

## (58) *In vitro* トランスフォーメーションアッセイの 発がんリスク評価への適用

佐々木 克典\*・篠本 祐介・中山 亜紀・米田 稔・森澤 眞輔

京都大学大学院工学研究科 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂4)

\* E-mail: [sasaki@risk.env.kyoto-u.ac.jp](mailto:sasaki@risk.env.kyoto-u.ac.jp)

化学物質のリスク評価は現在、動物実験に頼らない簡便な評価への転換を迫られており、*in vitro* 毒性試験に基づいたリスク評価の開発が望まれる。しかし、*in vitro* 試験系で生体における反応を再現するには限界があり、ヒト健康リスクへの外挿には困難を伴う。そこで本研究では、対象物質の毒性を等価な放射線量に換算して評価する、放射線等価係数によるリスク評価を提案する。*In vitro* トランスフォーメーションアッセイから得たDDT、X線に関する用量反応関係を比較することでDDTの放射線等価係数を決定し、放射線疫学情報からDDTの肝臓がんリスクを評価した。その結果Slope Factorとして0.143-0.152が得られ、US.EPAの示す0.34と比べ過小ながらも妥当な値となり、本評価の有効性が示された。

**Key Words :** cancer risk assessment, DDT, DDE, PBPK model, transformation assay

### 1. 序論

人類は現在、実に様々な化学物質を生産して人間社会に役立てており、それら化学物質が人類にもたらした便益は計り知れない。しかしながら、それらの中には生物に対して発がんに関連する悪影響を及ぼすものも少なからず存在するため、化学物質の使用にあたっては、そのリスクを正當に評価し責任をもって管理する必要がある。現在わが国においては、医薬品、農薬、食品添加物、化学物質については個々に発がん性試験のガイドラインが制定されており、基本的には実験動物を用いて、長期的に被験物質を反復投与したときに発現する発がん性に関する情報を得ている<sup>1)</sup>。動物実験は完全な生体を用いるためにリスク評価において非常に有効な試験ではあるが、毎年1000種以上もの新規化学物質が生み出されている現状では動物を用いた長期実験は時間及びコスト面で現実的でない。また、近年動物愛護の観点からも問題がささやかれており、迅速かつ簡便な手法をもって、凡その発がん性を評価できるツールの開発が望まれている。

その解決策の一つとして、*in vitro* 試験から得た情報を活用してリスク評価に結びつけることが考えられる。*in vitro* 試験は動物実験と比較して単純かつ安価な試験系であり、また近年の膨大な知見の集積により様々な試験法の開発が進んでいるため、有効な情報が得られると期待

できる。そこで本研究では、*in vitro* 発がん試験とも呼ばれるトランスフォーメーションアッセイから得た用量反応関係をもつてヒトの発がん性を評価することを目指す。培養細胞を用いる*in vitro* 試験系は短期間、低コストというメリットがある一方、生体における反応を再現するには限界があり、その結果を直接ヒトの発がんリスクに外挿するには不確定要素が多く、困難を伴う。そこで本研究においては、放射線等価係数を導入したリスク評価法を提案する。ここで放射線等価係数を、化学物質の曝露量を等価な毒性を示す放射線量として表す換算係数と定義する。放射線については広島・長崎の被爆者調査をはじめとして、様々な健康影響について豊富な疫学情報が蓄積されている。従って、化学物質の毒性を、放射線曝露との比較によって相対的に評価することが出来れば、豊富な疫学情報から体系付けられた放射線リスク評価システムを援用することで、不確定要素の多くを回避して評価の信頼性を高めることができると考える。

ここで、本研究におけるリスク評価の枠組みを図-1に示す。まず、体内動態モデルとしてPBPK (Physiologically based Pharmacokinetic) モデルを用いて化学物質の内部曝露量、すなわち対象臓器中濃度を算出する。次に、化学物質と放射線とで同様の*in vitro* 毒性試験を行い、その結果得られた両者の用量反応関係を比較することで化学物質の放射線等価係数を決定する。得られた内部曝露量と放

射線等価係数から、対象臓器における等価放射線量が計算できる。これに放射線の疫学情報を適用することで、化学物質の健康リスクを評価する。本評価において化学物質と放射線とを比較するにあたっては、両者の次元や発がんメカニズムが異なるため、化学物質濃度及び放射線量のそれぞれの発がんに対する寄与が異なる可能性が高く、単純な比較は難しい。そこで、例えば突然変異のような、化学物質及び放射線両者の発がんに共通する核心的なイベントを指標とした*in vitro*毒性試験を行う。その結果得られた用量反応関係に基づいて比較を行うことで、突然変異に至るまでのメカニズムの違い等の不確実性をブラックボックス化し、突然変異の発生以降は化学物質由来か放射線由来かにかかわらず発がんと同様に寄与するとの考えに基づいて信頼性の確保を図る。

本研究では、上述の枠組みを有機塩素系殺虫剤として知られるDDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane) のリスク評価に適用し、評価結果をUSEPA (Environmental Protection Agency) が動物実験から推定した評価値と比較することで*in vitro*試験に基づくリスク評価法の有効性を検討した。

ここで、DDTについては神経毒性をはじめとして様々な毒性が知られており<sup>2)</sup>、摂取されたDDTは生体内でGST (glutathione S-transferase) による触媒作用を受けるジハイドロクロリネーション過程を経てDDEに代謝される<sup>3)</sup>。DDT及びDDEの構造式を図-2に示す。DDEは体内でそれ以上の代謝を受けることがなく、脂溶性が高いために脂肪に蓄積されやすい<sup>4)</sup>。DDT及びDDEの発がん性については、DDTは発がんイニシエーターであると言われており、DDTの最終発がん物質はDDEであるとする報告もある<sup>5)</sup>。DDTに関してマウス及びラットを対象とした動物

実験において発がん性が認められており、主に肝臓に腫瘍の形成が観察されたことから、DDT及びDDEによる発がんの主要な標的臓器は肝臓であると考えられる<sup>6)</sup>。IARC (International Agency for Research on Cancer) はDDTをGroup 2B (possibly carcinogenic to humans) に位置づけており<sup>7)</sup>、USEPAではDDT及びDDEのRfD (Reference Dose)として0.0005 [mg/kg/day]を提唱し、発がんに関するSlope Factor (SF)を0.34 [1/mg/kg/day]としている<sup>8)</sup>。こうした従来の研究ではDDTとDDEは同じ発がん効果を持っているとしているが、DDEに関しての実験データは少なく、正確なリスク評価を行うにはDDT及びDDEの発がんの強さをより詳細に調査する必要がある。

トランスフォーメーションアッセイは*in vitro*発がん試験とも呼ばれ、定量的がん原性試験として広く用いられているが、実際に再現性のある検定法として評価されているものに、BALB/3T3細胞を用いたフォーカス検定法がある。これは、BALB/3T3細胞が本来有する接触阻害能が曝露処理に起因する形質転換によって失われることで形成する細胞集団 (フォーカス) を指標としてがん原性を評価するものである。本試験法においては、イニシエーター処理及びプロモーター処理の2段階の処理を行う2段階トランスフォーメーションアッセイを用いることで、試験物質のイニシエーター活性及びプロモーター活性の有無を判定することが可能である。

以上のような背景から、本研究では、*in vitro*試験としてBALB/3T3細胞を用いたフォーカス検定法による2段階トランスフォーメーションアッセイを行い、DDT、DDEのイニシエーター活性及びプロモーター活性の有無を確認すると共に用量反応関係を把握し、その結果に基づいて放射線等価係数を決定してDDTによる発がんリスクを評価することを目的とした。

## 2 研究方法

### (1) PBPKモデルを用いた内部曝露量評価

#### a) モデルの構造

本研究では、DDT及びDDEの内部曝露量評価には、菱川、深見が、YouらのPBPKモデル<sup>9)</sup>をもとに構築したPBPKモデル<sup>10)</sup>を改良して用いた。従来のモデルでは、DDTの経口摂取に関して消化管のコンパートメントを用いた計算を行っていたが、消化管自体はターゲット組織でなくその組織中濃度は重要でないため、パラメータ設定の際の不確定要素を可能な限り排除すべきとの観点から、本研究では消化管のコンパートメントを削除し、糞便排泄量と経口摂取量、吸収量に関する質量保存の関係式を追加することで同様の計算を実現した。本研究で構

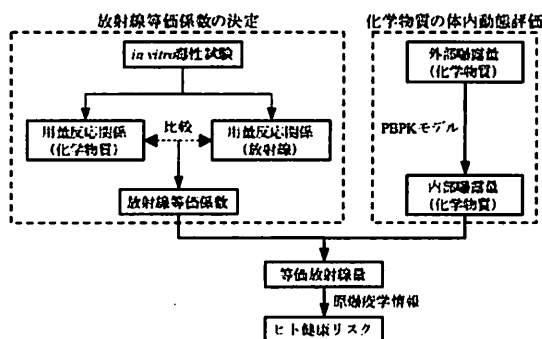


図-1 放射線等価係数を用いたヒト健康リスク評価

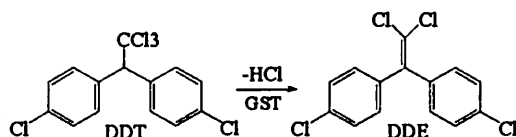


図-2 DDT及びDDEの構造式

築したPBPKモデルの構造を図3に示す。

本モデルにおいては人体は9のコンパートメントに分けてコンパート間を血流で結び、各々のコンパートメント中のDDT及びDDEに関して質量保存則を適用することにより物質収支を以下の式(1a)～(1g)の微分方程式群で表現した。なお、肝臓においてはDDTからDDEへの代謝反応を考慮した。

腎臓中DDT及びDDE：

$$V_{KI} \frac{dC_{KI}}{dt} = Q_{KI} (C_{AB} - \frac{C_{KI}}{P_{KI}}) - K_E \frac{C_{KI}}{P_{KI}} \quad (1a)$$

肝臓中DDT：

$$V_{LI} \frac{dC_{LI}}{dt} = Q_{LI} (C_{AB} - \frac{C_{LI}}{P_{LI}}) + \frac{dmet}{dt} + K_{AS} D_{oral} \quad (1b)$$

肝臓中DDE：

$$V_{LI} \frac{dC_{LI}}{dt} = Q_{LI} (C_{AB} - \frac{C_{LI}}{P_{LI}}) + \frac{dmet}{dt} + K_{AS} D_{oral} \quad (1c)$$

動脈血中DDT及びDDE：

$$V_{AB} \frac{dC_{AB}}{dt} = \sum Q_{ii} (\frac{C_{ii}}{P_{ii}} - C_{AB}) \quad (1d)$$

その他のコンパートメント中DDT及びDDE：

$$V_{ii} \frac{dC_{ii}}{dt} = Q_{ii} (C_{AB} - \frac{C_{ii}}{P_{ii}}) \quad (1e)$$

DDTからDDEへの代謝：

$$met = K_F V_{LI} C_{LI} \quad (1f)$$

糞便排泄：

$$D_{feces} = D_{oral} (1 - K_{AS}) \quad (1g)$$

ただし、

$V_{ii}$  : 組織*i*の容積[L]

$Q_{ii}$  : 組織*i*へと流入する血液流量[L]

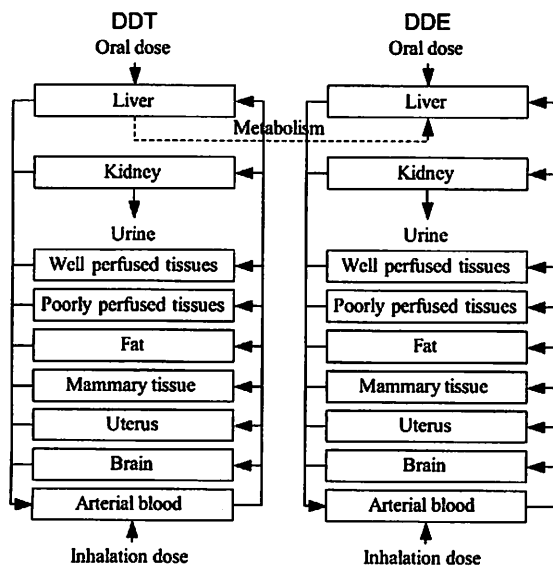


図3 本研究で構築したPBPKモデルの構造

$C_{ii}$  : 組織*i*中のDDT及びDDE濃度 [mg/L]

$P_{ii}$  : 組織*i*における組織、血液分配係数 [-]

$D_{oral}$  : DDT及びDDEの経口摂取量 [mg/kg/hr]

$K_{AS}$  : 吸収に関わる係数 [-]

$K_E$  : 排出に関わる係数 [L/hr]

$K_F$  : 代謝に関わる係数 [-]

とする。

上述の微分方程式群を、式(2)に示す後進差分法に從而て解くことでDDT及びDDEの体内動態を評価した。なお、差分の時間刻み幅  $dt$  は1hrとした。

$$C_i^{t+\Delta t} = C_i^t + \Delta t (\sum a_i \cdot C_i^{t+\Delta t} + b_i) \quad (2)$$

ただし、

$C_i^t$  : 時刻*t*における臓器*i*中のDDT、DDE濃度

$a_i$  : 臓器*i*中のDDT、DDE濃度にかかる係数

$b_i$  : 定数項

である

## b) パラメータ設定

本モデルのパラメータは、組織容積や血流量等のヒトに固有の生理学的パラメータについてはRonaldら<sup>11)</sup>、Haddadら<sup>12)</sup>が提示した値を採用した。また、血液・組織間の分配率等の各化学物質に固有の物理学的パラメータについては、Mussalo<sup>13)</sup>の示した脂肪組織の血液・組織間の分配率を基準に、それ以外のパラメータはYouら<sup>8)</sup>の行った動物実験におけるラットの値を参考に、パラメータフィッティングにより調整した。代謝・排泄速度等に関する生化学パラメータはヒトに関するデータが少なく、吸収率、尿排出率、代謝率はパラメータフィッティングにより算出した。本研究で設定したパラメータを表-1に示す。

## (2) *in vitro* トランスフォーメーションアッセイ

### a) 試薬と細胞

本研究で使用したBALB/3T3細胞は、JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) Cell Bank (大阪府) から分譲を受けた。細胞培養液中のMEN、D-MEM/F12、Insulin-Transferrin-Selenium-X (以下ITS)、牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, 以下FBS) はInvitrogen Corporationの製品を使用した。染色用のギムザ染色液には、(株)メルクジャパン製のギムザ液をpH 6.48 PBS (phosphate buffer sodium) で10倍に希釈したものを用いた。その他、記載の無い限りは(株)和光純薬工業製の試薬を使用した。

BALB/3T3細胞の培養はMEM培地 (10% FBS) 中で37℃、CO<sub>2</sub>濃度5%の条件下のインキュベータ内で行った。細胞が対数増殖期にあるのを確認した後トリプシン液で処理することで細胞を回収し、 $2 \times 10^3$  cells/mLの細胞懸濁液を作成した。

以後の処理は、細胞をイニシエーター活性測定用試料とプロモーター活性測定用試料とに分けて操作を行い、イニシエーター活性測定用試料とプロモーター活性測定用試料の各々について、細胞毒性検定用に1処理濃度あたり4枚、形質転換実験用に1処理濃度あたり20枚の60mmディッシュを用意して行った。所定の初期細胞濃度となるよう上述の細胞懸濁液をMEM培地(10%FBS)で希釈して各ディッシュに添加し、24時間の前培養を行った。

表-1 PBPKモデルに用いたパラメータ値

| パラメータ                   | 値         | 単位                           |
|-------------------------|-----------|------------------------------|
| 体重                      | $BW$      | 55.0 [kg]                    |
| 心流量                     | $Q$       | $15 \times BW^{0.75}$ [L/hr] |
| 肺換気量                    | $Q_L$     | 300.0 [L/hr]                 |
| 組織重量の体重に対する割合           |           |                              |
| Liver                   | $V_{LI}$  | 2.6 [%]                      |
| Kidney                  | $V_{KI}$  | 0.4 [%]                      |
| Well perfused tissues   | $V_{WP}$  | 12.2 [%]                     |
| Poorly perfused tissues | $V_{PP}$  | 34.1 [%]                     |
| Fat                     | $V_{FA}$  | 32.7 [%]                     |
| Mammary tissue          | $V_{MA}$  | 4.4 [%]                      |
| Uterus                  | $V_{UT}$  | 0.9 [%]                      |
| Brain                   | $V_{BR}$  | 2.0 [%]                      |
| 組織への流入血流量の心血流量に対する割合    |           |                              |
| Liver                   | $Q_{LI}$  | 27.0 [%]                     |
| Kidney                  | $Q_{KI}$  | 17.0 [%]                     |
| Well perfused tissues   | $Q_{WP}$  | 12.7 [%]                     |
| Poorly perfused tissues | $Q_{PP}$  | 17.0 [%]                     |
| Fat                     | $Q_{FA}$  | 8.5 [%]                      |
| Mammary tissue          | $Q_{MA}$  | 2.8 [%]                      |
| Uterus                  | $Q_{UT}$  | 0.5 [%]                      |
| Brain                   | $Q_{BR}$  | 12.0 [%]                     |
| 組織、血液分配係数               |           |                              |
| Liver                   | $P_{LI}$  | 5.0 [-]                      |
| Kidney                  | $P_{KI}$  | 3.0 [-]                      |
| Well perfused tissues   | $P_{WP}$  | 3.0 [-]                      |
| Poorly perfused tissues | $P_{PP}$  | 6.0 [-]                      |
| Fat (DDT)               | $P_{FAE}$ | 400.0 [-]                    |
| Fat (DDE)               | $P_{FAE}$ | 200.0 [-]                    |
| Mammary tissue          | $P_{MA}$  | 6.0 [-]                      |
| Uterus                  | $P_{UT}$  | 3.0 [-]                      |
| Brain                   | $P_{BR}$  | 3.0 [-]                      |
| 吸収係数                    | $K_{AS}$  | 0.9 [-]                      |
| 排出係数                    | $K_E$     | 0.0052 [L/hr]                |
| 代謝係数                    | $K_F$     | 0.15 [-]                     |

た。用いた初期細胞濃度は細胞毒性検定用ディッシュで $2 \times 10^3$  cells/mL、形質転換実験用ディッシュで $2 \times 10^3$  cells/mLである。

#### b) *in vitro* トランスフォーメーションアッセイ

本研究で行ったトランスフォーメーションアッセイの概要を図4に示す。

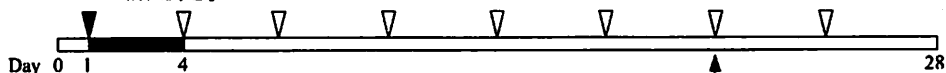
プロモーター活性測定用試料に関しては、24時間の前培養の後、イニシエーター処理として所定の最終濃度となるよう調整したDDTあるいはDDEのDMSO(dimethyl sulfoxide)溶液を全てのディッシュに添加した。72時間培養後、培養液をMEM培地(10%FBS)からD-MEM/F12培地(ITS+2%FBS)に交換し、以後培養液交換の際にはD-MEM/F12培地を使用した。更に72時間の培養の後、プロモーター処理として所定の最終濃度となるよう調整したDDT、DDEのDMSO溶液をそれぞれのディッシュに添加した。その後週に2回の頻度で培養液を交換しながら各濃度のDDT、DDEの曝露下で1週間培養した。1週間の曝露処理後、細胞毒性検定用のディッシュについてはインキュベータ内で更に1週間培養した。一方、形質転換試験用のディッシュについては1週間の曝露処理後DDT、DDEを含まない培地に交換し、更に2週間培養を続けた<sup>14)</sup>。この2週間の培養期間中についても週に2回の頻度で培養液交換を行った。なお、プロモーター活性測定に用いた処理濃度は、イニシエーター処理としてDDE 10 $\mu$ M、プロモーター処理としてDDTあるいはDDEそれぞれ0, 1, 5, 10, 15 $\mu$ Mの合計10条件である。

一方、イニシエーター活性測定用試料に関しては上記プロトコル内でプロモーター処理を行わず、72時間のイニシエーター処理の後に培養液をDDT、DDEを含まないMEM培地(ITS+2%FBS)に交換し、週に2度の頻度で培養液交換を行いながら、プロモーター活性測定用試料と同日間の培養を行った。なお、イニシエーター活性測定に用いたイニシエーター処理濃度は、DDTあるいはDDEそれぞれ0, 10, 20, 30 $\mu$ Mの合計8条件である。

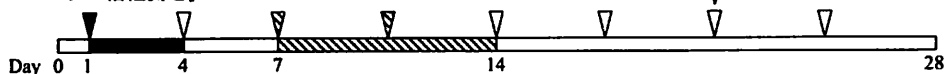
#### c) ギムザ染色

培養終了後、細胞毒性検定用のコロニー及び形質転換フォーカスを観察するためギムザ染色を行った。まず、

#### 【イニシエーター活性測定】



#### 【プロモーター活性測定】



▽ 培養液交換    ▼ イニシエーター処理    ▼ プロモーター処理

図4 本研究で行ったトランスフォーメーションアッセイの概要

ディッシュ中の培養液を吸引除去し、PBSを用いてディッシュ内を静かに洗浄した。その後3mLのメタノールを加えて室温で10分間細胞を固定した。固定液を吸引除去して風乾させた後、ギムザ染色液を3mL加えて室温にて60分間の染色を行った。染色後は流水によりディッシュを洗浄して風乾し、乾紫色に染まったコロニー数及びフォーカス数を計数した。

### 3. 結果

#### (1) PBPKモデルの検証

構築したPBPKモデルによる計算結果を、Morganらの行ったヒトを対象としたDDT投与実験<sup>19)</sup>の結果と比較することでモデルの検証を行った。Morganらの実験では、体重59.9kgの52歳女性を対象として、52日間にわたってDDTを食事に添加することにより5mg/dayの経口曝露を行い、曝露開始から3年間の脂肪中及び血液中濃度を測定している。本モデルでも同じ曝露条件を設定し、脂肪中DDT及びDDE濃度、血液中DDT濃度について計算結果を実測データと比較した。結果を図5～図7に示す。脂肪中DDT濃度において計算値が実測データよりやや高濃度となる結果ではあるが、これらの計算値は時間推移による濃度変化など、実測データを十分に再現できており、本モデルはDDT及びDDEの体内動態を良好に再現するモデルであると言える。

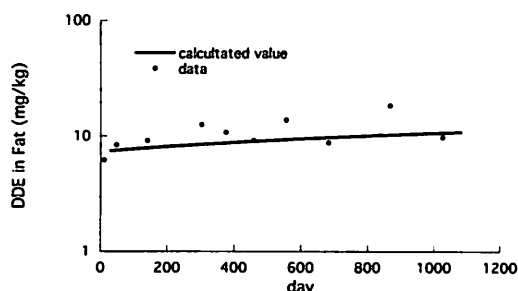


図6 PBPKモデル検証結果：脂肪中DDE濃度

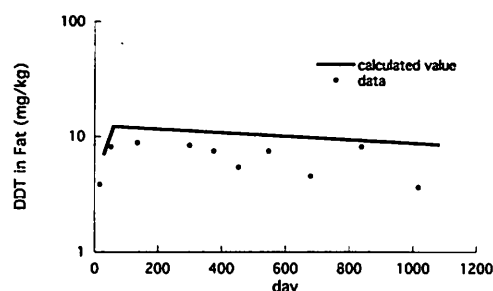


図5 PBPKモデル検証結果：脂肪中DDT

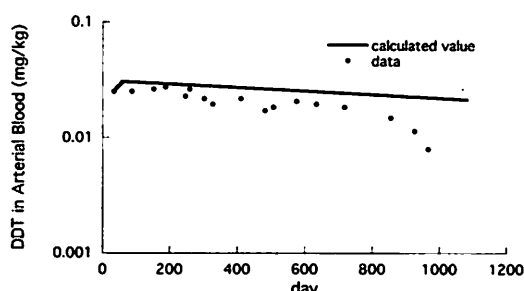


図7 PBPKモデル検証結果：血液中DDT濃度

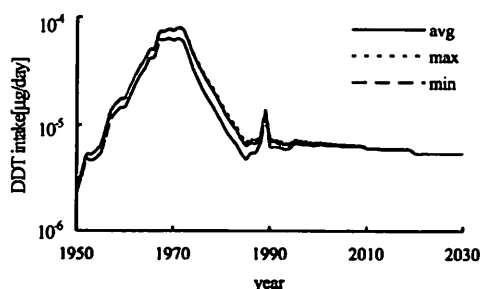


図8 曝露シナリオ：DDT経口摂取量濃度

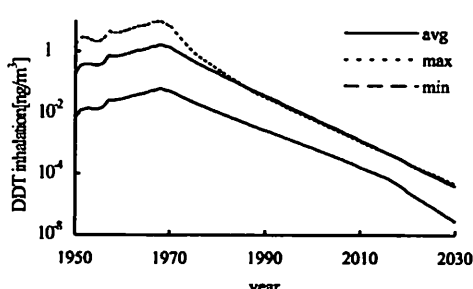


図9 曝露シナリオ：DDT経気道摂取量

#### (2) PBPKモデルを用いた内部曝露量評価

本PBPKモデルを用いて、標的臓器である肝臓中のDDT及びDDE濃度を推定した。評価対象は1950年生まれ、体重55kgの平均的な女性とし、0歳から80歳までの肝臓中DDT、DDE濃度の推移を計算した。なお、計算対象とする女性の懐胎、授乳は脂溶性物質であるDDT、DDEの排泄に関わるが、ここでは考慮しないものとした。曝露シナリオとしては、深見ら<sup>10)</sup>が構築したフガシティモデル、曝露評価モデルに基づいて算定される経口摂取量及び経気道摂取量を用いた。図8、図9に用いたDDTの経口摂取量及び経気道摂取量を、図10、図11に肝臓中DDT及びDDE濃度の計算結果を示す。

DDTはDDEへと代謝されるため、図10、図11に見られるように、DDTは減少傾向にあるのに対してDDEは増加傾向にあり、最終的にはDDTよりもDDEの方が100倍程度高濃度で肝臓へ蓄積する結果となった。また、肝臓中DDE濃度は42歳でピークに達し、その後平衡状態とな

った。そこで本研究では、平均的な日本人女性の寿命を80年とし、生涯における肝臓中DDE濃度が最大値の時に細胞ががん化し、その後潜伏期間を経て発症、死に至ると仮定し、DDTの肝臓がんリスク評価には表-2に示す42歳時点での肝臓中DDE及びDDT濃度を採用した。

(3) *in vitro*トランスフォーメーションアッセイ

トランスフォーメーションアッセイの結果得られた用量反応関係を図-12、図-13に示す。なお、縦軸には形質転換率として、曝露条件ごとに検出した形質転換フォーカスの総数をディッシュ数及び細胞生存率で除した値を取った。ここで、細胞生存率の計算には細胞毒性検定用ディッシュ中のコロニー数を用い、各曝露条件におけるコロニー数の平均値の、コントロールにおけるコロニー数の平均値に対する比として計算した。また、検出した形質転換フォーカスはその形質転換の程度によって、クラスⅢ（密集した細胞が多層を形成し、著しい配列異常を有する。濃い紫色に染まり紡錘形を呈する細胞が多い。）、クラスⅡ（密集した細胞が多層を形成するがクラスⅢに比べて配列以上は弱く紫色は薄い。）、クラスⅠ（密集した細胞からなり、薄い紫色を呈する）の3種類にクラス分けを行い、形質転換率の計算にはクラスⅢのフォーカス検出数のみを用いた。

表-2 42歳における肝臓中DDT及びDDE濃度

| 曝露シナリオ | 肝臓中濃度[mg/kg]       |                    |
|--------|--------------------|--------------------|
|        | DDE                | DDT                |
| Min    | $2.16 \times 10^2$ | $4.94 \times 10^4$ |
| Avg    | $3.57 \times 10^2$ | $6.19 \times 10^4$ |
| Max    | $3.67 \times 10^2$ | $6.48 \times 10^4$ |

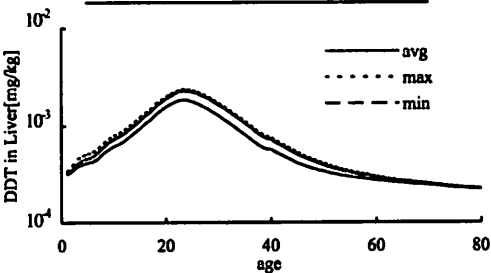


図-10 内部曝露量評価結果：肝臓中DDT濃度の時間推移

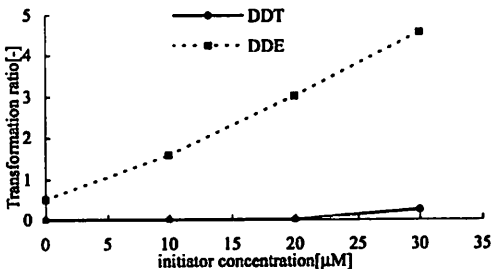


図-12 イニシエーター活性測定結果

Ⅰ（密集した細胞からなり、薄い紫色を呈する）の3種類にクラス分けを行い、形質転換率の計算にはクラスⅢのフォーカス検出数のみを用いた。

図-12、図-13から、DDTとDDEとを比較した際、イニシエーター活性はDDEの方が、プロモーター活性はDDTの方が強いことが示された。

(4) 放射線等価係数の決定

前節までの内部曝露評価及びトランスフォーメーションアッセイの結果から、DDEはDDTよりも強いイニシエーター活性を持ち、またDDTよりも100倍程度高い濃度で肝臓中に蓄積することが示された。従って、イニシエーションにはDDEのみが作用するとしてDDEについて放射線等価係数を決定する。放射線等価係数の決定は、図-12に示したDDE曝露によるトランスフォーメーションアッセイの結果を、Little<sup>10)</sup>が行ったX線照射BALB/3T3細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイの結果と比較することで行う。図-14にLittle<sup>10)</sup>の実験結果を示す。

まず、図-13中のDDE曝露による形質転換率の用量反応関係と図-14に示したX線曝露による形質転換率の用量反応関係を、LQモデル及びWeibullモデルを用いて回帰した。得られた回帰式を式(3a)～(3d)に示す。

LQモデル

DDE : ( $R^2 = 0.98$ )

$y = 1 - \exp(-4.7994 \times 10^{-5} C_{DDE} + 5.4378 \times 10^{-4} C_{DDE}^2)$  (3a)

X線 : ( $R^2 = 0.99$ )

$y = 1 - \exp(-3.1873 \times 10^{-6} D_x - 1.8638 \times 10^{-9} D_x^2)$  (3b)

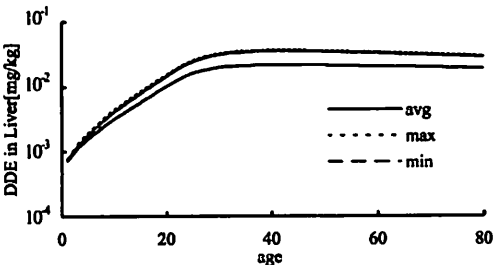


図-11 内部曝露量評価結果：肝臓中DDE濃度の時間推移

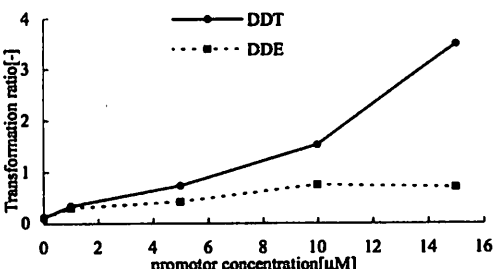


図-13 プロモーター活性測定結果

# Weibullモデル

DDE : ( $R^2 = 0.98$ )

$$y = 1 - \exp(-4.8868 \times 10^{-5} C_{DDE}^{0.98763}) \quad (3c)$$

X線 : ( $R^2 = 0.99$ )

$$y = 1 - \exp(-2.6543 \times 10^{-6} D_x^{1.0593}) \quad (3d)$$

ただし、

$y$  : 1細胞あたりの形質転換頻度 [-]

$C_{DDE}$  : DDE曝露量 [mg/kg]

$D_x$  : X線照射線量 [Gy]

とする。

これらの回帰式を用いて、形質転換頻度 $0 \sim 10^{-3}$ の範囲で、ある形質転換頻度に対応するX線量とDDE濃度を求めた。その結果を図-15、図-16に示す。また、図-15、図-16のそれぞれを線形回帰したところ、式(4a)、(4b)に示す回帰式を得た。式(4a)、(4b)の回帰式では高い相関係数が得られたため、DDEの放射線等価係数として各式の一次係数を採用した。すなわち、LQモデルにより算出したDDEの放射線等価係数を0.134、Weibullモデルによる放射線等価係数を0.139と決定した。

# LQモデル

$$D_x = 0.001463 + 0.13421 C_{DDE} \quad (4a)$$

# Weibullモデル

$$D_x = 0.0074251 + 0.13939 C_{DDE} \quad (4b)$$

# (5) 放射線等価係数を用いたDDEの肝臓がんリスク評価

DDEの肝臓がんリスクを、式(5)に基づいて評価した。

$$Risk_{Liver} = L \cdot R_{DDE} \cdot C_{DDE} \cdot P \quad (5)$$

ただし、

$Risk_{Liver}$  : DDTによる肝臓がんリスク [-]

$L$  : 肝臓における放射線リスク係数 [Gy]

$R_{DDE}$  : DDEの放射線等価係数 [Gy/mg/kg]

$C_{DDE}$  : 肝臓中DDE濃度 [mg/kg]

$P$  : プロモーター活性係数 [-]

とする。

なお、肝臓における放射線リスク係数はUS.EPAによ

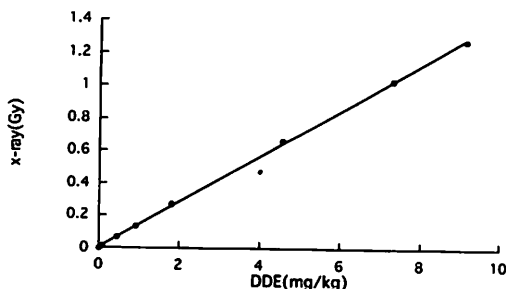


図-15 DDE濃度と放射線量との関係 (LQ model)

る値  $30.0 \times 10^{-4}$  [Gy]<sup>17)</sup>を採用し、プロモーター活性係数にはDDTのプロモーター活性を示す実験結果である図-14の回帰式(6)を用いた。また、肝臓中DDT及びDDT濃度は表-2に示した42歳時点での計算値を採用した。評価結果を表-3に示す。

$$P = (1 + 0.199 C_{DDT}) \quad (6)$$

# 4. 考察及び結論

本研究では、PBPKモデルを用いて行った内部曝露量評価の結果と、BALB/3T3細胞を用いた*in vitro*トランスフォーメーションアッセイから得られたデータに基づいて決定した放射線等価係数とを組み合わせることでDDTの肝臓がんリスクを評価し、ヒト健康リスクを簡便に評価する枠組みの構築を試みた。

PBPKモデルを用いた内部曝露量の評価では、DDTからDDEへの代謝を反映して、DDTが減少傾向にある一方でDDEは増加傾向にあり、最終的にDDTよりもDDEの方が100倍程度高濃度で肝臓へ蓄積する結果となり、脂溶

表-3 放射線等価係数によるDDTの肝臓がんリスク評価結果

| 曝露シナリオ | 肝臓がんリスク [-]        |                    |
|--------|--------------------|--------------------|
|        | LQ                 | Weibull            |
| Min    | $8.66 \times 10^6$ | $8.98 \times 10^6$ |
| Avg    | $1.43 \times 10^5$ | $1.48 \times 10^5$ |
| Max    | $1.47 \times 10^5$ | $1.52 \times 10^5$ |

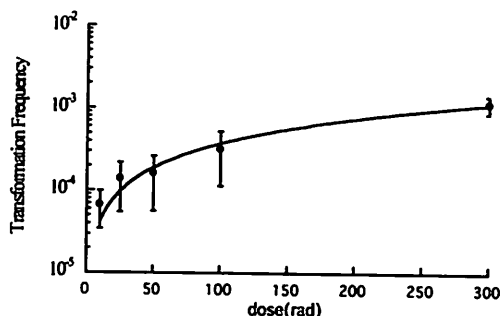


図-14 X線照射によるトランスフォーメーションアッセイ<sup>16)</sup>

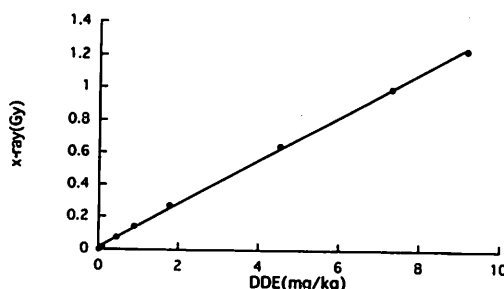


図-16 DDE濃度と放射線量との関係 (Weibull model)

性のDDEが肝臓中の脂肪中に蓄積することが示唆されたと共に、DDTの肝臓がんリスク評価においては最終代謝物であるDDEの影響を十分考慮する必要があると言える。

*In vitro*トランスフォーメーションアッセイの結果からは、DDTとDDEを比較して、イニシエーター活性はDDEの方が、プロモーター活性はDDTの方が強いことが示された。この結果はDDTが肝臓がんのプロモーター物質であると動物実験の結果<sup>10, 19)</sup>を支持するものである。また、DDTを摂取した場合、肝臓中にはDDT及びDDEが同時、あるいはDDEが遅れて、存在すると考えられるため、DDEがイニシエーターとして作用し、DDTがプロモーターとして作用するという生体内の発症機構が想定され、本結果はDDTによる発がんリスクを評価する上で重要な知見を示していると言える。

DDTの肝臓がんリスク評価では、平均的な日本人女性を対象とし、深見ら<sup>10)</sup>の研究に基づく曝露シナリオを設定して評価を行い、表-3に示した結果を得た。この評価値の妥当性を検証するために、USEPAの示すDDTのSFの値との比較を行う。本研究における評価値とPBPKモデルに用いた経口摂取量から式(7)に基づいてSFを算出し、USEPAの示すSF値 0.34<sup>9)</sup>と比較した。その結果を表-4に示す。

$$SF = \frac{Risk}{Intake} \quad (7)$$

ただし、

Risk : 超過発がんリスク [-]

SF : 単位経口摂取量に対するリスク [1/mg/kg/day]

Intake : 体重あたりの経口摂取量 [mg/kg/day]

とする。

表-4に示した通り、LQモデルから求めたSFは0.143～0.147、Weibullモデルから求めたSFは0.148～0.152となり、両者共にUSEPAによるSFの約25倍の過小評価となった。この原因として、本研究で得た用量反応関係は実際の曝露量よりも高濃度域の実験結果に基づくものであり、低濃度への外挿に際して誤差が生じた可能性が考えられる。また、トランスフォーメーションアッセイに用いたBALB/3T3細胞はマウス胎児由来の細胞であり、ヒトとの感受性の差異も考えられる。その一方で、USEPAによるSFは様々な動物実験で得られたSFの幾何平均によって算出された値であり、実際には0.082～1.04<sup>9)</sup>の値を取っており、本研究による評価値もこの範囲内の値となっている。また、USEPAによる評価は良性腫瘍の発生も含めた、安全側の評価となっている<sup>9)</sup>。一方本研究では、トランスフォーメーションアッセイにおいてクラスⅢのフォーカスのみを検出対象としており、悪性腫瘍の発生に重きを置いた評価となっている。以上のことから、本研究で得られた評価値は、*in vitro*試験からの積み上げ型リスク評価としては妥当な結果であると言える。

本研究の成果は、従来の動物実験に頼った事後的なリスク評価から*in vitro*試験に基づく予見的かつ簡便なリスク評価への転換を促す点で意義深い。本評価法の確立を目指した今後の展望としては、実験条件の改良、内部曝露量評価法の再検討、検証データの蓄積等が挙げられる。以下でこれらの各項目について具体的に述べる。

まず、本評価で用いた用量反応関係はDDT及びDDEについては著者らによる実験結果に基づいているが、放射線についてはLittle<sup>19)</sup>による実験結果に基づいている。*in vitro*毒性試験の結果は細胞の培養状態や実験室の環境条件に左右される可能性があるため、放射線等価係数の決定にかかる不確実性を最小化するためには放射線照射による用量反応関係についても著者ら自身の実験結果に基づくのが望ましい。従って今後追加実験として放射線照射によるトランスフォーメーションアッセイを行い、放射線等価係数を再決定したい。

次に、本研究で用いたPBPKモデルでは消化管が主要な発がん標的臓器でないことからパラメータ設定の際の不確定要素を可能な限り排除するために消化管のコンパートメントを削除して計算を行ったが、DDTを代謝するGSTは小腸中にも含まれており、DDTの体内動態を忠実に再現するためには消化管の代謝能にも注目する必要がある。従って今後小腸の代謝活性について詳細に調査し、消化管における代謝を考慮したモデルへと改良したい。また、本研究では生涯における肝臓中DDE濃度が最大値の時に細胞ががん化すると考えから、リスク評価に用いる内部曝露量としてはピーク時の肝臓中DDT及びDDE濃度を用いたが、より有用な方法として、濃度曲線下面積AUC (area under the curve) 等に基づき時間軸を考慮して評価することが考えられる。今後、毒性試験における細胞に対する曝露濃度及び曝露時間と肝臓に対する曝露濃度及び曝露時間との関連付けについて様々な観点から検討を重ね、最適な評価手法を見出したい。

最後に、本評価法における化学物質濃度と放射線量との比較にあたっては、*in vitro*トランスフォーメーションアッセイの結果得られた用量反応関係を比較することで、突然変異に至るまでのメカニズムの違い等の不確実性をブラックボックス化し、突然変異の発生以降は化学物質由来か放射線由来かにかかわらず発がんと同様に寄与するとの考えに基づいて信頼性の確保を図っている。しか

表-4 Slope Factorによる本評価法の検証結果

| 曝露シナリオ | Slope Factor [1/mg/kg/day] |         |        |
|--------|----------------------------|---------|--------|
|        | LQ                         | Weibull | US.EPA |
| Min    | 0.144                      | 0.149   | -      |
| Avg    | 0.143                      | 0.148   | 0.34   |
| Max    | 0.147                      | 0.152   | -      |

しながら、本質的に異なる二者を比較する手法であるために依然として適用範囲と限界や比較手法等について慎重に検討を重ねる必要があることは明らかであり、本評価法の有効性、実用性については数多くの検証データを蓄積して実証していくことが必要不可欠である。従って今後、様々な物質、症状について有効性を検討することで検証を重ね、本評価法の確立を目指したい。

#### 参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局企画課生活安全対策室（監修），国立医薬品食品衛生研究所（編集）：化学物質のリスクアセスメント現状と問題点，薬業時報社，1997.
- 2) 植村振作，川村宏，辻万千子，富田重行，前田静夫：農薬毒性の事典，三省堂，1992.
- 3) シツコワ・リャザノフ（松藤元訳）：農薬の衛生学と毒理学，講談社サイエンティフィック，1977.
- 4) 井上哲男編：最新農薬学，廣川書店，1999.
- 5) 若月俊一，松島松翠，安藤満：農薬の毒性と健康影響，公害研究対策センター，1989.
- 6) US. EPA: Integrated Risk Information System (IRIS), Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) (CASRN 50-29-3), <http://www.epa.gov/ncea/iris/subst/0147.htm/> (Accessed May 18th, 2010).
- 7) IARC: DDT AND ASSOCIATED COMPOUNDS, *IARC Monographs*, Vol. 53, pp. 179-249, 1991.
- 8) You L., Gazi E., Archibeque-Engle S., Casanova M., Conolly R.B. and Heck H.A.: Transplacental and Lactational Transfer of *p,p'*-DDE in Sprague-Dawley Rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 157, No. 2, pp. 134-144, 1999.
- 9) 菱川絢子：日本とインドにおける DDTs の健康リスクに関する研究，京都大学大学院工学研究科修士論文，2002.
- 10) 深見学史：数理発がんモデルを用いたリスク評価枠組みの構築，京都大学大学院工学研究科修士論文，2006.
- 11) Brown R.P., Delp M.D., Lindstedt S.L., Rhombert L.R. and Beiles R.P.: Physiological Parameter Values for Physiologically Pharmacokinetic Models, *Toxicology and Industrial Health*, Vol. 13, No. 4, pp. 407-484, 1997.
- 12) Haddad S., Restieri C. and Krishnan K.: Characterization of Age-Related Changes in Body Weight and Organ Weights from Birth to Adolescence in Humans, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, Vol. 64, No. 6, pp. 453-464, 2001.
- 13) Mussako-Rauhamaa H.: Partitioning and Levels of Neutral Organochlorine Compounds in Human Serum, Blood Cells, and Adipose and Liver Tissue, *The Science of the Total Environment*, Vol. 103, No. 2-3, pp. 159-175, 1991.
- 14) Tsuchiya T., Kato-Masatsuji E., Tsuzuki T. and Umeda M.: Anti-Transforming Nature of Ascorbic Acid and its Derivatives Examined by Two-Stage Cell Transformation using BALB/c 3T3 Cells, *Cancer Letters*, Vol. 160, No. 1, 2000.
- 15) Morgan D. and Roan C.C. (Hayes W.Jr. Ed): The Metabolism of DDT in Man, In *Essays in Toxicology* Vol. 5, pp. 39-97, Academic Press, 1974.
- 16) Little J.B.: Quantitative Studies of Radiation Transformation with the A31-11 Mouse BALB/3T3 Cell Line, *Cancer Research*, Vol. 39, No. 5, pp. 1474-1480, 1979.
- 17) US. EPA: ESTIMATING RADIOGENIC CANCER RISKS, <http://www.epa.gov/radiation/docs/assessment/402-r-93-076.pdf> (Accessed May 18th, 2010).
- 18) Kelly-Garvert F. and Legator M.S.: Cytogenetic and Mutagenic Effects of DDT and DDE in a Chinese Hamster Cell Line, *Mutation Research*, Vol. 17, No. 2, pp. 223-229.
- 19) Sugie S., Mori H. and Takahashi M.: Effect of in vivo Exposure to the Liver Tumor Promoters Phenobarbital or DDT on the Gap Junctions of Rat Hepatocytes: a Quantitative Freeze-Fracture Analysis, *Carcinogenesis*, Vol. 8, No. 1, pp. 45-51.

(2010.5.21 受付)

### An application of *in vitro* transformation assay for cancer risk assessment

Katsunori SASAKI, Yusuke SASAMOTO, Aki NAKAYAMA, Minoru YONEDA and Shinsuke MORISAWA

Dept. of Engineering, Kyoto University

Numerous chemicals used nowadays may cause serious damage to health, like cancers without knowing of their risks. However, it is virtually impossible to estimate the risk of each chemicals by performing animal testing, so alternative approaches should be discussed. As such an approach, we propose the application of *in vitro* transformation assay to the risk assessment. This framework consists of Physiologically based Pharmacokinetic model, transformation assay and conversion of chemicals toxicity to radiation. We defined the radiation equivalent dose for DDT based on two stage transformation assay using BALB/3T3 cells, and evaluated the DDT induced liver cancer risk. As a result, the slope factor was estimated to be 0.143-0.152, which is about 2/5 of the US.EPA's estimation, 0.34. This framework could be utilized to other chemical agents.