



環境変異原研究

**Environmental
Mutagen
Research
Communication**

Vol. 1 No. 1 1978

巻 頭 言

田 島 弥 太 郎

環境変異原研究会は今年で数え年7才になる。当時すでにアメリカに変異原学会 (AEMS) — 1969年創立 — があり、続いて翌年ヨーロッパにも学会 (EEMS) が創立され、日本にも是非同種の学会を設立して、ともに手をたずさえて、この新しい問題に取り組んで欲しいと私は Alexander Hollaender 博士から強い要請を受けていた。私達としても問題の重要性については十分認識していたのであるが、この分野は多分にルーチ的な仕事を必要とするので、果たして若い人達がついてくるだろうか、という点に疑念があったのである。それでも同志相計って研究グループ結成に重い腰をあげたのが1970年の秋であった。

変異原についての問題意識は遺伝学的観点に基づくものであるが、研究の方法論としては、生化学、薬学、疫学、腫瘍学、発生学、農学……など幅広い学問分野の知識が必要である。この幅広い分野の人達をどのようにして結集したらよいか大きな問題である。

そこでまず科学研究費による研究グループを組織して問題の検討を始めたわけである (1970年)。問題点は大きく分けると3つになった。(1)研究課題と研究者、(2)研究費、(3)研究推進策としての学会の設立。この研究会 (学会) の設立準備はもっぱらこの研究グループによって行われ、1972年8月21日国立教育会館で創立総会を開くことができた。この総会は折よく来日中の米国変異原学会長 Ernst Freese 博士ら3名の特別参加もあって予想外に盛会であった。

この研究分野を発展させるには何としても研究費の裏打ちが必要である。このため総合研究Aあるいは特定研究「人間の生存にかかわる自然環境に関する基礎的研究」の中の総合研究として研究活動が続けると共に、「環境変異原」を特定研究課題として認めてもらうよう学術会議研究費委員会に申請したが、3年続けてアウトになり、やむをえず文部省に直接お願いせざるを得ない破目になった。幸い当局の理解するところとなり、昭和52年度から発足した特別研究「環境科学」の中のひとつの柱として「人体影響」が取り上げられることになり、ようやく研究費の面を軌道にのせることができた。

一方、学会の方も6年間に会員数が240名に達し、研究会として遠慮しながら発足したものを、大いばりで学会に改名できるようになり、会員の分野別、年令別構成も何等心配のない理想的な姿を整えるに至った。一方学会員間のコミュニケーション手段としては、創立以来英文国際誌 Mutation Research の Environmental Mutagenesis Section をメディアとするユニークな方法によっていたが、会員数がこれだけに膨張してくると日本語によるコミュニケーション・メディアの必要性も痛感されるに至った。そこで発刊された第1号が本誌である。近藤宗平博士のお骨折りで御覧の通りのものができ上がった。今後とも会員各位の御支援を期待し本誌の発展を祈りたい。

巻 頭 言

杉 村 隆

環境科学の研究の問題は、環境と人間とのかかわり合いを明らかにすることである。少しくだいて言えば、人間のしたことが、環境に変化を起し、その変化が人間にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、それに必要なら、講ずべき適切な対策を明らかにすることである。

当たりまえのことながら、月にも火星にも“環境”はある。我国の環境科学の研究は、人間に間接に関係があると思われる環境要因の測定には熱心である。これに比べて、環境因子の人間への遺伝的影響とか、発がんへの影響は、環境科学の中で、可成り重要な部門であるのに、これをなぞりにしてきてはいないか？

幸い我国では、故中原和郎先生の発見された発がん物質—4ニトロキノリン・1オキシド—が、発がん性と微生物に対する突然変異原性をかねそなえていたので、遺伝学者とがん研究者の協力態勢が世界でどこよりも早く出来ていた。過去数カ年、田島会長の下に、環境変異原研究会は、日本のこの方面の研究者を組織し、情報の伝達、相互の助け合いに大きな成果を挙げてきた。数多くの環境中の変異原物質—その多くは発がん物質—を検出する方法が改良され、実際多くの変異原物質が発見測定された。

今、正に環境変異原研究は、一つの変曲点をむかえようとしている。それは、変異原物質の存在を証明する段階から、その存在の人間とのかかわり合いを明らかにする段階への推移である。しかも、そのかかわり合いは、定量的に考察されなければならない。環境変異原研究会が、正にこの時に学会に発展したのは、単なる偶然の一致とは思えない。それは、きっと多くの遺伝学者、がん研究者は勿論、その他の分野の研究者の衆知を集めて、日本のみならず、世界の環境変異原問題に大きなインパクトをもつ学術集団となるためのきっかけを、天が与えてくれたものであろう。

杉村隆博士の“米国環境変異原学会賞”授賞

近 藤 宗 平

米国環境変異原学会は、サンフランシスコにおける1978年3月9～12日の年会で、卓越した研究業績の今年の授賞者に杉村隆博士を選んだ。この賞は今まで、C. Auerbach, A. Hollaender, E. Freese, F. Sobels, B. Ames に贈られている。始めの4人は基礎的突然変異研究に大きな足跡を残した人である。生化学者 Ames は、基礎的研究に使われていたバクテリアの変異株の中から、“Ames のサルモネラ株”として現在広く使われている株を選び出して改良を加えた。この株と工夫された検出法の組合せによって、癌原性物質のかなりのものが、この系で変異原性を示すことがわかった。いち早く、この系が癌原性物質の検定に有用であることを認識した杉村博士は、協同研究者を動員して、Ames の仕事を追試し、やがてそれを凌駕する改良法をみだし、広範な環境変異原の検定を始めた。

杉村グループの仕事の特色は、実験結果が定量的にきちんとしていて、つねに“投与量と反応の曲線”が示されていることと、重要な作用原については、一気にその分子レベルの化学反応まで、その作用機序を解明することである。1975年夏、シアトルで、日米環境変異原・がん原協力会議が開かれた。その席上、アメリカの著名な環境学者 B. Commoner は、各種の化学物質に加えて都市の大気浮遊塵の変異原性について、Ames の系を用いた結果を発表した。その華々しさにいささか圧倒されていた私は、杉村博士が、投与量効果曲線を示しながら、Commonerが“ネガティブ”と結論したいくつかの化合物が、実は“ポジティブ”であることを、淡々とのべられた光景を今でも思い出す。

杉村博士は、1976年胃癌の研究で日本学士院恩賜賞を授かった。1977年 Cancer Research 誌9月号はそのカバーに杉村博士の肖像入りでこの胃癌の業績をたたえた。その仕事は、一言でいえば生化学的実験をつみかさねての実験癌の研究とでもいえよう。このように生化学的手法を専門にしながらも、遺伝的手法の価値をつとにみとめていたところに、杉村博士の偉さがあった。Ames の系が癌研究に使うほど進歩した時点——AF-2 の検出に無能な株がプラスミドの導入によって有能な株になったとき——をとらえて、協同研究者を総動員して環境変異原・がん原性の研究に踏み切って、今日におよんでいる。その実践力と成果に高い敬意が国内外から払われている。今回の授賞は国外からの敬意を端的に

示すものである。国内においては、数多くの研究者——とくに今まではバクテリアの突然変異を使ったことのなかった生化学その他の別分野の人々——が杉村グループの業績に励まされて、Ames の系をつかって、それぞれ違った環境分野で活躍を始めた。その活気は昨年日本環境変異原研究発表会にあふれていた。それは、賀田恒夫博士をして、エディンバラの国際会議より熱気が高い、といわしめた程であった。本誌には、紙面の都合で、その辺の空気をほんの少ししか、集録できなかった点をお詫びします。

杉村博士には、受賞の記念にプラークと副賞500ドルが送られる由であるが、この副賞を日本環境変異原学会に寄付したいとお申しでをうけている。杉村隆賞とでもいったものを設けてはどうかという動きがある。次回の評議員会の決定を楽しみにしてまつことで、結びとします。

米国変異原学会の受賞に際して

杉 村 隆



今回米国変異原学会の賞を受けたことは非常に
光栄に思っています。発がん機構の研究をしてい
る中に、いつしか環境変異原の研究にかかわるよ
うになりました。4・ニトロキノリン・1・オキ
シドの発がん性を中原先生のお手伝いをして見
つけたのが20余年前になります。その突然変異原性
は、それより早くからわかっていました。がん研
究者と遺伝学者が共同に研究するのに、よい材料
でした。

わが国では、つとに田島博士、遠藤博士、近藤博士、賀田博士らを中心として、学際的
研究サークルがあり、このような素晴らしい環境の中で変異原物質の研究が出来たのは、
私の幸運でありました。もう一つの環境因子は、熱心な共同研究者に恵まれたことであり
ます。先輩、同輩、後輩の諸兄姉にこの際厚く御礼申し上げます。

日本環境変異原学会の発展をいのってやみません。

国立がんセンター研究所、杉村隆所長の変異原性

テストによる癌原物質検出の研究の背景

国立がんセンター研究所

長 尾 美奈子、佐 藤 茂 秋

この度杉村が米国環境変異原学会から表彰されましたことは、我々杉村の指導のもとに
環境変異原物質を研究している者にとっても大変よろこばしいことです。この機会に、杉
村の現在の研究に至るまでの背景を紹介させていただきます。現在の研究が彼自身の過去の経
験に深く立脚していると同時に、日本の研究の流れに大きくささえられていると思われま
す。

現在の変異原—癌原物質の研究の最も基礎となったと思われるものに、中原和郎博士・
福岡文子博士と共に行った 4NQO の発癌実験があります。これは1957年の Gann に報告
されています。4NQO は抗マラリヤ剤として 戦争中に落合英二教授によって合成され、
1955 年岡林直博士によって大腸菌、*Aspergillus* に対する突然変異原性がみつかっていま
す。4NQO は環境中には実在しないので、人間の癌の研究には何も関係ないと、杉村は一
時もらしていることがありましたが、最近 4NQO が日本の癌研究にとって幸運な物質
であったと述懐して居ります。その1つは 4NQO が大腸菌で代謝され、その結果出来る
4HAQO に突然変異原性が見つかったため(岡林博士の発見)代謝活性化という概念が早
くからあった事です。また動物細胞では可溶性画分にある酵素系で活性化が起こるため、
培養細胞系にも適用し得たことにあります。可溶性画分の活性化酵素の作用は、杉村らの
発見による DT-diaphorase による 4HAQO の生成、多田満彦・万里子博士の発見による
セリン-tRNA 合成酵素による ultimate form の生成です。

また 4NQO は分子生物学的にも早くから解析された物質であり、学生時代、癌研究所
時代杉村が机を並べていた遠藤英也教授は、石沢実博士と共に Lwoff のフェージ誘導系
による癌原物質の検出法を導入し、その後、1970年には T4フェージを用いて、4NQO が
GC→AT の transition を起こすことを明らかにしています。

杉村は 1957年より3カ年米国に渡り、国立がん研究所でグリーンスタイン博士と癌と栄
養の研究をしました。chemically defined synthetic liquid diet、つまりすべて既知物質
で、しかもそのモル数のわかった液体飼料を用いて発癌実験は行われるべきであるという

思想にもとづくものでありました。当時、彼はこの研究を余り面白いと思わなかったようですが、現在の食品中の変異原物質研究の源流となっているようです。AAF の代謝活性化の鼻祖ともいえます。J. H. and E. Weisburger 博士との今日まで続く交際がこの頃始まりました。又、この頃 B. N. Ames 博士も NIH の Bld. 4 に居り、Bld. 6 に居た杉村は、彼らの共通の友人でありました阪大蛋白研倉橋潔教授を介して知己を得て居ります。米国滞在の最後の一年はクリーブランドのウェスタンリザーブ大学で過ごしました。この時は分子生物学の黎明期であり、生物科学は激動期を迎えようとしていました。酵母・好氣的適応に伴うユビキノンの合成と呼吸欠損菌におけるユビキノンの欠損の研究をしました。細胞質遺伝との出会いで、後のミトコンドリア形成に関して温度感受性一ポリフィリン蓄積型の呼吸欠損菌の研究に連って居ります。

1960年米国より帰国した杉村は、先程述べた遠藤教授の 4NQO・4HAQO によるフェージ誘導の研究に刺激されたそうです。

1962年国立がんセンター設立に伴い、中原博士と共に移りました。中原先生の癌原物質加算説を中心に、癌の体細胞突然変異説等、発癌のメカニズムについて馬場恒男教授、永田親義博士らとよく議論をかわして居りました。また夭折した森下博士の雑誌論文紹介の中に、MNNG が調節遺伝子に変異を起こすとあったことに大変興味を示し、直ちに MNNG の皮下注射によるラットの発癌実験を試みました。当時、早石修教授・小野哲生博士らと、がん細胞は代謝調節機構の異常であるという考えのもとに、研究班を組織しはじめていました。このことが、MNNG が DNA・RNA をメチル化すると同時に蛋白質にニトロアミノ化を起こすという発見につながって居ります。

杉村・長尾は動物の飼育に散慢で、それを助けてくれたのが、動物飼育担当の少年岡田好清君で、彼が、MNNG を注射したラットに腫瘍があることを見つけてくれました。彼は今幼稚園の園長となっています。さらに藤村真示博士と共に、MNNG を飲料水としてラットに与えたところ、幸運なことに腺胃に胃癌の発生を見ました。病理標本を見て下さった馬場恒男博士の方が、杉村より興奮しておられたのを思い出します。又、この頃より杉村は病理組織標本を自分で観察するようになりました。組織が正常か異常か、癌かそうでないかは、自分で判断が出来るようになったと杉村は申していますが（少し心臓に毛のケがあります）、この努力が杉村を単なる生化学的癌研究者でなくしていると思います。一方でこの実験胃がんの研究は日本人の食生活に関連した癌原物質の検索に指向する結果となったと思われます。

以上の様な発癌実験と並行して、遠藤教授にしげきされて、微生物による検出法を目的とした癌原物質によるフェージ誘導を河内卓博士と試みて居りましたが、薬物の膜透過性、代謝活性化の点で問題があったわけです。1971年には Slater らの repair-test の論文が Cancer Res. に出ました。杉村らは早速、4NQO と 4NPO の一連の誘導体について

repair-test を行った結果、癌原性との間に良い相関があることを認めました。時を同じくして、賀田恒夫博士の rec-assay 法が出はじめ、1972年、環境中の変異原物質に関する田島班の発足が遺伝学者と癌学者とをつなぐ役目をはたして居りました。又、この年山本正教授と de Serres 博士をパネルとする日米医学協力プログラム変異原・癌原部会が発足し、日本を訪れた Ames は NIH 時代知り合った杉村を訪ねて、我々の研究所でセミナーを行い rfa 株 TA1535 シリーズについて紹介しました。

この年、食品添加物 AF-2 による染色体異常誘起作用が外村晶教授によって明らかにされ、つづいて大腸菌に対する突然変異原性が、近藤宗平教授、賀田恒夫博士らによって明らかにされました。その結果、AF-2 を規制すべきか否か、その癌原性陰性に鑑み、世の騒然たる問題となりました。杉村らはウイスコンシンの Bryan 博士と共同で、20数種のニトロフラン化合物について突然変異原性を、大腸菌 WP2 で証明し、その中に癌原性化合物がかなりあることから AF-2 の癌原性を予測して居りました。しかし Ames の TA1535 シリーズは全く無能でした。1974年には AF-2 に癌原性のあることが池田良雄博士によって証明され、使用禁止でこの問題は落ち着いたのですが、AF-2 は学問的立場からすると格好な材料でありました。1つには short term テストを一次スクリーニングとして用いる典型的な例となったこと、第2は TA100, TA98 という感受性の高い菌の開発を促したことです。この間に日米癌協力プログラムも発足し、杉村は化学発癌のパネルとして、米国国立がん研究所長 Upton 博士と組み、変異原・癌原の問題に重点を置き活動をはじめました。

一方、Ames のスクリーニング法にも改良を加えました。例えば Ames 法で DAB やニトロソ化合物の突然変異原性が検出出来なければ、実用にならないと考えたのには、木下良順博士による DAB の発癌、その代謝活性化を研究しておられる橋本嘉幸教授、BBN 膀胱癌を中心としたニトロソ化合物の研究をしておられる岡田正志博士、小田嶋成和博士、伊東信行教授の影響があったわけです。Preincubation 法、補酵素の添加により、検出能を高めることができ、DMN, DEN, BBN, DAB 及びその他のアゾ色素類等の問題の物質の変異原性を検出できるようにしました。

1975年 IARC のシンポジウムがブラッセルで行われましたが、癌研究者の多くが Ames 法に反対的な雰囲気の中で、突然変異性テストの重要性を杉村は主張して居りましたが、同一人物が発癌実験と突然変異テストを行っている例が殆ど皆無であることに、却って私共は認識を新たに致しました。

既知癌原物質で、Ames 法の有用性を確認した後、癌原性未知の物質への応用を開始しました。大阪での肺癌学会の特別講演を引き受けていた杉村は、その日が近づいたある日肺癌と喫煙の関係から、煙草のタールの変異原性をサルモネラの系で調べてみる様示唆しました。結果は煙草タールには著明な変異原性があり、その強さは、タール中に実際含ま

れているベンツピレンによる変異原性の約1万倍というものでした。物を燃焼させた時に生ずる煙に注目し、この前後から日常我々が摂取する魚、肉を焼いた時生ずる煙、焦げの変異原性の研究がはじまりました。

静岡薬科大学で4NQOを用いて酵母呼吸欠損菌の研究をして居られる三淵一二教授から小菅卓郎教授が永年「黒焼き」の研究をして居られることを知り共同研究が開始されました。トリプトファンからTrp-P-1, Trp-P-2なるものが精製され、東大薬学部岡本敏彦教授らのグループと共に構造が決定されました。つづいて、トリプトファン中に多く存在するノルハルマン、ハルマンにcomutagenic作用のあることを見出しました。またワラビ中の癌原物質を名取信策博士らのグループと検索中にフラボン誘導体に突然変異原性を見出し、自然界に存在する突然変異原物質を無視すべきでないことを説くに至りました。

以上の研究とは全く別に、1969年動物細胞核の合成するpoly (ADP-Ribose)を発見し、第三の核酸と名づけた早石修教授らのグループ、フランスのMandel教授らのグループと激しい競争が展開されたこともありました。最近poly (ADP-Ribose)がDNA修復に関係あるという報告も出され、思わぬところでこの問題も発癌とからみ合う様相を呈してきました。

上記の様に、変異原の研究が杉村のグループによって比較的短期間に進み、新しい知見が次々と発見されて来たのは、杉村が単にごく基礎的な研究のみを行う生化学者ではなく、人の癌をその医師生活の間に多くみて、その悲惨さを体験し、その上に立って積極的に癌研究を遂行し、病理学の面まで及ぶ知識と経験が遺伝学者的思考とうまく組合わされて来た事によると思います。又同時に常に国の内外の研究者と交流し、その研究の流れを早くキャッチする事に努め、重要と思った事はすぐ自分の所で実験するという積極性にもよっています。良き師にもめぐまれ、良き同僚、友達も多く、又良い後輩を育ててきました。

研究者は身の回りをシンプルにして研究、思索に当たる事、常に研究室に居る事、リーダーを廻して常に情報を適確につかむ事、必要な事は直ちに気軽に実験に移す事、更に研究室においては、そこに働く人々の和が大切な事を、若き後輩達に教え、自分も又これを実行しております。研究室にあっては、時間の許す限り、多くの人間とその実験を討論し、時には机を叩き大声で叱りつける事もあります。又時には、ここの連中は自分がやってみろと言った実験は誰もやらないで無視してしまう、それが外国で発表されるとあわててやり出すとぐちを言ったり、外部の学会や研究集会で他の人に辛辣な事を言ったあとで、言いすぎたかと反省したりしております。これ等はすべて、癌研究の重要性を積極的に考え、常に努力している事の現れであります。

我々は、どなられたり、すかさされたりしながらもこの所長と共に働き得るのをこの上ない幸せと考えております。

Key Publications

- Carcinogenic action of 4-nitroquinoline 1-oxide W. Nakahara, F. Fukoka and T. Sugimura, Gann : 48, 129—137 (1957)
- Genetic analysis of a respiration-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking all cytochromes and accumulating coproporphyrin. N. Gunge, T. Sugimura and M. Iwasaki, Genetics : 57, 213—226 (1967)
- Carcinogenic action of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. T. Sugimura, M. Nagao, and Y. Okada, Nature : 210, 962—963 (1966)
- Tumor production in glandular stomach by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. T. Sugimura and S. Fujimura, Nature : 216, 508 (1967)
- Poly (adenosine diphosphate ribose). T. Sugimura, Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 13, 127—151 (1973)
- Experimental Stomach Cancer. T. Sugimura and T. Kawachi, Methods in Canc. Res. 7, 245—308 (1973)
- Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. M. Nagao and T. Sugimura, Adv. in Cancer Res., 23, 131—169 (1976)
- Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T. and Sugimura, T., Cancer Letters 2, 221—226 (1977)
- Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T., and Okada, M., Mutation Res., 48, 121—129 (1977)
- Mutagenic Factors in Cooked Foods. T. Sugimura and M. Nagao, Critical Review of Toxicology, in press
- Modification of Mutagenic Activity. T. Sugimura and M. Nagao, Chemical Mutagens 6, in press

環境変異原研究の進歩

九州の大気汚染と変異原性

常盤 寛, 北森 成治
(福岡衛生公害センター)

大西 克成
(徳島大学医学部 細菌学教室)

まえがき

大気汚染の発生源としては各種工場、焼却炉、暖房設備、自動車、汽船、航空機などが考えられる。大気汚染は呼吸器疾患、肺がんなどの原因の1つとされている。従来発がん物質を含めた汚染物質の解明は、主としてベンゾ(a)ピレンを中心に化学的手法によってきた。しかし、実際に我々は、混合汚染物質を吸収しているのだから、混合物質のがん原性または変異原性の強さをそのまま生物化学的手法で解明する必要がある。本研究はバクテリアに対する大気汚染物質の突然変異誘発能の強さで大気汚染の程度を測定するとともに変異原性物質の化学的分析を行うことを目的とした。

材料と方法

大気中粒子状浮遊物質はハイボリウムサンプラーによって大気約 2,000m³ から集めた。浮遊塵は、あらかじめ恒温恒湿(24℃, 50%湿度)で48時間放置し秤量しておいたグラスファイバーフィルター(東洋ロ紙 GB 100R)につかまったもので、直径0.3~10μの粒子状物質であった。

大気汚染物質から変異原物質を抽出する方法は、捕集したフィルターの一定面積(25 cm²)を切りとり、ソックスレーの抽出装置でメタノールによって8時間抽出し、ついで減圧下で濃縮乾固し、抽出物を秤量した後最終的に DMSO 1ml に溶解した。

突然変異活性の測定及びラット肝 S-9 画分の調整は Ames らの方法¹⁾によった。

大気汚染物質のメタノール抽出物は S. typhimurium TA 1535, 1536 株を除く他の 4 株に対して明らかな突然変異性を示し、ラット肝ミクロソームによ

って代謝活性化される。ラットの前処理薬剤として使用したアロクロール 1254 または カネクロール(200, 300, 400, 500) は 3 メチルコラントレンやフェノバルビタールより代謝活性化が強かった。一方混合物としての大気汚染物質は TA 98 株に対する His⁺ 復帰変異頻度が高く、dose response curve では 100~400μg/plate で直線関係を示し、変異活性の測定が可能であった。

結 果

Salmonella TA 98 株による変異活性測定法を各地域の大気汚染物質に応用してえた結果は表 1 のとおりである²⁾³⁾。非汚染大気としては長崎県 壱岐島で採取したもの(試料 No. 22)について調べた。この大気の清浄度は化学的にも環境基準をぬいており、きわめてきれいな気圏である。実際にこの大気の 1m³ あたりの変異活性(revertants/m³)は 1.1 であった。ところが工場地域(試料 No. 1~6)の大気では 22~445 revertants/m³ で平均 182, 中小都市(試料 No. 13~21)の大気では 42~133 で平均 80 revertants/m³, 大都市住宅地域(試料 No. 7~12)では 7~78 で平均 29 revertants/m³ であり、非汚染大気に比べると驚くほど変異原物質によって汚染されていることが明らかになった。また μg/revertant で表現すると最低 0.38 であり、微量の大気汚染混合物の変異活性が検出可能であることがわかった。

大気汚染物質に含まれる変異原物質の化学的解析はアルミナカラムクロマト, GC/MS 法によって検討した結果はつぎのとおりである。大気汚染物質の粗抽出物(38.7mg, 5470 revertants/mg)を 1×20cm のカラムを使用して、0~45%シクロヘキサンで溶出し、

表 1

大気汚染物質の突然変異活性

Sample no.	Sampling vol (m ³)	Dust weight (μg/m ³)	Methanol extracts (μg/plate)	m ³ /plate	Revertants ^a /plate	μg/100 revertants	Revertants /m ³	m ³ /100 revertants
1	560	1320	855	3.39	1510	57	445	0.23
2	1270	429	846	7.69	2210	38	288	0.35
3	2220	142	620	13.4	1260	49	94	1.06
4	2000	143	810	12.1	1670	49	138	0.72
5	2010	127	755	12.1	1260	60	103	0.96
6	2000	73	935	12.1	268	349	22.2	4.51
7	1980	55	370	12.0	148	250	12.4	8.08
8	2710	108	682	16.4	1270	54	77.6	1.29
9	2240	91	375	13.5	167	225	12.3	8.10
10	1990	127	862	12.0	630	137	52.4	1.91
11	2080	84	499	12.6	166	301	13.2	7.57
12	2010	176	1970	12.1	86	2300	7.1	14.1
13	2097	80.9	825	12.7	1060	78	83.5	1.20
14	1447	76.6	610	8.74	365	167	41.8	2.39
15	1342	99.9	430	8.10	550	78	67.9	1.47
16	1492	148.4	805	9.01	710	113	78.8	1.27
17	3399	71.9	1100	20.5	1400	79	68.3	1.46
18	3629	71.9	1270	21.9	1810	70	85.0	1.21
19	1254	324	890	7.57	560	159	74.0	1.35
20	1247	468	905	7.53	660	137	87.6	1.14
21	1829	179	935	11.0	1460	64	133	0.75
22 b	1954	34.4	630	23.6	26	2423	1.1	90.8

a ; revertants/plate は *S. typhimurium* TA 98 株に対する Dose-response curve から算出し、自然復帰変異した集落数を減じた値である。b ; 試料 No. 22 は大気非汚染地域の試料で、化学的には SO₂ : 0.001ppm, CO : 0.8ppm, オキシダント : 0.026ppm であり、NO, NO₂ は検出されなかった。

各分画について TA 98 株に対する変異活性を測定した。その結果20~45%のエーテル濃度で3つの活性ピークがえられ、さらに100%エーテルで溶出する部分にも1つの活性ピークが認められた。前3つの活性ピークについて GC/MS で分析した結果28種の多環芳香族炭化水素が定性的に確認された。そのうちの12種は発がん性及び突然変異性を有することがわかった。

考 察

以上の結果、大気汚染物質を混合物として *Salmonella* 系では生物学的に測定可能であることがわかった。この方法によると汚染大気は非汚染大気に比べ、7~440倍の変異活性を示した。これらの変異活性値によって地域的な大気汚染度を生物学的に評価することが可能と思われる。また汚染大気と喫煙との比較を試みると、われわれの実験ではタバコ（ハイライト）1本吸った時に吸引した煙の中のタール量は10.7mgであり480 revertants/mg タール（TA 98）であっ

た。一方、ヒトの呼吸量を1日平均9m³として大気9m³あたりの変異活性とタバコ1本の煙に含まれるタールの変異活性を比較することによってヒトに対する生物学的危険度を推測することができる。この成績からではなおタバコタールによる変異活性が高いことがわかった。

大気汚染物質に含まれる多環芳香族炭化水素の発がん性はすでに10種以上が判明しているが、これらの有機物以外にも高い変異活性を有する化合物の存在を示唆する結果を得ているので現在検討中である。

文 献

- 1) Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki and F. D. Lee (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2281.
- 2) Tokiwa, H., K. Morita, H. Takeyoshi, K. Takahashi and Y. Ohnishi (1977) Mutation Res. 48, 237.
- 3) 常盤寛, 武吉広明, 高橋克己, 大西克成 (1977) 公害と対策, 13, 1259.

大気汚染物質と食用植物の加熱分解物質の突然変異誘起性について

竹 村 望

(東京慈恵会医科大学 公衆衛生学)

I. 大気汚染物質の変異原性

近年、工業国における肺がん死亡率の急速な増加は重要な問題となっている。この増加の原因として考えられる環境要因として、紙巻タバコの喫煙の増加との相関がまずあげられている。しかし一面、世界の諸国において、都市住民は農村住民に比較して肺がん発生が高率であるともいわれる。我国の厚生省の統計によると呼吸器系悪性新生物の訂正死亡率を7大都市と郡部別にみると、1965年では郡部100とすると、7大都市では135.8、1970年では後者は142.7と約1.5倍となっている。この結果を直接大気汚染の影響とみなすことはむずかしいが、Carnow と Meier は、都市での肺がん増加は、喫煙だけでは説明できない部分があり、これを大気汚染、とくに、ベンゾ(a)ピレンによって説明できると述べ、量-反応関係を回帰直線によって示している。しかし、これまで大気汚染物質としての発がん物が、ベンゾ(a)ピレンに主眼点が置かれ、これを1つの指標とされてきた。しかし、このような炭化水素類以外の発がん物の存在も推定される。実際に大気中にニトロソアミン化合物が存在することを発見した。

(1) 我々が対象として選んだ地域は、東京の中心部である西新橋、虎ノ門交差点、および銀座四丁目交差点の3カ所で、自動車交通量の多い地点である。地上1.5mに設置したハイボリュームエアサンプラー2台を用いて、吸引速度1.5m³/minで大気を8時間(9 a.m.—5 p.m.)吸引し、グラスファイバーフィルター上に大気浮遊粒子状物質を捕集した。この2枚の濾紙を秤量後細切し、メタノールに2時間浸し抽出、この抽出液を減圧濃縮した後、その残渣をメタノール：水(4：1)に溶解し、これにシクロヘキサンを加え、シクロヘキサン可溶成分を分離する。次いでこ

のシクロヘキサン層にニトロメタンを加えニトロメタン層を分離する。これによって脂肪族炭化水素はシクロヘキサン層に、芳香族炭化水素はニトロメタン層に移行し、その他はメタノール層に残る。この3つの層について各々 Ames test を行ったところ、ニトロメタン抽出物では、TA 98, TA 100 ともに S-9 Mix 添加群に強い変異原性がみられ、TA 100 では S-9 Mix を加えなくても変異原性がみられた。一方シクロヘキサン抽出物では、TA 98, TA 100 ともに S-9 Mix を加えた群に弱い変異原性がみられた。又、メタノール抽出物では TA 98, TA 100 ともに S-9 Mix の有無にかかわらず強い変異原性がみられたが、更に、TA 100 では、メタノール抽出物の水可溶成分にも変異原性がみられた。

(2) ニトロメタン層から得た濃縮残渣について2波長クロマトスキャナーによりベンゾ(a)ピレン量を計測したところ、西新橋路上の大気1,000m³中約2μg検出された。

(3) 西新橋路上で採取した大気浮遊粒子状物質をジクロロメタンに抽出したもの、或いは、コールドトラップで-40℃に冷却したジクロロメタンに吸収した大気成分について Thermal Energy Analyser で分析した結果、次の4種類のニトロソ化合物が検出された。即ち、Dimethylnitrosoamine, Di-iso-propylnitrosoamine, Di-propylnitrosoamine, Di-iso-butylnitrosoamine である。更に大気1m³中のDimethylnitrosoamine 量を各測定地点別にみると、西新橋0.67μg、虎ノ門4.67μg、銀座3.39μgであった。

(4) 昭和52年2月東京に降った雪について、表面部の雪を溶かして得た水5lをn-ヘキサンに抽出し、減圧濃縮後その残渣をDMSOに溶かし突然変異原性を検討したところ、TA 98, TA 100 ともに S-9 Mix

を加えた場合に陽性を示した。しかし対照として得た富士山頂の雪を同様に処理検討したが変異原性を示さなかった。

ニトロソアミンは光により分解され易いにもかかわらず大気中から検出されたことは、大気浮遊粒子状物質中とりこまれた場合には、比較的安定になるためであると考えられその存在原因として自動車の排気ガスによる問題が考えられるが、この点に関しては今後検討が進められる必要がある。ただ、いままです大気汚染物質中の発がん物質としてベンゾ(a)ピレンが主に指標とされて来たが、ニトロソ化合物の存在が明らかとなった以上、この二面からの追求が必要とされる。

II. 食用植物およびビタミンの加熱分解物質の突然変異原性

魚を焼いた時の煙成分や、焼魚の焼けこげた部分のDMSO抽出成分に突然変異誘起作用物質の存在することが長尾らにより、又、アミノ酸であるフェニアラニンやトリプトファンあるいはクレアチニンなどの燃焼タール成分中に突然変異原性物質の存在することが杉村のグループによって証明されている。

我々は、食用に供される植物の加熱分解物質中にも同様に突然変異誘起作用を持つものがあると考え、ニンニク、タマネギ、アサクサノリ、サツマイモ、ダイコン、米飯について検討した。更に、ニンニク中に存在するアミノ酸の一種であるアリンおよび化学構造の類似したS-Methylaptein sulfoxide (Methyiin) とS-Methyl-L-cysteineの加熱分解タール成分についての突然変異原性についても検討を加えた。

方法は、生ニンニク、タマネギ、サツマイモ、ダイコン、米飯、缶入りアサクサノリを各々細切してつぼに入れ、下からガス火で燃焼し焼けこげたもの13gをエーテル：エタノール(3:1)に抽出し、減圧濃縮した残渣をDMSOに溶かしTA 98及びTA 100にてS-9 Mixを加えた場合と加えない場合について検討した。

ニンニクにはアリンが多量に存在し、これは酵素ア

リナーゼによりアリンシになることが知られている。そこでこのアリナーゼを不活化するため100℃、30分間煮沸して得たニンニクを上記同様の方法で変異原性をみた。

一方アリン及び類似化学構造を持つMethyiin S-Methyl-L-cysteineの純品各5gをつぼに入れガス火で加熱して得たタール成分について、上記同様TA 98とTA 100の2菌株を用いてその変異原性の検討を行った。

その結果、生ニンニク、タマネギ、アサクサノリ、煮沸ニンニクには突然変異誘起性を認め、特にアサクサノリに最も強い変異原性を認めた。

一方、アリン、Methyiin、S-Methyl-L-Cysteineの加熱分解物にも強い変異原性が認められた。このうち、S-Methyl-L-cysteineが最も強い変異原性を示した。

サツマイモ、ダイコン、米飯などの食品100gあたりのアミノ酸成分には、シスチン、フェニアラニン、トリプトファンなどの含有量が少ないのに対し、アサクサノリでは、シスチンやフェニアラニンが多量に含まれている。又ニンニク中にはアリンが多量に存在し、タマネギにもアリンが含まれている。各種アミノ酸の加熱分解物の変異原性について河内らの報告があるが、これら植物中に存在するアミノ酸含有量の違いにより変異原性の強さも異なってくるものと思われる。アリンと類似構造のMethyiin、S-Methyl-L-cysteineにも変異原性があるが、これらと類似構造を持つアミノ酸であるL-cystine、L-cysteineにも強い変異原性があることから、S基を共通に持つこれら化合物は加熱により変異原物質を生ずることが考えられる。

上述の方法と同様にして検定した結果、ビタミンB₁、B₂、B₆の加熱産物中に、S-9 Mix存在下でTA 98およびTA 100の両者に突然変異誘起性を示す成分があった。特にタール1mgあたりの換算ではビタミンB₂の変異原性が最も強かった。ビタミンB₆は弱陽性を示したが、ビタミンCは陰性であった。

加熱食品の突然変異原性について

上田 雅彦, 金田 妙子
間崎 真典, 田植 栄
(高知県衛生研究所)

はじめに

食品又は食品成分の加熱変化の報告は食品の調理加工に関連して数多いが、その熱分解物に関する突然変異原性の研究はなかった。最近長尾らは、焼魚のこげ部分および他の蛋白質熱分解物に強い変異原性を検出し¹⁾²⁾、杉村ら³⁾、松本ら⁴⁾もアミノ酸熱分解物に変異原性を認め特にトリプトファン熱分解物より2種の変異原物質を同定した。これらの報告は、変異原研究に新分野を拓いたもので特に蛋白食品の加熱調理過程での変異原物質生成の可能性から、食習慣とひとの発がんとの関係を示唆したことが極めて注目された。われわれも食品の変異原性研究の一環として、50種類の食品および食品成分の加熱分解物の変異原性を検討したので報告する。

実験方法

試料

水分25%以下のもの：砂糖、寒天、マッシュポテト、白米、玄米、小麦粉、パン粉、乾しいたけ、わかめ、コーヒー豆、乾大根、乾ぜんまい、紅茶、抹茶、脱脂粉乳、粉チーズ、焼のり、小豆、大豆、きな粉、乾燥酵母、高野とうふ、するめ、かつを節、牛肉末、あじ魚粉、カゼイン、ゼラチン、グルテン、アルブミン、大豆油、レシチン、ムチン、トリプトン、カザミノ酸。

水分70%以上のもの：生しいたけ、とうふ、なす、キャベツ、あじ、太刀魚、うなぎ、牛肉、豚肉、鶏肉、全卵、卵黄、卵白、たらこ、板付かまぼこ。

食品の加熱および変異原物質の抽出

供試食品は30メッシュ以下に粉碎するか、均質化し

その5gを100mlのパイレックスビーカーに取り、大きさ10×15×30cmの電気炉中200℃、250℃、300℃、400℃でそれぞれ10分間加熱する。熱分解物はホモジナイザーでクロロホルム/メタノール(1:1)100mlで抽出、ガラスファイバーフィルターで濾過、濾液は減圧下溶媒を留去、残渣をDMSO 5mlに溶かして変異原性検出用試料とする。

変異原性の検出

S. typhimurium TA 98, TA 100を用いAmes Standard Method⁵⁾にYahagiらのPreincubation Method⁶⁾を併用した。

実験結果と考察

1. 加熱温度と変異原性の発現

食品の200℃、10分加熱によってはほとんど変異原活性の発現をみないが、250℃10分加熱では水分の少ない高蛋白食品、例えば高野とうふ、きな粉、するめ、魚粉、かつを節などに活性が検出される。これらの活性は300℃加熱で最高となり400℃ではかえって減少する。魚肉、食肉、鶏卵などの高水分含有量食品の活性は200℃では検出されず300℃加熱分解物から検出され始め400℃加熱で更に高くなる。

2. TA 98とTA 100株に対する活性の差異

食品加熱分解物のTA 98に対する変異原活性は、全てS-9 Mix存在下でのみ検出された。TA 100に対する活性は、砂糖の250℃、300℃熱分解物ではS-9なしで検出できたが、他はほとんどがS-9 Mix存在下でのみ検出された。焼くまへの食品0.1gあたりの活性は、TA 98+S-9 Mixの場合最高21,000(変異体/プレート)で、TA 100+S-9 Mixの場合に比べておよそ10倍程度であった。

3. 変異原活性と食品の蛋白含量との相関

300°C 加熱分解物に TA 98+S-9 Mix で活性の検出された食品について、その活性と蛋白含量との相関をみると $N=30$, $r=0.87$, $t=18.92$, $P<0.005$, 同様に TA 100+S-9 Mix の場合では $N=18$, $r=0.85$, $t=12.27$, $P<0.005$ で明らかな相関が得られたが、他の食品成分である脂肪、炭水化物含有量との間には相関は認められなかった。

4. 変異原性が検出されなかった食品

寒天, マッシュポテト, 白米, 玄米, 小麦粉, パン粉, 乾大根, 紅茶, 乾燥酵母, 大豆油, レシチン, 生しいたけ, なす, キャベツ, 14種類

結 論

50種類の食品, 食品成分の 200°C ~ 400°C 熱分解物のうち 36 例に *S. typhimurium* TA 98+S-9 Mix, TA 100+S-9 Mix によって突然変異原性が検出さ

れ、その活性は食品の蛋白質含量と相関が認められた。しかしながら加熱食品の突然変異原性の強さは、加熱方法、加熱時間、試料の組成、性状などにより大差がある。食品のような複雑な組成の試料の突然変異原性の由来については今後の研究にまっところが大きく、又一方これらの研究は食物の栄養と安全性の関係を考える上で今後新たな知見を提供するものと考えられた。

文 献

- 1) Nagao, M. et al. (1977) Cancer Letters 2, 221.
- 2) Nagao, M. et al. (1977) ibid. 2, 335.
- 3) Sugimura, T. et al. (1977) Proc. Japan Acad. 53, 58.
- 4) Matsumoto, T. et al. (1977) Mutation Res. 48, 279.
- 5) Ames, B. N. et al. (1975) ibid. 31, 347.
- 6) Yahagi, T. et al. (1977) ibid. 48, 121.

農 薬 の 変 異 原 性

白 須 泰 彦

(残留農薬研究所・毒性部)

我々は農薬の変異原性を微生物を用いた系で検索した。試験系としては、*B. subtilis*, H 17, M 45株を用いた rec-assay と Ames の開発した *Salmonella* TA 1535, TA 100, TA 1537, TA 1538, TA 98 株と *E. coli* B/r 系の WP 2, WP 2 hcr⁻ 株を用いた復帰変異試験である。試験した農薬は殺菌剤67, 殺虫剤60, 除草剤 67, 植物成長調整剤2の合計 196 農薬である (Table 1)。その結果、現在まで 18 の農薬の変異原性を検出した。それらは、Bis-Dithane, Captafol, Captan, DDC, Dexon, Dichlofluanid, Dichlorvos, EMSC, ETU, Ferbam, Folpet, HEH, NBT, NNN, TMTD, TTCA, Vamidothion および Ziram である (Fig. 1)。(DDC, EMSC, ETU は Table 1 になし。)このうち Dichlorvos と Vamidothion は 殺虫剤であり、他の16農薬は全て殺菌剤である。Dexon, Dichlo-

fluanid, NBT, NNN は、塩基置換型とフレームシフト型の変異原性を有し、その他の農薬では塩基置換型の変異原性が認められた (Table 2)。これらの農薬の変異性発現には S-9 Mix による活性化は必要でなかった。さらに、これらの農薬の rec-assay の成績は ETU を除き全て陽性、或いは弱陽性であり、復帰変異試験の成績との間に良い相関が認められた。しかし Aldrin, α -BHC, Chlorobenzilate, p-p'-DD, Griseofluvin, ATA, PCNB 等の発癌性の報告がある農薬は、代謝活性化を含む試験においても陰性であった。さらに、初期のスクリーニングにおいては、主としてスポット試験を実施したが、農薬の変異原性をより詳細に明らかにする為に代謝活性化を含む変異原性試験を全ての農薬で実施している。

以上、農薬の変異原性スクリーニングの結果を要約

Table 1 Pesticides Assayed in Microbial Mutagenicity Testing (193)

Fungicides (64)

Asozin Baykel BEBP Benzalkonii chloridum Binapacryl Bis-Dithane
Blasticidin S* Captafol Captan CBA CECA Cellocidin Chinomethionate
CPA Daconil** DAD DAPA DDPP Denmert** Dichlofluanid Dichlone
Dichlozoline Dicloran** Dithianon DTAS EMP ESBP ESTP ETM Fentiazon
Ferbam Folpet Griseofluvin** Hinosan** IBP** Karathane Kasugamycin**
MAC MAF Maneb* MAS Metiram NBT NNN OPP** PCNB** Phenazine PMA PMC
PMF Polyoxin B* Polyoxin D*Rabcide Sankel Styroicide Tachigaren
Thiabendazole** Thiophanate TMTD Triazine TTCA Zineb* Ziram ZM

Insecticides (60)

Aldrin** Arprocarb BHC (mixture of α , β and γ) BPMC* Carbanolate Carbaryl
Cartap** Chlorfenson Chlorfenvinphos* Chlorobenzilate** Chlorophenamide
Chloropropylate** Cidial CVMP Cyanox** DCIP** DDT** Diazinon**
Dichlorvos Dieldrin Dinobuton** Dimethoate Dimite Dioxathion DMTP
Dursban Elsan** EPN** Eradex Ethion Fenthion Heptachlor Hopcide
Hydrol Imidan Kelthan Macbal Malathion Mecarbam Meobal** Mipcin*
MTMCZ** Ofunack** Omite Phenisobromolate Phenkapton Phosalone Phosvel
Propaphos** Salithion Smite S-Seven** Sumithion Tetradifon Torque*
Trichlorfon Triforine** Tsumacide** Vamidothion Vydate**

(前頁の続き)

Herbicides (67)

ACN Alachlor Alanap Ametryne Amitrole** Asulam Atrazine Benefin
 Bensulide Benthicarb Bromacil Butachlor CBN Chloronitrophen
 Chloroxuron Chlorthiamid CMPT Cremart** 2,4-D DCPA Desmetryne
 Dicamba-dimethylamine Dichlobenil Diphenamid Diquat-dibromide Diuron
 Eptam* HEH Ioxynil-octanoate** IPC Lenacil Linuron MCPB-ethyl**
 MCPB-sodium MCPFA MCPE MCPFA MCPP Methoxyphenone** MO Molinate
 Monuron NIP PCP Pebulate Pentanochlor Phenmedipham Phenopylate
 Phenothiol Prometryne Propazine Ronstar** Siduron Simazine Simetryne
 Sweb** 2,4,5-T TCA TCBA TCTP** Tetrapion Thiochlormethyl* Tokunol
 TOPE Trietazine Trifluralin Vernolate
 Plant growth regulators (2)
 Sodium 1-naphthaleneacetate** MH**

*With metabolic activation: WP 2hcr⁺, WP 2hcr⁻, TA 1535, TA 1536, TA 1537 and TA 1538

**With metabolic activation: WP 2hcr⁻, TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 and TA 100

Noasterisk Without metabolic activation: WP2hcr⁺, WP 2hcr⁻, TA 2535, TA 1536, TA 1537 and TA 1538

Table 2 Mutagen Specificity for the Tester Strains

Pesticides	Rec assay	Base-change type			Frameshift type			
		E. coli		S. typhimurium				
		WP 2	WP 2hcr ⁻		TA 100	TA 1536	TA 1537	TA 1538
Captafol	++	+	+	-	-	-	-	-
Captan	++	+	+	+	+	-	-	-
Dexon (DAPA)	++	+	+	-	-	-	+	+
Dichlorvos (DDVP)	++	+	+	+	-	-	-	-
Dichlofluanid	+ ^w	+	+	+	+	-	-	+
ETU	-	-	-	+	-	-	-	-
Folpet	+ ^w	+	+	+	-	-	-	-
HEH	+	+	+	+	-	-	-	-
NBT	++	-	-	+	-	-	+	+
NNN	+ ^w	-	+	-	-	-	+	+
Vamidothion	+	+	+	+	-	-	-	-
Bis-Dithane	+ ^w	-	-	+	-	-	-	-
DDC	+ ^w	-	-	+	-	-	-	-
EMSC	-	-	-	+	-	-	-	-
Ferbam	+ ^w	-	+	+	-	-	-	-
TMTD	+ ^w	-	+	+	-	-	-	-
TTCA	+ ^w	-	+	+	-	-	-	-
Ziram	+ ^w	-	+	+	-	-	-	-

^w: weakly positive

したが、近年、化学物質と亜硝酸との相互作用による変異原物質の生成が問題となっている。Zineb, Maneb 等の ethylenbisdithiocarbamate 系農薬の代謝、分解産物である ETU も亜硝酸と反応して変異原物質を生成する。ETU と亜硝酸ナトリウムを酸性条件下で混合した液は、E. coli WP2 hcr⁻, TA 1535, TA 100 株に強い変異原性を示した。さらに、

Salmonella G 46株を用いた宿主経由試験をマウスで行った。亜硝酸ナトリウム (50mg/kg)、或いは、ETU (150mg/kg) の単独経口投与群では対照群に比べ、復帰変異頻度の上昇は全く認められなかったが、両物質の同時投与群では著明な復帰変異頻度の上昇が認められた。さらに、ETU の投与量を 150mg/kg に固定し、亜硝酸ナトリウムの投与量を変化させた実験、

Table 3 Host-mediated assay with S. typhimurium G 46

Chemicals	No. of mice	Revertants per 10 ⁸ survivors
Gum arabic (2%)	6	0.59 ± 0.21
NaNO ₂ (50mg/kg)	5	0.38 ± 0.12
ETU (150mg/kg)	6	0.50 ± 0.35
ETU + NaNO ₂ (150 + 50mg/kg)	5	15.37 ± 4.19**
Nitroso-ETU (125mg/kg)	6	82.64 ± 17.71***

** P < 0.01

*** P < 0.001

Common name	Use	Chemical name	Chemical structure	Common name	Use	Chemical name	Chemical structure
Captafol	F.	N-(1,2,2-tetrachloroethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide		DDC	F.	sodium dimethyldithiocarbamate	
Captan	F.	N-(trichloromethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide		Ferbam	F.	iron dimethyldithiocarbamate	
Dexon	F.	sodium p-dimethylaminobenzene-diazo sulfonate		Ziram	F.	zinc dimethyldithiocarbamate	
Dichlorvos	I.	2,2-dichlorovinyl dimethylphosphate		TTCA	F.	arsenic dimethyldithiocarbamate	
Folpet	F.	N-(trichloromethylthio)phthalimide		TMTD	F.	bis(dimethylthiocarbamoyl)disulfide	
HEH	H.	N-(2-hydroxyethyl)hydrazine		EMSC	F.	N,N-bis(dimethyldithiocarbamoyl)ethylenediamine	
NBT	F.	2,4-dinitrophenyl thiocyanate		Bis-Dithane	F.	dizinc bis(dimethyldithiocarbamate) ethylenebis(dithiocarbamate)	
NNN	F.	5-nitro-1-naphtho nitrile		Dichlofluanid	F.	N-(dichlorofluoromethylthio)-N-(dimethylsulfamoyl)-aniline	
Vamidothion	I.	dimethyl S-[2-(1-methylcarbamoyl-ethylthio)ethyl]phosphorothioate		ETU	F.	ethylenethiourea	

Fig. 1 Chemical Structure of Mutagen Pesticides

および亜硝酸ナトリウムの投与量を 50mg/kg に固定し、ETU の投与量を変化させた実験を行ったが、いずれの実験でも明瞭な用量-復帰変異頻度の相関が認められ、前者の実験では亜硝酸ナトリウム 3.12mg/kg、また、後者の実験では ETU 1mg/kg という低投与量で有意な復帰変異頻度の上昇が認められた (Table 3)。

さらに、その他の農薬についても亜硝酸との相互作用による変異原性の発現を検討した結果、NAC, PHC, CPMC 等一連の methylcarbamate 系殺虫剤とメカルバム、ジメトエートで TA 100株に対する変異原性を確認した。

<小集会I>

微生物と変異原性試験

— ま と め —

司 会 松 島 泰 次 郎
(東京大学医科学研究所)

初めての試みであったが、82名の参加者が夜10時まで、熱心に聴講する中で、3名の演者により、未発表のデータも含め、ホットな話題が提供された。個々の講演の詳細は、それぞれの演者が書かれているので、全体の印象を記す。

住友化学の鈴木氏は、誰もが日頃やりたくてできない、ラットと、それ以外の小動物の臓器から得た S-9 の作用について、その動物種差を示された。国立がんセンターの長尾氏は、焼いたトリプトファン中にも存在する、ハルマン、ノルハルマンが、変異原でないアニリンのような化合物まで、強い変異原に変える魔術師—co-mutagen—であること、さらにノルハルマンの DNA に対する作用についても言及された。三共の平野氏は、国立遺伝研でのお仕事を基に、細胞融合で枯草菌の新しい指示菌株を得たこと、試験方法の改良について、さらには演者の抱いている夢まで述べられた。

時間の関係もあって、一方通行的な会になったが、

質問も活発に行われ、司会の松島氏によって、問題点が下記のようにまとめられた。1) ヒトの代謝に近い S-9 の探究の必要性和、ヒト臓器を使う場合の危険性(肝炎ウイルスなど)。2) 企業などで行う、細菌を用いた復帰変異試験では、S-9 を PCB 誘導の SD 系ラット肝臓からとり、指示菌は、*Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 に、TA 92 (UV^r, rfa⁺, R⁻) を用いるのが、最小限のセットであろう。3) 一連の同種の化合物を試験する場合、化学構造から、最適な条件や co-factors を選んで行うのがよい。4) 新しい試験方法の開発には、既知方法との比較や、多くの変異原でのデータの蓄積を行う義務がある。

この会合をきっかけに、上述のような問題点、あるいは試験方法の標準化や効率化といった問題も含めて、経験の浅い人や豊かな人、異なる立場の人がお互いのコミュニケーションをよくしていく場を、今後定期的に持つことができれば幸いだと思う。

(文責 坂本豊)

Ames Test に用いられる S-9 の動物種差

宮本 純之, 鈴木 裕
(住友化学工業㈱農薬事業部研究部)

サルモネラの突然変異原性を指標とする Ames の検出系は、化学物質の発がん性の予備検査法として広く用いられるようになった。

我々は、Ames 法に用いられる in vitro の薬物代謝系について検討を試みた。用いた動物は、いずれも雄で SD ラット (5 週令) ICR 系マウス (6 週令)

ゴールデン・ハムスター (6 週令) Hartley モルモット (6 週令) および New Zealand White 種のウサギ (15 週令) の 5 種。肝薬物代謝酵素系の inducer としては PCB (Kanechlor 400) フェノバルビタール ナトリウム (PB) および 3-メチルコランスレン (MC) をそれぞれ単独で用いた。化学変異原としては、ジメチルニトロソアミン (DMNA) アセチルアミノフルオレン (AAF) 3,4-ベンツピレン (B(a)P) を用いた。S-9 Mix は、1ml 中に、肝ホモジネート 9000×g 上清 0.4ml、磷酸緩衝液 (0.1M, PH 7.0) 0.4ml、Mg Cl₂ (0.02M) 0.2ml、NADPH 10mg、NADH 10mg を含むようにし、この S-9 Mix 0.4ml に、バクテリア液 0.1ml (約 2×10⁸ cells) と化学変異原の DMSO またはアセトン溶液 10μl を加え、37℃で30分振盪の予備培養の後で、通常の方法でプレートした。colony は automatic colony counter で測定した。

代謝活性の誘導の指標としては Cytochrome P-450 を用いた。PCB (500mg/kg) 腹腔内投与後の SD 系ラットから、肝をとりその S-9 分画について、P-450 量と、それを DMNA, AAF, B(a)P に添加したときの突然変異原活性との変化を日を追って調べた (図 1)。両者とも誘導処理後、日と共に増加し 5 日目に最大となった。PB は 5 日間の連続投与とし、1日あたりの投与量はラット、マウス、ハムスターが 80mg/kg、モルモットは 50mg/kg、ウサギは 40mg/kg とした。MC については 1 回投与とし、ラット、マウス、ハムスター、モルモットで 80mg/kg、ウサギで 50mg/kg とした。この投与量における各動物の肝 S-9 分画中の P-450 量の変化を図 1 に示した。P-450 量はほぼ最大値を示す処理後 5 日目のサンプルについて、突然変異誘発活性を比較した。

結論：ラットおよびマウスにおいては、PCB が最良の inducer と考えられるが、ハムスター、モルモット、ウサギにおいては PCB は PB, MC とほぼ同等の効果と考えられる。P-450 量と突然変異誘起活性

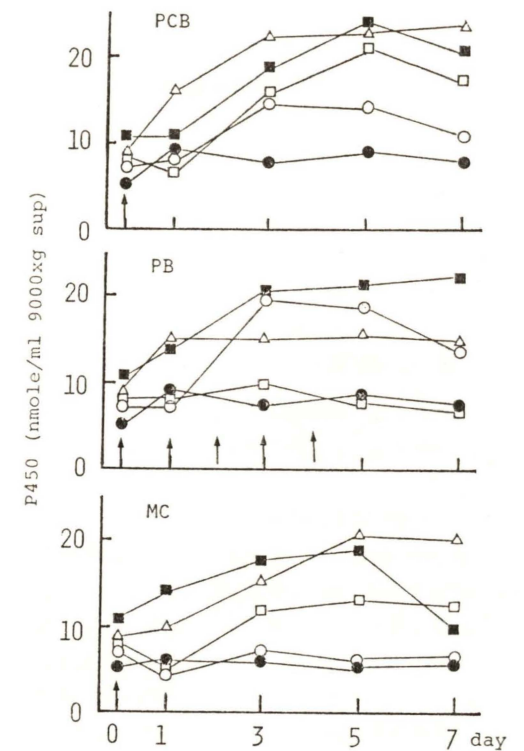


図 1. Cytochrome P-450 contents of hepatic S-9 fractions from several species of animals after each inducer treatment. ↑ indicates injection day of inducer. ○; rat ●; mouse □; guinea pig ■; rabbit △; hamster

とはかならずしも平行関係であるとは認められなかった。以上の結果より、これからは、S-9 の source として、SD 系ラットのみではなく、モルモットおよびハムスターをも用い、化合物の突然変異性の検索を行っていくべきであろうと考えられる。

(詳細は農薬学会誌 2 巻 4 号掲載予定)

ノルハルマン及びハルマンの補助変異原性

長 尾 美 奈 子
(国立がんセンター・生化学部)

1. はじめに

癌はその大部分が環境因子に起因すること、又特に食品に由来することは疫学的データから明らかにされている¹⁾²⁾。

B. N. Ames 博士の開発したサルモネラ菌株 TA 98 と TA 100 を用いて、先ずタバコの煙の突然変異原性、焼魚の焦げ、煙の突然変異原性が証明された。更に主に蛋白質及びアミノ酸、あるいは糖の加熱分解により突然変異原物質が生成されることが発見された³⁾⁴⁾⁵⁾。とくにトリプトファンの熱分解物が強い突然変異原性を持つことから、その活性本体を究明する作業がはじまり2種類の化合物(Trp-P-1 および Trp-P-2)の結晶化に成功した⁶⁾。これらは γ -カルボリン誘導体で構造を図1に示す。Trp-P-1 および Trp-P-2

は強い frame-shift 型の突然変異原物質で、TA98 に対する比活性はアフラトキシン B₁ より強く、これまで我々が調べた突然変異原物質のうちで最も強い。

またこのタールの中にはノルハルマン及びハルマンという β -カルボリン化合物が多量に存在している⁷⁾。Trp-P-1, Trp-P-2 の突然変異原性はノルハルマン又はハルマンの添加によって数倍増強されることがわかった。

ジメチルアミノベンゼン(DAB)で代表されるアゾ化合物は肝癌を誘発するにもかかわらず突然変異原性が低い。このことは微生物突然変異原性テストを行っている者にとって1つの問題であった。DAB にノルハルマンを加えたプレートに2,000 コ以上のコロニーを見た時は大きな喜びであった。

表 1 アゾ色素の突然変異原性に対するノルハルマンの影響

化 合 物	His ⁺ コロニー数 / プレート				
	TA 98		TA 100		
	対照	+ノルハルマン	対照	+ノルハルマン*	
MAB	μ g				
	20	62	880	248	154
	50	67	1800	233	216
AB	100	74	1840	264	244
	15	44	222	254	176
	37.5	54	420	301	178
3'-メチル-DAB	75	79	534	334	229
	20	106	1100	359	158
	50	150	1580	357	181
2'-メチル-DAB	100	121	1560	410	252
	20	43	51	757	149
	50	67	75	188	192
対照	100	112	104	299	278
		16	25	145	198
		21	30	114	141

*ノルハルマン 200 μ g を S-9 Mix と共に preincubation mixture に加えた⁷⁾。

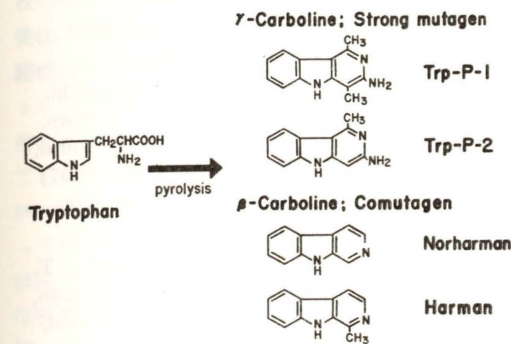


図 1

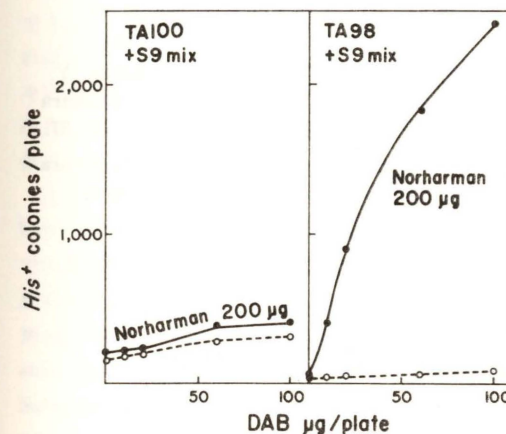


図 2 ノルハルマンの DAB の突然変異原性に及ぼす影響

2. ノルハルマンの comutagenic 作用

ノルハルマンの comutagenic 作用は Trp-P-1, Trp-P-2 をはじめフルオレニルアセトアミド、ベンツピレン、DAB、Yellow OB 等に認められた。本文では、DAB を中心に紹介する。DAB の突然変異原性は S-9 および cofactor として NADPH, G6P のほかに NADH および ATP を加えて、プレインキュベーション法でみて TA 100 で 300~500/100 μ g, TA 98 で 100~200/100 μ g というようにならかなり低い。これにノルハルマン200 μ g をプレインキュベーションの際加えると図2に示す様に TA 98 で著しい復帰変異が認められる。一方 TA 100 ではこのような効果は見られなかった。この復帰変異数は 1mg まではノルハルマンの増加に伴って増す。一方ノルハルマンそのものは、突然変異原性は陰性であった。DAB を 50 μ g,

ノルハルマンを 200 μ g と限定し、S-9 の量を変えてみると少なくとも S-9 150 μ l/plate までは S-9 の量に比例して復帰突然変異の数は増す。

次に DAB のいろいろな誘導体について調べたところ、癌原性のあるメチルアミノアゾベンゼン(MAB), 3'-メチル-DAB, アミノアゾベンゼンでは明かに comutagenic 作用があったが、一方再生肝ではじめて癌原性の検出される2'-メチル-DAB では comutagenic 作用は認められなかった(表1)⁷⁾。

ところで DAB はアゾ還元酵素によってアニリンとジメチル-p-フェニレンジアミンに分解される。そこでこの分解産物がノルハルマンによって突然変異原性を示すようになるのか否かを調べてみた。アニリンにはそれ自身突然変異原性は全くないが、ノルハルマン存在下でかなり強い突然変異原性を示す⁸⁾。一方ジメチル-p-フェニレンジアミンに対してノルハルマンは comutagenic 作用を示さなかった。そこで DAB のノルハルマンによる復帰突然変異数の増加はアゾ還元酵素によって生ずるアニリンがノルハルマンの存在で突然変異原性を示す為であるとも考えられる。3'-メチル-DAB の場合、還元生成物は m-トルイジンとジメチル-p-フェニレンジアミンである。ところが m-トルイジンはノルハルマンの有無にかかわらず突然変異原性を示さない。従って少なくとも3'-メチル-DAB の場合、アゾ体自身がノルハルマン存在下で著しい突然変異原性を示すことがわかった。さらに興味あることは、m-および p-トルイジンはノルハルマンによって突然変異原性を示さないが、o-トルイジンは強い突然変異原性を示したことである⁹⁾。又、フェニレンジアミン、アミノフェノールでは o-, m-, p- いずれもノルハルマンの comutagenic 作用は発現されなかった。

3. 作用機構の1つとしての DNA-ノルハルマンの反応

ノルハルマンの comutagenic 作用が frame-shift 型の TA 98 のみにみられることからノルハルマンが DNA に intercalate する可能性が考えられ、やはりノルハルマンと DNA が相互作用を持つことが示された⁹⁾。

次に、super helix を持つ fd ファージ DNA を用いて、ノルハルマンによる DNA の巻きもどしを調べた所、ノルハルマンは DNA に intercalate し、1分

子のノルハルマンが intercalate することにより $17 \pm 3^\circ$ の巻きもどしが生ずることがわかった⁹⁾。一方ハルマンはノルハルマンよりも DNA に対し強い相互作用互があることが示されたが、DAB に対しノルハルマンは comutagenic 作用を全く示さない。DNA に intercalation するのみでなく、なにか DAB との相互作用が関連している様に思われる。またフルオレニルアセトアミド、ペンツピレン等では S-9 Mix による代謝がノルハルマンによって影響されている事実がわかってきている。

詳細な作用機構はまだ不明である。

文 献

- 1) Wynder, E.L. and G. B. Gori (1977) J. Natl. Cancer Inst. **58**, 825—832.
- 2) Doll, R. (1977) Nature **265**, 589—596.
- 3) Nagao, M., M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi and T. Sugimura (1977) Cancer Letters **2**, 221—226.

変異原検出系における菌体の改良に関する提案

平 野 光 一

(三共・安全性試験センター)

環境変異原の検出法としては、現在迄の所、各研究室で種々の方法が考案されてきている。その中で、細菌を用いた系は、その簡易さ、結果判定迄の早さ、低価格性といった点で勝れている。我々は、現在ある細菌の系を、高次な動物試験に近づけ、あるいは人間に対する毒性を直接予告できるような系に改良するよう努力せねばなるまい。そういった意味で、まず賀田等¹⁾が開発した枯草菌の rec-assay について改良を施す事を試みた。この rec-assay は、組み換え修復機構の欠損株である M45 と、組み換え修復に関して野生型である H17 に対する検体の致死性の差で、DNA に対する損傷性を判断する。通常この試験は、broth agar の上に -80°C で stock した両菌を streak し、充分液が乾いたあと起点にペーパーディスクを置いて、これ

- 4) Nagao, M., M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, T. Kawachi and T. Sugimura (1977) Cancer Letters **2**, 335—340.
- 5) Sugimura, T., M. Nagao, T. Kawachi, M. Honda, T. Yahagi, Y. Seino, S. Sato, N. Matsukura, T. Matsushima, A. Shirai, M. Sawamura and H. Matsumoto (1977) Origins of Human Cancer p. 710—719 Cold Spring Harbor.
- 6) Sugimura T., T. Kawachi, M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Okamoto, K. Shudo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, Y. Iitaka and A. Itai (1977) Proc. Japan Acad. **53**, 58—61.
- 7) Nagao, M., T. Yahagi, M. Honda, Y. Seino, T. Kawachi and T. Sugimura (1977) Cancer Letters (in press).
- 8) Nagao, M., T. Yahagi, M. Honda, Y. Seino, T. Matsushima and T. Sugimura (1977) Proc. Japan Acad. **53**(B), 34—37.
- 9) Hayashi, K., M. Nagao and T. Sugimura (1977) Nucleic Acid Res. (in press).

に試料液を浸み込ませて24時間培養後に菌の増殖阻止状態で判定する。この方法の場合2つの欠点がある。一つは凍結した菌を使用する事により、一夜培養の菌を用いるより感度は上がるが、実験毎の生菌数の振れがあり、再現性に欠ける事である。もう一つは、寒天培地を乾燥させておかないと streak した菌が乾かない。比較的厚い層を用いる事により、試料の拡散効率があまり良くなく、特に拡散の遅い試料では判定困難となる。そこで出来るだけ寒天層を薄くして実験する事により、単位時間あたりの拡散効率が良くなる。M45の胞子、H17の胞子を含んだ broth agar を別々に調製し、10ml ずつ 90mm シャーレに分注して固化させる。胞子数は $5 \times 10^5/\text{ml}$ になるように加えておく。この胞子寒天に 8mm のペーパーディスクを3

枚のせ、これに検体を浸み込ませる。 37°C 、24時間培養後、阻止帯の直径を測り、M45とH17で比較する。陽性対照（例えば AF_2 等）及び陰性対照（例えばストレプトマイシン等）は必ずおき、陰性対照での阻止帯の差（これは、M45とH17の増殖速度が異なる為で）を差し引く。この結果、差があれば検体は rec-assay 陽性であると判定する。胞子寒天平板は作って直ちに用いても良いし、 4°C に少なくとも一週間は保存できる様である。胞子懸濁液は安定で水中で冷蔵庫に保存できる為、 -80°C のフリーザーなどを持っていない所でも容易に行える。1 plate, 1 drug, 1 point で triplicate で値が求まる為、dose response curve を描いて MIC（最少阻止濃度）を求める事ができ、この値を用いてM45とH17の MIC ratio を求めれば、今迄陽性、陰性のみで判断していた rec-assay を定量化できる。この結果、物によっては、賀田等の改良した cold incubation rec-assay²⁾ よりも更に10倍以上の感度の上昇が認められた。

次に、枯草菌の tester strain の開発を試みた。base-change type に対して用いる事のできる菌はすでに定家等³⁾が報告している。frame-shift type の変異原に対する菌は未だ得られていない。ただ、胞子形成に関する forward mutation を用いて、frame-shift type の変異原が検出されている⁴⁾。Ames 等の Salmonella は、his locus の変異であり、その全てが塩基の Guanine 及び Cytosine に関するものである。我々は、Adenine 及び Thymine に関する変異が起きやすい可能性のあるマーカーを選択する事とした。宗像等は、紫外線感受性のマーカーは ATrich で

あると報告し⁵⁾、アミノ酸要求性の中では trp C_{168} が調べた限り、最も紫外線感受性であったとしている。我々は、 48°C では増殖できず (dna-8132)⁶⁾、紫外線高感受性で (uvr)⁷⁾、tryptophan 要求性 (trp C_{168})⁷⁾の株を選択した。この結果得られた BKH 5002 (trp C_{168} , dna-8132, uvr-19, uvr-5) は、ICR-170 及び MNNG にも良く応答する。

更にこの菌に SPO2 フェージを組み込ませた溶原菌を作った。溶原菌に対する Chemical のフェージ誘導を調べてみると、 AF_2 、ICR-170、Benzo (a) pyrene といったものに良く応答する。BKH 5002 の特徴をまとめると、AT rich のマーカーを持ち、frame-shift type の変異原に良く応答すると共に、base-change type といわれている AF_2 、MNNG にも良く応答する。又、同じ菌で溶原菌誘導も行える。

文 献

- 1) Kada, T. et al. (1972) Mutation Res. **16**, 165—174.
- 2) Kada, T. (1976) Mutation Res. **38**, 340.
- 3) Sadaie, Y. et al. (1976) EMS Japan 14.
- 4) MacGregor et al. (1976) Mutation Res. **38**, 271—286.
- 5) Munakata, N. et al. (1966) Mutation Res. **3**, 93—100.
- 6) Hara, H. and H. Yoshikawa (1973) Nature New Biol. **244**, 200—203.
- 7) Munakata, N. et al. (1969) Mutation Res. **7**, 133—139.

<小集会II>

優 性 致 死

— ま と め —

司 会 土 川 清
(国立遺伝学研究所)

このセミナーは、化学物質の変異原性試験のうち哺乳動物を用いた *in vivo* 試験について、研究者間の相互理解と情報交換を行いつつ、この分野の研究の発展に努めるべく発足した。JEMS 評議員会において、本研究会の分科会としての活動が認められている。名称は優性致死セミナーと仮称しているが、これは最初にとりあげたテーマに基づくもので、発会の主旨からして、単に優性致死試験に限定せず、哺乳動物を用いる試験全般について、順次検討を加えて行く予定である。

本セミナーの最大の特徴は、メンバーに大学関係者がほとんど入っていないことである。企業研究所や受託試験機関などで必要にせまられてルーチン試験を実施している研究者が中心となっている。わが国におけるこの分野の研究態勢の立ち遅れ、研究者の層の薄さを反映する。基礎研究なくしてルーチン試験のありうるはずがなく、本セミナー発足の動機もまさにこの点にあった。しかし見方をかえれば、この分野の日本での研究が大きな「穴場」であることを示す。

さて、今回の会合は20名余の参加のもとに行われた。優性致死に関しては、まだ種々の問題が残されている。当日午後的一般講演において、問題解決のためのいくつかのアプローチが示されたので、主なものについて補足説明あるいは追加発言の形で討議が進められた。基礎的な研究としては次のものがあげられる。

- (1) EMS および MMC の長期投与実験：益淵正典他（都衛研）
- (2) MMS の誘発転座試験：渋谷徹他（食薬センター）
- (3) TEM および MMC の誘発優性致死と初期胚の染色体研究：菊池康基他（武田薬品）

- (4) ラットにおける優性致死試験と奇形発生および染色体異常：村尾真一他（神戸大）
- (5) 優性致死と奇形発現の可能性：水谷正寛他（食薬センター）

(1) に関しては、これらの薬物の優性致死効果の差異が薬物の生体内運命と関連して討議された。また、長期連投実験の有用性に関しても質疑が交された。(2)の試験は優性致死にはかからない均衡型相互転座の carrier F_1 を、妊性試験あるいは染色体観察によって検出する方法であり、その有効性は高く評価された。次に、優性致死の原因とされている染色体異常を発生の初期段階で調べたのが(3)である。優性致死と染色体異常の関係を直接的に解明する方法といえよう。(4)はラットでの試験で妊娠の末期（通常の優性致死試験では妊娠中期）に胎児観察を行い、奇形胎児を認めたという報告である。しかも、これら奇形児のいくつかに染色体異常がみられたということで、これらの奇形や異常が薬物で誘発されたものかどうか論議が集中した。これに対し、優性致死と同一の投与、交配方法で MMS による骨異常の発現をマウスで調べた(5)の実験では、異常の成立は認められなかった。この骨異常を変異の指標とする方法は、可視優性突然変異を調べることになり、また生殖試験の Segment I との関連性も深く、注目された。その他、生殖細胞における不定期 DNA 合成、aspermia 現象〔加藤基恵他、田中憲穂他（食薬センター）〕、ETU と Nitrite の同時投与による優性致死試験〔寺本昭二他（残留農研）〕の報告などについても討論が行われた。

次に、ルーチン試験に関係した議題として、各研究グループよりマウスの死胚に関するデータが持ち寄せられた。これにより、マウスの系統で死胚率に大きな差

のあることが明らかにされた。一般に近交系 F_1 では死胚率は低く、近交系や closed colony のマウスでは高い傾向がみられた。このことはすでにいわれていることではあるが、わが国で優性致死に用いるマウスの系統をどうするか、今後に残された大きな問題である。

る。

今回の会合は夜の11時過ぎまで3時間余りにわたったが、メンバーのほとんどは自ら実際に試験を行い、種々の問題を肌で感じとっている方々であるために、最後まで熱心な討議が行われた。（文責 菊池康基）

薬物による誘発優性致死と初期胚の染色体研究

菊池 康基，一ツ町晋也，山本 好一
(武田薬品・中央研究所)

薬物により誘発される優性致死が、配偶子に生じた染色体異常に起因することは、以前より推論されていた。Röhrborn (1970)¹⁾ は trenimon の試験で初期胚に異数体がみられること、Generoso (1969)²⁾ は ethyl methanesulfonate (EMS) の、Joshi ら (1970)³⁾ は triethyl phosphoramide (TEPA) の実験で、初期胚に小核や異常卵割が出現すること、あるいは卵割の遅延が起こることを認め、これらの現象と優性致死とがきわめて関係深いことを報告している。また、最近になって、Brewen ら (1975)⁴⁾ は methyl methanesulfonate (MMS) で、Matter と Jaeger (1975)⁵⁾ は triethylenemelamine (TEM) で、優性致死が初期胚での染色体異常によることを明らかにした。

演者らは前回の第5回研究発表会において、CF \sharp 1系雄マウスに TEM を 0.3mg/kg 投与後、無処理雌と交配し、3日目胚について染色体を調べた結果を発表した⁶⁾。また今回の一般講演で、mytomycin C (MMC) 3mg/kg を投与した同様な実験結果を発表したので、これら2実験を対比してみた。

優 性 致 死 作 用

TEM による誘発優性致死は経時的に増加し、投与後11~13日目に交配した群で最高値を示した。このことは TEM が精細胞 (spermatid) 期に主に作用することを示している。また、これら優性致死は着床前および着床後の卵の死亡が共に増加したことに起因していた。

MMC では誘発優性致死は第3週以後経時的に増加し、第6週で最高となり、この薬物が精母・精原細胞期に作用することを示した。この場合は着床卵の減少が主因と考えられる。

3 日目胚の発生段階

TEM 処理後20日目までの交配からえられた胚では、無処理対照群に比べて発生の遅延が認められた。無処理群では17~32細胞期の胚が50%以上であるのに対し、もっとも発生の遅延が強かった13日目交配の胚では2~8細胞期のものが約55%をしめていた。しかし、退行卵の増加はほとんど観察されなかった。

これに対し、MMC 処理では発生の遅延はそれほど顕著ではなく、そのかわりに経時的に退行卵が増加し、第6週目で最高値を示した。

3 日目胚での染色体異常および小核の出現

TEM 処理群では、上記発生の遅れた胚で、分裂中期の細胞では小核が、分裂中期の細胞では染色体異常が高頻度で観察された。染色体異常としては染色体型の切断あるいは交換、及び premature chromosome condensation が主であった。これら異常と小核の出現は、卵割の遅延と同様に処理後の時間と共に増加し、13日目交配で最高値を示した。

MMC 投与群では、いずれの週でも染色体異常や小核の出現頻度は対照群との間に有意な差はなかった。

精子観察

MMC 処理群についてのみ調査した。精子数は第5週でやや減少し、第6週では対照群の50%以下に低下した。また、形態異常の精子は第5～6週において対照群のおよそ2倍となった。

以上より、TEM は雄の成熟分裂後の生殖細胞の染色体に傷害を与え、この傷が受精卵で染色体異常として現れることが確かめられた。これら異常を有する胚の多くは着床後の発生過程で死滅するか、あるいは着床不能となるものと推察される。MMS⁴⁾ や trenimon⁷⁾ についても同様なことが考えられる。このように成熟分裂後の生殖細胞に作用する薬物では、初期胚でみられる染色体異常と優性致死との関係が明らかにされているのに対し、MMC のように成熟分裂前の精原あるいは精母細胞に作用する薬物では、初期胚で染色体異常がみられなかった。MMC を投与された雄マウスでは骨髄と同じく精原細胞にも染色体異常を起こすことはすでに知られている。おそらく、染色体異常を起こした精原、精母細胞は、成熟分裂をはじめとする精子形成の一連の過程で淘汰されて精子数の減少をきたし、あるいは淘汰されないとしても異常な精子を形成し、このために未受精卵の増加をまねくものと推定される。従って、MMC の場合でも、優性致死の第一次的な原因は生殖細胞に起こった染色体異

常であると推論される。

ところで、優性致死は一般には生存胎児の減少を指標としている。生存胎児数の減少の原因としては、これまで述べたように、①着床胚の発生途上での死滅、と②未受精卵などによる着床不能とがある。前者は真の優性致死であり、後者は妊性の低下 (sterility) として記録されるべきであるが、これまでこれら両者は混同して広義の優性致死とされてきた。しかし、昆虫などですでに行われているように、両者をはっきり区別して考える必要があることを提言したい。

文 献

- 1) Röhrborn, G. (1970) Chemical Mutagenesis in Mammals and Man (ed. by Vogel, F. et al.), Springer, Berlin 294—316.
- 2) Generoso, W. M. (1969) Genetics **61**, 461—470.
- 3) Joshi, S. R. et al. (1970) Genetics **65**, 483—494.
- 4) Brewen, J. G. et al. (1975) Mutation Res. **33**, 239—250.
- 5) Matter, B. E. and I. Jaeger (1975) Mutation Res. **33**, 251—260.
- 6) Hitotsumachi, S. and Y. Kikuchi (1977) Mutation Res. **42**, 117—124.
- 7) Binkert, F. and W. Schmid (1977) Mutation Res. **46**, 77—86.

長期投与による優性致死試験法の検討

益 淵 正 典

(都立衛生研究所・毒性部)

普通、マウスを用いた優性致死試験では、雄に1回(急性)あるいは5～7回(亜急性)被検物質を投与後、精子形成に要する6週間、毎週末処置末経産の雌と交配を続け、妊娠中期に胎児調査が行われている。しかし、安全性評価の際に対象となる化学物質のほとんどは微量かつ長期的に摂取されるものが多く、体内

での代謝や蓄積性も含め、その作用は急性試験の結果からは推し測れぬものがある。優性致死試験においても長期投与による作用の調べられることが望まれるが、これまでにその例は少なく、試験法としての是非を検討するにもほとんど資料のない現状である。我々はこのような観点から、長期投与による優性致死試験

の必要性を感じ、いくつかの化学物質についてそれを試みてきた。ここでは第3回優性致死セミナーの討議内容である“試験の感度を高める方法およびルーチンとして行う場合の問題点”に的をしばって紹介したい。

検 討 資 料

既知突然変異原物質であり優性致死試験においても陽性対照としてよく用いられている化学物質のうち、1回投与後優性致死作用の現れるまでの時期を異にする ethyl methanesulfonate (EMS) と mitomycin C (MMC) を選び、1回投与後および4, 6, 8週間投与後の優性致死誘発性について調べた。動物は JCL-ICR 系マウスを用い、どの実験においてもあらかじめ予備交配して正常な交尾と胎児所見を示した雄のみを使用した。雄は個別飼育とし、交配は雄1に対し雌2匹の4日間同居法により行い、また胎児調査は妊娠13日目に通常の方法で行った。投与開始時の雄、交配時の雌はそれぞれ10週令である。

① 1回投与による優性致死誘発性

EMS, MMC にそれぞれ10投与量群(図1)を設け、1回腹腔内投与後10, 30日目に交配して胎児調査を行った。使用雄数は各群平均10～15匹である。図1はその結果であるが、先にも述べたごとく EMS では10日目に、MMC では30日目に優性致死作用が認められ、EMS では 120.3mg 以上で、また MMC では

1.75mg 以上で顕著な用量作用反応関係を示している。

② 長期投与による優性致死誘発性

1回投与の結果(図1)を参考に、EMS では203.4mg 以下、MMC では 1.75mg 以下にそれぞれ7投与群(図2)を設け、4日毎に1回4, 6, 8週間腹腔内投与し続けたのち交配して胎児調査を行った。MMC では1回投与であまり作用の認められぬ 1.75mg を最高投与量としたが、これは投与後4～5週目から死亡する例が多数見られるためである。各群とも10匹の雄を用いた。

両物質4, 6, 8週投与後の生存率(生存雄数/投与雄数)、交尾率(交尾確認雄数/交配使用数)、妊娠率(妊娠雌数/交尾確認雌数)などはそれぞれ図2a)～d) のようであった。また投与期間および投与量と優性致死誘発率の関係を図2e) に示した。

長期投与による優性致死現象と感度の変化

図2e) に示されたごとく、両物質の dose response curve は投与期間の長短にかかわらず非常に似通った形状をとり、その作用は同一機序によることがうかがえる。感度の上昇は顕著に認められ、特に MMC では投与期間が長くなるほどさらに低投与量でも強い優性致死性を示す。本方法は、実際に即した条件で行うことができ、また感度が高められるという点では非常に有効な方法であると考えられる。一般に動物実験は個体により感受性に差があり結果はバラツキやすい

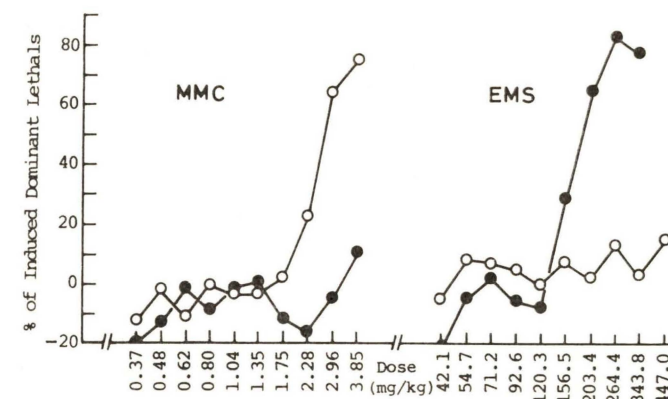


図 1 ethyl methanesulfonate, mitomycin C 腹腔内1回投与における投与量と優性致死誘発率との関係。投与後●—●10日目、○—○30日目の交配結果を示す。

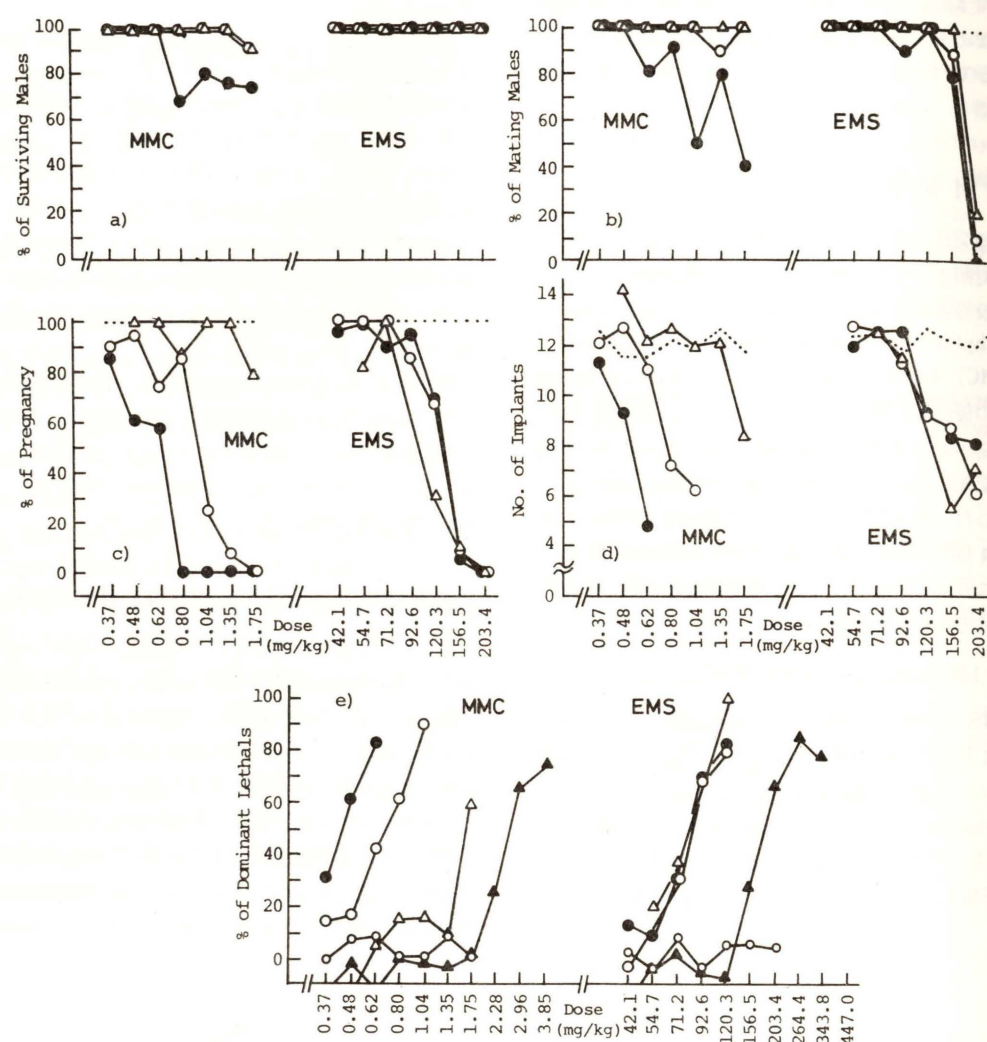


図 2 ethyl methanesulfonate, mitomycin C 腹腔内長期投与における投与量および投与期間と a) 生存率, b) 交尾率, c) 妊娠率, d) 1母体あたりの着床数, e) 優性致死誘発率との関係。 $\Delta-\Delta$ 4週間, $\circ-\circ$ 6週間, $\bullet-\bullet$ 8週間投与後の結果, および参考として $\blacktriangle-\blacktriangle$ 1回投与後, \cdots 陰性対照, $\circ-\circ$ 予備交配の結果を示す。

ルーチンとして行う場合の問題点

ここで理想的なものは ① 技術的に簡単であること, ② 時間および ③ 費用のかからぬ方法であろう。長期投与による試験法は, 以下にふれるごとくこのいずれの条件をも満たしてくれるものであった。① に関してはかねて優性致死試験の長所として論ぜられるところである。②, ③ に関しては, 図 2 e) で示唆されたごとく, 精子形成過程の異なる時期に作用する物質であっても 6~8 週間投与すれば同時に優性致死現象を示すようになることから, 投与後最低 1 回の交配によりその影響を検討することができる。このことは非常に大きな長所であり, 投与後毎週交配を続ける従

来の方法に比べ, 使用する雄数は変わらぬが交配回数とそれに必要な雌数は $1/6 \sim 1/8$ となり, また交配と解剖に要する手間など, 時間と費用は大幅に縮小される。また, 慢性毒性試験などで飼育されている動物を利用したり, それと同一ロットの動物で平行して実験を開始すれば, 遺伝毒性以外の毒性試験結果も参考にでき総合的な判断を下すことが可能である。

以上長期投与における優性致死試験について紹介してきた。今後, 飼料に添加した場合の結果, および物質によっては短期間であっても高濃度にさらされた場合の方が, その影響が強く現われるものもあることから, さらに種々の投与方法および物質について検討されることが望まれる。

が, 使用動物数を増やすことおよび日常我々が接触しているよりもさらに高濃度の物質を投与することが可能であり, それにより感度は多少鈍くとも大きな効果を得られることが期待される。しかしその反面, 急性試験にも共通することではあるが, 日常の実際量と実

験投与量との差, および多量投与するために調べようとするもの以外の要因で生じる疑優性致死現象 (たとえば生殖細胞に生じた cell killing) などには十分な注意が払われなければならない。

第6回日本環境変異原研究会（昭和52年9月16日）

＜小集会Ⅲ＞

哺乳動物の培養細胞を用いる

スクリーニング法に関する問題点

— ま と め —

世話人 石 館 基
(国立衛生試験所)

はじめに

種々化学物質の遺伝毒性、変異原性あるいは発癌性に関する社会的関心は年々増加しつつある。なるべく多くの物質を短期間で検定し得るためには、操作が簡単で、しかも得られた結果が、既に知られている実験情報と一致したものでなければならない。哺乳動物細胞を用いる検索法は、細菌における程確立されていない。

本邦では昭和50年、食品衛生調査会の添加物、毒性合同部会によって、「食品添加物などの遺伝的安全性検討の暫定基準」がまとめられた（薬局、26, 115, 1975）。これは、AF2の変異原性に関する検討を行う過程で作成されたものであり、本邦における衛生行政における化学物質の取締規範として固定されたものではないが、その基本的考え方として次の様なことが上げられている。

1) 化学的に異なった化合物の突然変異性検定に万能的に適用できる方法はなく、各種の方法をいくつか組み合わせて用いる必要がある。この場合、被検物質の利用度、人体に取込まれる量、代替物の有無、社会的重要性などに応じて、採用すべき検定方法の種類を増していくものとする。

2) 人体への影響を考慮するにあたって、当然のこ

とながら、哺乳動物における検定結果を重視するものとする。

3) 被検物質の投与形式は、その物質が人体内に摂取される形式に即して定められるべきである。しかし、安全性の評価にあたっては、これによらない検定資料も考慮に入れる必要がある。

4) 安全性評価に際しては、人体への1回の摂取量、使用頻度、特に総摂取量等に応じて厳格度を定めるものとする。

本基準では、突然変異性の検定法として、まず、細菌による変異誘導試験を第一次スクリーニングとし、更に、哺乳動物の培養細胞による染色体異常試験、ショウジョウバエによる伴性劣性致死試験、あるいは、カイコの特定位法による劣性可視突然変異の検定などを第二次スクリーニング試験としてあげている。更に、安全性の評価にあたっては、動物個体を用いるその他の試験法が必要とされている。

本小集会では、哺乳動物細胞を用いるスクリーニング法に関する問題点を討議した。この分野に関心を持たれる方々は意外に多く、約30人位の方々が集まり、夜11時まで熱心な討議がなされた。

以下は話題提供者の要旨を中心とし、当日討議された内容を含めて世話人がまとめたものである。

(I) 染色体異常誘発試験の問題点

1. 培養細胞を用いる染色体試験

石 館 基, 林 真, 沢田 稔, 金子厚子
(国立衛生試験所薬品病理部)

チャイニーズハムスター肺由来の線維芽細胞 (CHL) を用いる。当細胞は染色体数が少ない上、培養が容易で、しかも、薬物に対する感受性が他の細胞系に比べて高いなどの利点を持っている。径6cmのシャーレに 2×10^4 ケ細胞を培養し、3日目に検体を加える。検体の溶媒には、生理食塩水、エタノール（最終濃度 1.0% 以下）あるいは DMSO（最終濃度 0.5% 以下）を用いる。検体を加えた後、更に 5% CO_2 条件下で培養し、24, 48 時間目にそれぞれ、コルセミド処理後、トリプシンで細胞を剥して、通常の如く染色体乾燥標本作製する。

加える検体濃度は、細胞増殖を 50% 阻止する濃度を中心として 2 倍希釈し、計 3 濃度を用いる。一濃度につき、100 ケ観察し、gap, break, exchange, ring 等を記録する。既に 200 余種の化学物質について検索を行い、その一部 (134 種) の結果については既に *Mutation Res.* 48 (1977) 337—354 に発表した。これによると、細菌 Ames 試験で陽性を示した物質の殆ど全てが陽性を示した。ただし、動物で既に癌原性が知られている物質のあるものでは陰性を示した。そこで実験法を改良し、ラット肝マイクロゾーム (S-9) を併用するシステムを取り入れた。細胞を浮遊状態のまま、検体と S-9 Mix と共に 3 時間振盪し、更に、シャーレ上で 24 時間培養した後、染色体標本作製した。この方法によって、上記直接法では陰性であったジアルキルニトロサミン系化合物、あるいは、キノリンなどが陽性を示した。この場合、染色体異常の多くは、exchange 型のものである。

細菌に変異原性を示さないが、染色体異常を誘発す

るものがわかった。食品添加物として知られるサッカリン、カフェイン、安息香酸ソーダや、医薬品のバルビタール、フェナセチン、アセトアミノフェンや、その他の化学物質として、4-アミノキノリン-1-オキサイド、ニトログアニジンなどである。また、従来、発癌剤として知られているウレタンや、スチルベスチロールなどもこの部類に属する。カフェイン及びフェナセチンは最近その発癌性が問題となっている。

＜問題点＞

- (1) 染色体異常のうち gap と break との判別が難しい。また、物質の作用機序と、染色体異常型の種類との相関についての究明がみられている（外村）。AF2 あるいは、4 NQO などでは、染色体異常はさほど顕著に現れてこない。この点紫外線型修復と関係があるのかも知れない（石館）。
- (2) 検体によって、細胞死直前に染色体異常を誘発するものと誘発しないものに別れる。特に、細胞毒性が高濃度 (5mg/ml 以上) で出現する場合には DNA に及ぼす直接的損傷よりも、細胞内ライソゾーム系を通じての間接的損傷による可能性もある（石館）。
- (3) 染色体異常そのものは変異原性の有無を決定するものではない。実際に、異常を起こした細胞が生存し、変異細胞として増殖し得るかについては、別の実験系を組まなければならない。従って、染色体試験で陽性のものの方が、細菌による突然変異陽性のものより、多く、より広い範囲にわたって出て来る可能性がある（武部）。

2. ラット骨髓細胞を用いた in vivo の細胞遺伝テスト

杉山武敏, 島津 肇, 後藤恵子
(神戸大学病理学教室)

in vivo の染色体切断を指標とするテスト系については、その重要性にもかかわらず、in vitro の系程、系統的に検討されていない。1972年に特別委員会が国際的な標準法試案がだされている。この方法は、マウス、ラット等の小型哺乳動物に常用量、最大量、及び中間量の薬剤を投与し、6, 24, 48 時間後の骨髓における染色体切断の頻度を調べる急性テストと5日間投与の後、6時間後に調べる亜急性テストの二つのテストより成る。この方法は、今日の薬剤の細胞遺伝テストの基本プログラムとして、特に、医薬品のテスト等には基準とすべき方法であるが、実際に一つのサンプルに92匹の動物を検査する必要があるため、数限りない環境変異原の予備検定法としては少なからず非能率的である。

我々は、ラットを用いて多くの典型的な変異原、癌原物質の投与実験をした。物質によって染色体切断は早いもので、3時間から遅いもので24時間にピークを示すことから、6と18、又は24時間の2時点テストで一応の成果が得られること、 10^{-2} ~ 10 moles/kg の範囲で陽性を示すことから上記2時点での投与量で検討することを考えた。

また投与する物質の溶解性が多様であるため、DMSO や油、アルコールも用いられており、且つ、投与ルートによっても吸収のスピードが異なるため、我々は、溶解性の如何にかかわらず様に生理食塩水に溶解、あるいは懸濁して腹腔に投与する方法を取ってみた。この方法で、芳香族炭化水素の様な不溶性のものも十分に検出可能であることが明らかになり、発癌性と平行関係を示した。この場合、陽性の判定には、(1)3%以上の中期細胞で染色体切断、gap をみること、(2)dose-response 関係が明らかであるという2点を考慮した。

しかし、発癌性が陽性であってもこの系でどうして

も検出出来ないものがあった。これは、アゾ色素、ナフチルアミン、2-AAF、等の肝、尿路系に癌を誘発する物質であり、ラットの骨髓細胞を用いる検出系では、わずか16.7%の陽性率を示すにすぎなかった(表1)。

表1 ラット骨髓細胞における染色体異常誘発能

A. 皮膚・乳腺・胃・骨髓・耳道・腔に 発癌性のあるもの		染色体 切断能
7,12-DMBA		+
Benzopyrene		+
4-Acetylaminobiphenyl		-
4-Dimethylaminostilbene		+
Butylnitrosourea		+
N-Methyl-N-nitrosourea		+
N-n-Butyl-N-nitrosourea		+
Ethynylestradiol		+
AF-2		+
Nitrofurazone		-
4 NQO		+
9/11(=81.8%)		
B. 肝臓・膀胱に発癌性のあるもの		
2-Acetylaminofluorene		-
4-Aminobiphenyl		-
Dimethylnitrosamine		+
β -Naphthylamine		-
Butylbutanolnitrosamine		-
Di-n-Butylnitrosamine		-
β -BHC		+
γ -BHC		-
4-Aminoazobenzene		-
3'-Methyl-4-DAB		-
3-Hydroxyanthranilic acid		-
dl-Ethionine		-
2/12(=16.7%)		

<問題点>

- (1) 投与法に関するもの。DMBA の場合では油溶性であるため、投与ルートによって結果は100倍も異なる場合がある。投与法は本来その検体が投与されるべきルートで行うべきであるが、スクリーニングとして、その検体が陽性であるか、陰性であるかを問題にする時には、腹腔内で統一する考え方も可能である(杉山)。
- (2) 投与した検体が果たして骨髓まで到達しているかが問題である(近藤)。これには、アイソトープによる追跡が必要である。骨髓細胞のみならず他の臓器組織の染色体が観察出来る様な手法の開発が望まれる(乾)。
- (3) 動物種差の問題。一般にラットの方がマウスよりも感受性が高い様である(杉山)。
- (4) 染色体異常と SCE とは機構が違う。従って、結果は必ずしも平行しない。ただし、一般に SCE はかなり低い濃度でも出現するが、使用した BUdR 自身の染色体に及ぼす影響も考慮に入れる必要がある(石館)。
- (5) 骨髓細胞の代りに人間で行われている様に末梢血リンパ球を用いる方於ても可能ではあるが、一般に、ラットでは PHA による幼若化がかかりにくい点に問題がある(外村)。

従って、ラット骨髓細胞を用いる in vivo 系では、皮膚、乳腺、胃、骨髓、耳道、腔等に発癌をつくる物質について81.8%の陽性率を示し、肝、尿路系に発癌性を示すものは別に活性化等を考慮せねばならないと考える。現在の所、in vivo の活性化系は充分実用の域に達していない。

なお、最近採用されつつある in vitro 系、姉妹染色体交換(SCE)の実用的方法について教室の後藤らの方法を紹介する。

1. 骨髓細胞をチミジンを含まず、BUdR (2 μ g/ml) を含む F-12 培地で26時間 (2 cell cycle) 培養
2. 染色体標本を作製
3. 水洗
4. 10^{-5} M Hoechst 33258 で染める (15分)。
5. 水洗の後、pH 8.0 の McIlvaine buffer で封入
6. 50℃の標本伸展板上でブラックライト (東芝、ナショナル、FL 15 BLB・2本 5cm 間隔、5cm距離) で30分照射
7. 水洗
8. 2%ギムザ液 (pH 6.8, 0.01M リン酸 buffer) で15分間染色

この方法は、染色体標本を70℃以上に加熱しない系としては最も speedy で再現性がある。

(II) 体細胞変異誘発試験の問題

1. 哺乳動物の培養細胞による突然変異検出

黒 田 行 昭
(国立遺伝学研究所)

哺乳動物の培養細胞を用いて化学物質の遺伝子突然変異誘発作用を調べる方法は、Chu および Malling (1968) の研究以来、多くの改良がなされてきたが、なお多くの問題点が残されている。

よく用いられているマウス、ハムスターなどの実験動物の培養細胞に比べて、ヒトの培養細胞は体外培養条件下でも生体内の細胞と酷似した機能や増殖の様式を持ち、得られた結果を評価する際の利点とともに培養技法上の問題もまた多い。ここでは、この様な哺乳動物の培養細胞を用いた遺伝子突然変異検出の際の種々の問題点と、その改良法とともに、エジンバラで開催された第2回国際環境変異原学会での報告や討議をあわせて話題提供を行いたい。

1) 劣性遺伝的マーカーの問題点

これまで多く使用されてきた薬剤抵抗性や栄養要求性の遺伝的マーカーは、劣性であるため、ヘテロでは表現型として発現しない。このため、Lyonization を利用した伴性の遺伝的マーカーや、ヘテロの細胞、あるいは復帰突然変異などが使用されている。しかし、なお、モノソミーや半数染色体細胞などの開発も望まれる。

また、各種の遺伝マーカーの間で突然変異誘発についての感受性の相違のあることが報告されており、この問題は今後さらに検討が必要である。

2) 代謝協同の現象 (Metabolic cooperation)

培養条件下の細胞は、隣接細胞同志の接触によって、細胞相互の物質の移動が起こり、酵素欠損細胞の表現型が発現しないことが知られている。これをさけるため、再播種法 (replating method) の使用が望まれる。コロニー形成ではなく、単一細胞レベルでの突

然変異細胞の検出法の開発が望まれる。

3) 突然変異発現時間 (Expression time)

化学物質によって誘発された突然変異が表現型として発現するまでの時間は、化学物質の種類、遺伝的マーカーなどによって異なる。

4) 突然変異形質の安定性 (Stability)

得られた薬剤抵抗性、栄養要求性が真の遺伝子突然変異に基づくもので、その性質が安定であることが要求される。このためには、その遺伝的マーカーに随伴する酵素の活性や化学的性質、細胞の継代を続けた場合の安定性などをチェックする必要がある。

5) 変異原物質の活性化 (Metabolic activation)

変異原物質の中には活性化が必要なものがある。この様な物質に対しては、肝ミクロゾーム分割 (S-9) や Co-factor の使用が試みられているが、代謝活性化酵素を持つ培養細胞の使用や実験動物を用いた host-mediated assay の使用などが考えられる。

<問題点>

- (1) 本法は殺菌力のある抗生物質などのスクリーニングに適用されよう。細菌の変異原性が陰性の場合でも、この方法で陽性となる可能性がある。金属などの影響も同様である (黒田)。
- (2) 変異の発現には細胞分裂が必要である。検体投与によって細胞周期がどの位延長するかについて考慮する必要がある (梅田)。
- (3) 変異形質の安定性のチェックをいつまで続けられようかについては特に定説はない (黒田)。

2. 培養内悪性化試験法

梅 田 誠
(横浜市立大学医学部)

哺乳類の培養細胞を用いて発癌性をスクリーニングする方法は、動物実験に比べ短時間で能率よく検出出来る可能性があるため、その開発、一般試験としての適用が望まれている。しかし、今迄に発表されている方法には、名人芸的な要素が存在したり、判定に困難さがつきまったり、また再現性に問題がある。

今迄に報告されている培養細胞による発癌性試験法は、3つに大別される。その第1は、正常のハムスター胎児由来細胞などを試験物質で処理した後、継代を重ね、細胞が悪性化するのを待つ方法である。細胞が悪性化するには早くても40日、通常は3カ月以上を要し、しかも無処理の細胞も4カ月を過ぎると自然悪性転換を起こし易い。すなわち、手間と時間のかかる割に問題があり、実用的な方法とは言えない。

第2は少数細胞を播き、コロニーを形成させる方法であるが、試験物質処理により形成されるコロニーの形態が、piling up, criss-cross などの悪性形態を示すのを調べる方法である。ハムスター胎児細胞の場合は、X線を照射した feeder 細胞を使用する。また3T3細胞でこの方法で成功すると報告されている。この方法は約10日間で結果が出る大いに魅力的な方法である。しかし悪性転換率が低いこと、一群でシャーレを20~30枚使わねばならないこと、無処理でも時に悪性形態コロニーが出現し易いこと、コロニー形態に移行があるためその判定が難しいことなどの問題がある。

第3の方法は、2の方法より多数の細胞を播き、試験物質処理後継代せずに培地更新のみを続け、4~6週後に形成される悪性形態、細胞増殖巣の出現をみる方法である。C3H マウス前立腺由来の細胞、3T3、10T 1/2 細胞など、接触阻害を示す細胞が用いられている。この方法は第2の方法と比べ、判定がより容易である利点はあるが、時間がかかること、実際に手がけてみると、接触阻害を示すような細胞を継代維持することの困難さなど、案外、実験がスムーズに行かないことがある。

<問題点>

- (1) 米国の Pienta は、第2の方法の変法として、シリアン・ハムスターの冷凍保存胎児細胞を用いる方法を提唱している。彼によると、胎児14日目の細胞を feeder とし、X線5000Rを照射し、24時間後その上に胎児13日目から得られた標的細胞500コを播く。特に、標的細胞は、予め、発癌剤に高い感受性を示したものを保存しておく。翌日検体を加え、8日間培養した後、固定し、ギムザで染色した後、正常のコロニーと悪性化したと思われるコロニーとを形態学的に判定する (梅田)。
彼の方法によると、約10日で判定が可能であり、しかも、その結果を見ると、検体の発癌性とかなり高い相関性があると言う。しかしながら、実際のデータを見るとかなりの問題があるように思われる。まず、コロニーの形態の判別に客観性があるか否か。第2に形態変化を起こしたと言う変異コロニーの数は極めて少なく、統計的にも問題が少なくない。第3に、そのコロニーの全てが果たして動物に腫瘍を形成するに至るかと言うこと。などをあげることが出来る (石館)。これらの点につき、なお、再吟味が必要であろう (梅田)。
- (2) 一般に in vitro における細胞悪性化試験は、発癌過程の解析には有用ではあるが、最終的には動物体内に復元して、実際の造腫瘍性を確認する必要がある。動物体内で腫瘍が形成されるまでの期間を含めるとかなり長く、変異原性試験としては、第一次としてよりも第二次的試験に属するものと思われる (乾)。
- (3) 本法は発癌過程の解析のみならず、制癌剤その他を用いる抗発癌性の試験などにも応用することが出来る (梅田)。

3. 化学物質の経胎盤投与による変異原検出法

乾 直 道
(生物実験センター)

妊娠11~12日目のハムスターに、経口あるいは、腹腔内注射で化学物質を投与する。化学物質投与後24時間目に母体より胎児を摘出、全胎児をトリプシン分散後培養する。培養開始後48~72時間後に、細胞 5×10^5 /dish (直径 6cm) を8-アザグアニン (10, 20 μ g/ml), あるいは、ウワバイン (1mM) を含んだ液に再播種し、更に15~30日間抵抗性細胞の選択培養を行う。選択培養終了後、シャーレを固定、染色し耐性細胞の算定を行う。

一方、残余の細胞は単層培養に達する迄、培養を継続した上、 $0.5 \sim 1 \times 10^4$ cells/dish の割合で細胞をシャーレに再播種し、1週間培養後、シャーレを固定、染色し、Transformed Colony の同定に供する。

上記手法における基礎的研究はAF₂を使用して詳細に行われてきたが、現時点でのその適用範囲は、ニトロ化合物 (DMN, Nitrosomorpholine 等), 芳香族炭化水素 (3-MC, BP), 芳香族アミン (2 AAF, 2.7 AAF), アゾ色素 (3'M-DAB), 4 NQO, ニトロフラン, ワラビ毒等である。一方他の系で変異原性、癌原性の著明であるメチルニトロソ・シアナミド (MNC) には本系の適用はできなかった。重金属, タバコタール等にもこの系の適用は難しい。次の点が問題として残っている。

- 1) 活性化体の half life span の極端に短い物質。
- 2) 動物あるいはその胎児に非常に急性毒性の強い物質。

<問題点>

- (1) 本法では、細胞突然変異、染色体異常、及び、コロニー形態異常など3種の試験を同じ材料で同時

に比較することができる。薬剤が胎盤を通過するかどうか問題である。胎児細胞の臓器による差を検討するのも重要で、肝臓の線維芽細胞に最も高い感受性があるようである。(以上乾)。

- (2) in vivo を用いる試験では常に問題になることであるが、母親に投与した薬剤がどの程度胎児に及んでいるかを見極める必要がある。薬剤が到達していないために陰性になる場合には、真の陰性とは言えなくなる。(以上外村)。

おわりに

変異原性あるいは癌原性の検索のために哺乳動物培養細胞を用いる人々は年々増加する傾向にあり、その手技に関しても多種多様を極めている。時間の都合上、本小集会ではこれらを全て網羅するわけにはいかなかった。たとえば、人間末梢血リンパ球を用いる方法は、労働衛生管理のモニタリング、治療に用いた薬物あるいは放射線の副作用のチェックにも役立つ。BUdR を用いて姉妹染色分体交換 (SCE) を指標とする検索も行われている。通常の染色体異常と SCE との相関性、あるいは定量性とその評価についてはなお検討を要する。

最後に、本小集会を通じ、活発な討論によって御協力をいただいた諸氏に御礼を申し上げるとともに、染色体異常その他細胞遺伝学的事象にかかわり、多くの助言を賜った医科歯科大学・外村教授に深く感謝し上げる。また、この有意義な討論の機会を企画して下さった、本学会世話人・近藤宗平教授の御好意、並びに、そのための準備に労をとられた武田薬品の諸氏に厚く御礼を申し上げる。

Jems News

No. 10

1978年1月1日

日本環境変異原学会

先号は1977年6月10日に発行しましたが、今回は1978年1月1日から学会として改組されることになり、その最初のお知らせとしてその後の状況などを以下記します。

日本環境変異原研究会の第6回研究発表会は、昭和52年9月16(金)、17(土)の両日にわたり、大阪府吹田市(武田薬品研修所)で行われました。9月16日午後に総会が開催されましたが、それに先立って、同日の午前に第11回評議員会が行われました。この評議員会で了承された事項のすべてが総会で承認されましたので、これらを整理して以下に記します。

第11回評議員会について

日時・所 昭和52年9月16日午前10~12時
吹田市(武田薬品研修所)

1. 出席者(アイウエオ順・敬称略)
岩原繁雄, 賀田恒夫, 梶原 弘, 黒田行昭
近藤宗平, 白須泰彦, 田島弥太郎, 滝沢行雄
土川 清, 外村 晶, 早津彦哉
2. 欠席者(アイウエオ順・敬称略)
遠藤英也, 斉藤 守, 杉村 隆, 菅原 努
西村秀雄, 村上氏廣, 山口彦之, 吉田俊秀

第11回評議員会および昭和52年度総会における
報告事項と議事

昭和52年度総会について

日時・所 昭和52年9月16日午後15:20~16:00
吹田市(武田薬品研修所)

なお、議長として梶原評議員がこれに当たった。

報告事項

会長報告: 田島会長より以下報告があった。

1. 本研究会は設立されてから本年度で5年となり、会の規模、内容とも充実してきた。今後、学会として組織したい。

2. この夏、7月11~15日にエジンバラで第2回国際環境変異原学会があり、日本からも十数名の参加者があって盛況であった。次の第3回会議は日本が行うことになったので、会員諸氏の御協力を得たい。

3. 国際 EMS 連合の新役員に、会長として P. Oftedal, 副会長として Y. Tazima 庶務幹事として B. J. Kilbey, 会計幹事として S. Wolff の諸氏が就任した。

4. ICPEMC (International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens) が本年より、F. H. Sobels 博士を会長として発足し、国際的に環境中の突然変異原、癌原の評価、許容基準の設定などの作業に当たることになった。(詳細は Mutation Research 誌 46 (1977) 311~312 を参照)

庶務報告

賀田庶務幹事より以下報告された。

1. 現在の会員数は、A会員111名、B会員131名、計242名である。
2. 本研究会を学会に組織替える件に関して、前回評議員会の申合せに基づいて、遺伝研所属の

評議員で学会会則案をまず作製し、これを評議会、総会に提出することとした。

3. 次期の役員の推薦投票を実施、終了した。

会 計 報 告

黒田会計幹事より以下報告された。

1. 昭和52年度予算ならびに9月14日現在の収支は表1の通りである。
2. 昭和51年度収支決算および昭和53年度予算に関しては後に議事として承認を求める。

協 議 事 項

1. 会計の決算および予算について
昭和51年度収支決算について表2の通りであることが報告され承認された。昭和53年度予算に関しては表3の案が提案され、そのまま承認された。
2. 次の第7回研究発表会の開催地に関して協議した結果、三島市で行うことが了承され、同地区の評議員がその世話をを行うこととなった。

3. 評議員、役員の改選について
次期の評議員候補の推薦、投票（9月3日締め切り）の集計に関しては、田島会長より依頼された土川清、天野悦夫の両会員によって開票され、その結果を土川評議員より付表の通り報告された。

会則では、評議員の規定数は15名であるが、第15、16位の得票は同数であり、会長指名者を含む現評議員の総数は16名であることを考慮し、評議会として総会に対して16名を推薦し承認を求め、これがそのまま承認された。

次期会長候補者に関して意見を交換した結果、評議会は杉村隆評議員を総会に推薦しこれが承認された。なお、同氏は現在在米中であるので、帰国をまって田島現会長から正式受諾を要請することとし、その上であらたに庶務、会計両幹事の委嘱を行う手順になるので、それまで現幹事が仮に事務を引続き行うこととなった。

（附記）11月4日、田島会長は国立がんセンターに杉村隆評議員を訪ね、評議員会の議にもとずき会長就任を要請、承諾を得た。

4. 学会への改組について

以前より作業を進めてきた学会会則案に関して評議員会で検討したうえ、これを総会に提出し、その大要が承認された。なお字句的な細部に関しては、杉村氏の帰国以後に予定されている学会の発足作業を行う新評議員会に一任することとした。

（学会会則に関しては、その後11月28日に行われた新評議員会の議事録を参照のこと）

日本環境変異原研究会第12回評議員会記録

日時 昭和52年11月28日(月)16～19時

所 三島市 田代グレル

出席者（アイウエオ順・敬称略）

石館 基、賀田恒夫、菊池康基、黒田行昭、
近藤宗平、白須泰彦、菅原 努、杉村 隆、
田島弥太郎、土川 清、外村 晶、
西岡 一、早津彦哉、松島泰次郎

欠席者

岩原繁雄、遠藤英也

協 議 事 項

1. 役員について

杉村会長は、学会発足（昭和53年1月1日を予定）に当たり、庶務幹事に賀田評議員を、会計幹事に黒田評議員を委嘱した。その任期はあらたに施行される学会会則によることとする。会計監査には、梶原彊会員および滝沢行雄会員を委嘱したいむね表明された。

2. 学会への改組について

前回の総会（9月16日、吹田市）でその大綱が承認された日本環境変異原学会会則案についてさらに検討し、その最終案を作製した。あらたに賛助会員を設けることとした。さらに字句などの点の再吟味した後、全評議員の通覧を得たものを、昭和53年1月1日に予定される学会発足とともに施行することとする。

3. 第3回 EMS 国際会議（1981年日本で開催を予定）の準備について意見の交換を行った。当面次の8人委員会（会長を含め9人）を設けて検討を始めることとした。杉村会長および（以下敬称略・アイウエオ順）石館、賀田、黒田、田

（付表）

JEMS 次期評議員推せん投票結果

1. 賀 田 恒 夫	9. 土 川 清
2. 田 島 弥太郎	10. 外 村 晶
3. 近 藤 宗 平	11. 西 岡 一
4. 杉 村 隆	12. 遠 藤 英 也
5. 石 館 基	13. 岩 原 繁 雄
6. 黒 田 行 昭	14. 菊 地 康 基
7. 早 津 彦 哉	15. 菅 原 努
8. 白 須 泰 彦	16. 松 島 泰次郎

島、外村、西岡、早津および松島の各評議員。

4. 次回の研究会について、三島地区の評議員に対して種々要望がなされた。
5. ニュースなどの充実について
学会としての発足を機として、「環境変異原研究」と題する和文誌を前回の研究発表会の特集として近藤評議員を中心として編集し、全会員に配布することとを申し合わせた。

表 1 昭和52年度予算並びに収支中間報告書（昭和52年9月14日現在）

日本環境変異原研究会会計幹事 黒田 行 昭

収 入

摘 要	予 算 (円)	中間報告 (円)
1. 昭和52年度会費(1,000円)	200,000	228,000(228人)
2. 昭和51年度会費(1,000円)	20,000(20人)	16,000(16人)
3. 52年度 Mut. Res. 購読料		
(1) Environm. Mut. (6,100円)	628,300(103人)	646,600(106人)
(2) Rev. Genet. Toxicol. (6,100円)	347,700(57人)	317,200(52人)
(3) Env. Toxicol. Test. (6,100円)	353,800(58人)	335,500(55人)
(4) Mut. Res. Complete	100,650(1人)	
4. 昭和52年度JEMS Royalty	75,000	81,262
5. 昭和51年度 Mut. Res. 購読料		
(1) Environm. Mut. (5,600円)	22,400(4人)	16,800(3人)
(2) Rev. Genet. Toxicol. (5,600円)	16,800(3人)	11,200(2人)
(3) Environm. Toxic. Test. (5,600円)	16,800(3人)	5,600(1人)
(4) Mut. Res. Complete	97,293(1人)	97,293(1人)
6. 昭和53年度購読料一部前納金		18,300
7. 昭和51年度繰越金	198,404	198,404
8. 利 息	2,000	12,593
合 計	2,079,147	1,984,752

支 出

摘 要	予 算 (円)	中間報告 (円)
1. 昭和52年度 Mut. Res. 購読料		
(1) Environm. Mut. (52Df1)	628,300(103人)	623,793(106人)
(2) Rev. Genet. Toxicol. (52 Df1)	347,700(57人)	342,142(59人)
(3) Env. Toxic. Test. (52 Df1)	353,800(58人)	348,042(59人)
(4) Mut. Res. Complete(86 1Df1)	100,650(1人)	97,680(1人)
2. 昭和51年度 Mut. Res. Complete (640 Df1)		70,985(1人)
3. 昭和52年度本部納入金	35,000	31,029
4. 郵便代(通信料, 送金手数料)	100,000	246,637
5. 印刷費(ゼロックス代, タイプ代, 印刷代)	50,000	47,200
6. 消耗品費(文具, 封筒代)	50,000	10,984
7. 会議費(評議委員会経費)	100,000	99,733
8. その他	50,000	4,800
9. 予備費	263,697	0
合 計	2,079,147	1,923,025
差 引 残 額	0	61,727

表 2 昭和51年度収支決算報告書（昭和51年1月～12月）

日本環境変異原研究会会計幹事 黒田 行 昭

収 入	
昭和50年度繰越金	16,234 円
昭和51年度会費(1,000円×183人)	183,000
Mut. Res. 誌購読料	
(1) Environm. Mut. (5,600円×76人)	425,600
(2) Rev. Genet. Toxicol. (5,600円×29人)	162,400
(3) Env. Toxicol. Test. (5,600円×34人)	190,400
昭和50年度会費・購読料未納者入金(23人)	
(A) 5,800円×2人	
(B) 4,800円×1人	37,400円
(C) 1,000円×21人	
昭和50年度 JEMS Royalty	58,355
昭和52年度会費納入金(9人)	9,000
昭和51年度第5回環境変異原研究発表会運営委員会より寄付金	30,000
利 息(4回分)	2,570
合 計	1,114,959
支 出	
Mut. Res. 購読料(①78人 ②31人 ③37人)	753,979 円
EMS 本部納付金(昭和51年度分179人)	26,850
郵便代(通信料, 送金料)	47,520
印刷費(ゼロックス代, タイプ代, 領収書印刷代)	28,835
消耗品費(文具, 封筒代)	4,400
会議費(評議委員会経費2回分)	39,200
その他(通関税, 運送費, タイプ謝礼)	15,771
合 計	916,555
残 金	198,404
昭和51年度繰越金	198,404

表 3 昭和53年度予算書

日本環境変異原研究会会計幹事 黒田 行 昭

収 入	予 算 (円)
摘 要	
1. 会 費	
(1) 昭和53年度(2,000円)	460,000(230人)
(2) 昭和52年度(1,000円)	14,000(14人)
(3) 昭和51年度(1,000円)	4,000(4人)
2. Mut. Res. 誌購読料	
(1) 昭和53年度	
a. Environm. Mut. (12,600円 Vol. 53, 54)	1,335,600(106人)
b. Rev. Genet. Toxicol. (6,300円 Vol. 55)	371,700(59人)
c. Env. Toxicol. Test. (18,900円 Vol. 56, 57, 58)	1,115,100(59人)
d. Mut. Res. Complete(166,725円 Vol. 49～58)	166,725(1人)
(2) 昭和52年度	
a. Environm. Mut. (6,100円)	0(0人)
b. Rev. Genet. Toxicol. (6,100円)	42,700(7人)
c. Env. Toxicol. Test. (6,100円)	24,400(4人)
(3) 昭和51年度 Mut. Res. 購読料	91,385(3人)
3. 昭和53年度 JEMS Royalty	120,000
合 計	3,745,610 円

支 出

摘 要	予 算 (円)
1. 昭和52年度 Mut. Res. 購読料	
(1) Environm. Mut. (107Df1 Vol. 53, 54)	1,335,600
(2) Rev. Genet. Toxicol. (53.5Df1 Vol. 55)	371,700
(3) Envir. Toxicol. Test. (160Df1 Vol. 56, 57, 58)	1,115,100
(4) Mut. Res. Complete (1425Df1 Vol. 49~58)	166,725
2. 昭和52年度本部納入金	40,000
3. 郵便代 (通信料, 送金手数料)	250,000
4. 印刷費 (ゼロックス代, タイプ代, 印刷代)	200,000
5. 消耗品費 (文具, 封筒代)	50,000
6. 会議費 (評議委員会経費)	150,000
7. その他	66,485
合 計	3,745,610 円
差 引 残 額	0

日本環境変異原学会会則

第1条 本会は日本環境変異原学会 (The Environmental Mutagen Society of Japan) と称する。

第2条 本会は人間環境における突然変異原, 特に公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。

第3条 本会の会員は, 正会員および賛助会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し, 環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し, 定められた会費を納入した者, 賛助会員はこの学会の事業を後援し, 定められた会費を納入した個人または法人とする。

第4条 本会に入会を希望するものは, 所定の申込書に記入の上, 本会事務所に申込むものとする。入会の可否は評議員会において決定する。

第5条 会員は毎年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は評議員会において審議し総会において定める。

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し, 学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
2. Mutation Research 誌の特別巻を特価で購入販布する。
3. 国際環境変異原協会に加入し, 国際協力に必要な活動を行う。
4. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次の通り役員および評議員を置く。

会 長 1名, 庶務幹事 1名,
会計幹事 1名, 会計監査 2名
および評議員若干名。

評議員は全会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。

庶務幹事, 会計幹事および会計監査は会長が委嘱する。

この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承認を得て, 評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。

役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

第8条 評議員会は会員を代表し, 事業計画, 経費の収支, 予算決算およびその他の重要事項について審議する。

第9条 本会は年1回総会を開く。総会において会則の改廃制定, 予算・決算の承認, その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。

第10条 本会の事務執行機関は会長および2名の幹事をもって構成する。会長は執行機関の長となり, また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

附 記

1. 本会則は昭和53年1月1日より施行する。
2. 本会は事務所を
静岡県三島市谷田1111番地に置く。
3. 正会員および賛助会員の会費はそれぞれ年額2,000円 および¥20,000円とする。
ただし, Mutation Research 誌の特別巻の配布を希望するものは, 会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

— 編集後記 —

日本環境変異原研究会は発展して学会と改称。それにあまりおくれをとらず「環境変異原研究」の創刊号がやっとなる。表紙は石井裕氏の創作で、白い右上がりの太い曲線が「投与量反応曲線」。印刷の寸前に、杉村隆博士に「米国環境変異原学会賞」が授けられるという朗報がまいこむ。急拠特別記事を加えた編集に改変。本誌は、ずっとまえに評議員会でその有用性を承認され、その発刊の責任をお引うけしていたもの。いろいろの事情でこのようにおくれ、しかもこのような形になりました。私をたすけて、原稿をおよせ下さったのに、いただいた原稿のかなりのをのせなかったし、のせたものも、著者に断りなく短縮・改変し、しかも著者校正をお願いしなかった。諸般の事情を御賢察の上、これらの点御許しのほどお願いします。

編集にあたっては、不馴れな私をよく助けて下さった、石井道子、梁治子、池永満生、石井裕の諸氏に感謝する。本誌の発行は、中富社の上杉豊氏の多大の御骨折りに負う所が多いことを付記して、感謝の言葉にかえる。

目 次

環境変異原研究 第1巻1号 1978年

巻 頭 言	田島弥太郎	1
	杉村 隆	3
杉村隆博士の“米国環境変異原学会賞”授賞	近藤 宗平	4
米国変異原学会の受賞に際して	杉村 隆	6
国立がんセンター研究所、杉村隆所長の変異原性テストによる 癌原物質検出の研究の背景	国立がんセンター研究所・長尾美奈子、佐藤茂秋	7
環境変異原研究の進歩		
九州の大気汚染と変異原性	常盤 寛、北森成治、大西克成	13
大気汚染物質の食用植物の加熱分解物質の 突然変異誘起性について	竹村 望	15
加熱食品の突然変異原性について	上田雅彦、金田好子、間崎真典、田植 栄	17
農薬の変異原性	白須泰彦	19
第6回日本環境変異原研究会		
小集会Ⅰ. 微生物と変異原性試験		
ま と め	松島泰次郎	22
Ames Test に用いられる S-9 の動物種差	宮本純之、鈴木 裕	22
ノルハルマン及びハルマンの補助変異原性	長尾美奈子	24
変異原検出系における菌体の改良に関する提案	平野 光一	26
小集会Ⅱ. 優性致死		
ま と め	土川 清	28
薬物による誘発優性致死と初期胚の染色体研究	菊池康基、一ツ町晋也、山本好一	29
長期投与による優性致死試験法の検討	益淵 正典	30
小集会Ⅲ. 哺乳動物の培養細胞を用いるスクリーニング法に関する問題点		
ま と め	石館 基	34
培養細胞を用いる染色体試験	石館 基、林 真、沢田 稔、金子厚子	35
ラット骨髓細胞を用いた in vivo の細胞遺伝テスト	杉山武敏、島津 肇、後藤恵子	36
哺乳動物の培養細胞による突然変異検出	黒田 行昭	38
培養内悪性化試験法	梅田 誠	39
化学物質の経胎盤投与による変異原検出法	乾 直道	40
JEMS NEWS No. 10	日本環境変異原学会	41
日本環境変異原学会会則		49

昭和53年4月10日 印刷

昭和53年4月15日 発行

発行者 日本環境変異原学会

編集者 近 藤 宗 平

責任者 大阪大学医学部放射線基礎医学教室

〒530 大阪市北区中之島4-3-57

☎ 06-443-5531 電 272

印刷所 中 富 社

〒534 大阪市都島区東野田町5-4-2

☎ 06-928-5621・921-3245