研究所で吉田富三學士(目下外遊中)と共に此実験だけでも四百匹に上る鼠に毎日一定分量のオルトアミドアツトルオールを与えた結果最短百九十五日で肝臓癌を生ぜしめる事に成功、更に引續いて「癌を速く作る方法」「遅く作る方法」「出来なくする方法」等に就いて研究中であるが此の研究は最も難治とされる癌治療の方法に重大な示唆を与えこの臨床方面の研究に一契機を作るものとして学界の興味を集めている、博士は謙遜しながら次の様に語った『いやコロンブスの卵みたいなもので誰だってやれば出来る事なんです、偶然僕がやったと云うだけでね、いや僕だけじゃない、吉田君は勿論他に助手やら小使やら色んな人が一緒に研究したんですよ、近頃の研究は戦争みたいなもので一人では出来ない、ただ司令官が僕ただだけさ、鼠は動物屋から買って来て直ぐ薬をやると死ぬし又薬をやり過ぎると死ぬし随分厄介なものです、大部殺したから猫以上に恨まれているでしょう』

佐々木博士は、人工癌の生成に大なる功績を挙げ、今年度の恩賜賞を受賞することになった。佐々木博士は、約七年前から駿河台佐々木研究所で吉田富三學士(目下外遊中)と共に此実験だけでも四百匹に上る鼠に毎日一定分量のオルトアミドアツトルオールを与えた結果最短百九十五日で肝臓癌を生ぜしめる事に成功、更に引續いて「癌を速く作る方法」「遅く作る方法」「出来なくする方法」等に就いて研究中であるが此の研究は最も難治とされる癌治療の方法に重大な示唆を与えこの臨床方面の研究に一契機を作るものとして学界の興味を集めている、博士は謙遜しながら次の様に語った『いやコロンブスの卵みたいなもので誰だってやれば出来る事なんです、偶然僕がやったと云うだけでね、いや僕だけじゃない、吉田君は勿論他に助手やら小使やら色んな人が一緒に研究したんですよ、近頃の研究は戦争みたいなもので一人では出来ない、ただ司令官が僕ただだけさ、鼠は動物屋から買って来て直ぐ薬をやると死ぬし又薬をやり過ぎると死ぬし随分厄介なものです、大部殺したから猫以上に恨まれているでしょう』

之は大正初期に我が山際市川両博士によってタール塗布による人工癌生成以来の世界的大研究である博士は約七年前から駿河台佐々木研究所で吉田富三學士(目下外遊中)と共に此実験だけでも四百匹に上る鼠に毎日一定分量のオルトアミドアツトルオールを与えた結果最短百九十五日で肝臓癌を生ぜしめる事に成功、更に引續いて「癌を速く作る方法」「遅く作る方法」「出来なくする方法」等に就いて研究中であるが此の研究は最も難治とされる癌治療の方法に重大な示唆を与えこの臨床方面の研究に一契機を作るものとして学界の興味を集めている、博士は謙遜しながら次の様に語った『いやコロンブスの卵みたいなもので誰だってやれば出来る事なんです、偶然僕がやったと云うだけでね、いや僕だけじゃない、吉田君は勿論他に助手やら小使やら色んな人が一緒に研究したんですよ、近頃の研究は戦争みたいなもので一人では出来ない、ただ司令官が僕ただだけさ、鼠は動物屋から買って来て直ぐ薬をやると死ぬし又薬をやり過ぎると死ぬし随分厄介なものです、大部殺したから猫以上に恨まれているでしょう』

# がん原性試験の対象

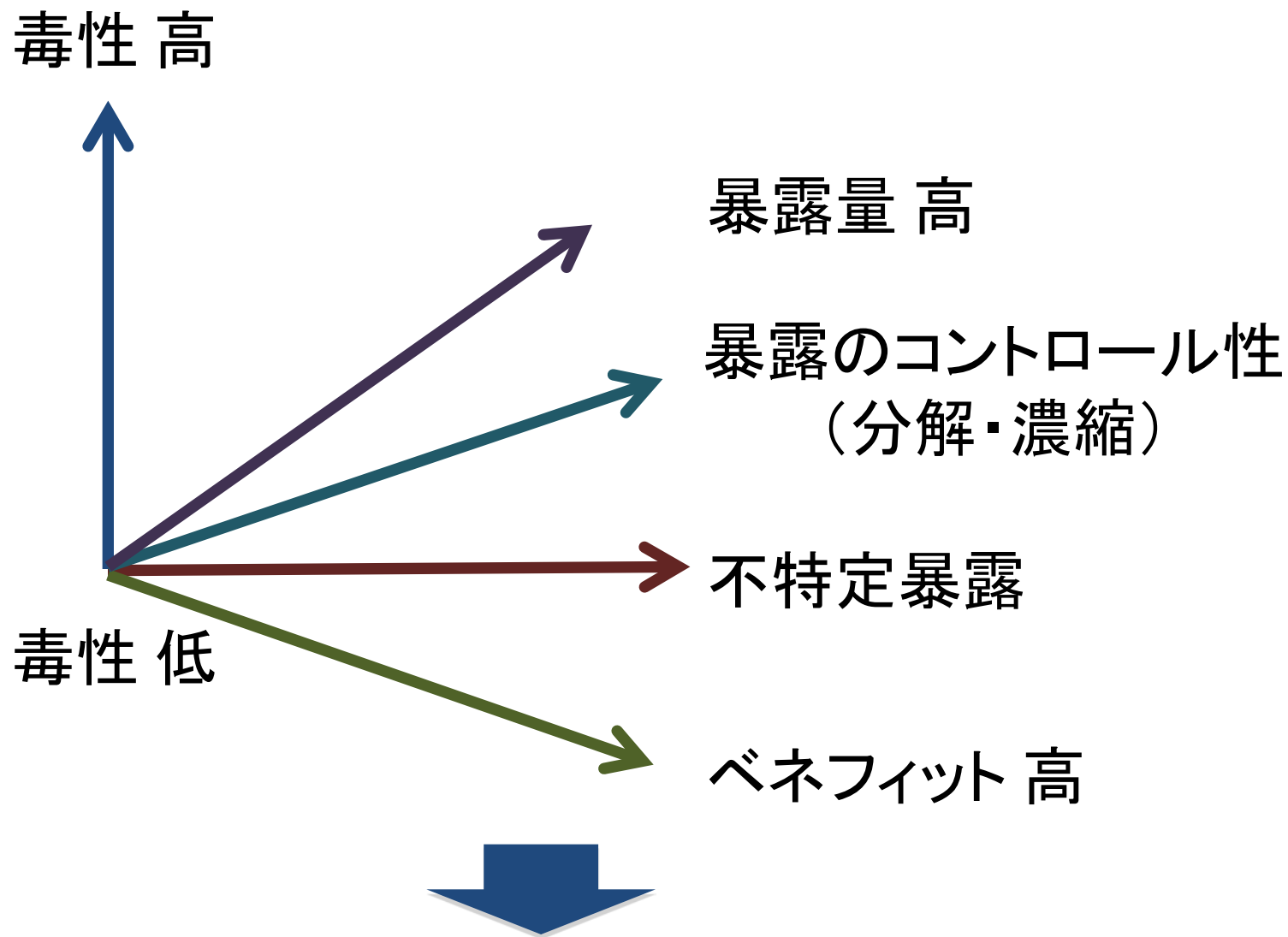
医薬品、医薬部外品、化粧品、農薬、食品添加物、特定保健用食品、飼料添加物、動物用医薬品、一般化学品などの各種化学物質

対象	管理する日本の法律	国際的ガイドライン等
化学物質	化学物質審査規制法 (化審法) 労働安全衛生法 (安衛法)	OECD (経済協力開発機構; TG415*) 1981- テストガイドライン REACH、TSCA等
農薬	農薬取締法 (農取法)	OECD (経済協力開発機構; TG 415) テストガイドライン JMRP (FAO/WHO合同残留農薬専門会議)
医薬品、医薬部外品、 化粧品及び医療機器	薬事法	ICH (日米EU医薬品規制調和国際会議; S1) 1997- ガイドライン等
食品添加物等	食品衛生法	JECFA (FAO/WHO合同食品添加物専門家会議)

\*ラットが望ましいが、マウスなど他のげっ歯類動物を用いても良い。通常24ヶ月間にわたって投与される。



# 化合物の性質のパラメータ



毒性試験・がん原性試験の緊急性が異なる

# ICH S1 の内容

ガイドライン	内容	内容
ICH (S1A)	試験の必要性	1) 臨床投薬期間(6か月以上) 2) がん原性が懸念される場合 同種同効医薬品 構造活性相関 前がん病変 局所的組織反応 3) 遺伝毒性 <i>in vitro, in vivo</i>

## ガイドライン

## 内容

## 内容

ICH (S1B)

試験法

- 発がん潜在能を検出する実験的方法
  - 1)げっ歯類を用いた長期がん原性試験
  - 2) *in vivo* におけるがん原性検出のための追加試験
- げっ歯類の2段階モデル
- トランスジェニックげっ歯類モデル
- 新生児げっ歯類モデル
- もう1種類のげっ歯類による長期がん原性試験
- メカニズム研究
  - 1) 細胞変化(アポトーシス、増殖活性、変異細胞集、細胞間連絡の変化)
  - 2) 生化学的測定値(ホルモン、成長因子、蛋白結合、酵素活性)

## ガイドライン

## 内容

## 内容

ICH (S1C)

用量設定

最大耐量, MTD: がん原性試験において軽度な毒性作用が現れることの予想される用量

げっ歯類における未変化体あるいは代謝物の血漿 AUC がヒトの25 倍となるよう選択することが実際的である

最大臨床用量が 500 mg/man/日を超えない場合, がん原性試験の高用量は, 1500 mg/kg/日を必ずしも超える必要はない

投与可能最大量 (混餌投与は 5%)

## ガイドライン

## 内容

## 内容

見直しの提案！

ICH (S1B)

試験法

- 発がん潜在能を検出する実験的方法
  - 1)げっ歯類を用いた長期がん原性試験
  - 2) *in vivo* におけるがん原性検出のための追加試験
- げっ歯類の2段階モデル
- トランスジェニックげっ歯類モデル
- 新生児げっ歯類モデル
- もう1種類のげっ歯類による長期がん原性試験
- メカニズム研究
  - 1) 細胞変化(アポトーシス、増殖活性、変異細胞集、細胞間連絡の変化)
  - 2) 生化学的測定値(ホルモン、成長因子、蛋白結合、酵素活性)

# ICH S1 EWG のこれまでの流れ

Retrospective な解析 (Sistare *et al.*, 2011など)



一定の要件を満たせばラットがん原性試験を省略可能という提案



Prospective な検証作業が必要との意見



Regulatory notice document (RND): 検証方法の文書



Public input を経て RND を確定させる



現在 → 検証期間に WOE に基づき、がん原性を想定するレポート  
Carcinogenicity assessment document (CAD) を蓄積し、がん原性試験結果  
と比較検討



Step 2

## CAD記載すべき内容

- Weight of evidence (WOE) の要素の記載
- 計画中／進行中の2年間ラットがん原性試験について予測される試験結果（陽性／腫瘍発生に対する標的臓器、または陰性）
- がん原性試験に関する総合評価およびヒトに対するリスク評価における2年間ラットがん原性試験結果の実施意義の予測
- CADが
  - 1) 2年間ラットがん原性試験の実施、または
  - 2) 2年間試験の免除申請のどちらを裏付けるのかについての明確な記述および説明と、それぞれの化合物の**カテゴリー分類**

- 当該医薬品の標的及び経路の薬理作用、二次的及び標的外の薬理作用
- 標的分布に関するラット及びヒトにおける知見
- 遺伝毒性試験の成績
- ラット反復投与毒性試験の病理組織学的評価
- ラット慢性毒性試験における曝露マージン
- ホルモンかく乱作用の証拠
- 免疫抑制作用
- 特殊な試験及びエンドポイント
- 非げっ歯類毒性試験の成績
- 遺伝子改変マウス試験



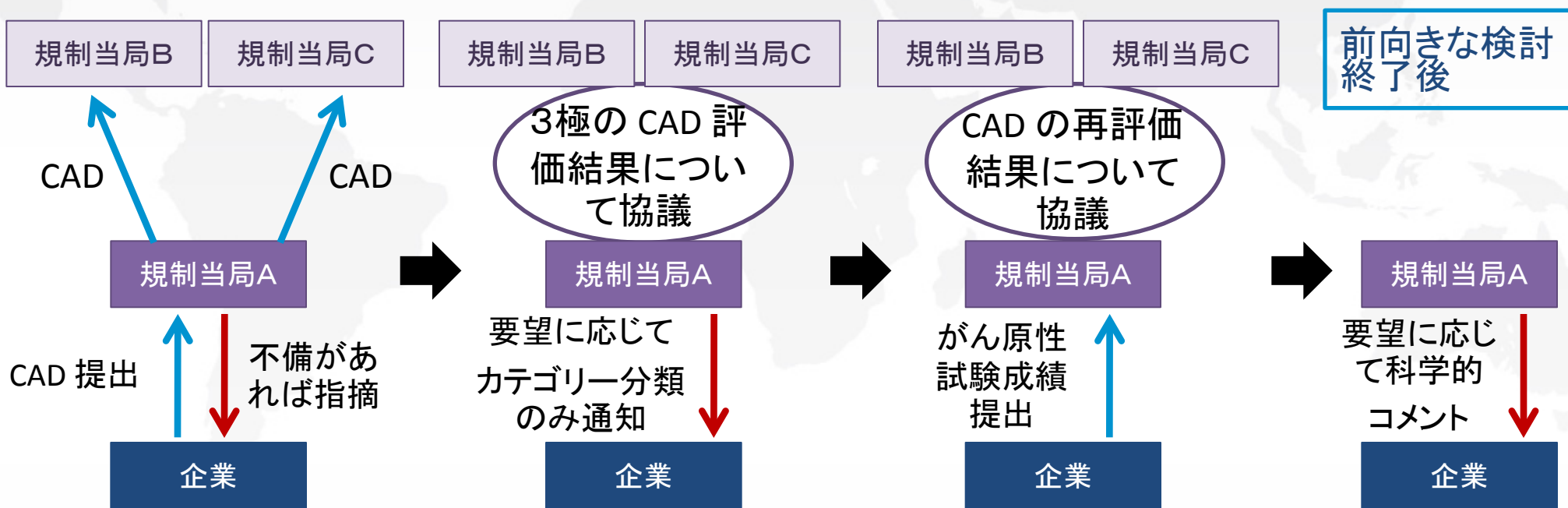
## CAD 記載のカテゴリー分類

カテゴリー	条件	がん原性試験
1	ヒトに対する発がん性ありと予測される	ラベルすることにより省略可
2	ヒトに対する発がん性不明と予測される	実施する価値あり (省略不可)
3a	ラットに発がん性あるが、ヒトにおいては発がん性がないと予測される	実施する価値なし (省略可)
3b	ラット及びヒトに発がん性なしと予測される	省略可

## 2年間ラットがん原性試験結果の 受領後のCADの再評価

- CADに記載された WOE に基づく 2 年ラットがん原性試験での腫瘍発生予測と実際の結果を比較し、予測が正確であったかどうか
- 実施されたがん原性試験の総合的な結果と比較し、企業及び各規制当局が行ったカテゴリー分類が正確であったかどうか
- 腫瘍発生予測と実際の腫瘍発生に差異があった場合、規制にどのような影響を及ぼすか

# 前向き評価の方法(案)



## <留意点>

- CADは、化合物名及び提出企業名は匿名化して企業が作成
- 企業がCADを提出した規制当局の受付担当のみが提出企業の連絡先の情報を入手可能とする
- 本調査はCAD評価のバイアスを防止するために、可及的に治験届の調査や審査業務とは無関係な調査員が実施すべき

# S1 今後の予定

前向き調査のための  
Regulatory Notice  
Document(RND) 案作成  
(2012年11月会合)

ICHのWebサイトにて  
公表各規制当局から  
パブリックコメント募集  
のために公表

パブリックコメントを反映した  
RND改訂案を作成  
(2013年6月会合)

RND確定版の発出  
(2013年8月目標)

RND確定版の内容  
・がん原性試験省略のための  
特定要件案を明記し、S1ガイドラインの改定  
の提案についての説明  
・ガイドライン改訂のために  
必要な前向き評価につ  
いての説明

ICH文書と  
して公表

前向き評価期間  
(2013年10月～  
2017年)

CADが50以上、カテ  
ゴリー3のCADが20  
程度収集されるま  
で評価期間継続

Step2文書の準備

前向き評価結  
果が改定方針  
と一致した場  
合

前向き評価結  
果が改定方針  
と異なった場合

Step 4 ガイドライン  
(2018年)

Step 2文書をパブリックコ  
メント募集のために公表  
(2018年)

ガイドライン  
改訂作業中止

**患者の安全性を損なうことなく、医薬品のがん原性評価を改善し、3R（使用動物数の削減 / 苦痛の軽減 / 代替法の利用）の原則に従って動物の使用を抑え、他の医薬品開発資源の使用を減少させ、ときに市販承認までの時間を短縮することを期待している。**

## ガイドライン

## 内容

## 内容

ICH (S1B)

試験法

S1 見直しの  
対照外

### •発がん潜在能を検出する実験的方法

- 1)げっ歯類を用いた長期がん原性試験
- 2) *in vivo* におけるがん原性検出のための追加試験

げっ歯類の2段階モデル

トランスジェニックげっ歯類モデル

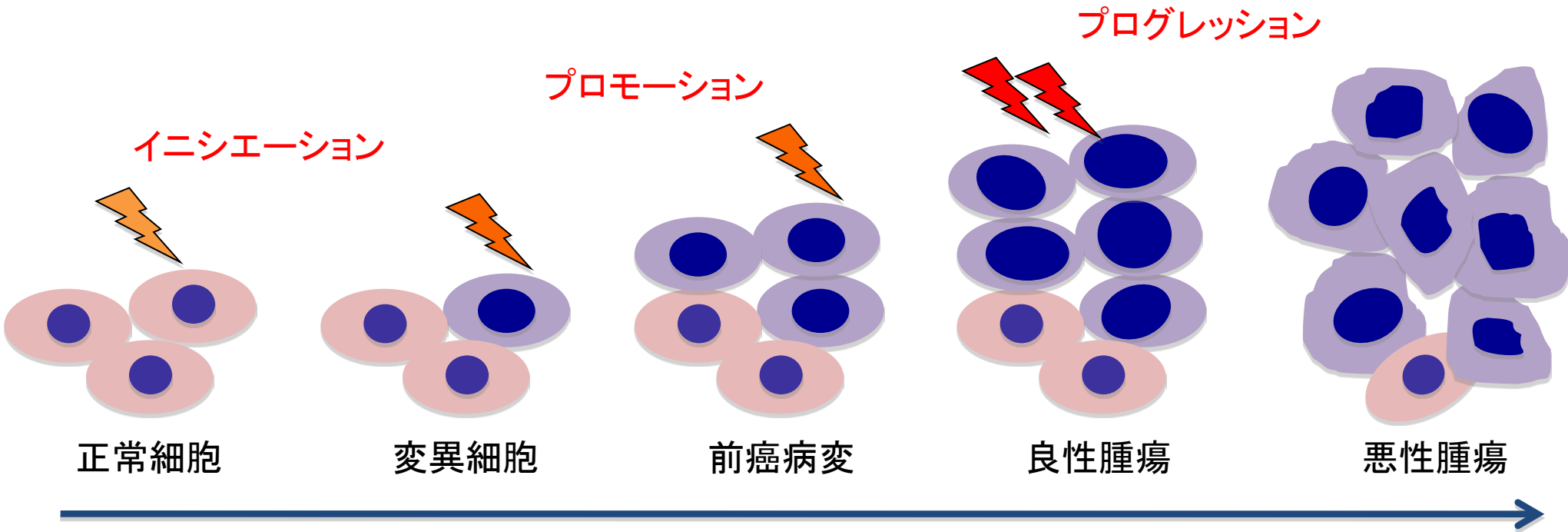
新生児げっ歯類モデル

もう1種類のげっ歯類による長期がん原性試験

### •メカニズム研究

- 1) 細胞変化(アポトーシス、増殖活性、変異細胞集、細胞間連絡の変化)
- 2) 生化学的測定値(ホルモン、成長因子、蛋白結合、酵素活性)

# 多段階発がんモデル



遺伝毒性/エピジェネティック機序によるDNA発現異常の蓄積

自律的細胞増殖能の獲得  
浸潤能の獲得

# 2段階発がんモデル

## ラット中期肝発がん性試験法(伊東法)



動物: F344 雄ラット 6 週齢

↓ : DEN 200mg/kg, 腹腔内投与

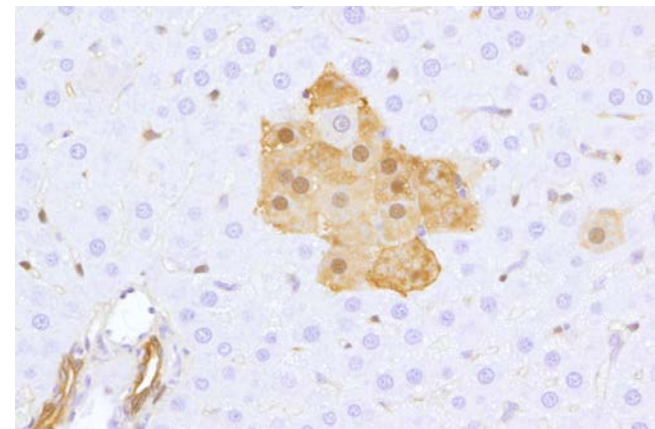
▼ : 2/3部分肝切除

単位面積あたりの  
GST-P陽性巣を定量

### 肝臓を標的とする発がん物質

総数	肝臓を標的とする化合物	データ
147	87 (59%)	IARC, 1987
149	80 (54%)	NCI/NTP, 1987

Glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive foci : ラット肝前癌病変の指標(腺腫、癌に進行しても陽性を示す)





# 327化合物のラット中期肝発がん性試験法(伊東法)の結果

被験物質の発がん性	陽性率			合計
	遺伝毒性 (Ames 試験等)			
	陽性	陰性	unknown	
肝発がん物質	31/32 (97) <sup>a</sup>	29/33 (88) <sup>b</sup>	1/1 (100)	61/66 (92)
非肝発がん物質	7/26 (27)	2/15 (13)	1/2 (50)	10/43 (23) <sup>d</sup>
非発がん物質	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)
合計	42/78 (54)	64/180 (36)	17/69 (25)	123/327 (38)

a; 陰性の1物質 (4,4-diaminodiphenylmethane)

b; 陰性の4物質 (ペルオキシゾーム増生作用を持つ物質、clofibrate, di(2-ethylhexyl)adipate, di(2-ethylhexyl)phthalate, trichloroacetic acid)

c; 陰性の1物質 (malathion)

d; 合計11物質 (陽性だが、肝発がん性は見られない) 11/93 (12%)

# 病理部の取り組み①: 病理組織学的検索に基づく部位特異的 *in vivo* 変異原性評価

## レポーター遺伝子導入ラットを用いたオクラトキシンAの発がん機序解明

### 病理組織学的検索

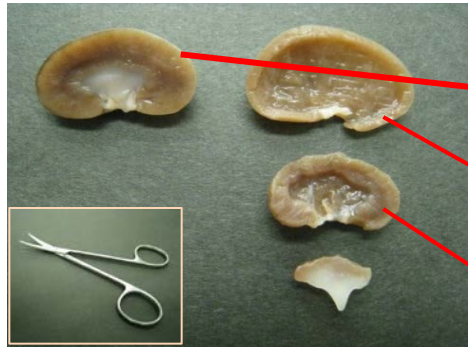


**髄質外帯外層に限局した毒性発現**

- ・カリオメガリー
- ・アポトーシス
- ・空胞変性

※ 皮質を含むその他の部位に著変なし

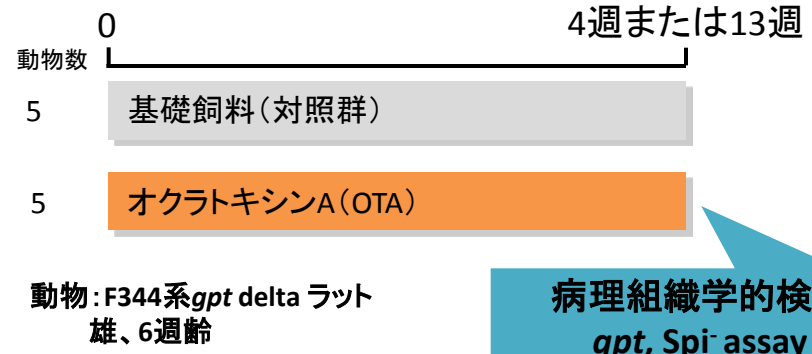
### *in vivo* 変異原性評価



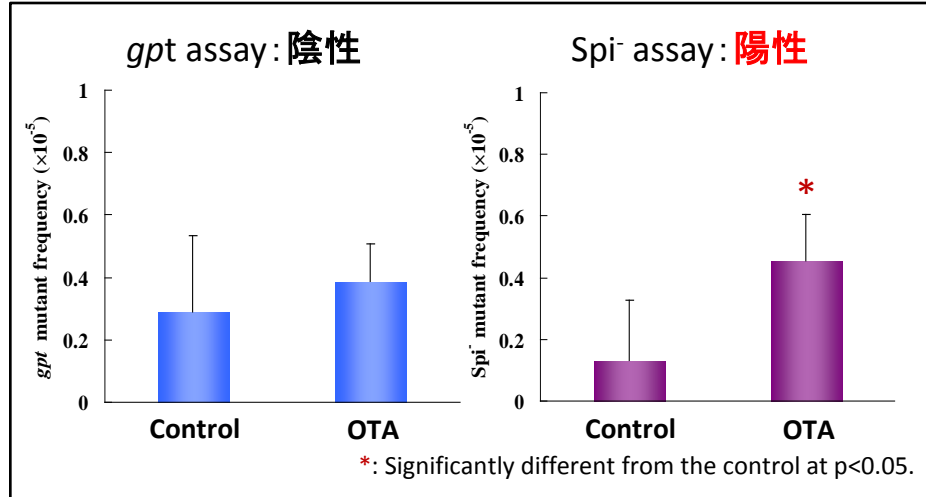
検索部位	<i>gpt</i> assay	<i>Spi</i> <sup>-</sup> assay
腎臓全体	陰性	陰性
腎皮質	陰性	陰性
腎髄質外帯 (毒性標的部位)	陰性	陽性

眼科用反剪ばさみを用いて肉眼的に各部位を採取

### 試験プロトコール



病理組織学的検索 *gpt*, *Spi*<sup>-</sup> assay (*in vivo* 変異原性)



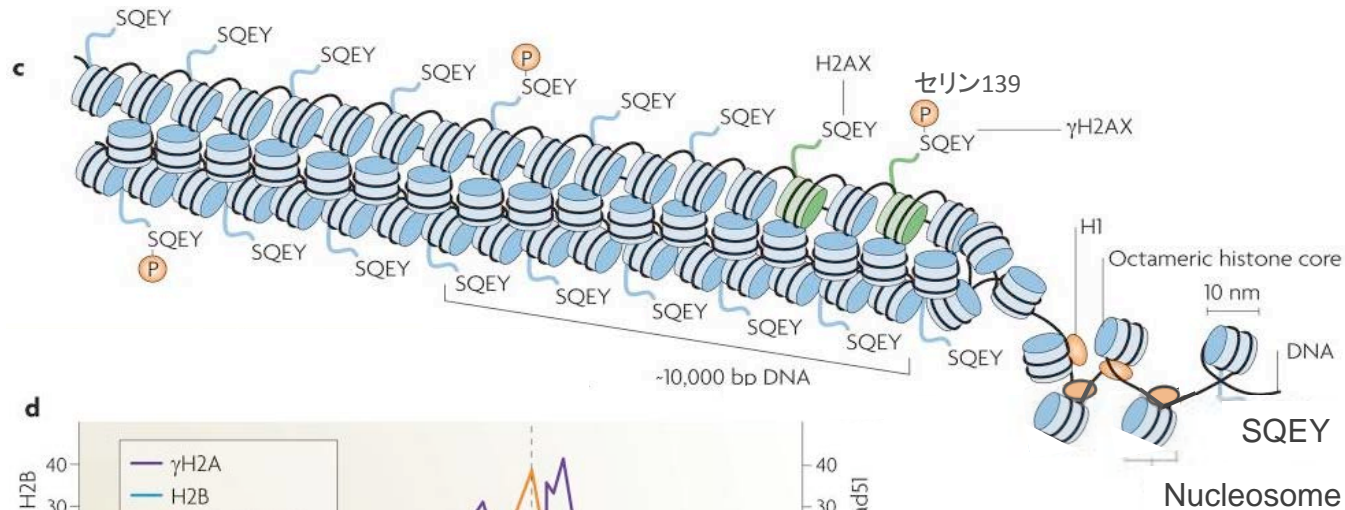
OTAの発がん機序に遺伝毒性メカニズムの関与が示唆された。

# 病理部の取り組み②: DNA損傷修復をマーカーとした遺伝毒性検出の試み

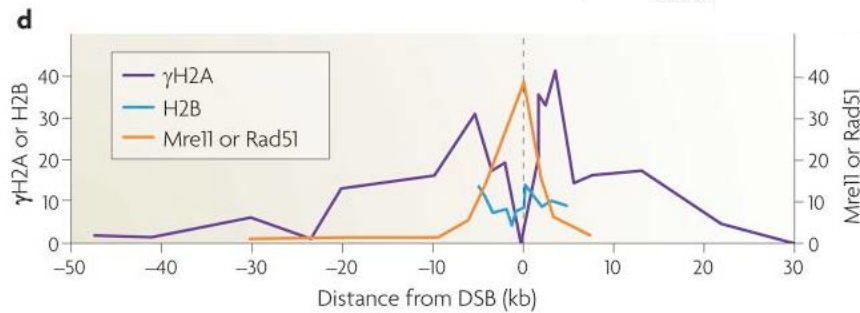
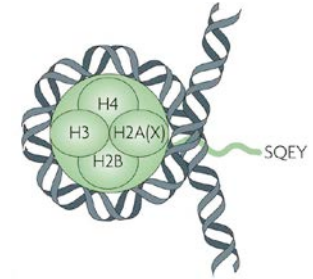
Immunohistochemical expression pattern of DNA repair markers

Class	Proteins	Control rat urinary bladder		BBN-treated rat urinary bladder	
		Urothelium	Mesenchymal cells	Normal-appearing and hyperplastic urothelium	Carcinoma
<b>Double-strand breaks</b>	<b>γ-H2AX</b>	—	—	+	+
	<b>MRE11</b>	+	+	++	++
	<b>XRCC1</b>	+	+	+	+
<b>Direct damage reversal</b>	<b>MGMT</b>	-	-	+	-
<b>Mismatch repair</b>	<b>MLH1</b>	±	±	+	+
	<b>MSH6</b>	+	±	+	+
<b>Base excision repair</b>	<b>APE1</b>	++	++	++	++
<b>Nucleotide excision repair</b>	<b>DDB1</b>	++	++	++	++
	<b>ERCC1</b>	±	-	+	+
<b>Proof-reading repair</b>	<b>TREX1</b>	+	++	++	++
<b>Cell cycle checkpoint</b>	<b>SMC1</b>	++	++	++	++
<b>Post replication repair</b>	<b>RAD18</b>	++	++	++	++

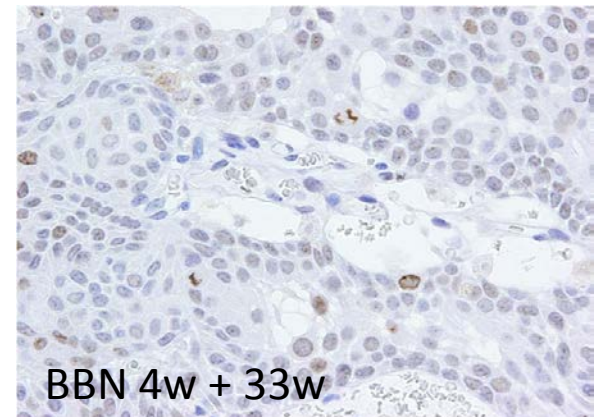
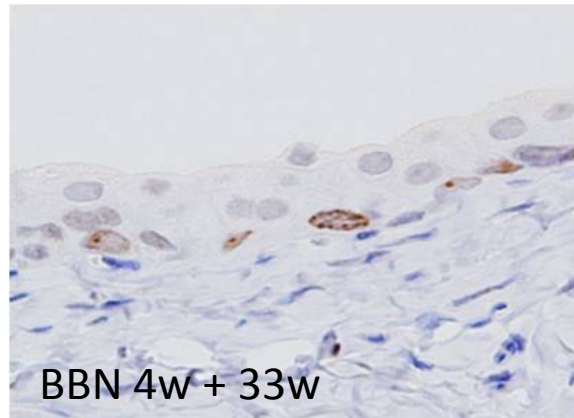
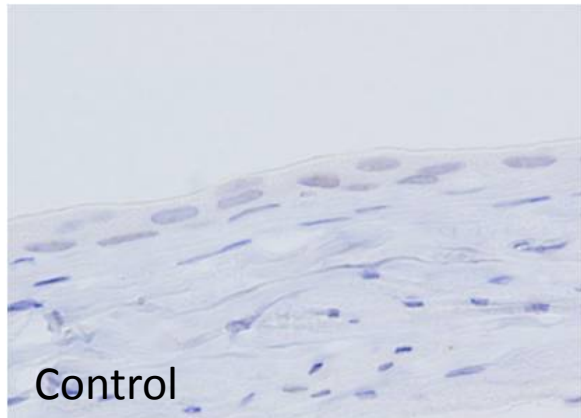
# DNA 2本鎖切断部位のマーカールとしての $\gamma$ -H2AH



*Nat Rev Cancer*, 8:957-67 (2008)より改変

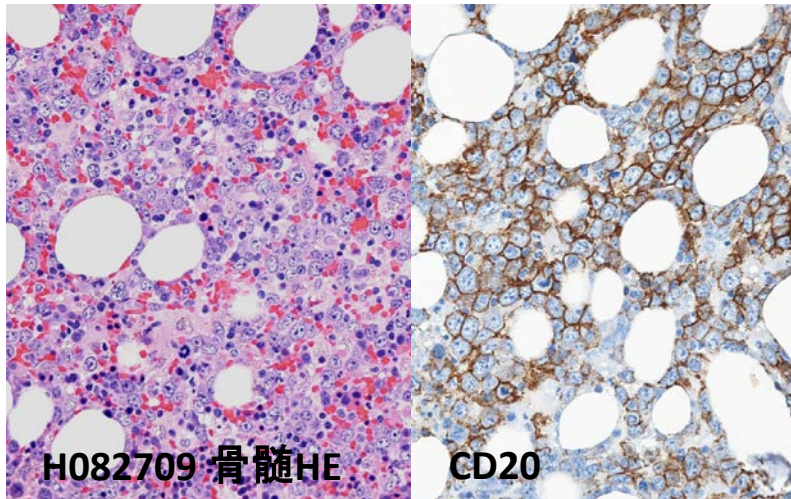


## $\gamma$ -H2AX expression in rat urinary bladder

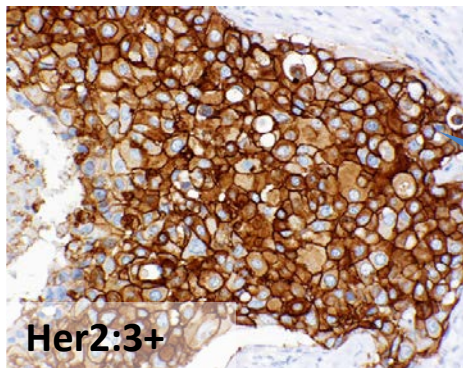
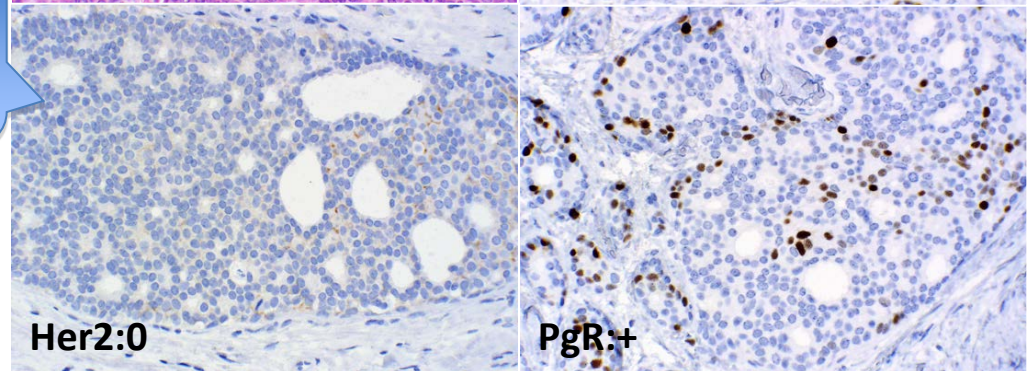
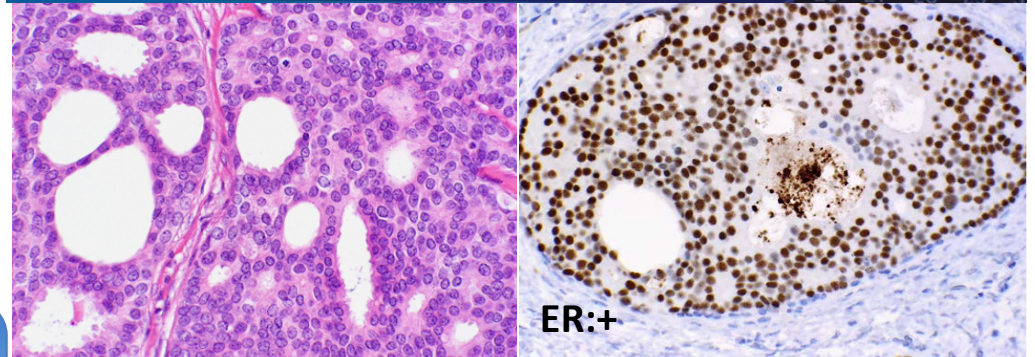


# 新規物質の安全性・がん原性評価への対応

抗体医薬 増殖因子を標的とする  
iPS 細胞 奇形腫発生懸念



びまん性B細胞リンパ腫



Her 2 陰性  
ホルモン陽性  
乳癌

Her 2 陽性  
ホルモン陰性  
乳癌

# 考 察

- 様々なカテゴリーにおいて、多数の既存および新規化合物の安全性評価が必要とされている。
- 現在、医薬品のがん原性試験については、実施要件の見直が可能か、前向き調査が計画されている。
- 様々なスクリーニング手法を活用して、緊急性の高い物質から優先的にがん原性を評価する必要がある。
- 安全性を損ねることなく、短期にがん原性・*in vivo* 遺伝毒性を評価できる方法を追求していく必要がある。
- 新規機序の化合物や医薬品の開発が想定されており、これまでとは異なるがん原性の評価方法への対応も必要と考えられる。