

1 ① 二段階肝発がん試験

2 a. 13 週間二段階肝発がん試験（マウス） 2002 年

3 マウス（C3H 系、7 週齢、雄 5 又は 8 匹/群）を用いて、二段階発がん試験が実施さ  
4 れた。投与計画は、表○に示した。

5

6

表○ マウスを用いた 13 週間二段階発がん試験における投与計画

群	投与方法試験開始		D-ガラクトサミン(投与開始 2 及び 5 週に腹腔内投与(300 mg/kg 体重))
	最初の 2 週間	次の 13 週間	
1	基礎飼料のみ	基礎飼料のみ	—
2	基礎飼料のみ	基礎飼料のみ	+
3	基礎飼料のみ	基礎飼料と フェノバルビタール(飲水投与(500ppm))	+
4	フルメキン添加飼料(4,000 ppm)	基礎飼料のみ	+
5	フルメキン添加飼料(4,000 ppm)	基礎飼料と フェノバルビタール(飲水投与(500ppm))	+
6	フルメキン添加飼料(4,000 ppm)	フルメキン添加飼料(4,000 ppm)	+

7 中山専門委員修文

8

9 試験期間中、フルメキン投与群（4～6 群）で対照群に比較して有意な体重の低値が  
10 みられたが、基礎飼料に切り替えると回復した（4 及び 5 群）。

11 肝臓の絶対重量の有意な増加が 3、5 及び 6 群でみられ、フルメキンとフェノバル  
12 ビタールの長期投与の影響と考えられた。肝臓の相対重量は全投与群（2～6 群）で高  
13 値を示した。

14 肝臓の病理組織学的検査の結果を表○に示した。肝細胞増殖巣が、5 及び 6 群でそ  
15 れぞれ 8 例中 2 例及び 7 例中 6 例に観察された。（参照 2、16）[FAS 51, p3 の 2 段落  
16 目][Toxicol Sci 2002]

17

18

表○ マウスにおける二段階発がん試験で肝病変がみられた動物数

群	動物数 (匹)	肝病変		
		小葉中心性 脂肪変性	小葉中心性 肝細胞肥大	肝細胞増殖巣
1	4	0	0	0
2	8	0	0	0
3	8	0	8 <sup>a, b</sup>	0
4	8	0	0	0
5	8	0	8 <sup>a, b, c</sup>	2
6	7	7 <sup>a, b, c</sup>	0	6 <sup>a, b, c</sup>

19 a : 1 群と有意差あり (P<0.05)

20 b : 2 群と有意差あり (P<0.05)

c : 4 群と有意差あり(P<0.05)

b. 26 週間二段階肝発がん試験 (マウス) 2001 年

*p53*ヘテロ接合欠損マウス (CBA 系、*p53*(+/-)、雄 41 匹、雌 27 匹)<sup>1</sup>を用いて、二段階発がん試験が実施された。イニシエーション相ではジメチルニトロソアミン (DMN) を単回腹腔内投与 (5 mg/kg 体重) し、プロモーション相では DMN の投与 1 週間後からフルメキンを 26 週間混餌投与 (4,000 ppm) した。また、野生型マウス (CBA 系、*p53*(+/+))、雄 42 匹、雌 32 匹) にも同様に投与した。投与終了後に肝臓の病理組織学的検査を実施し、増殖細胞病巣の PCNA (増殖細胞核抗原) 陽性率を測定した。

肝臓の病理組織学的検査の結果を表○に示した。*p53*(+/-)及び *p53*(+/+)マウスにおけるフルメキン全投与群の生存動物のほとんどに変異細胞巣がみられ、その頻度はそれぞれの対応するフルメキン非投与群より高かった。変異細胞巣は主に明瞭明な細胞から成り、時折それらの病変に好酸性細胞病巣が混じっていた。吉田専門委員修文

肝臓の非増殖性病変として、*p53*(+/-)及び *p53*(+/+)マウスにおける DMN+フルメキン及びフルメキン単独投与群に、肝細胞の単細胞壊死及び核の大小不同がみられた。

*p53*(+/-)マウスの雌雄における DMN+フルメキン投与群の肝臓の変異細胞増殖巣吉田専門委員修文の PCNA 標識率は、*p53*(+/+)マウスと比較して有意に高かった。肝臓の非増殖性領域の PCNA 標識率は、*p53*(+/-)及び *p53*(+/+)マウス間では同様であったが、*p53*(+/-)及び *p53*(+/+)マウスの DMN+フルメキン及びフルメキン単独投与群の標識率はそれぞれの対応するフルメキン非投与群より有意に高かった。(参照 2、23) [FAS 51, p3 の一番上の試験] [J Toxicol pathol]

表○ *p53*ヘテロ接合欠損及び野生型マウスを用いた二段階肝発がん性試験における肝臓に細胞増殖性病変がみられた動物数及びその病変

マウス	性	投与		検査 動物数 (匹)	病変			
		DMN	フルメキン		変異細胞巣	腺腫	がん	1 匹当たりの細胞増殖巣 <sup>a</sup>
<i>p53</i> ヘテロ接合欠損	雄	+	+	12	12 <sup>b</sup>	1	0	45.3 ± 16.1 <sup>b</sup>
		+	-	6	2	0	0	0.3 ± 0.5
		-	+	12	12 <sup>b</sup>	1	0	34.5 ± 19.8 <sup>b</sup>
		-	-	4	0	0	0	0
	雌	+	+	8	8	1	1	7.4 ± 4.7 <sup>b, c</sup>
		+	-	6	3	0	0	0.7 ± 0.8
		-	+	5	5 <sup>b</sup>	0	0	4.6 ± 1.1 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> 遺伝毒性発がん物質に対する感受性が增大している。

		-	-	4	0	0	0	0
野生型	雄	+	+	14	13	2	0	41.2 ± 19.0 <sup>b</sup>
		+	-	6	4	0	0	1.0 ± 1.1
		-	+	14	14 <sup>b</sup>	0	0	27.5 ± 12.7 <sup>b</sup>
		-	-	6	1	0	0	0.2 ± 0.4
	雌	+	+	12	12 <sup>b</sup>	1	0	3.2 ± 1.4 <sup>b</sup>
		+	-	10	1	0	0	0.1 ± 0.3
		-	+	5	5 <sup>b</sup>	0	0	3.6 ± 1.1 <sup>b</sup>
		-	-	5	0	0	0	0

- 1 a : 平均 ± 標準偏差  
2 b : フルメキン投与群と対応するフルメキン非投与群間に有意差あり (p<0.05)  
3 c : p53ヘテロ接合欠損マウス及び野生型マウス間に有意差あり (p<0.05)

4  
5 c. 30 週間二段階**肝**発がん試験 (マウス) 1999 年

6 マウス (CD-1 系、雄、5 週齢、20 匹/群) を用いて、二段階発がん試験が実施され  
7 た。投与計画は、表○に示した。投与開始 9、19、24 又は 30 週目に、各群 5 匹から  
8 肝臓を採取した。

9  
10 表○ マウスを用いた 30 週間二段階発がん性試験における投与方法

群	投与方法	
	イニシエーション相	プロモーション相 <sup>a</sup>
1	N, N'-ジメチルニトロソアミン(DEN)を単回腹腔内投与(100 mg/kg 体重)	フルメキンを 30 週間混餌投与(4,000 ppm <sup>b</sup> )
2	DEN を単回腹腔内投与(100 mg/kg 体重)	フェノバルビタールを 30 週間飲水投与(500 ppm)
3	DEN を単回腹腔内投与(100 mg/kg 体重)	基礎飼料を 30 週間給餌
4	生理食塩水を単回腹腔内投与	フルメキンを 30 週間混餌投与(400 ppm)
5	生理食塩水を単回腹腔内投与	フェノバルビタールを 30 週間飲水投与(500 ppm)
6	生理食塩水を単回腹腔内投与	基礎飼料を 30 週間給餌

- 11 a : DEN 又は生理食塩水の投与 1 週間後から投与開始  
12 b : マウスの 18 か月発がん性試験における最低用量に相当

13  
14 病理組織学的検査において、非腫瘍性変化として 1 及び 4 群の全時点で小葉中心性  
15 に腫大して染色性が低い脂肪滴を含む肝細胞、炎症性細胞浸潤及び有糸分裂肝細胞の  
16 増加がみられたが、その程度重度 [中山、吉田専門委員修文] は投与期間が伸びるにつれ  
17 て低下した。これらの投与群では、肝細胞の有糸分裂像及び PCNA 陽性細胞数の増加  
18 が投与開始 9 週後にみられ、その後漸減した。

【中山専門委員修文】

…全時点で小葉中心性に腫大して染色性が低~~く~~脂肪滴を含む肝細胞、…

【吉田専門委員修文】

…全時点で脂肪滴を含む小葉中心性肝細胞に腫大して染色性が低~~く~~脂肪滴を含む肝

細胞、…

腫瘍性病巣については、投与開始 9 週目の 1 及び 4 群において、好塩基性の変異細胞巣がみられた。1 群では、その後時間の経過とともに 19 及び 24 週目に、好塩基性の変異細胞巣が増加した。これらの時期に、好塩基性細胞から成る腺腫に加えて好酸性及び両染色の変異細胞巣もみられたが、30 週間後にはこれらの病巣は減少した。4 群では、好塩基性細胞巣のみが 9、19 及び 24 週間後にみられ、24 週目で最も多かったが、その数は 1 群より少なく、30 週目には認められなかった。(参照 2、21) [FAS 51, p2 の一番下の段落] [Cancer Lett 1999]

【事務局より】

吉田委員から、本試験についても b の試験のように、投与と結果を一つの表にまとめたほうがよいとのご意見をいただきましたので、以下のとおり作成しました。  
ご検討お願いいたします。

表○ マウスを用いた 30 週間二段階肝発がん試験における投与及び病変

群	投与		病変		
	DEN <sup>a</sup>	プロモーション <sup>b</sup>	腺腫	変異細胞巣	主な非腫瘍性変化
1	+	フルメキン <sup>c</sup>	+	+	低染性小葉中心性肝細胞腫大、炎症性細胞の浸潤、有糸分裂像の増加
2	+	フェノバルビタール <sup>d</sup>	—	+	小葉中心性好酸性肝細胞腫大
3	+	基礎飼料	—	+	—
4	—	フルメキン <sup>c</sup>	—	+	低染性小葉中心性肝細胞腫大、炎症性細胞の浸潤、有糸分裂像の増加
5	—	フェノバルビタール <sup>d</sup>	—	—	小葉中心性好酸性肝細胞腫大
6	—	基礎飼料	—	—	—

n=20

a : DEN を単回腹腔内投与(100 mg/kg 体重)。DEN 非投与群には生理食塩水を投与。

b : DEN 又は生理食塩水の投与 1 週間後から投与開始

c : フルメキンを 30 週間混餌投与(4,000 ppm)

d : フェノバルビタールを 30 週間飲水投与(500 ppm)