

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

環境変異原研究

第11卷 第1号

1989年

日本環境変異原学会

目 次

昭和63年度学会奨励賞受賞者論文

環境変異原・癌原物質の in vivo 短期評価法の 開発と応用	降旗 千恵	1
環境変異原の酵素的活性化機構の研究	山添 康	13

日本環境変異原学会第17回大会シンポジウム

「発がんに伴う DNA 変化：染色体異常およびがん遺伝子」 細胞のがん化と染色体変化	鈴木 文男 加藤 満雄 二階堂 修	23
染色体移入による造腫瘍性抑制に働く染色体の同定	押村 光雄	35
ヒトがんにおける染色体欠失	横田 淳	41

日本環境変異原学会第17回大会一般演題より

コーヒー煎り豆における 2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-f]- quinoline (MeIQ) の生成とその含量	高橋 伸也 加藤 哲太 菊川 清見	47
ヘテロサイクリックアミンの DNA 傷害作用に対するクロロフィリンの効果 —ショウジョウバエ修復能欠損株を用いて—	根岸 友恵 糸目 千穂 早津 彦哉	53
ダイエタリーファイバーの変異原吸着作用：in vitro と in vivo の比較	蜂谷 紀之 権 太浩 滝澤 行雄	59
ニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示す Salmonella typhimurium TA98, TA100 の新しい誘導株の樹立	渡辺 雅彦 能美 健彦 石館 基	67
癌遺伝子 v-Ha-ras を導入した BALB 3T3 細胞株 (Bhas 42) を 用いる発癌プロモーター検索系の開発	佐々木澄志 田中 憲穂 水沢 博 石館 基	75
無アルブミン血症ラットにおけるアルブミン産生肝細胞の 出現を指標とした体細胞突然変異検出系	落合 雅子 新田 紀子 島 礼 Peter J. Wirth	81
鈴木 美加 杉村 隆 長尾美奈子 長瀬 すみ		

分科会などの報告

哺乳動物試験分科会 (MMS分科会) ニュース	祖父尼俊雄	87
-------------------------	-------	----

日本学術会議だより

付記		
日本環境変異原学会奨励賞受賞者一覧		98

環境変異原・癌原物質の in vivo 短期評価法の開発と応用

東京大学 医科学研究所 降旗 千恵

1. はじめに

環境変異原・癌原物質の第一次スクリーニング法として用いられている Ames らの *Salmonella* テスト系¹⁾ などの in vitro テスト系で多くの変異原性陽性物質が見出されている。しかしながら、これらの“in vitro 変異原物質”を哺乳類個体に投与すると、1) 化学物質の摂取経路による体内分布の違い、2) 標的臓器あるいは細胞での吸収の違い、さらに 3) 代謝活性化、解毒、排泄など多くの要素によって修飾されるため、in vivo で変異原性を示す場合にも特定の臓器でのみ陽性となる“臓器特異性”を示すし、in vivo では変異原性を示さないこともある。それ故“in vitro 変異原物質”が必ずしも“in vivo 変異原・癌原物質”であるとは限らないので、これを確かめる必要がある。in vivo テストを多額の費用と莫大な労力と 2~3 年もの長期間とを要する長期動物実験だけに頼ることは不可能となって來たので、短期間での in

vivo テスト系が必要となって來た。

遺伝子毒性 (genotoxic) 物質が卵子や精子などの生殖細胞に作用すると子孫に遺伝する遺伝的障害となるが、体細胞に作用すると、重要な結果の一つとして、正常細胞が癌化(発癌)する。発癌では、遺伝子毒性 (DNA に対する作用) - 発癌のイニシエーション) も重要であるが、発癌プロモーションも重要であると考えられている。それ故“完全癌原物質”(1種類の化学物質を動物に投与することによって発癌に至らせる化学物質)は、遺伝子毒性のみでなく、発癌プロモーション作用も持つので、両方の活性を測定することが必要と考えるに至った。そこで次に述べる in vivo 短期評価法を開発した。

2. in vivo 短期評価法

図 1 に示すように、遺伝子毒性は、DNA 損傷による DNA 一本鎖切断(アルカリ溶出法)と、切斷

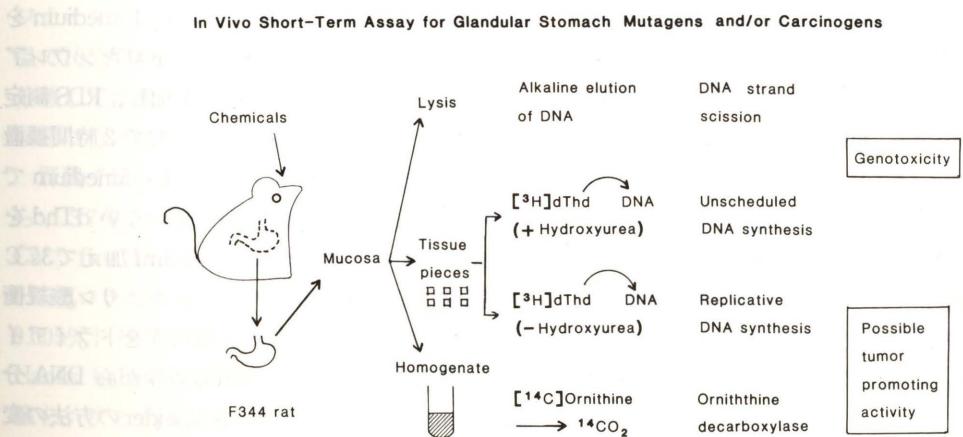


図 1 腺胃における in vivo 短期評価法

後に引き続いて誘導される修復による不定期DNA合成(UDS)とを指標とした。発癌プロモーションはその本態が明らかにされつつある段階で、まだ完全には解明されていないので、DNAに変化を受けた細胞が増殖していくことが発癌プロモーションと関連していると考えて、増殖に伴う複製DNA合成(RDS)と、皮膚発癌の系で発癌プロモーションの指標酵素として用いられたオルニチン脱炭酸酵素(ODC)の誘導とを発癌プロモーション活性の指標とした。

アルカリ溶出法はDNAをアルカリ条件下($pH > 12$)で一本鎖に解離させ、ポアサイズの決ったフィルターから溶出させる。この時にDNAに切断があると、一本鎖DNAの低分子量化により、フィルターからの溶出が早くなる。検出感度は 10^7 ヌクレオチドあたり1切断のオーダーである²⁾。UDSはDNA損傷に引き続いて細胞に誘起される修復DNA合成をさす³⁾。すなわち、変異原物質、化学癌原物質あるいはその代謝活性化物、放射線がDNAを修飾して、それが除去修復で修復される場合に、トリチウムで標識したチミジン(^{3}H dThd)を共存させると、1ヶ所の傷に対し、多数の ^{3}H dThdが取り込まれて、高感度でDNA損傷を検出することが出来る。

RDS検出にも ^{3}H dThdを含む培養液を用いて高感度に検出することが出来る。ODCは細胞増殖因子の一つであるポリアミン合成系(オルニチン→プロレシン→スペルミジン→スペルミン)の第一段階の酵素であり、 ^{14}C オルニチンを基質にして $^{14}CO_2$ の生成を測定することでその酵素活性を調べることが出来る。ODCを指標に用いて多くの皮膚発癌プロモーターがスクリーニングされて見出されている⁴⁾。

実際にこの方法を適用する時には、UDSとRDSとを20頭のラットについて同時に測定することが出来るので、まずこれを調べて、次に補足あるいは確認のためにアルカリ溶出法とODCを用いている。

1) UDSとRDS⁵⁻⁷⁾

1群5頭のFischer(F344, チャールズ・リバー

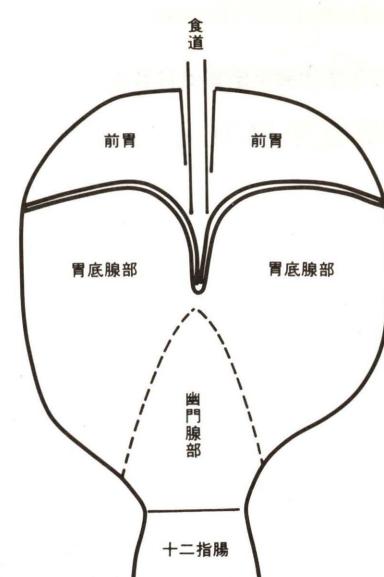


図2 ラットの胃を大脛側で切開した図

社)7~8週令雄ラットを用いた。ラットに胃チューブで試料を投与し、UDS測定には2~4時間後に、RDS測定には16~24時間後にラットを屠殺して個別に調べた。胃幽門腺部粘膜(図2)と大腸粘膜では、臓器を取り出して切り開き、滅菌生理食塩水、次いで培養液で洗った。眼科用ハサミで粘膜を約1mmの幅で細長く切り取り、さらにメスで細かく(約1mm間隔で)刻み、約20mgをL字管に入れた。370kBq/ml [^{3}H]dThd(2~3TBq/mmol)・100 μ g/mlストレプトマイシン・100units/mlペニシリンGを含むL-15mediumを3ml加えた。UDS測定の時にはヒドロキシウレア(HU, RDS阻害剤)を10mMに添加し、RDS測定の時にはHUを添加しないで、37°Cで2時間振盪培養(60回/分)した。2時間後にL-15mediumで一度洗った後、放射能で標識していないdThdを1mMに添加したL-15mediumを3ml加えて37°Cで30分間さらにインキュベートした。リン酸緩衝化生理食塩水で洗った後、組織切片をドライアイス上で凍結した。この凍結組織切片からDNA分画をSchmidt, Thanhauser, Schneiderの方法の変法で抽出した。すなわち凍結組織切片をスピット遠心管型ホモジナイザー(図3)中10%トリクロロ

酢酸(TCA)溶液1mlでホモジナイズして、3000rpm 15分間の遠心分離でTCA可溶分画を除いた。沈澱をもう一度同様の操作で洗った後、沈澱をIN KOH 1.1mlでホモジナイズし、37°Cで一夜インキュベートしてRNAを加水分解した。TCAでDNAとタンパク質分画を沈澱させ、5%TCA 650 μ lでホモジナイズ後80°C、30分加温してDNAを加水分解した。加水分解液上清0.5mlをシンチレーターACS IIに溶かして、液体シンチレーションカウンターで、DNAに取り込まれた [^{3}H]dThdの量を定量した。またDNA濃度は、加水分解液上清20 μ lに2Mの3,5-ジアミノ安息香酸・2塩酸塩(DABA)(東京化成)40 μ lを加え、37°Cで30分インキュベートした後、0.6N過塩素酸(PCA)300 μ lを加え、ミクロセルを用いて、励起光410nm、蛍光510nmで蛍光を測定して求めた。DNA標準試料として、仔牛胸腺DNA 75 μ g/mlを5%TCAで加水分解したもの用いた。

前胃上皮では、前胃(図2)を漿膜ごと切り取り、丸ごとL字管に入れてインキュベートした後凍結した。凍結した前胃を、24mM EDTA・75mM NaCl(pH7.5)で洗い、前胃上皮を片刃のカミソリで削り取り、スピット遠心管型ホモジナイザー外筒管(図3)に入れ、300mM NaCl・30mM EDTA・0.5%SDS(pH10.2)溶液1mlを加え、37°C 5分間インキュベートした後、軽くホモジナイズし、70%TCA 150 μ lを加えて混合し、室温で10分間静置した後、室温で3000rpm 15分遠心分離して沈澱を得た。後の操作は幽門腺部粘膜と同様に行なった⁸⁾。

肝臓では⁹⁾、エーテル麻酔下に、肝臓を門脈から、37°Cの0.5mM EGTA・10mM HEPES・Ca⁺⁺-free Hanks' balanced salt液で、次いで0.05%コラゲナーゼ・10mM HEPES・1%BSA・0.005%トリプシンインヒビター・Ca⁺⁺-Free Hanks' balanced salt液で10~15分間灌流した。肝臓をハサミで細切後ナイロンメッシュとガーゼでろ過して、肝細胞を取った。直径9cmのFalcon組織培養皿に10mlのWE medium・10%FCS・

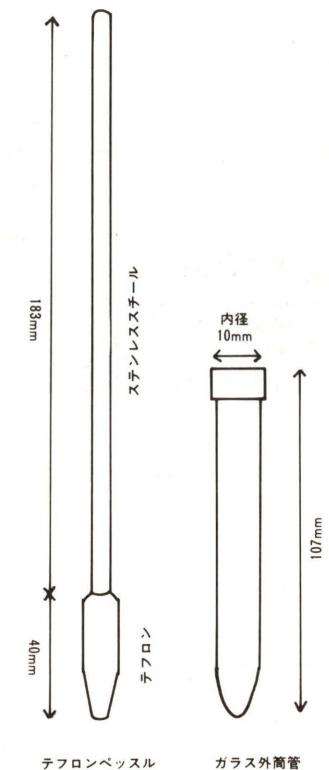


図3 スピット遠心管型ガラスホモジナイザー

0.1IU/mlインシュリン・2.5 μ g/mlファンギゾン・0.1 μ g/mlカナマイシン・370kBq/ml [^{3}H]dThdを入れ、4×10⁶ヶの肝細胞をまいて、95%air-5%CO₂、37°Cで2時間インキュベートした。UDS測定にはHUを10mMに添加し、RDS測定にはHUを添加しない。2時間後に培養液を放射能で標識していないdThdを1mMに添加した培養液に換えて、さらに30分間インキュベートした。肝細胞は低張液(10mM Tris・HCl pH7.5, 2mM MgCl₂)でホモジナイズして750gで5分間遠心分離し、次に10mM Tris・HCl pH7.5, 2mM MgCl₂を含む0.25M蔗糖液でホモジナイズして、0.34M蔗糖液に重層して遠心分離して核分画を取った。核分画からSchmidt, Thanhauser, Schneiderの方法の変法で幽門腺部粘膜と同様にDNA分画を抽出した。

2) アルカリ溶出法

アルカリ溶出法はSinaらの方法¹⁰⁾を改良して胃幽門腺部粘膜に用いた¹¹⁾。あらかじめ1 μ m

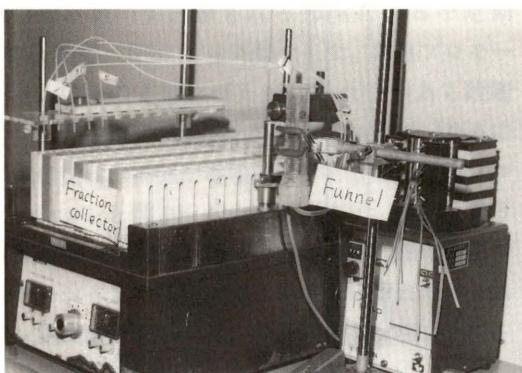


図4 アルカリ溶出法装置。ファネルとポンプとフランクションコレクター。実際には5本のファネルはアルミ箔で被って遮光する。

pore size, 25mm 直径の Fluorinert フィルター (Millipore Ltd.) をはめたファネルに3mlのlysis液 (25mM EDTA・100mM グリシン・2%SDS・1mg/mlプロテイナーゼK, pH9.7)を入れておく。溶出装置全体を図4に示す。溶出装置は黄色の安全灯を取りつけた暗室内に置いた。処置ラットの胃を大脳側で切り開き、滅菌生理食塩水で洗った後、幽門腺部粘膜(図2)から約5mgの粘膜をメスの刃で削り取り直ちにlysis液に入れて1時間暗中で処置した。lysis液を流し出し、洗浄液(20mM EDTA・30mM NaOH)で洗った後、20mM EDTA・94mM tetra-n-propylammonium hydroxide, pH12.1, 30mlで、暗中で、20-25°C, 0.05ml/分で溶出した。3mlずつ10分画取った。溶出液中のDNAはエタノール(95%エタノール・0.15M酢酸ナトリウム・0.055M酢酸)沈澱後、フィルター上に残ったDNAは直接、5%TCA中、80°C, 30分加温して加水分解し、DABAと反応させて、励起光410nm, 蛍光510nmでDNA量を定量した。溶出したDNA量から各点でのフィルター上に残ったDNA量を求めて片対数グラフに表わし、その勾配から溶出速度定数(m⁻¹)を計算した。実験でのDNAの回収率を推測するために、ファネルに入れたのとは別に、同じラットの幽門腺部粘膜約5mgから10%TCA不溶性分画を取り、5%TCAで加水分解後、DABAと反応させ

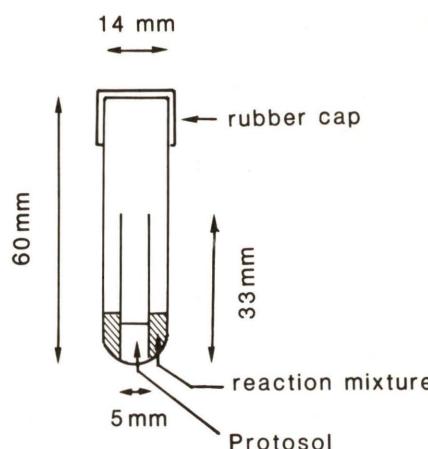


図5 ODC活性測定用二重試験管

てDNA量を定量した。実験での推定DNA回収率が30%以下の場合には、最終データーから除外した。

3) ODC活性^{6, 12)}

3-4頭の処置ラットの胃幽門腺部粘膜をブールして、800μlの50mMリン酸ナトリウム緩衝液・0.1mMピリドキサールリン酸・0.1mM EDTA, pH7.2でホモジナイズした後、16000rpm, 20分遠心分離した上清を粗酵素抽出液とした。L-[1-¹⁴C]オルニチン(2.01GBq/mmol, New England Nuclear)を基質として、二重試験管にゴムキャップを付けて(図5)酵素活性を測定した。すなわち200μlの粗酵素抽出液と、200μlの160mMリン酸ナトリウム緩衝液・0.7mMピリドキサールリン酸・1.6mMジチオスレイトール, pH7.2と、200μlのL-[1-¹⁴C]オルニチン(18.5 kBq・0.2μmol L-オルニチン)とを外管に入れて0.5-1時間, 37°Cで反応させた後、2Mクエン酸300μlを注射器で外管に加えて反応を止めた。さらに30分間インキュベートして、生成した¹⁴CO₂を、あらかじめ内管に入れておいた200μlのプロトゾールに吸収させた。このプロトゾールをトルエン・シンチレーターに溶かして、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

粗酵素抽出液中のタンパク質濃度は Heil と Zilling の方法¹³⁾で、牛血清アルブミン (BSA) を

標準試料として測定した。すなわち2μlの粗酵素抽出液をセルロース・アセテート膜 (Schleicher & Schül, GMBH) に直径6mmの円形に付けて乾かした。0.25%Amido black10B・45%メタノール・10%酢酸水溶液で10分間染色し、45%メタノール・10%酢酸水溶液を3回交換して脱色し、直径6.5mmにくりぬいて試験管に入れ、80%酢酸・10%蟻酸・1%TCA水溶液1mlを加え、超音波発生装置を用いてフィルターを溶かして、630nmの吸収を測定した。

3. 結果

1) UDSとRDS

UDSは化学物質投与2-4時間後のHU存在下でのDNA合成の増加として検出され、RDSは化学物質投与16-48時間後のHU非存在下のDNA合成の増加として検出される。

図6に胃幽門腺部粘膜で3-ジアゾ-N-ニトロソバメタンによるUDS誘起の場合を示す。UDSを誘起する化学物質はRDSも促進する場合が多い。10mM HUはRDSを約95%抑制し、約5%は阻害されずに残る。従ってRDSが促進されるとHUで阻害されずに残るDNA合成もそれに伴って増加する。そこで同じ個体について、+HUと-HUを同時に測定することによって、式1), 2)からUDSとRDSとをおおよそ算出することが出来る。

-HUの場合：

$$[DS(-HU)]_0 + [UDS]_t + [RDS]_t = [DS(-HU)]_t \quad (式1)$$

+HUの場合：

$$[DS(+HU)]_0 + [UDS]_t + k[RDS]_t = [DS(+HU)]_t \quad (式2)$$

(式1) - (式2) より

$$[RDS]_t =$$

$$\frac{[DS(-HU)]_t - [DS(-HU)]_0 - [DS(+HU)]_t + [DS(+HU)]_0}{1-k} \quad (式3)$$

(式2) と (式3) から

$$[UDS]_t = [DS(+HU)]_t - [DS(+HU)]_0 - k[RDS]_t$$

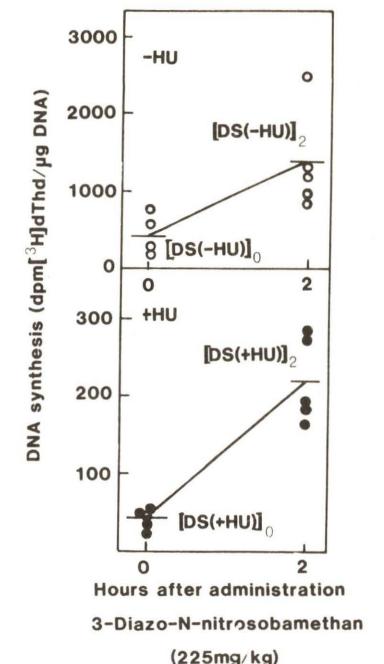


図6 3-ジアゾ-N-ニトロソバメタンによるラット胃幽門腺部粘膜でのUDS誘起

ここで

[DS(-HU)]₀ : 0時間(対照)の-HUでのDNA合成(実測値)

[DS(+HU)]₀ : 0時間(対照)の+HUでのDNA合成(実測値)

[DS(-HU)]_t : t時間の-HUでのDNA合成(実測値)

[DS(+HU)]_t : t時間の+HUでのDNA合成(実測値)

[UDS]_t : t時間の誘導されたUDS

[RDS]_t : t時間の促進されたRDS

k : HUによるRDSの阻害定数

(今までの実験値から幽門腺部粘膜では近似値0.05)

今

$$[DS(-HU)]_0 = 446,$$

$$[DS(+HU)]_0 = 42.6,$$

$$[DS(-HU)]_2 = 1416$$

$$[DS(+HU)]_2 = 220$$

表1 化学物質によるUDS誘導の臓器特異性

化学物質	UDS誘導/腫瘍誘発			
	腺胃	前胃	大腸	肝臓
MNNG	+/+	+/+	+/+	
ENNG	+/+			
PNNG	+/+			
4NQO	+/+		-/-	
NMUT	+/+	+/+		
MNU	±/+	+/+	+/+	
MAMAc			+/+	
2AAF	-/-	-/-	-/-	+/+
DMN	-/-		-/-	+/+
Trp-P-1	-/-			
Trp-P-2	-/-			
IQ	-/-			
NC	-/-			
B [a] P		±/+		
4AAF		-/-		
Pyrene		-/-		

表1 脚注:

MNNG,	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;
ENNG,	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;
PNNG,	N-propyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;
4NQO,	4-nitroquinoline 1-oxide;
NMUT,	N-nitroso-N-methylurethane;
MNU,	1-methyl-1-nitrosourea;
MAMAc,	methylazoxymethanol acetate;
2AAF,	2-acethylaminofluorene;
DMN,	dimethylnitrosamine;
Trp-P-1,	3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido [4,3-b] indole;
Trp-P-2,	3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole;
IQ,	2-amino-3-methyl-imidazo [4,5-f] quinoline;
NC,	nitrosocimetidine;
B [a] P,	benzo [a] pyrene;
4AAF,	4-acethylaminofluorene.

$k=0.05$ をあてはめると

$$[UDS]_2 = 136 \text{ dpm} [{}^3\text{H}] \text{dThd}/\mu\text{g DNA}$$

$$[RDS]_2 = 834 \text{ dpm} [{}^3\text{H}] \text{dThd}/\mu\text{g DNA}$$

となり、UDSもRDSも陽性となる。

表1に16種類の変異原・癌原物質およびその類似体による胃幽門腺部粘膜、前胃上皮、大腸粘膜および肝臓でのUDSの誘導の結果を示した^{5, 7-9)}。なお胃粘膜ではヒトでも実験動物でも幽門腺部粘膜での発癌が多いので、幽門腺部粘膜で調べている。UDSの誘導と発癌の標的臓器とはかなりよく一致した。2AAFおよびDMNは標的臓器の肝臓ではUDSを誘導するが、他の3つの非

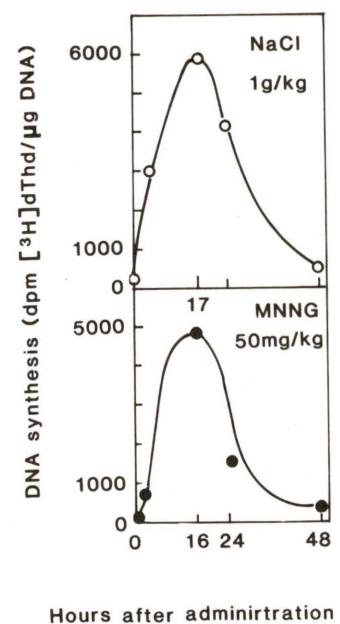


図7 腺胃癌原物質MNNGおよび腺胃発癌プロモーターNaClによるラット胃幽門腺部粘膜でのRDSの促進

標的臓器では数倍から10倍の投与量でもUDSを誘導しなかった。

図7に腺胃癌原物質N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)および腺胃発癌プロモーターNaClによるラット胃幽門腺部粘膜中のRDSの促進を示す。化学物質投与16時間後にRDSは対照の約10倍に増加し、48時間後には元に戻った。RDSは粘膜の増殖帶で観察された^{12, 14)}。今までに明らかにされた腺胃癌原物質、MNNG, ENNG, PNNG, 4NQO, NMUT¹⁴⁾および腺胃発癌プロモーター、NaCl, タウロコール酸ナトリウム¹⁵⁾, グリオキザール¹⁶⁾, ホルムアルデヒド¹⁷⁾, カテコールはすべて胃幽門腺部粘膜に組織傷害を与え、組織修復のために一過性に細胞増殖帶での細胞増殖が増加すると推察している。

2) アルカリ溶出法

図8にアルカリ溶出法で、MNNGによる胃幽門腺部粘膜中のDNA鎖切断を調べた結果を示す。MNNGを体重1kg当たり1~100mg投与して、DNA鎖切断は用量反応性を示した¹¹⁾。体重1

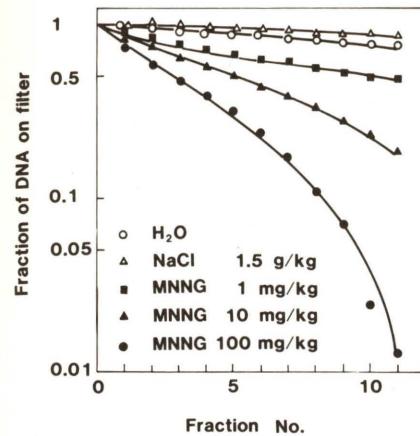


図8 腺胃癌原物質MNNGおよび腺胃発癌プロモーターNaClによるラット胃幽門腺部粘膜でのDNA鎖切断

kg当たり1mg投与では、MNNG 200μg/mlを1ml投与したので、長期動物発癌実験の場合の濃度とあまり変わらない低い濃度で投与したことになる。腺胃発癌プロモーターNaClでは体重1kg当たり0.5~1.5g投与で、DNAの溶出は増加せず、組織傷害を誘起する化学物質による非特異的なDNA鎖切断は無いことが示された。さらに腺胃癌原物質NMUT、変異原物質グリオキザール¹¹⁾、1-ニトロソインドール-3-アセトニトリルなどで陽性となった。肝癌原物質2AAF¹¹⁾、腺胃発癌プロモーターのカテコール、4-メチルカテコールなどで陰性となった。

3) ODC

図9に腺胃癌原物質MNNG¹⁴⁾および腺胃発癌プロモーターNaCl¹²⁾によるラット胃幽門腺部粘膜中のODC活性の誘導を示した。MNNGでは24時間後を頂点としてNaClでは6~9時間後を頂点として、対照の約100倍のODC活性の一過性の誘導があった。

今までに明らかにされた腺胃発癌プロモーター、NaCl、タウロコール酸ナトリウム¹⁵⁾、グリオキザール¹⁶⁾、ホルムアルデヒド¹⁷⁾、カテコールおよび腺胃癌原物質MNNG、ENNG、PNNG、4NQO、NMUT¹⁴⁾はすべて胃幽門腺部粘膜でODC活性を一過性に誘導した。肝癌原物質

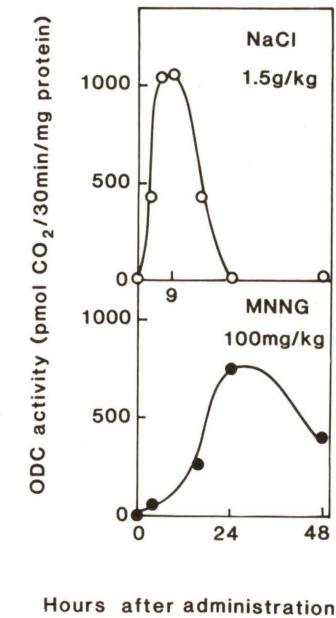


図9 腺胃癌原物質MNNGおよび腺胃発癌プロモーターNaClによるラット胃幽門腺部粘膜でのODC活性の誘導

2AAF、DMN、Trp-P-2、腺胃発癌プロモーターでないエタノールは、胃幽門腺部粘膜でODC活性を誘導しなかった。

4) 腺胃癌原物質の予測

日本では癌死亡者のうち胃癌死亡者が最も多く、世界的にも癌死亡者のうち胃癌死亡者がが多いので、腺胃癌原物質の予測を重点的に行っている。

現在までに“in vitro変異原”で胃幽門腺部粘膜に対して遺伝子毒性と細胞増殖性とを示す物質を5種類と、混合物1種類とを見出した。また“in vitro変異原”ではあるが、胃幽門腺部粘膜に対してはin vivoで遺伝子毒性を示さない物質を2種類見出した(表2)。

葛西らが加熱食品中に存在することを見出した¹⁸⁻¹⁹⁾、直接作用型“in vitro変異原”である3種類のジカルボニル化合物、グリオキザール、メチルグリオキザールとジアセチルとがラット胃幽門腺部粘膜に対して遺伝子毒性と細胞増殖性とを示した^{6, 11, 16)}。このうちグリオキザールは、

表2 腺胃癌原物質の予測

化学物質	UDS	DNA鎖切斷	RDS	ODC	腺胃に対する 癌原性 発癌プロ モーション
	(有効用量mg/kg体重)				
MNNG (既知癌原物質)	+	+	+	+	+
	50-250	1-100	10-100	10-200	
グリオキザール	+	+	+	+	+
	200-400	500-550	150-400	400	
メチルグリオキザール	+		+	+	
	100-500		100-300	200-600	
ジアセチル	+		+	+	
	500-1500		300-1000	500-1500	
1-ニトロソインドール-3-アセトニトリル	+	+	+	+	
	300	500-1000	20-80	40-300	
3-ジアゾ-N-ニトロソバメタン	+		+	+	
	75-225		225	75-225	
ヒッコリー燻液		+	+	+	
		3-4 ml	1-4 ml	2-4 ml	
ヒッコリー燻液+NaNO ₂	+	+	+	+	
	4ml	4ml	1-4ml	2-4ml	
IQ	-				
	77-230				
ニトロソシメチジン	-				
	500-2780				

MNNG をイニシエーターとする二段階発癌実験系で、腺胃癌原物質となることが高橋らによって証明された²⁰⁾。発癌イニシエーター作用についても実験する予定である。

燻製肉と燻製魚も疫学的に胃癌と関係があると言われている。調味料としてアメリカで市販されているヒッコリー燻液(種々のアルデヒド類、フェノール類を含む)をそれのみで、あるいは亜硝酸ナトリウムと同時投与すると、胃幽門腺部粘膜に対して遺伝子毒性と細胞増殖性を示した²¹⁾。

胃内の酸性条件下で亜硝酸との反応で生成されるニトロソ化合物やジアゾニウム化合物が胃癌原物質の候補物質として調べられて来ているが、胃粘膜についてその作用を調べた研究はほとんどなかった。若林らによって白菜などの野菜中に前駆体が見出された²²⁻²³⁾。直接作用型変異原1-ニトロソインドール-3-アセトニトリルと菊川らによって報告された血管拡張剤を亜硝酸と反応させて生成される直接作用型変異原3-ジアゾ-N-ニトロソバメタン²⁴⁾とがラット胃幽門腺部粘膜に対する作用を明らかにした。この2つの

して遺伝子毒性と細胞増殖性を示した²⁵⁻²⁶⁾。

代謝性活性化を必要とする発癌性ヘテロサイクリックアミン、2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]キノリン (IQ) は胃幽門腺部粘膜にUDSを誘起しなかった²⁷⁾。消化管疾患治療薬シメチジンと亜硝酸との反応で生成する直接作用型変異原ニトロソシメチジンは最大耐性用量投与しても胃幽門腺部粘膜にUDSを誘起しなかった²⁷⁾。この2つの化合物は、胃幽門腺部には腫瘍を誘発しないことが明らかになり²⁸⁻²⁹⁾、予測と一致した。

5) 腺胃癌原物質の予測

ヒトの胃癌は長期間を要することから、発癌イニシエーターのみでなく、発癌プロモーターの関与も重要と考えられている。今までに長期動物癌原物質で腺胃癌原物質と明らかにされた6種類の化学物質、NaCl¹²⁾、グリオキザール¹⁶⁾、カテコール、タウロコール酸ナトリウム¹⁵⁾、ホルムアルデヒド¹⁷⁾、K₂SO₄³⁰⁾はすべて、ラット胃幽門腺部粘膜でODC活性を誘導し、RDSを促進することを明らかにした。この2つの

表3 既知腺胃癌原物質によるRDSとODCの誘導と腺胃癌原物質の予測

化学物質	用量 mg/kg 体重	RDS	ODC	腺胃癌 プロモーション
塩化ナトリウム	250-1500	+	+	+
カテコール	10-90	+	+	+
タウロコール酸ナトリウム	400-1200	+	+	+
ホルムアルデヒド	22-110	+	+	+
メタ重亜硫酸カリウム	300-1200	+	+	+
エタノール	2300	-	-	-
酢酸ナトリウム	500-1850	+	+	
L-アスコルビン酸ナトリウム	1700-3400			
炭酸ナトリウム	500-1500			
L-グルタミン酸ナトリウム	2400-3200			
ソルビン酸ナトリウム	1200-2300			
塩化カリウム	1000-1640	+	+	
亜硫酸カリウム	500-1000			
塩化カルシウム	500-1000	+	+	
硫酸アンモニウム	1000-2800			
硫酸マグネシウム	500-1500			
蔗糖	1100-4500			
タウロケノデオキシコール酸ナトリウム	400-1200			
タウロデオキシコール酸ナトリウム	200-1200			
グリココール酸ナトリウム	400-1200	+	+	
グリコケノコール酸ナトリウム	400-1200			
グリコケノデオキシコール酸ナトリウム	400-1200			
グリコデオキシコール酸ナトリウム	400-1200			
タウロリトコール酸ナトリウム	400-1200			

指標を用いて、環境中の腺胃癌原物質の可能性のある化学物質を検索した。

食品添加物として使われている塩類のうち、NaCl以外に5種類のナトリウム塩、2種類のカリウム塩、1種類のカルシウム塩と1種類のアンモニウム塩とが、ラット胃幽門腺部粘膜でODC活性を誘導し、RDSを促進することを明らかにした(表3)³⁰⁾。蔗糖を高濃度投与しても同様の現象が起こらないので³⁰⁾、高濃度の電解質による作用と推定している。

胃潰瘍手術後の胃に胃癌発生の頻度が高いことから、胃手術後に逆流する胆汁が胃癌原物質として作用している可能性が示唆されている。胆汁の1成分であるタウロコール酸ナトリウムがラットを用いた二段階実験胃癌系で腺胃癌原物質であることが明らかにされている³¹⁾。タウロコール酸ナトリウムと他の6種類の胆汁酸ナトリウムを調べた結果、タウロリトコール酸ナ

トリウムを除く胆汁酸ナトリウムが、ラット胃幽門腺部粘膜でODC活性を誘導し、RDSを促進することを明らかにした(表3)¹⁵⁾。

4. おわりに

以上述べたように、このin vivo短期評価法を用いて、実際に、腺胃癌原物質の可能性のある物質、腺胃癌原物質の可能性のある物質を探し出せるようになった。現段階でのin vivo短期評価法として大いに利用価値があると考えている。例えば、癌原物質あるいは癌原物質が見付かった時に、その類似化合物での試験には威力を發揮するであろう。ヒトの胃癌原物質や胃癌原物質も、明らかにされた物はまだごくわずかである。候補物質をin vitro試験法で見出して、そのin vivoの作用を評価する手段としては十分有効と考えられる。実際にこの数年間で50余りの化学物質を試験し、可能性のありそうな物質を重

点的に調べたせいもあって、プロモーターも含めると、約7割が陽性であった。長期動物実験ではこれだけの数の化合物を小人数でこの期間で試験することは不可能である。現段階では最終的にはまだこれらの候補物質を長期動物実験でその作用を定量的に確認していくことが必要と考えている。動物発癌実験は長期間を要するので、手間取っているが、グリオキザールのように、この方法でin vivoの作用が見出された物質が、長期動物実験で作用を確認された例もやっと出始めている。確認の作業が進めば、in vivo短期検索法を長期動物実験の代りに用いる時代も夢ではない。

今までに、腺胃、前胃、大腸、肝臓についてUDSの方法を確立したので、さらに肺、脾臓、食道、膀胱、腎臓、子宮、乳腺など他の臓器についてもこの方法を適用していく必要がある。そうすれば、ある化学物質についてすべての臓器でin vivoで短期検索を行うことが可能になる。

発癌イニシエーションは発癌に関係する突然変異につながるDNAの変化と考えられている。癌遺伝子の点突然変異による活性化なども既に明らかにされている。³²P-ポストラベル法などの高感度法を用いると、発癌の標的臓器でも標的臓器以外の臓器でも色々のDNA付加体が検出される³²。DNA付加体と突然変異の関係についての研究も少しずつ進み、すべての付加体が突然変異に関与するのではなく、突然変異あるいは発癌に関与する特定の付加体があることが明らかになりつつある³³。DNAに変化があることは、発癌の必要条件であるが、十分条件ではない。突然変異および発癌に直接関与するDNAの変化についてさらに研究の進展が望まれるところである。研究の進展に伴って、さらに新しいin vivo短期評価法の開発も可能となろう。

謝 辞

このたびの奨励賞受賞にあたり、助言と励ましをいただきました松島泰次郎先生と、御鞭撻いただきました杉村隆先生と、共同研究者の皆様に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Maron, D. M. and Ames, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.*, 113, 173-215, 1985.
- 2) Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewig, R. A. G. and Friedman, C. A. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry*, 21, 4629-4637, 1976.
- 3) Djordjevic, B. and Tolmach, L. J. Responses of synchronous populations of HeLa cells to ultraviolet irradiation at selected stages of the generation cycle. *Rad. Res.*, 32, 327-346, 1967.
- 4) Fujiki, H., Suganuma, M., Tahira, T., Yoshioka, A., Nakayasu, M., Endo, Y., Shudo, K., Takayama, S., Moore, R. E. and Sugimura, T. New classes of tumor promoters: teleocidin, aplysian toxin, and palytoxin. in *Cellular Interactions by Environmental Tumor Promoters*, H. Fujiki et al. (eds.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/VNU Science Press, Utrecht, pp. 37-45, 1984.
- 5) Furihata, C., Yamawaki, Y., Jin, S. -S., Moriya, H., Kodama, K., Matsushima, T., Ishikawa, T., Takayama, S. and Nakadate, M. Induction of unscheduled DNA synthesis in rat stomach mucosa by glandular stomach carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.*, 72, 1327-1334, 1984.
- 6) Furihata, C., Sato, Y., Matsushima, T. and Tatematsu, M. Induction of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by methylglyoxal. *Carcinogenesis*, 6, 91-94, 1985.
- 7) Furihata, C. and Matsushima, T. Use of in vivo/in vitro unscheduled DNA synthesis for identification of organ-specific carcinogens. *The CRC Crit. Rev. Toxicology*, 17, 245-277, 1987.
- 8) Furihata, C., Takezawa, R. and Matsushima, T. Unscheduled DNA synthesis and total DNA synthesis in rat forestomach stratified squamous epithelium. in *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, eds., Ashby, J., de Serres, F. J., Shelby, M. D., Margolin, B. H., Ishidate, M., Jr., Becking, G. C., Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K., II, pp. 45-47, 1988.
- 9) Sawada, S., Furihata, C. and Matsushima, T. In vivo short-term assays of repair and replication of rat liver DNA. *J. Cancer Res. Clinic. Oncol.*, 115, 345-350, 1989.
- 10) Sina, J. F., Bean, C. L., Dysart, G. R., Taylor, V. I. and Bradley, M. O. Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential. *Mut. Res.*, 113, 357-391, 1983.
- 11) Furihata, C., Hatta, A., Sato, Y. and Matsushima, T. Alkaline elution of DNA from stomach pyloric mucosa of rats treated with glyoxal. *Mut. Res.* 213, 227-231, 1989.
- 12) Furihata, C., Sato, Y., Hosaka, M., Matsushima, T., Furukawa, F. and Takahashi, M. NaCl induced ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121, 1027-1032, 1984.
- 13) Heil, A. and Zilling, W. Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. *FEBS Lett.*, 11, 165-168, 1970.
- 14) Furihata, C., Yoshida, S., Sato, Y. and Matsushima, T. Inductions of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by glandular stomach carcinogens. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 1363-1369, 1987.
- 15) Furihata, C., Takezawa, R., Matsushima, T. and Tatematsu, M. Potential tumor-promoting activity of bile acids in rat glandular stomach. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 32-39, 1987.
- 16) Furihata, C., Yoshida, S. and Matsushima, T. Potential initiating and promoting activities of diacetyl and glyoxal in rat stomach mucosa. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 76, 809-814, 1985.
- 17) Furihata, C., Yamakoshi, A. and Matsushima, T. Inductions of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by formaldehyde. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 79, 917-920, 1988.
- 18) Kasai, H., Kumeno, K., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Nagao, M., Fujita, Y., Sugimura, T., Nukaya, H. and Kosuge, T. Mutagenicity of methylglyoxal in coffee. *Gann*, 73, 681-683, 1982.
- 19) Nagao, M., Suwa, Y., Yoshizumi, H. and Sugimura, T. Mutagens in coffee. *Bunbury Rep.*, 17, 69-77, 1984.
- 20) Takahashi, M., Okamiya, H., Furukawa, F., Toyoda, K., Sato, H., Imaida, K. and Hayashi, Y. Effects of glyoxal and methylglyoxal on gastric carcinogenesis in Wistar rats after initiation with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis*, in press.
- 21) Ohshima, H., Furihata, C., Matsushima, T. and Bartsch, H. Evidence of potential tumour-initiating and -promoting activities of hickory smoke condensate when given alone or with nitrite to rats. *Food & Chem. Toxicol.*, in press.
- 22) Wakabayashi, K., Nagao, M., Tahira, T., Saito, H., Katayama, M., Marumo, S. and Sugimura, T. 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile, a mutagen produced by nitrite treatment of indole-3-acetonitrile. *Proc. Jpn. Acad.*, 61(B), 190-192, 1985.

- 23) Wakabayashi, K., Nagao, M., Ochiai, M., Tahira, T., Yamaizumi, Z. and Sugimura, T. A mutagen precursor in Chinese cabbage, indole-3-acetonitrile, which becomes mutagenic on nitrite treatment. *Mut. Res.* 143, 17-21, 1985.
- 24) Kikugawa, K., Kato, T. and Takeda, Y. Formation of a highly mutagenic diazo compound from the bamethan-nitrite reaction. *Mut. Res.* 177, 35-43, 1987.
- 25) Furihata, C., Sato, Y., Yamakoshi, A., Takimoto, M. and Matsushima, T. Inductions of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 432-435, 1987.
- 26) Furihata, C., Yamakoshi, A., Matsushima, T., Kato, T. and Kikugawa, K. Possible tumour-initiating and -promoting activities of 3-diazo-N-nitrosobamethan in rat stomach mucosa. *Mutagenesis*, 3, 299-301, 1988.
- 27) Furihata, C. and Matsushima, T. Unscheduled DNA synthesis in rat stomach — Short-team assay of potential stomach carcinogens. *Banbury Rep.* 13, 123-135, 1982.
- 28) Takayama, S., Nakatsuru, Y., Masuda, M., Ohgaki, H., Sato, S. and Sugimura, T. Demonstration of carcinogenicity in F344 rats of 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f] -quinoline from broiled sardine, fried beef and beef extract. *Gann*, 75, 467-470, 1984.
- 29) Lijinsky, W. Carcinogenesis studies with nitrosocimetidine. *Bunbury Rep.* 12, 397-401, 1982.
- 30) Furihata, C., Yamakoshi, A., Takezawa, R. and Matsushima, T. Various sodium salts, potassium salts, a calcium salt and an ammonium salt induced ornithine decarboxylase and stimulated DNA synthesis in rat stomach mucosa. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 424-429, 1989.
- 31) Kobori, O., Shimizu, T., Maeda, M., Atomi, Y., Watanabe, J., Shoji, M. and Morioka, Y. Enhancing effect of bile and bile acid on stomach tumorigenesis induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 73, 853-861, 1984.
- 32) Discher, R. M. and Randerath, K. ^{32}P -post-labeling assay for covalent DNA binding in rodent tissues. in *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, eds., Ashby, J., de Serres, F. J., Shelby, M. D., Margolin, B. H., Ishidate, M., Jr., Becking, G. C., Cambridge Univ. Press, Cambridge, U. K. II, pp. 57-60, 1988.
- 33) Dipple, A., Pigott, M. A., Agarwal, S. K., Yagi, H., Sayer, J. M. and Jerina, D. M. Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA. *Nature*, 327, 535-536, 1987.

環境変異原研究11: 13-21(1989)

昭和63年度学会奨励賞受賞者論文

環境変異原の酵素的活性化機構の研究

慶應義塾大学 医学部薬理 山添 康

1. はじめに

我々の環境中に含まれる変異原物質の多くは、そのままの形では不活性であり、生体内で酵素的にいわゆる“代謝的活性化”を受けて生体高分子、特にDNAと反応し、その作用を示すことが知られている。食品の加熱によって生成するヘテロサイクリックアミンは Ames 試験系等で強い変異原性を示すが、その作用が発現するためにはやはり酵素系の存在を必要とする。筆者らはこれらヘテロサイクリックアミンを中心とするアリルアミンの活性化にどのような酵素(系)が関与するのかを知るため下記の研究を行った。その結果、多くのアリルアミンはN-水酸化とO-エステル化の2段階の反応を受けてDNA等と容易に反応する代謝活性体に変換されることが明らかとなった。ここではヘテロサイクリックアミンを中心に2段階活性化に関与する酵素系について、その性質及び特性を概説する。

2. ヘテロサイクリックアミンの酸化的代謝

現在までに15以上の加熱変異原が見い出されており、その構造から α -及び γ -ピリドカルボリン、 α -アミノイミダゾール(アミノアザアレン)、及びその他に区分することができる。

これらのヘテロサイクリックアミンのうち

Lys-P-1等の少数の例外を除く全ての物質は複素環に結合した芳香族1級アミノ部分構造を持っている。筆者らが調べた約10種のヘテロサイクリックアミンはいずれもこの1級アミンの酵素的酸化が活性化に必要であった。すなわち図1に示したIQの例のように芳香族1級アミノ基がN-ヒドロキシアミノ基に変換される。このN-水酸化は肝ミクロソームに含まれるチトクロームP-450によって触媒される。アリルアミンの活性化に関するチトクロームP-450分子種については筆者らの論文及び総説を参照されたい¹⁻⁴⁾。

さて、ヘテロサイクリックアミンの中にはN-水酸化を受けたのちすでに生体高分子を修飾しうる高い反応性を示すものもあるが、その多くはさらに酵素的な変換を受けて、より反応性に富む活性化体に導かれDNAやタンパクと共有結合する。筆者らはこれらヘテロサイクリックアミンが表1に示した少なくとも3種の酵素系によって活性化されることを明らかにしている。

3. アセチル化

(1) N-アセチル化

古くから2-アミノフルオレンや4-アミノビフェニルのような癌原性アリルアミンはアセチルCoA要求性の可溶性酵素によってN-アセタミド

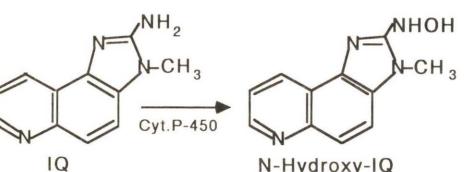


図1 IQのチトクロームP-450によるN-水酸化

表1 ヘテロサイクリックアミンを含むアリルアミンN-水酸化体の活性化系路

反応系路	活性化を受けるアミン
1) O-アセチル化	Glu-P-1, IQ, Trp-P-2, AF, ABP
2) O-スルホ化	Glu-P-1, IQ, AF
3) O-アミノアシル化	Trp-P-2, 4HAQO

表2 肝アセチルトランスフェラーゼ活性の種差

動物種	N-アセチル化		O-アセチル化	
	AF	Trp-P-2	N-OH-AF	N-OH-Trp-P-2
マウス	16,930	40	296	<0.2
ハムスター	30,150	320	1009	86
ラット	2,360	7	95	63
モルモット	11,700	4	521	0.4
ウサギ	12,100	120	5670	<0.2
イヌ	<10	<0.5	<0.1	<0.2

活性の単位は pmol/mg protein/min

O-アセチル化活性は tRNA 結合量として定量

体に変換されることは良く知られている⁵⁾。ヘテロサイクリックアミンも同様に肝可溶性画分とアセチル CoA を含む反応系に添加すると N-アセチル体が生成する。各種実験動物についてヘテロサイクリックアミンに対する活性を調べると、表 2 に示したように肝可溶性画分における Trp-P-2 の N-アセチル化はハムスターで最も高く、ウサギ、マウスの順に低下し、ラットやモルモットでは低かった⁶⁾。一方非ヘテロサイクリックアミンの 2-アミノフルオレンに対する活性はやはりハムスターで最も高いが、ウサギ、マウスおよび Trp-P-2 に対して極めて弱い活性を示したモルモットも 2-アミノフルオレンに対しては高い活性を示した⁶⁾。個体数が少ないので明確な値ではないがヒト肝の N-アセチル化活性はラットとほぼ同程度であった。ハムスターあるいはマウスの肝可溶性画分を用いて他のヘテロサイクリックアミンについても同様の実験を行ったところ、7種のヘテロサイクリックアミン中 Glu-P-1 と Glu-P-2 が最も速く N-アセチル化された（表 3）。一方 MeAαC と IQ の N-アセチル化は極めて遅かった。Weber ら⁵⁾によってアリルアミンの相対的な N-アセチル化速度は基質の脂溶性に比例すると報告されている。しかしながら調べた7種のヘテロサイクリックアミンの脂溶性と N-アセチル化速度の間に良い相関が認められなかった。ヘテロサイクリックアミンを実験動物に投与すると生体内で N-アセチル化を受け、尿や糞中に N-アセチル誘導体として排泄されるが、N-アセ

表3 ハムスター及びマウス肝可溶性画分におけるヘテロサイクリックアミンの N-アセチル化

アミン	ハムスター	マウス
Trp-P-1	118	81
Trp-P-2	350	20
Glu-P-1	1000	306
Glu-P-2	1640	415
AαC	280	31
MeAαC	3	6
IQ	18	6

活性の単位は pmol/mg protein/min

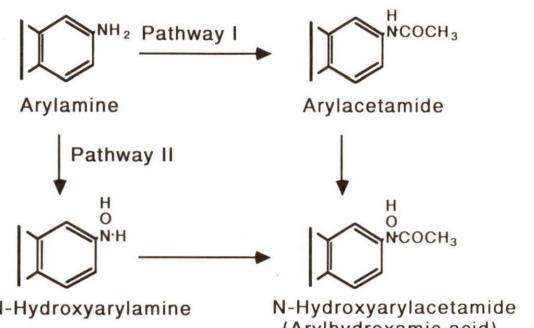


図2 アセチルトランスフェラーゼによるアリルアミン活性化の系路

最近までアリルアミンはまず N-アセチル化され生成した N-アセタミドが N-水酸化を受けて N-ヒドロキシアリルアミド（アセトヒドロキサム酸誘導体）となる系路によって活性化されると考えられてきた。これには 2-アミノフルオレンと 2-アセチルアミノフルオレンを比べると後者により強い癌原性が認められること、また70年代当初 Booth¹¹⁾ や Bartsch ら¹²⁾ が肝ホモジネートにアセチル CoA を添加しても N-ヒドロキシルアミンはあまり活性化されないと報告していたことなどが理由として考えられる。筆者らは Trp-P-2 に対する低いアセチル化活性から、ヒドロキシルアミンが直接酵素的活性化を受ける場合もあるのではないかと考え、N-ヒドロキシ-Trp-P-2 を用いて実験を行った。その結果肝可溶性画分を含む反応系に N-ヒドロキシ-Trp-P-2 のみを添加しても牛胸腺 DNA への共有結合量は増加しないが、この系にアセチル CoA を添加すると著しく反応が促進されることを見い出した¹³⁻¹⁵⁾。

(3) ハムスター肝のアセチルトランスフェラーゼ

先に示したようにハムスター肝は多くのアリルアミン基質に対して高いアセチル化活性を示す。またハムスターに 2-アミノフルオレンやベンジジンを投与すると肝癌を生ずることが明らかにされている。そこでハムスター肝よりアセチルトランスフェラーゼの精製を行った^{16, 17)}。肝の可溶性画分を直接 FPLC/Mono-Q イオン交換カラムにかけて分画すると活性は 2 つのピークとして現われ（図 3），後者のピークは 2-アミノフルオレンの N-アセチル化に高い活性を示し、前者のピークは 2-アミノフルオレンの N-アセチル化と p-アミノ安息香酸の N-アセチル化に高い活性を示したが、N-ヒドロキシ-Glu-P-1 に対して活性を示さなかった。これらの結果は基質特異性を互いに異なる少なくとも 2 種のアセチルトランスフェラーゼ（AT-I と AT-II）の存在を示唆するものと考えられた。そこで 20% ポリエチレングリコール処理、さらにアミノアゾベンゼンアフィニティーカラム処理によって両分子種を分離し、次いでゲルろ過及び FPLC-MonoQ によるイオン交

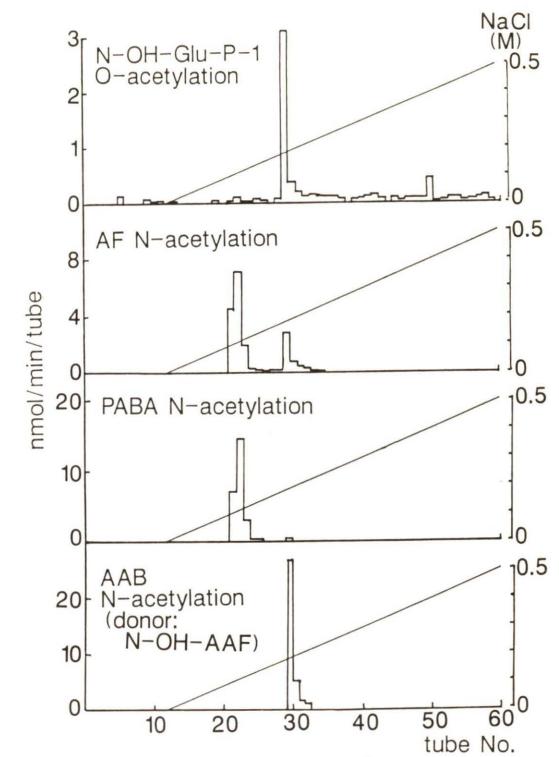


図3 ハムスターアセチルトランスフェラーゼの FPLC モノ Q カラムからの溶出パターン
N-OH-Glu-P-1; N-ヒドロキシ-Glu-P-1,
AF; 2-アミノフルオレン, PABA; p-アミノ安息香酸, AAB; アミノアゾベンゼン

換により精製した。得られたアセチルトランスフェラーゼ AT-I と AT-II は SDS電気泳動上でそれぞれ単一のバンドを示し、分子量マーカーとの比較からそれぞれの分子量は 31,000 と 30,000 と判定された。AT-I と AT-II は基質特異性が異なり、またアセチル供与体に対する反応性にも違いが認められた。

Booth¹¹⁾ はアリルヒドロキサム酸を肝の可溶性画分に添加するとアリルアミンの N-アセチル化が起きることを見い出した。この反応はアミノアゾベンゼン（AAB）を基質とした場合アセチル CoA はアセチル供与体とならず、N-ヒドロキシ-AAF のようなアリルヒドロキサム酸が供与体となることからそれまでに知られていた N-アセチルトランスフェラーゼとは異なる酵素によって触媒されているものと考えられてきた。しかしな

がらハムスター肝より精製した AT-I は 1) アセチル CoA 依存性の N-アセチル化, 2) アセチル CoA 依存性の O-アセチル化, 3) アリルヒドロキサム酸依存性の N, O-アセチル転移, および 4) アリルヒドロキサム酸依存性の N, N'-アセチル転移の 4 タイプの異なる反応を触媒することが明らかとなった¹⁶⁾。一方 AT-II は補酵素としてアセチル CoA を要求し, アリルヒドロキサム酸をアセチル供与体として用いることができない。そのため 3) および 4) のタイプの反応を触媒できないが, アセチル CoA 依存性の N-アセチル化および O-アセチル化を触媒した。但し AT-I に比べ AT-II はより高い基質選択性を示し, AT-II は N-ヒドロキシアミノフルオレンの O-アセチル化反応を触媒するが N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の O-アセチル化を触媒しなかった。AT-I による N-ヒドロキシルアミンの O-アセチル化の機構については 2 系路が可能である。その 1 つは先ず N-アセチル化が起こり N-アセチル-N-ヒドロキシルアミン (ヒドロキサム酸) が生成し, この中間体の分子内あるいは分子間転移により N-アセトキシ体が生成する系路であり, 他方は N-ヒドロキシルアミンが直接 O-アセチル化される系路である。もし N-ヒドロキシ-Glu-P-1 のアセチルトランスフェラーゼによる O-アセチル化が N-アセチル化を経由して起こるならば反応の過程においてヒドロキサム酸が生成すると予想される。そこで ³H-N-ヒドロキシ-Glu-P-1 を用いて反応を追跡したが, HPLC 上で合成標品の N-アセチル-N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の位置に放射活性は検出されなかった¹⁵⁾。これらの結果から N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の O-アセチル化は直接的な一段階の反応によって進行するものと考えられる。また AT-II も N-ヒドロキシアミノフルオレンの O-アセチル化を触媒するが, AT-II は N-ヒドロキシ-4-アセチルアミノビフェニルや N-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンをアセチル供与体としてアリルアミンの N-アセチル化あるいは N, O-アセチル転移を触媒することができない。このことから AT-II は, AT-I と同様に N-ヒドロ

キシルアミンを直接 O-アセチル化することによって活性化しているものと考えられる。

精製した AT-I 標品を家兎に免疫して抗 AT-I 抗体を作成し, 肝における各種アセチル化活性に対する抗体の添加効果を調べたところ, ハムスター肝可溶性画分によるアセチル CoA 依存性の N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の O-アセチル化および N-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレン依存性の AAB の N-アセチル化反応は濃度依存的に抗 AT-I 抗体の添加によって抑制された。アミノフルオレンの N-アセチル化も同様に阻害されたが, 高濃度の抗体を添加しても阻害は 50% 程度であった。また p-アミノ安息香酸の N-アセチル化はあまり阻害されず最大で約 20% 程度であった。これらの結果は生成 AT-I と AT-II 標品から明らかになった両酵素の基質特異性と一致していた。

(4) ハムスターにおける酵素的アセチル化の遺伝的差異

アリルアミンあるいはイソニアジドのようなヒドロキシルアミン (ヒドロキサム酸) が生成し, この中間体の分子内あるいは分子間転移により N-アセトキシ体が生成する系路であり, 他方は N-ヒドロキシルアミンが直接 O-アセチル化される系路である。もし N-ヒドロキシ-Glu-P-1 のアセチルトランスフェラーゼによる O-アセチル化が N-アセチル化を経由して起こるならば反応の過程においてヒドロキサム酸が生成すると予想される。そこで ³H-N-ヒドロキシ-Glu-P-1 を用いて反応を追跡したが, HPLC 上で合成標品の N-アセチル-N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の位置に放射活性は検出されなかった¹⁵⁾。これらの結果から N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の O-アセチル化は直接的な一段階の反応によって進行するものと考えられる。また AT-II も N-ヒドロキシアミノフルオレンの O-アセチル化を触媒するが, AT-II は N-ヒドロキシ-4-アセチルアミノビフェニルや N-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンをアセチル供与体としてアリルアミンの N-アセチル化あるいは N, O-アセチル転移を触媒することができない。このことから AT-II は, AT-I と同様に N-ヒドロ

(可溶性分画) あたりで 2-アミノフルオレン N-アセチル化は肝の 15% 程度に達する。従って体表面積 (ハムスターで約 130 cm²) を考慮するとアリルアミンの代謝に皮膚は重要な役割をはたしている可能性がある。さて先述の個体差の原因を明らかにするため 2-アミノフルオレンや p-アミノ安息香酸の N-アセチル化に高い活性を示す個体 (迅速型), 低い個体 (遅延型) 及びその中間群について肝の可溶性画分を調製し Western プロットを行った¹⁷⁾。先述の AT-I と AT-II は互いに免疫学的に類似しているため抗 AT-I 抗体と免疫交差性を示し, 電気泳動後イムノプロットによって検出できる。各個体中の AT-I 及び AT-II 含量を調べたところ, 迅速型の個体では AT-I と AT-II に相当する位置に染色バンドが検出された (図 4)。一方遅延型の個体でも AT-I の位置にバンドが検出されたが, AT-II (低分子量) は遅延型のいずれの個体でも検出されなかった。また中間群では AT-I と AT-II が検出されたが, AT-II の含量は迅速型ハムスターの約 1/2 程度であった。現在, 迅速型と遅延型ハムスターそれぞれの交配実験を行い, 第 5 世代までであるが AT-II の形質が一応メンデルの第二法則 (不完全優性) に従って発現することを明らかにしている。

4. O-スルホン化

実験動物, 殊にラットにおいて N-ヒドロキシ-AAF がスルホトランスフェラーゼによって活性化され DNA 損傷を起こすことは King¹⁹⁾ や Miller ら²⁰⁾ によって明らかにされている。しかしながら N-ヒドロキシアミノフルオレンのような N-ヒドロキシアリルアミンはこの酵素の良い基質ではないと考えられてきた。筆者らも N-ヒドロキシ-Trp-P-2 を基質に用いたがスルホトランスフェラーゼによって活性化されなかった。しかしながら 1985 年に Lai ら²¹⁾ は N-ヒドロキシアミノフルオレンがマウスの可溶性画分に含まれるホスホアデノシンホスホスルフェート (PAPS) 要求性のスルホトランスフェラーゼによって活性化されることを見い出した。我々も同じころに N-ヒ

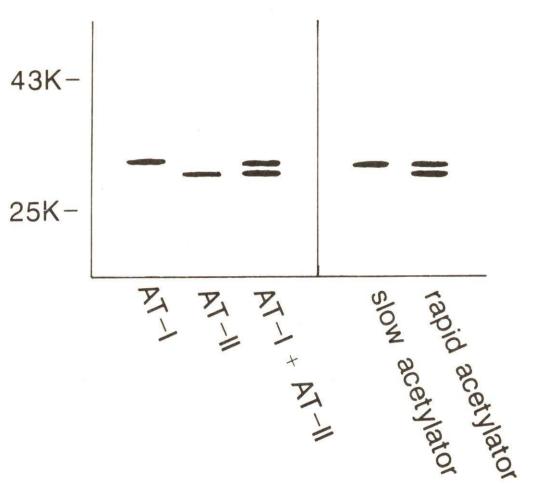


図 4 ハムスターアセチルトランスフェラーゼ AT-I と AT-II のイムノプロット 抗 AT-I 抗体を用いてウエスタンプロット法により染色した。

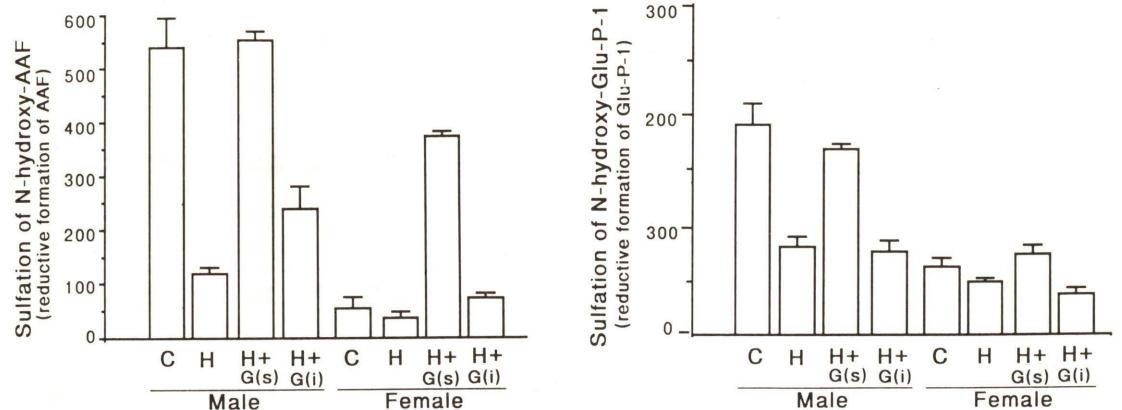


図5 N-ヒドロキシアミノフルオレン(左)およびN-ヒドロキシ-Glu-P-1(右)のO-スルホン化に対する下垂体摘除および成長ホルモン投与の影響
C:無処置, H:下垂体摘除, G(s):成長ホルモン間欠投与(雄型), G(i):成長ホルモン持続注入(雌型)。活性は生成したO-スルホン化体がチオール存在下で還元的に生成するアセチルアミノフルオレンおよびGlu-P-1として定量した。

に関する実験を行っていたが、この実験においてスルホトランスフェラーゼと類似した雄>雌の性差を示すチトクロームP-450分子種が性ステロイドとともに下垂体ホルモンによって調節されていることを見出していた。そこでN-ヒドロキシアリルアミンの活性化に関与するスルホトランスフェラーゼについても下垂体系の関与を検討した。図5に示したように、雄性ラットの下垂体を摘除するとN-ヒドロキシアセチルアミノフルオレンの活性化は約1/4程度にまで低下した。下垂体前葉ではプロラクチンや成長ホルモンをふくむ幾つかのホルモンが産生され、血中に放出されている。これらホルモンのうち成長ホルモンの血中レベルにはラットで性差のあることが報告されている²⁴⁾。そこでこの放出パターンの違いがスルホトランスフェラーゼ活性発現の差異と関連するのではないかと考え、ヒト成長ホルモンを2種の異なる方法を用いて下垂体摘除ラットに投与した。すなわち雄性に認められる脈動的な(パルス)パターンを再現するため1日2回の間欠投与群と雌性ラットに特徴的な持続型分泌を再現するためミニ浸透圧ポンプを背部に埋め込み常に血中に成長ホルモンが放出される持続投与群を作り、N-ヒ

ドロキシアセチルアミノフルオレンおよびN-ヒドロキシ-Glu-P-1のO-スルホン化への影響を調べた。下垂体を摘除した成熟雄性ラットに成長ホルモンを間欠的に投与するとN-ヒドロキシアセチルアミノフルオレンおよびN-ヒドロキシ-Glu-P-1のO-スルホン化活性は著しく増加し、正常雄のレベル近くにまで回復した。持続注入群ではN-ヒドロキシアセチルアミノフルオレンに対する活性は幾分増加したが、N-ヒドロキシ-Glu-P-1に対する活性は変化が認められなかった。成長ホルモンによる同様の変化は雌性下垂体摘除ラットでも認められた。図には示さなかったが、下垂体摘除ラットにテストステロンやエストラジオールを投与しても両活性に変化は認められなかった。これらの結果からN-ヒドロキシアリルアミンおよびN-ヒドロキシアリルアミドの活性化に関与するスルホトランスフェラーゼは下垂体より放出される成長ホルモンによって発現・維持の調節がなされていることが明らかとなった。そして成熟ラットに認められるスルホトランスフェラーゼの性差は雌雄間での成長ホルモンの放出パターンの違いに由来し、性ステロイドは間接的に視床下部/下垂体系における成長ホルモンの

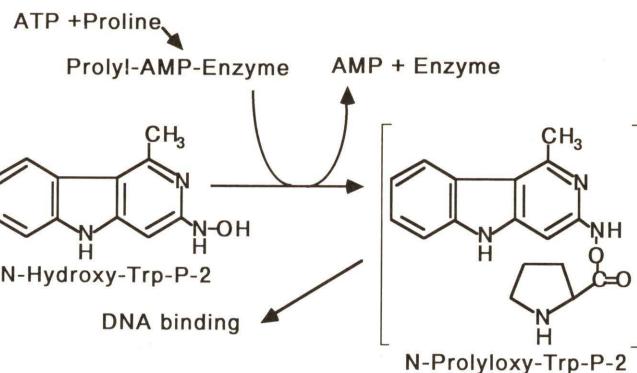


図6 プロリルtRNA合成酵素によるN-ヒドロキシ-Trp-P-2の活性化
Enzyme: プロリルtRNA合成酵素

放出に影響することによって作用しているものと考えられる。現在、著者らはSDラットの肝より数種のスルホトランスフェラーゼを精製しており少なくとも2つ以上の分子種がN-ヒドロキシアリルアミンおよびN-ヒドロキシアリルアミドの活性化に関与することがわかってきてている。

5. アミノアシル化

癌原性物質としてよく知られている4-ニトロキノリン-1-オキシドは生体内で還元されN-ヒドロキシルアミンとなってからDNAを損傷することはよく知られている。この反応は多田博士によって明らかにされた活性化系であり、筆者らは多田博士と共同実験を行い酵母より精製したセリル-tRNA合成酵素をセリンおよびN-ヒドロキシ-Trp-P-2を含む反応系に加えるとDNAへの共有結合が促進されることを明らかにした²⁵⁾。ラットの肝可溶性画分から調製したG-25ゲルろ過処理試料を酵素源として用いると同様のアミノ酸およびヌクレオチド要求性が認められた。ただし、酵母の場合とは異なりセリンは有効でなく、プロリンの存在下で最も高い値が得られた^{13, 26)}。プロリンの効果は立体特異的であり、L-プロリンの代りにD-プロリンを添加してもN-ヒドロキシ-Trp-P-2の活性化反応はほとんど進行しなかった。またプロリンアミドやN-アセチルプロリンに促進効果は認められなかった。またモノ三磷酸ヌクレオチドのうちATPはN-ヒドロキシ-Trp-P-2が存在すると生成したL-プロリル-AMPがN-ヒドロキシルアミノ基と反応してアシル化体(N-O-プロリル-Trp-P-2)が生じるものと考えられる。構造が単純なヒドロキシルアミン(NH₂OH)はアミノアシル化によってN-アミノアシル体(ヒドロキサム酸)を形成する際、O-アシル中間体を経て生成することが明らかに

されており上述の反応機構を支持している。

6. おわりに

日本で見い出されたヘテロサイクリックアミンを中心にはアリルアミンの代謝的活性化を触媒する酵素系についてその性質を述べた。これら活性化酵素系の発現・調節のメカニズムを解析することによって毒性あるいは発癌にみられる個体差・系統差・性差の原因をより良く理解できるものと考えられる。現在、我々はスルホトランスクフェラーゼ等のcDNA解析を行っており今後とも一層この面での研究を進めて行きたい。

参考文献

- 1) Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Matsuda, N., Ishii, K. and Kato, R. A high-spin form of cytochrome P-450 highly purified from polychlorinated biphenyl-treated rats. *Molec. Pharmacol.* 24 : 146-155 (1983).
- 2) Yamazoe, Y., Abu-Zeid, M., Manabe, S., Toyama, S. and Kato, R. Metabolic activation of a protein pyrolysate promutagen 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4, 5-f] quinoxaline (MeIQx) by rat liver microsomes and purified cytochrome P-450. *Carcinogenesis* 9: 105-109 (1988).
- 3) Kato, R., Kamataki, T. and Yamazoe, Y. N-Hydroxylation of carcinogenic and mutagenic aromatic amines. *Envir. Health Perspec.* 49 : 21-25 (1983).
- 4) Kato, R. and Yamazoe, Y. Metabolic activation and covalent binding to nucleic acids of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrolysates. *Jap. J. Cancer Res.* 78 : 297-311 (1987).
- 5) Weber, W. W. and Hein, D. W. N-acetylation pharmacogenetics. *Pharm. Rev.* 37 : 25-79 (1985).
- 6) Shinohara, A., Yamazoe, Y., Saito, K., Kamataki, T. and Kato, R. Species differences in the N-acetylation by liver cytosol of mutagenic heterocyclic aromatic amines in protein pyrolysates. *Carcinogenesis* 5 : 683-686 (1984).
- 7) Negishi, C., Umemoto, A., Rafter, J. J., Sato, S. and Sugimura, T. N-Acetyl derivative as the major active metabolite of 2-amino-6-methyldipyrido[1, 2-a:3', 2'-d]imidazole in rat bile. *Mutat. Res.* 175 : 23-28 (1986).
- 8) Rafter, J. J. and Gustafsson, J. Å. Metabolism of the dietary carcinogen TRP-P-1 in rats. *Carcinogenesis* 7 : 1291-1295 (1986).
- 9) Kanai, Y., Manabe, S. and Wada, O. Detection of N-acetyl derivative of 2-amino-6-methyldipyrido[1, 2-a:3', 2'-d]imidazole (Glu-P-1) in Glu-P-1-injected rats. *Mutat. Res.* 207 : 63-67 (1988).
- 10) Størmer, F. C., Alexander, J. and Becher, G. Fluorometric detection of 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline, 2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoline and their N-acetylated metabolites excreted by the rat. *Carcinogenesis* 8 : 1277-1280 (1987).
- 11) Booth, J. Acetyl transfer in arylamine metabolism. *Biochem. J.* 100 : 745-753 (1966).
- 12) Bartsch, H., Dworkin, M., Miller, J. A. and Miller, E. C. Electrophilic N-acetoxyaminoarenes derived from carcinogenic N-hydroxy-N-acetylaminobenzenes by enzymatic deacetylation and transacetylation in liver. *Biochem. Biophys. Acta* 286 : 272-298 (1972).
- 13) Yamazoe, Y., Shimada, M., Kamataki, T. and Kato, R. Covalent binding of N-hydroxy-Trp-P-2 to DNA by cytosolic proline-dependent system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107 : 165-172 (1982).
- 14) Shinohara, A., Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T. and Kato, R. DNA binding of N-hydroxy-Trp-P-2 and N-hydroxy-Glu-P-1 by acetyl-CoA dependent enzyme in mammalian liver cytosol. *Carcinogenesis* 6 : 305-307 (1985).
- 15) Shinohara, A., Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T. and Kato, R. Acetyl coenzyme A-dependent activation of N-hydroxy derivative of carcinogenic arylamines : Mechanism of activation, species difference, tissue distribution and acetyl donor specificity. *Cancer Res.* 46 : 4362-4367 (1986).
- 16) Kato, R. and Yamazoe, Y. N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase in mammalian livers and *Salmonella*. in *Carcinogenic and Mutagenic Responses to Aromatic amines and Nitroarenes* (eds. King, C. M., Romano, L. J. & Shuetzle, D.) 125-136 (Elsevier Science Publishing, New York, 1988).
- 17) Kato, R. and Yamazoe, Y. Further metabolic activations of mutagenic and carcinogenic N-hydroxyarylamine by conjugating enzymes. in *Xenobiotic Metabolism and Disposition* (eds. Kato, R., Estabrook, R. W. & Cayen, M. N.) 383-391 (Taylor & Francis, London, 1989).
- 18) Kawakubo, Y., Manabe, S., Yamazoe, Y., Nishikawa, T. and Kato, R. Properties of cutaneous acetyltransferase catalyzing N- and O-acetylation of carcinogenic arylamines and N-hydroxyarylamine. *Biochem. Pharmacol.* 37 : 265-270 (1988).
- 19) King, C. M. and Philips, B. Enzyme-catalyzed reactions of the carcinogen N-hydroxy-2-fluorenylacetamide with nucleic acid. *Science* 159 : 1351-1353 (1968).
- 20) DeBaun, J. R., Miller, E. C. and Miller, J. A. N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene sulfotransferase : Its probable role in carcinogenesis and in protein-(methion-S-yl) binding in rat liver. *Cancer Res.* 30 : 577-595 (1970).
- 21) Lai, C. C., Miller, J. A., Miller, E. C. and Liem, A. N-Sulfoxy-2-aminofluorene is the major ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the livers of infant male C57BL/6JxC3H/HeJ F₁ (B6C3F₁) mice. *Carcinogenesis* 6 : 1037-1045 (1985).
- 22) Manabe, S., Yamazoe, Y. and Kato, R. Enzymatic activation of a reactive intermediate of IQ, N-hydroxy-IQ. 15th meeting of Japanese Env. Mutat. Soc. Tokyo, p44 (1986).
- 23) Yamazoe, Y., Manabe, S., Murayama, N. and Kato, R. Regulation of hepatic sulfotransferase catalyzing the activation of N-hydroxyarylamine and N-hydroxyarylamine by growth hormone. *Mol. pharmacol.* 32 : 536-541 (1987).
- 24) Eden, S. Age-and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105 : 555-560 (1979).
- 25) Yamazoe, Y., Tada, M., Kamataki, T. and Kato, R. Enhancement of binding of N-hydroxy-Trp-P-2 to DNA by seryl-tRNA synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102 : 432-439 (1981).
- 26) Yamazoe, Y., Shimada, M., Shinohara, A., Saito, K., Kamataki, T. and Kato, R. Catalysis of the covalent binding of 3-hydroxy-amino-1-methyl-5H-pyrido[4, 3-b]indole to DNA by a L-proline- and adenosine triphosphate-dependent enzyme in rat hepatic cytosol. *Cancer Res.* 45 : 2495-2500 (1985).

細胞のがん化と染色体変化

金沢大学薬学部放射薬品化学教室 鈴木 文男, 加藤 満雄*, 二階堂 修

(*現在, 京都大学放射線研究センター)

1. はじめに

多くの腫瘍由来細胞には高頻度に染色体異常が見られる。特に悪性度の高い組織では、染色体の数的変化だけでなく構造異常を持ったマーカー染色体が出現する。このような異常は古くからがんの診断に応用されるとともに、発がん機構解析の最も有力な手がかりの一つとして注目されていた。すでに75年も前に『染色体異常が細胞がん化の原因である』とする仮説が提唱されている¹⁾。しかし、染色体分析技術の遅れもあって、長い間がん発症との関わりを証明するまでに至らなかった。

1960年に入って、ようやく末梢リンパ球の培養や染色体標本作製法が確立し、染色体形態を中心とした核型分析が可能となった。この手法を用いて Nowell と Hungerford は、ヒト慢性骨髄性白血病患者に特異な異常染色体 (Ph¹ chromosome) が出現することを見つけた²⁾。この報告は、染色体異常が発がんに関係していることを示した最初のものである。1980年以降から染色体分染法が導入され、がんの染色体研究は急速に進展した。現在では白血病やリンパ腫といった血液系のがんだけでなく、種々の固形腫瘍においても特定の染色体異常が見つかっている³⁾。重要な点は、異常の多くは相互転座であり、その際の切断部分ががん遺伝子 (c-onc) 座と近接していることである^{4, 5)}。バーキットリンパ腫や慢性骨髄性白血病で示されたように、そのような染色体変異は c-onc の異常発現や融合遺伝子産物を誘起し、正常細胞の悪性形質転換を引き起こしているものと思われる⁶⁾。

このようにがん細胞に見られる染色体異常は、

自身のc-oncの活性化に関与している可能性が高いが、最近逆の意味からその重要性が示唆された。すなわち、ヒト網膜芽細胞腫やウイルムス腫瘍において高頻度に特定染色体の部分欠失が出現し、それががん抑制能の消失に関係していることがわかったのである^{7, 8)}。正常細胞とがん細胞を融合してできた雑種細胞ではがん細胞側の形質が抑制されるので、かねてからがん抑制遺伝子の存在が示唆されていた⁹⁾。実際に網膜芽細胞腫の染色体欠失部位 (13q14) から Rb 遺伝子がクローニングされ¹⁰⁾、その遺伝子を網膜芽細胞腫や骨肉腫細胞に導入すると造腫瘍性能が抑制されることが証明された¹¹⁾。近年乳癌や肺小細胞癌でも Rb 遺伝子の欠損が見つかっているので^{12, 13)}、この遺伝子はがん全般にわたってかなり広く関わっているものと思われる。

一方、がん患者の病理的所見から、一般にがんは正常組織が長期間かかって段階的な変化を起こした末に生じるものと考えられている¹⁴⁾。実験動物を用いた皮膚発がん実験では、少なくともイニシエーションとプロモーションと呼ばれる段階があることが証明された¹⁵⁾。ヒト悪性腫瘍において2種類のがん遺伝子活性化が見つかっており¹⁶⁾、遺伝子レベルでもそのことは支持されている。現在約50種近くのがん遺伝子が同定され、精力的な解析が試みられている¹⁷⁾。細胞内分布や機能から6~9種類に分類されるが、これも細胞がん化における複数遺伝子の関与を示すものであろう。

このようながん発症の多段階性はがん特有のものであり、他の病気とは全く異なっている。しか

し、その複雑さがゆえに機構解明が容易でないのも事実である。発がんシステムを単純化し、細胞がん化の各段階を明らかにすることが現状打開の唯一の手段であろう。これまで、培養哺乳類細胞を用いた *in vitro* 発がん系においても細胞がん化の多段階性が証明されてきた¹⁸⁻²²⁾。本稿では、チャイニーズハムスター胎児細胞を用いて得られた研究結果を中心に、細胞がん化における染色体変化の役割について考察する。がん遺伝子に加えてがん抑制遺伝子研究が大きく進展しつつある今日、もう一度細胞レベルでの現象を整理し、両者の関わりについて論することは重要であろう。発がん機構を考える上で参考になれば幸いである。

2. 細胞がん化は段階的におこる

1) 無限増殖能の獲得

一般に培養下のがん細胞の増殖動態は、正常細胞のそれとは大きく異なる。たとえば線維芽細胞の場合、細胞の形態変化と運動性の異常が見られる。定量測定に用いられている単層細胞シートの細胞塊（フォーカス）形成は、その性質を利用したものである。またゲッ歯類の細胞では、軟寒天培養液中の細胞集落（軟寒天コロニー）形成能として同定される基質依存性の消失は、ヌードマウスに対する造腫瘍性の獲得とよく相関することから、最も信頼される細胞がん化（悪性形質転換：neoplastic transformation）の指標とされてきた。ヒト細胞では無限増殖能の獲得がrate-limiting stepと考えられている²³⁾。

我々はこのような細胞がん化形質を指標として、正常二倍体細胞がどのようなステップを経て悪性形質転換細胞になるかを調べた。13から14日齢のチャイニーズハムスター胎児より細胞を分離し、一定数の細胞を培養フラスコに植え、3日毎に継代培養した。培養初期では活発に増殖したが、15~20継代付近で一旦低下し、それ以降一定の増殖率を示した。各培養系(strain)間で増殖速度に差があるものの、このような増殖パターンは9例の培養系すべてに共通していた。各継代期のコロニー形成率を調べたところ、5~10継代目で

最低値を示しその後回復することから、この間で加令死滅する細胞と無限増殖能を獲得した細胞との交代がおこっているものと思われる。

同様の継代培養をゴールデンハムスター胎児細胞についても行なったが、ほとんどの細胞は15~20継代で死滅した。しかし、X線照射することによって無限増殖能を獲得した細胞を得ることができた²²⁾。Kraemerらも、チャイニーズハムスター胎児細胞では、用いた20例のstrainすべてが無限増殖系へ移行したと報告している²¹⁾。これらの結果は、チャイニーズハムスター細胞はゴールデンハムスター細胞に比べて株化しやすいこと、さらにそこには何んらかの変異が関与していることを示すものである。

2) 悪性形質の獲得

不死化したチャイニーズハムスター細胞が継代培養の過程で生じたものか、それとももともと分離細胞集団中に存在し、培養により選択増殖してきたのかについては明らかでない。ただ、無限増殖能ががん細胞の重要な性質のひとつである以上、細胞がん化へ一步踏み出した細胞と言える。我々が調べた限り、その後の継代培養による悪性化はstrain間で大きく異なることがわかった。すなわち、0.2%寒天を含む培養液中に細胞を植えると²⁴⁾、一つの細胞系(A2 strain)では10代目以降に明らかなコロニー形成が認められ、継代培養を進めるに従い形成率が上昇した(図1)。またヌードマウスに対する造腫瘍性は10~15代目ですでに観察され、継代培養とともに固形腫瘍が検出されるまでの潜伏期間が短縮した。一方、C2 strainでは60継代培養しても全く軟寒天コロニーは検出できなかった。この細胞に紫外線照射すると軟寒天コロニー形成能が誘発されたが、得られた基質非依存性細胞をヌードマウス皮下に移植しても固形腫瘍を形成しなかった(図1)。

このように無限増殖系へ移行した細胞の一部は、継代培養に伴い基質依存性の消失や造腫瘍性の獲得といった悪性形質を段階的に発現することがわかった。同様な細胞がん化の多段階性は、化学生物発がん剤処理による *in vitro* 発がん実験系を用

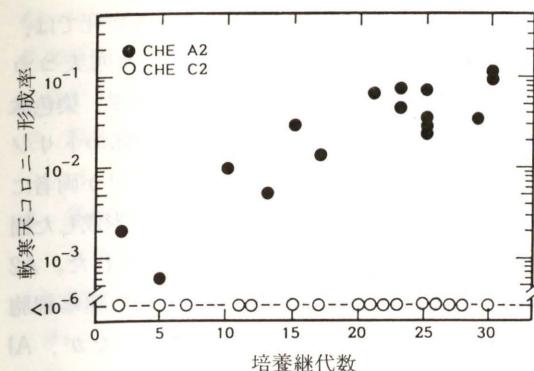


図1 継代培養されたチャイニーズハムスター胎児細胞の悪性形質転換
2種の細胞系(A2 strainとC2 strain)について、0.2%寒天を含む半固形培地中のコロニー形成能を調べた。

いて証明してきた^{18, 19)}。ここではチャイニーズハムスター細胞株を用いたSmithとSagarの研究結果を紹介する²⁰⁾。

彼らは細胞をエチルメタヌルホネートやメチルニトロソグアニジン、4ニトロキノリン1オキシドで処理し、その後の悪性形質発現動態について調べた。その結果、発がん剤処理により血清非要求性や軟寒天コロニー形成細胞が出現するが、それらの細胞のほとんどはヌードマウスに移植しても固形腫瘍を作らず、造腫瘍性の獲得には再度薬剤処理する必要があることがわかった。最初の形質転換細胞はクローニング分離により得られており、ここでは細胞相互間の影響や選択増殖の可能性は除外できる。つまりこの結果は、細胞がん化は多段階であり、その各段階には異なる遺伝的変異が関与していることを示唆するものである。我々の場合、細胞の不死化は100%の高い割合で生じたが、その後の悪性化については9例中2例(約22%)と低かった。これは、悪性形質転換を引き起こす変異が限られた遺伝子変異によると仮定すると考えやすい。なぜなら化学発がん剤処理の場合と異なり、継代培養過程で生じる突然変異の頻度は極めて低いと考えられるからである。

3. 細胞がん化には特定の染色体変化が関与する

1) 細胞がん化に伴う染色体変化

すでに述べたように、がん化を引き起こす遺伝的変異の要因として、染色体変化は益々重要視されている。第一にがん遺伝子の活性化に³⁾、第二にがん抑制遺伝子の消失に^{7, 8)}直接関係している可能性がある。ただがん化した細胞は核型が不安定で、種々の染色体異常がおこりやすい。故に古くから指摘されているように、その変化が細胞がん化の原因なのか、それとも、付随的に生じた二次的変化なのかを見きわめることはむずかしい。やはり *in vitro* 発がん系を用いて、できるだけ早い時期に出現する染色体変化を同定することが重要である。段階的ながん化形質発現との関連性を明らかにすることによってのみ、細胞がん化と染色体変化との因果関係が明らかになるはずである。

チャイニーズハムスターの染色体は22本と少なく同定しやすいので、その培養細胞は各種の体細胞遺伝学的研究に繁用してきた。他の哺乳類細胞に比べ、株化しても比較的核型が安定しているという利点を有する。この性質は、染色体変異を中心とした細胞がん化機構の解析に極めて有利である。

まず A2 strain についてギムザ分染法による核型分析を行った。造腫瘍性が認められた10継代目から染色体分布モードが一本増加し、その増えた染色体は3番染色体または短腕部が欠失した異常3番染色体であった。ほとんどの場合、この染色体の異常は動原体から上の欠失 (del(3)(cen)) であり、結果的に3番染色体長腕部のみが一本付加されていた(単に3qトリソミーと言う: 図2)。悪性形質を示さなかったC2 strainでは、20継代目以降から3番染色体長腕部の付加が高頻度で出現した。60継代培養した9例の細胞系についてみると、正常二倍体のまま培養できたA3 strainを除いて、5番や8番染色体のトリソミーや3qトリソミーが出現した。造腫瘍性のある細胞では3番染色体長腕部が共通して付加していた。しかしこの異常染色体は、悪性形質を示さない細胞にも見られるので、最終的ながん化には染色体変化では検出できないような遺伝的変化が必要なのかもしれない(図2)。

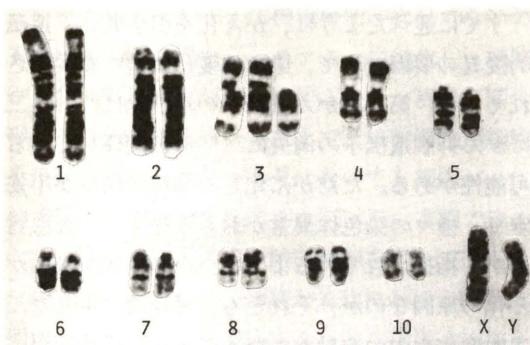


図2 形質転換した細胞(A2 strain, 20 繼代目)の核型染色対数の分布モードは23本であり、そのほとんどの細胞に3番染色体長腕部の付加が見られた。

2) 悪性形質発現に関係した染色体変化

上記の結果は、チャイニーズハムスター細胞のがん化過程は多段階より成り立っており、その悪性化の段階に極限られた染色体異常が関係していることを意味する。従来ゲッシ類の細胞では、染色体変化は比較的初期の変化、少なくとも細胞の不死化かそれ以前に関係しているものとされてきた²³⁾。実際 Oshimura らは、アスベスト処理したシリアンハムスター胎児細胞より造腫瘍性を示さない8種の細胞株を得たが、そのうち6種に11番染色体トリソミーが見られたと報告している²⁵⁾。Connellはチャイニーズハムスター胎児細胞に発がん剤を処理し、各継代期の細胞について核型分析した。その結果、すべての培養系で早い時期に3番染色体長腕部の付加が出現することから、3qトリソミーが無限増殖能の獲得に関与していると結論した²⁶⁾。しかしながらチャイニーズハムスターの場合、一部の細胞系では半年(60継代)以上培養しても何等核型変化を示さなかったり(本研究結果)、現実に正常二倍体の不死細胞株(CHEF/18)が存在することから²⁷⁾、この考えは否定できる。

では染色体変化は細胞がん化のどの段階に関与しているのだろうか。さらにその際の最も本質的な変化は何であろうか。この疑問に答えるためには、やはり軟寒天コロニーや固形腫瘍より細胞を分離し、クローンレベルで悪性形質発現に対応し

た核型変化を同定する必要がある。本研究では、まず A2 strain より分離した2種の軟寒天コロニー形成細胞について調べた。その結果、染色体変化は5番染色体と3番染色体長腕部のトリソミーに限られ、しかも3qトリソミーだけが両者に共通していた。一方、ヌードマウスに形成した固形腫瘍由来細胞では種々の変化が見られた。A2 strain は比較的単純で、得られた2種の腫瘍細胞とも90%以上が3qトリソミーを示したが、Al strain では1番と4番染色体以外のすべての染色体に異常が出現した。例えば40継代培養した細胞由来のものでは、3qトリソミーに加えてY染色体トリソミーや5番染色体と3番染色体長腕部の相互転座(t(5;3q))、60継代培養由来のものでは、2本の3番染色体長腕部の付加と8番、10番、Y染色体のトリソミーが見られた。しかしながら、この場合も共通していた変化は3番染色体長腕部の1ないし2本の増加であった。これらの結果は、チャイニーズハムスター細胞の自然がん化過程に伴う染色体変化(3qトリソミー)は細胞が不死化したあとの悪性形質発現の段階、すなわち細胞増殖の基質非依存性を獲得する段階に関与していることを強く示唆するものである。

同様の結果は Bloch-Shtacher と Sachs によって得られている²⁸⁾。彼らは SV40 やメチルコランスレンにより誘発した悪性形質転換細胞、およびそれらの正常型復帰細胞と再誘発させた形質転換細胞について詳細な核型分析を行ない、3番染色体の長腕部分の増量が細胞の悪性形質発現に関係していることを証明した。興味あることにアザシチジンやインシュリン²⁹⁾、さらにはプラスミドベクター(pSV2gpt)および活性化がん遺伝子(c-Ha-ras)を含むプラスミド(pSV2gptEJ)処理³⁰⁾で得た悪性形質転換細胞にも、高い頻度でこの異常染色体が見られている。もちろんほかの染色体(5番と8番)の関与を指摘している報告や³¹⁾、一部には3qトリソミーを示さない腫瘍細胞もあるので^{27, 32)}、この変化だけがチャイニーズハムスター細胞のがん化に寄与しているわけではない。ただ他の動物細胞のがん化系に比べ、比較になら

ないほど単純で、極限られた染色体変化(3番染色体長腕部の付加)が出現するという事実は注目に値する。今後遺伝子レベルで解析していくうえで、格好の材料を提供していると言える。

4. 染色体変化に加えてがん遺伝子の活性化が関与する

1) 細胞がん化に伴う遺伝子変化

チャイニーズハムスターでは3番染色体に *fes* と *H-ras-1*、8番染色体には *K-ras-2* 遺伝子が存在することがわかっている^{32, 33)}。もしこれらのがん遺伝子ががん化に関係しているとすれば、悪性度の異なる段階で遺伝子発現量に差がみられる可能性がある。興味あることに、3番と8番染色体はいずれも継代培養過程で変異が見つかったものである(前述)。しかしながら、結果はネガティブであった。*fes* の発現はほとんどなく、また *H-ras*、*K-ras* については十分な発現量が検出されたものの、悪性度に依存した傾向は認められなかった。このことは、がん遺伝子の量的変化でなく質的変化がおきている可能性を示唆する。

マウス NIH3T3 細胞を用いたトランスフェクション法は、活性化がん遺伝子(トランスフォーミング遺伝子)を分離する方法として幅広く用いられている。特に腫瘍ウイルスの構造解析がほとんど終了にさしかかっている今日、残されたがん遺伝子分離法のひとつとして期待がかかっている³⁴⁾。本研究では、得られた種々の悪性形質転換細胞に活性化がん遺伝子が存在するか否かを調べるために、抽出したDNAについてトランスフェクション実験を行なった。表1より明らかなように、標的細胞として用いた NIH3T3 細胞DNAにはトランスフォーミング活性はないが、ヒト膀胱癌由来 T24 細胞のDNAでは多くのフォーカスを形成することがわかった。すでに T24 細胞は、活性化がん遺伝子(mutant c-H-ras)により高い形質転換能を有することが知られている³⁵⁾。一方、造腫瘍性を示すようになった段階の細胞および腫瘍由来細胞のDNAは、活性としては T24 細胞の半分以下と低いが、一様にフォーカス形成が認め

られた。また、これらの形質転換 NIH3T3 細胞をヌードマウスに移植すると固形腫瘍を形成し、その細胞中にはチャイニーズハムスター特異的な反復配列遺伝子と反応するDNAが含まれていることがわかった。この結果は、自然の悪性形質転換したチャイニーズハムスター細胞にはマウス NIH3T3 細胞をがん化する遺伝子、すなわち活性化がん遺伝子が存在することを示唆する。もっとも、一部の悪性形質転換していない段階の細胞にも、弱いながらトランスフォーミング活性がみられ、その有意性については再検討する必要がある。いずれにせよ、早急に活性化がん遺伝子をクローニングし、その発現と染色体座位を調べることが重要である(表1)。

2) チャイニーズハムスター細胞の自然がん化モデル

これまで得られた結果を以下にまとめる。

- ①チャイニーズハムスター胎児細胞は継代培養するだけで容易に株化する。
 - ②無限増殖系へ移行した細胞の一部は、継代培養を繰り返すうちに軟寒天コロニー形成能やヌードマウスに対する造腫瘍性を示すようになる。
 - ③ほとんどの培養系で特定の染色体変化(3qトリソミー)が生じる。
 - ④悪性形質発現する段階で3qトリソミーが共通して出現する。
 - ⑤軟寒天コロニーや固形腫瘍由来細胞中に3qトリソミーが維持される。
 - ⑥造腫瘍性を示す細胞や腫瘍由来細胞のDNAは、マウス NIH3T3 細胞に対してトランスフォーミング活性を有する。
- これらの結果より、継代培養過程で生じたチャイニーズハムスター胎児細胞のがん化プロセスを推理してみる。前提として、胎児細胞には分裂増殖能の高い未分化細胞はあるが、がん細胞に特徴づけられるような無限増殖細胞は存在しないとする³⁶⁾。また、生理的培養下でもDNA損傷が生じ、その結果として遺伝子変異や染色体異常が誘発されるものとする³⁷⁾。

まず、13~14日齢胎児をトリプシン処理して得

表1 悪性形質発現とトランスフォーメーション活性との関係

DNA:由来 細胞名 (passage数)	供与細胞の性質 造腫瘍性 染色体変化	フォーカス の数 (foci/dishes)	出現頻度*
マウス細胞株 NIH3T3		0/16	
ヒト膀胱がん細胞株 T24	+	17/14	0.097
チャイニーズハムスター細胞			
CHE A1 (20)	正常二倍体	0/12	
CHE A1 (40)	+3q, t(3q;10)	7/12	0.047
CHE A1 (60)	+3q, +Y	7/11	0.051
CHE A2 (10)	+3, +3q	2/8	0.02
CHE A2 (20)	+3q	1/8	0.01
CHE A2 (30)	+3q	4/8	0.04
CHE A3 (40)	正常二倍体	0/8	
CHE A3 (60)	正常二倍体	0/7	
CHE B2 (15)	+3q	0/8	
CHE B2 (32)	+3q, t(3q;6)	1/7	0.006
CHE B2 (60)	+3q, +5	0/8	
CHE C1 (5)	正常二倍体	0/12	
CHE C1 (20)	+3q	0/12	
CHE C1 (40)	+3q	0/11	
CHE C1 (60)	+3q, +5	1/11	0.007
腫瘍由来のチャイニーズハムスター細胞株			
T40-A1	+3q, t(3q;5), +Y	7/16	0.035
T60-A1	+3q, +3q	7/16	0.01
T15-A2	+3q	13/16	0.065
T25-A2	+3q	4/12	0.027

* 10⁶個細胞に対して、単位DNA量(μg)処理当たりに出現したフォーカスの数として表した。

各細胞のDNAについてDNAリソカルシウム共沈殿物を調製し、マウス NIH3T3 細胞にトランスフェクトした。処理後2~3日毎に低血清培養液で培地交換し、2~3週間培養した。表には数回行った実験結果をまとめ示した。

た細胞を培養すると、より未分化型の細胞ほど永く分裂増殖する。しかし、継代培養するに従いほとんどの細胞は分化形質を発現して増殖停止したり(differentiation)，加令現象をおこし死滅する(cellular aging)。一部の細胞に変異(異常染色体として検出できないような点突然変異あるいは遺伝子制御異常)が生じ、無限増殖能を獲得する不死化:immortalization)。一方、分裂増殖のさいある頻度で染色体の不等分離が生じ、染色体欠損細胞(21本でmonosomyを持つ)と染色体増加細胞(23本でtrisomyを持つ)が生まれる。前者は死滅する可能性が高く、後者については一本増えた染色体の種類によって異なる増殖度で生き残

る。特に、3番染色体トリソミーの細胞は他の細胞より増殖活性が高い。ただし、動原体の部位で切斷が生じやすく、結局は3qトリソミーを持った細胞が大勢を占めるようになる。培養過程で低頻度ながらがん遺伝子に突然変異が生じ、変異蛋白質を発現するようになる。この変異が3qトリソミー、すなわち3番染色体短腕部の欠失した染色体を持つ細胞中でおこると形質転換細胞となる(transformation)。さらにより悪性形質に関与する遺伝子に変異が生じると、造腫瘍性として同定されるような悪性形質転換細胞となる(neoplastic transformation)。

5. 細胞がん化における染色体変化の役割

1) 遺伝子発現のバランス

染色体変化ががん発症に重要な関わりを持っていることは、種々のヒト悪性腫瘍の核型分析から明らかにされてきた^{3, 4)}。一般に特定の染色体間での相互転座や HSR (homogeneously staining region: 均一染色領域), DM (double minute: 微小染色体)などの異常染色体が出現するが、ゲッ歯類の実験がんでは単純な数的変化も見られる³⁸⁾。たとえばウイルスやX線、さらには種々の化学発がん剤で誘発したマウス白血病では高頻度に15番染色体が1本増加し、その変化はリンパ腫についても共通していた³⁹⁾。白血病にかかりやすいAKRマウスでも15番トリソミーがみられるが、白血病の発症時期と平行して出現することがわかっている⁴⁰⁾。これらの結果は、15番染色体の附加が単にがん化した細胞の二次的な変化でなく、がん化に直接関係している変化であることを示唆する。

では染色体の数的変化がどのようにして細胞がん化に関わっているのだろうか。相互転座がおきると、がん遺伝子発現の異常や融合蛋白質の产生で説明できる⁶⁾、DMやHSRをもった腫瘍細胞ではそこにあるがん遺伝子の発現が著しく増加している⁴¹⁾。一方、トリソミーの場合は高々1.5倍の遺伝子増幅である。否定的に考えざるをえない。しかし最近のがん遺伝子研究で明らかにされたように⁴²⁾、がん遺伝子産物は増殖因子にはじまってそのレセプター、細胞内修飾因子、信号伝達物質、さらには核内蛋白質というふうに分布し、これらの複合的な働きによって細胞の増殖制御が行なわれているはずである。染色体の数的変化によるちょっとした遺伝子発現のくずれがこのような信号伝達カスケードを乱し、最終的にアンプリファイされて異常増殖や悪性形質発現へと導く可能性がある。

Sachsのグループは、ゴールデンハムスター胎児細胞より得た悪性形質転換細胞とその復帰細胞の核型分析から、『細胞がん化の染色体バランス説』を提唱した⁴³⁾。すなわち、それぞれ別々の

染色体上にがん化形質の発現と抑制に関与する遺伝子があり、悪性形質転換は前者が数的に勝った時に生じるとする考え方である。すでに述べてきたように、試験管内発がん系では特定染色体の数的変化が最も頻繁におきる変化であり、細胞がん化の初期変化として注目してきた。我々の研究では、チャイニーズハムスター細胞のがん化には3qトリソミーが必要であることがわかった。簡単に言えば、3番染色体の短腕部よりも長腕部の数が勝った時にがん化形質が発現する可能性がある。もちろん他の染色体はほとんど正常二倍体を維持しているので(表1)、このことは対3番染色体短腕部だけに限らない。3番染色体長腕部に載っているがん遺伝子発現がわずかに増え、他の産物との釣合が崩れて形質転換系へ移行したのかもしれない³⁹⁾。

2) 多段階的細胞がん化過程での役割

遺伝子発現のバランスだけでは、チャイニーズハムスターのがん化は解けないと思われる。まず第一に、3qトリソミーを持っても悪性形質発現のあるものないものがある(表1)。第二に3番染色体長腕部にある遺伝子発現を調べても、その量は3qトリソミーあるなしに関係しないという結果が得られた。特に、最近がん遺伝子 *fes* と *H-ras* がともに3番染色体長腕部にあることが報告され⁴⁴⁾、染色体バランス説を証明するものとして注目された(図3)。しかし実験結果は、3qトリソミーを持った細胞が多く発現することはなく、また細胞の悪性度とも全く相関性を示さなかった。

細胞がん化は多段階より成り立っており、そこには複数の遺伝子変異が関与しているという考えが定着している^{41, 45)}。証拠はヒト悪性腫瘍の遺伝子解析と既知がん遺伝子のトランスフェクション実験に由来する。たとえば、Landらはラット初代培養細胞と不死化したRat-1細胞に活性化 *myc* および *ras* 遺伝子をトランスフェクトし、Rat-1細胞では *ras* 単独でもがん化したが、初代培養細胞では *myc* と *ras* を一緒に入れないとがん化しないことを発見した⁴⁶⁾。我々もゴールデンハムスター細胞を用いて同じような結果を得てい

る⁴⁷⁾。ただ *myc* と *ras* により形成した初代培養細胞由来の固形腫瘍は増殖度が低く、時には縮退傾向を示した。またこれらの腫瘍細胞には高頻度に染色体の数的变化 (15番染色体モノソミー) がみられ、*myc* や *ras* に加えて何んらかの遺伝的変異の関与が示唆された。一方、Oshimuraらは腫瘍細胞と正常細胞との細胞融合実験から、15番染色体にはがん抑制遺伝子があり、それが欠損してはじめて両活性化がん遺伝子による悪性形質が発現すると結論している⁴⁸⁾。

以上の結果は、チャイニーズハムスター細胞のがん化過程に見られる3qトリソミーは、がん遺伝子の活性化でなくむしろその抑制の消失に関係しているという考え方を支持する。実際、自然発がんした細胞はこの染色体変化を持っていると同時に、マウス NIH3T3 細胞をトランスフォームする能力がある (表1)。また Stenman らは、活性化 *ras* で悪性形質転換した細胞に共通して3qトリソミーが出現すると報告している³⁰⁾。活性化がん遺伝子との関連性を考える上で非常に興味がある。我々はまず活性化がん遺伝子を明らかにすべく、遺伝子クローニングを試みている。現在一次、二次トランスフェクションが終わったところではつきりしないが、サザンプロット解析から *H-ras* 以外のがん遺伝子が活性化している可能性が示唆された (予備実験結果)。いずれにせよ、チャイニーズハムスター細胞の自然がん化は多段階より成り立っており、そこには複数の遺伝子変異 (がん遺伝子活性化) と染色体変化 (がん抑制能の消失) が関与していると思われる。

3) がん抑制能との関わり

すでに述べたように、チャイニーズハムスターでは3番染色体長腕部の付加ががん抑制能の消失にきいている可能性が高い。つまり、3番染色体の短腕部にがん抑制遺伝子があり、それが欠損すると悪性形質が発現するという考えが成り立つ。この仮説が正しいか否かは、正常細胞よりがん抑制遺伝子が分離され、その染色体座位が決定されてはじめて明らかになるはずである。しかし、現在のところ試みられてはいるが成功していない。

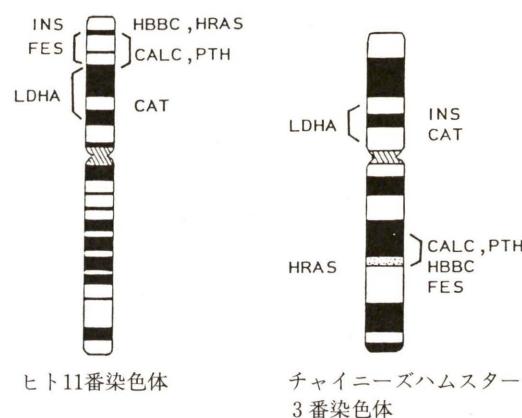


図3 ヒト11番染色体とチャイニーズハムスター3番染色体の比較
Genetic Maps 1987 (Ed. O'Brien, S. J.)と文献44)にもとづいて作成した (略名については表2参照)。

ここでは Sager らのグループの研究結果を紹介し、状況証拠としたい。

彼らはチャイニーズハムスター胎児から分離した正常二倍体の核型を維持する細胞株 (CHEF/18) を用いて、種々の化学薬剤やプラスミド処理による悪性形質転換について調べた^{12, 30)}。すでにエチルメタンスルホネート (EMS) で誘発した腫瘍細胞に、高い頻度で3番染色体の異常が生じることを見つけていたので⁴⁹⁾、他の薬剤の場合どうなるかが興味の的であった。

まず、分化誘導剤のアザシチジン処理で得た前脂肪細胞は造腫瘍性を示すが、その腫瘍細胞すべてに3qトリソミーが出現することを見つかった^{27, 50)}。この時彼らは、3番染色体長腕部にがん遺伝子が載っていると仮定し、脱メチル化による活性化が悪性形質発現にきいていると予想した。しかし後に、活性化がん遺伝子を導入して得た悪性形質転換細胞にも3qトリソミーが共通して見られることから、がん遺伝子活性化による悪性形質発現にはむしろ3番染色体短腕部が重要な働きをしていると考えるようになった³⁰⁾。実際、正常細胞と融合してできた雑種細胞では3番染色体の短腕部(3p)が存在する限りがん化形質を示さないが、再び悪性化した細胞ではこの部分の欠失が見られた⁵¹⁾。これ以前に、活性化 *ras* をヒト正常

表2 ヒトとチャイニーズハムスターにおける、各種遺伝子の染色体位置の比較

遺伝子名	ヒト 遺伝子座	チャイニーズハムスター 遺伝子座
インシュリン (INS)	11p15.5	3p0 - 1
カタラーゼ (CAT)	11p13	3p0
上皮小対ホルモン (PTH)	11p15.4 - 15.1	3q3 - 4
カルシトニン (CALC)	11p15.4 - 15.1	3q3 - 4
βグロブリン遺伝子 クラスター (HBBC)	11p15.5	3q3 - 4
<i>H-ras</i> がん遺伝子 (HBBC)	11pter - 15.5	3q4
<i>fes</i> がん遺伝子 (FES)	15	3q5

Genetic Maps 1987 (Ed. O'Brien S. J.)と文献44)をもとに作成した。

細胞にトランسفェクトしても悪性形質発現せず⁵²⁾、また CHEF/18細胞では腫瘍化した細胞と融合するとがん化形質が抑制されるという重要な報告をしている⁵³⁾。注目すべきことは、いずれの場合も *ras* 遺伝子の転写や蛋白質(p21)産生量に影響がないのに抑制現象が見られる点である。シリアンハムスター細胞を用いた研究においても同様の結果が得られており⁴⁸⁾、形質発現レベルでの優位な抑制遺伝子の存在が現実のものとなってきた。最近、活性化 *ras* (v-K-ras) でがん化したマウス NIH3T3 細胞の悪性形質を抑える遺伝子 (cDNA) がクローニングされた⁵⁴⁾。この種の研究は従来とは異なった面、すなわちがん抑制遺伝子の立場からがん化機構を解明しようとするものであり、今後の進展が期待される。

がん抑制遺伝子の存在は、主として遺伝性の腫瘍発症に関する研究から示唆されてきた^{7, 8)}。前述したように、ヒト網膜芽細胞腫に関与する Rb 遺伝子は間違いなくがん抑制遺伝子のひとつである¹⁰⁻¹³⁾。一方、同じ遺伝性のウイルムス腫瘍については、11番染色体短腕部(11p13)の欠失と関係していることが解っているだけで⁵⁵⁾、分子レベルでの解析はほとんど進んでいない。はたして11番染色体上にがん抑制遺伝子があるのだろうか。最近、この可能性を強く示唆する研究結果が報告された⁵⁶⁾。Weissman らは11番染色体(実際は t(X; 11)(11 pter > 11 q 23 :: Xq 26 > Xqter))を一本含む微小細胞を作製し、ヒポキサンチングアミニホスホリボシル転移酵素 (HPRT) を欠失したウイルムス腫瘍由来細胞株 (G401 HPRT⁻) と

細胞融合させた。その結果、分離した雑種細胞では悪性形質発現が見られないが、6-チオグアニンを含む選択培地で得た細胞では造腫瘍性を示し、両者の違いは導入した11番染色体が存在するか否かによることがわかった。13番染色体について行なった時には悪性形質の抑制が見られなかつたことから、この抑制遺伝子は網膜芽細胞腫に関与する Rb 遺伝子とは異なるものであることが示唆される。この他、多くの腫瘍で11番染色体に欠失がみられることが報告されており⁷⁾、複数の抑制遺伝子が存在する可能性もある。

チャイニーズハムスター細胞のがん抑制遺伝子を考える上で、これらの情報は極めて重要である。何故なら、すでにヒトでは1500以上、チャイニーズハムスターでは60以上の遺伝子が染色体上にマッピングされているが、ヒト11番染色体とチャイニーズハムスター3番染色体との間にかなりの相同意があることが分かっているからである (Genetic Maps, Vol. 4, 1987)。すでに述べてきたように、チャイニーズハムスターの場合3番染色体短腕部にがん抑制遺伝子の存在が示唆された。このことを証明するため、Stenman と Sager はヒト11番染色体に載っている6種の遺伝子について *in situ* ハイブリダイゼーションによる染色体マッピングを行なった⁴⁴⁾。表2は彼らの結果をまとめたものであるが (遺伝子の略名は表参照のこと)、いずれも3番染色体に分布していることがわかる。ただ、ヒトとチャイニーズハムスターとではその配列が異なっていた。たとえば INS と CAT では3番染色体短腕部の動原体に近い位置

(3p0-1と3p0)にあるが、ヒトではINSが11番染色体短腕の末端部(11p15.5)、CATはその中央部(11p13)に同定されている。両者の間にはHBBCとPTH、CALCが近接して存在し、チャイニーズハムスターではこれらは共に3番染色体長腕部(3q3-4)に位置していた。いずれにせよ、3番染色体短腕部にヒト11番染色体短腕部にある2種の遺伝子が近接して存在するという事実は、重要な意味を持つ。すなわち、3番染色体の欠失(del(3)(cen))がウイルムス腫瘍に関与するようながら抑制遺伝子(CAT, 11p13に近接)の消失となり、その結果として悪性形質発現が生じたのかもしれない。

まとめ

ここでは当研究室で得られた結果を中心に、細胞がん化における染色体変化の役割について考察した。細胞レベルで見ても、正常細胞から悪性ながん細胞に至る過程は複雑で、そこには複数の遺伝的変異が関係していることが示された。しかし、チャイニーズハムスター細胞の自然がん化系においてはかなり単純化でき、少なくともがん(トランسفォーミング)遺伝子の活性化とその抑制能の消失である程度説明できることが分かった。また、がん化に伴って出現する特定染色体変化(3qトリソミー)は、ウイルムス腫瘍の発症に関係しているようながん抑制遺伝子の消失であることが示唆された。もちろん、先のモデルで示したように無限増殖能の獲得や軟寒天コロニー形成能の獲得、そして造腫瘍性とその潜伏期から判断されるその後の悪性化には、それぞれ異なったがん遺伝子とがん抑制遺伝子が関係している可能性がある。いずれにせよ、まずはチャイニーズハムスター細胞から活性化がん遺伝子とがん抑制遺伝子を分離し、その遺伝子構造と働き、さらには染色体座位を明らかにすることが、当面の重要な課題である。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は、文部省がん研究

補助金、および財団法人北国がん研究振興財団の研究助成金の援助によってなされた。また研究を遂行するに当たって、当研究室の森俊雄氏や松永司氏をはじめ多くの学生諸君の協力を得た。ここに深く感謝の意を表するものである。

参考文献

- Boveri, T. : In "Zur Frage der Enstehung Maligner Tumoren", Fisher, Jena, 1914.
- Nowell, P. C. and Hungerford, D. A. : Science, 132, 1497 (1960).
- Yunis, J. J. : Science, 221, 227-236 (1983).
- Rowley, J. D. and Ultmann, J. E. : In "Chromosomes and Cancer: From Molecules to Man", Academic Press, 1983.
- Yunis, J. J., Soreng, A. L. and Bowne, A. E. : Oncogene, 1, 143-148 (1987).
- Croce, C. M. : Cell, 49, 155-156 (1987).
- 押村光雄, 清水素行:組織培養, 13, 404-408 (1987).
- Ponder B. : Nature, 335, 400-402 (1988).
- Stanbridge, E. J., Der, C. J., Doersen, C.-J., Nishimi, R. Y., Peehl, D. M., Weissman, B. E. and Wilkinson, J. E. : Science, 215, 252-259 (1982).
- Lee, W.-H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.-J., Shew, J.-Y. and Lee, E. Y.-H. P. : Science, 235, 1394-1399 (1987).
- Huang, H.-J. S., Yee, J.-K., Shew, J.-Y., Chen, P.-L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E. Y.-H. P. and Lee, W.-H. : Science, 242, 1563-1566 (1988).
- Lee, E. Y.-H. P., To, H., Shew, J.-Y., Bookstein, R., Scully, P. and Lee, W.-H. : Science, 241, 218-221 (1988).
- Harbour, J. W., Lai, S.-L., Whang-Peng, J., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Kaye, F. J. : Science, 241, 353-357 (1988).
- Foulds, L. : In "Neoplastic Development, Vol.2", Academic Press, 1975.
- Belenblum, I. : Cancer Res., 14, 471-477 (1954).
- 田矢洋一:医学のあゆみ, 133, 1144-1147 (1985).
- O'Brien, S. J. and Johnson, P. A. : "Genetic Maps", (Ed. O'Brien, S. J.), 598-599, Cold Spring Harbor Lab., 1987.
- Barrett, J. C. and Ts' o P. O. P. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3761-3765 (1978).
- Barrett, J. C. : Cancer Res., 40, 91-94 (1980).
- Smith, B. L. and Sager, R. : Cancer Res., 42, 389-396 (1982).
- Kraemer, P. M., Travis, G. L., Ray, F. A. and Cram, L. S. : Cancer Res., 43, 4822-4827 (1983).
- Suzuki, K., Suzuki, F., Watanabe, M. and Nikaido, O. : Cancer Res., 49, 2134-2140 (1989).
- Kakunaga, T., Crow, J. D., Leavitt, J. and Hamada, H. : In "13th International Cancer Congress, Part B, Biology of Cancer (1)", 127-140, Alan R. Liss, Inc., 1983.
- Suzuki, F., Suzuki, K. and Nikaido, O. : Tissue Culture Methods, 8, 109-113 (1983).
- Oshimura, M., Hesterberg, T. W. and Barrett, J. C. : Cancer Genet. Cytogenet., 22, 225-237 (1986).
- Connell, J. R. : Br. J. Cancer, 50, 167-177 (1984).
- Sager, R. and Kovac, P. E. : Somatic cell Genet., 4, 375-392 (1978).
- Bloch-Shtacher, N. and Sachs, L. : J. Cell. Physiol., 93, 205-212 (1977).
- Harrison, J. J., Anisowicz, A., Gadi, I., Raffeld, M. and Sager, R. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 6606-6610 (1983).
- Stenman, G., Delorme, E. O., Lau, C. C. and Sager, R. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 184-188 (1987).
- Kraemer, P. M., Ray, F. A., Bartholdi, M. F. and Cram, L. S. : Cancer Genet. Cytogenet., 27, 273-287 (1987).
- Stallings, R. L., Adair, G. M. and Siciliano, M. J. : In "Genetic Maps", (Ed. O'Brien, S. J.), 474-477, Cold Spring Harbor Lab., 1987.
- Stallings, R. L., Crawford, B. D., Black, R. J. and Chang, E. H. : Cytogenet. Cell Genet., 43, 2-5 (1986).
- 東孝次, 笹井平, 三好淳, 角永武夫: 実験医学, 5, 400-404 (1988).
- Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E. and Barbacid, M. : Nature, 300, 149-152 (1982).
- Nakano, S. and Ts' o P. O. P. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4995-4999 (1981).
- Friedberg, E. C. : In "DNA Repair", 1-77, Ron Newcomer & Associates, 1984.
- 前田盛, 山口俊昌, 杉山武敏: トキシコロジーフォーラム, 8, 697-704 (1985).
- Klein G. : Nature, 294, 313-318 (1981).
- Dofuku, R., Biedler, J. L., Spangler, B. A. and Old, L. J. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1515-1517 (1975).
- Bishop, J. M. : Science, 235, 305-311 (1987).
- 山本雅: 実験医学, 5, 391-399 (1988).
- Bloch-Shtacher, N. and Sachs, L. : J. Cell. Physiol., 87, 89-100 (1975).
- Stenman, G. and Sager, R. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9099-9102 (1987).
- Land, H., Parada, L. F. and Weinberg, R. A. : Science 222, 771-778 (1983).
- Land, H., Parada, L. F. and Weinberg, R. A. : Nature, 304, 596-602 (1983).
- 鈴木文男: 放射線科学, 31, 39-43 (1988).

- 48) Oshimura, M., Koi, M., Ozawa, N., Sugawara, O., Lamb, P. W. and Barrett, J. C. : *Cancer Res.*, **48**, 1623-1632 (1988).
- 49) Kitchin, R. M., Gadi, I. K., Smith, B. L. and Sager, R. : *Somatic Cell Genet.*, **8**, 677-689 (1982).
- 50) Gadi, I. K., Harrison, J. J. and Sager R. : *Somatic Cell Mol. Genet.*, **10**, 521-529 (1984).
- 51) Craig, R. W., Gadi, I. K. and Sager, R. : *Somatic Cell Mol. Genet.*, **14**, 41-53 (1988).
- 52) Sager, R., Tanaka, K., Lau, C. C., Ebina, Y. and Anisowicz, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7601-7605 (1983).
- 53) Craig, R. W. and Sager, R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2062-2066 (1985).
- 54) Noa, M., Kitayama, H., Matsuzaki, T., Sugimoto, Y., Okayama, H., Bassin, R. H. and Ikawa, Y. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 162-166 (1989).
- 55) Francke, U. : In "Chromosome and Cancer: From Molecules to Man" (Eds. Rowley, J. D. & Ultmann, J. E.). Academic Press, New York, 99-116 (1983).
- 56) Weissman, B. E., Saxon, P. J., Pasquale, S. R., Jones, G. R., Geister, A. G. and Stanbridge, E. J. : *Science*, **236**, 175-180 (1987).

シンポジウム「発がんに伴うDNA変化: 染色体異常およびがん遺伝子」

染色体移入による造腫瘍性抑制に働く
染色体の同定

神奈川県立がんセンター研究所 細胞遺伝 押村 光雄

はじめに

がん細胞の種々のがん形質、とりわけ造腫瘍性は正常細胞との細胞融合により抑制される。したがって、造腫瘍性の観点からみれば、正常細胞はがん細胞に対して優性であると考えられる¹⁾。すなわち、正常細胞中には、がん細胞の種々のがん形質を抑制する遺伝子（がん抑制遺伝子）が存在すると考えられ、発がん過程にはそのような遺伝子の消失あるいは不活性が必要であるとの仮説が成り立つ²⁾。その仮説を実証するためには、最終的には、遺伝子の分離およびその機能を知ることが必要不可欠ではあるが、種々のがん形質を抑制するがん抑制遺伝子の存在する染色体の同定は、その前段階として極めて重要な情報を提供してくれる。

1. 細胞雜種法の利用

1969年のHarrisらの研究を発端に³⁾、がん抑制遺伝子の存在すると考えられる染色体の同定が、細胞雜種法を用いて行われてきた⁴⁻¹²⁾。すなわち、がん細胞と正常細胞との融合により非腫瘍性となった雜種細胞を継代培養していく過程で、再び腫瘍性を再獲得した細胞が得られる。これらの細胞の染色体解析を行うと、ある特定の染色体の消失が認められた（表1）。たとえば、Stanbridgeらは、HeLa細胞株と正常ヒト由来線維芽細胞との非腫瘍性雜種細胞より腫瘍性を再獲得した雜種細胞においては、11番および14番染色体のそれぞれ1本が消失していることを見いだした⁵⁾。また、Benedictらは、ヒト線維肉腫由来細胞株

HT1080と正常線維芽細胞との細胞融合実験により、とりわけ1番染色体の消失が雜種細胞の造腫瘍性の再獲得と相関するとの結果を得た⁷⁾。いずれの場合においても、遺伝子多型(RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism)による解析より、消失した染色体は正常細胞由来のものであることが確認されており^{12, 13)}、正常細胞中にはがん抑制遺伝子が存在することを強く示唆している。また、表1に示すように、ヒト×ヒトばかりでなく異種間雜種細胞においても、がん抑制遺伝子の存在すると考えられる染色体の同定がなされてきた⁸⁾。このように、生物の種を越えて極めて安定ながん抑制遺伝子が存在するとともに、複数の遺伝子の存在を示唆している。しかし、マウス黒色腫、乳癌、肉腫およびリンパ腫に共通にマウス4番染色体が関与しているとの結果から推測されるように、腫瘍型に特異的であるようにはみえない。このことは、腫瘍型に特異的ながん抑制遺伝子が存在しないということを必ずしも意味しているものではなく、むしろ、造腫瘍性という限定された形質の抑制には共通の遺伝子が係わっていることを示唆しているように思える。このように、雜種細胞を用いて、がん抑制遺伝子の存在すると考えられる染色体の同定がなされてきたが、仮説の域を出でていない。

次に述べる微小核細胞融合法による染色体移入は、さらにがん抑制遺伝子の存在を明確にし、より具体的な問題を明らかにしてくれるものとして期待されている。

表1 細胞雑種法によって腫瘍性あるいは増殖の付着依存性の消失を抑制することが示唆された染色体⁴⁻¹¹⁾

腫瘍または非付着 依存性細胞	非腫瘍性細胞	腫瘍形質が再獲得された時に 消失した染色体
(ヒト×ヒト)		
HeLa (子宮頸癌)	正常線維芽細胞	11, 14
HeLa (子宮頸癌)	正常線維芽細胞	2, 11, 13, 17, 20
HT1080 (肉腫)	正常線維芽細胞	1, 4
(マウス×ヒト)		
A9 (肉腫)	正常線維芽細胞	8, 9, 11
RAG (肉腫)	正常線維芽細胞	8, 9, 11
PG19 (黒色腫)	正常リンパ球	2, 9, 13, 18
PG19 (黒色腫)	CML由来リンパ球	2, 3, 4, 5, 9, 13, 16, 18, Y
1D (肉腫)	CML由来骨髄細胞	2, 8, 9, 11, 13, 15, X, Y
FM3A (乳癌)	CML由来骨髄細胞	7, 8, 9, 20
(チャイニーズハムスター×ヒト)		
K627 (CHO由来線維肉腫)	正常線維芽細胞	2, 9, 10, 11, 17
a3 (DON由来線維肉腫)	正常リンパ球	2, 7, 12, 13, 15, 16, 18, Y
a3 (DON由来線維肉腫)	CML由来リンパ球	1, 2, 6, 7, 9, 15, X, 9q+
(シリアンハムスター×ヒト)		
シリアンハムスター	正常線維芽細胞	1
非付着依存性BHK		
(ヒト×マウス)		
NPC (鼻咽頭癌)	IT-22	1, 5, 6, 9, 11, 12, 15
B46M (バーキットリンパ腫)	1D	1, 2, 4, 5, 9, 11, 15
(マウス×マウス)		
PG19 (黒色腫)	正常線維芽細胞	4
MEL2C (黒色腫)	正常線維芽細胞	4
YACIR (リンパ腫)	正常線維芽細胞	4
A9TH (肉腫)	正常線維芽細胞	4
SEWA (肉腫)	正常線維芽細胞	4
TA3HaHB (乳癌)	正常線維芽細胞	4
T-細胞白血病	正常線維芽細胞	15
(シリアンハムスター×シリアンハムスター)		
r/m-1線維肉腫	正常胎児由来細胞	15

2. 微小核細胞融合法の利用

すでに述べたように、細胞雑種法を用いた研究によって、HeLa 細胞の造腫瘍性の抑制に11番染色体が関与していることを見い出したが⁵⁾、さらに、正常細胞由来の11番染色体を微小核融合法を用いて染色体移入することにより、HeLa 細胞の造腫瘍性を抑制することができることを示した¹⁴⁾。表2に、Stanbridge らのグループおよび我々のグループが行ってきた、染色体移入によるがん形質の変化に関する結果をまとめ¹⁴⁻¹⁹⁾、図1に我々の用いている手法についてその概要を示

した。

表2に示されるように、正常11番染色体移入によって子宮頸癌、横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍および線維肉腫由来の細胞株の造腫瘍性が抑制された¹⁴⁻¹⁹⁾。子宮頸癌においては、細胞雑種法によってその抑制遺伝子の存在が予想され⁵⁾、横紋筋肉腫およびウィルムス腫瘍においては、染色体解析および遺伝子多型 (RFLP) 分析により、がん抑制遺伝子が11番染色体上に存在することが示唆されていた^{22, 23)}。また、染色体解析およびRFLP 分析によって、1番染色体短腕部位の欠失

表2 正常ヒト染色体の移入によるがん形質の抑制

がん細胞株	造腫瘍性を抑制した染色体	造腫瘍性を抑制しなかった染色体	文献
子宮頸癌			
HeLa (D98/AH-2)	t (X; 11)		14
SiHa	11	12	16, 17
横紋筋肉腫			
A204	11		17
ウィルムス腫瘍			
G401	t (X; 11)	X, t (X; 13)	15
SK-NEP-1	11		19
子宮内膜癌			
HHUA	(1)**, 6, 9	11*, 19	17, 18
神経芽細胞腫			
SK-N-MC	1	11	19
腎細胞癌			
YCR	3*	1, 11, X	17, 19
線維肉腫			
HT1080	(1)**, 11	2, 7, 12	19
Kirsten 肉腫ウイルス 形質転換NIH3T3			
DT	(1)**	11, 12	19

*, 腫瘍増大速度の低下。

**, () in vitro における形質 (血清要求性、形態、増殖速度、付着依存性) に変化が生じたもの。

が高頻度に観察されてきた神経芽細胞腫²⁴⁾、3番染色体短腕部位の欠失が観察されている腎細胞癌においても²⁵⁾、その部位を含む染色体移入による結果は良く一致している。しかし、in vitro における種々の形質の変化は、1番染色体の移入によって造腫瘍性が抑制された HHUA, HT1080 および Kirsten 肉腫ウイルス感染形質転換 NIH3T3 細胞株 (DT) においてのみ認められた^{18, 19)}。とりわけ、1番染色体が移入された HHUA および HT1080 においては、その細胞形態の変化 (Flat) が著しく (図2)、1番染色体移入 DT を含め、血清要求性、増殖速度の低下、付着依存性は 3 細胞株に共通に認められた^{18, 19)}。

このように、造腫瘍性の抑制と in vitro の形質変化とは必ずしも一致しない。また、HHUA および HT1080 にみられるように、複数個の染色体ががん形質抑制に係わっている。これらのこととは、

RFLP 分析によって示されてきたように^{26, 27)}、発がんの様々な段階において、がん抑制遺伝子が関与しているとの考えを強く支持する。

おわりに

細胞雑種法および微小核細胞法によって明らかにされてきたがん形質抑制に係わる遺伝子の存在する染色体の同定について示した。現在、2つのグループにおいて進められているのみであり、ようやく正常染色体移入により、種々のがん形質の抑制が可能であることが明らかになった段階である。今後、RFLP および染色体解析で示されてきたがんに特異的にみられる消失部位のがん化における役割を知る上において、染色体移入によるがん形質抑制に関する研究は、貴重な情報を提供してくれるであろう。

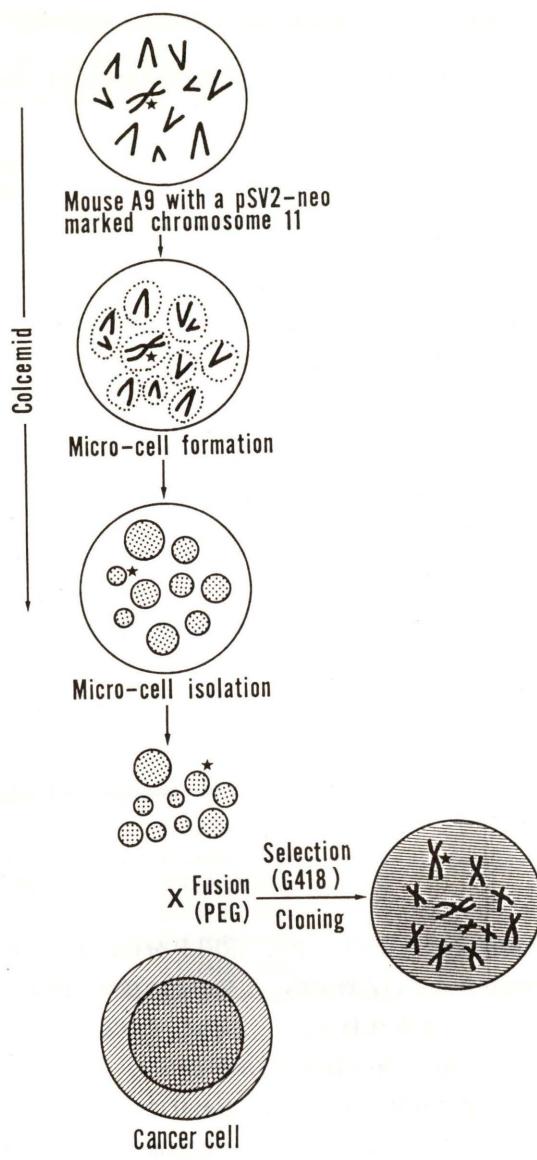


図1 pSV2neo遺伝子マーカーを標識した正常ヒト染色体を含むマウスA9細胞から微小核細胞を形成し、がん細胞へ正常ヒト染色体を移入するまでの模式図^{20, 21}。(方法と原理:pSV2neo優性遺伝子を正常ヒト線維芽細胞へトランスフェクションする。G418を含む培地で選択培養することにより、pSV2neoが取り込まれたクローンを得る。pSV2neo遺伝子は一般にランダムに染色体中に組み込まれる。コルセミドは細胞分裂時の紡錘子形成を阻害することにより核の分裂を阻害する。マウスA9細胞は長時間コルセミド処理することによって微小核を効率よく形成する。ところが正常細胞の多くは微小核の形成率が非常に低いので、微小核細胞を他の細胞へ融合するのに十分数を得ることができない。この点を克服するために、第一ステップとしてヒト×マウス雑種細胞を形成し、これらの雑種細胞で微小核を誘導させる。サイトカラシンB処理、遠心後得られる微小核細胞は微小核(1~数個の染色体が含まれる)とわずかな細胞膜よりなる。これらの微小核細胞とA9細胞とを再び融合させ、G418で選択培養することにより、pSV2neoで標識された染色体を含むA9クローンを得ることができる。図に示すように、これらのクローンを供与細胞として微小核細胞を形成して、目的とするがん細胞と再び融合することによって、がん細胞への特定ヒト正常細胞由来染色体の移入が完了する。)

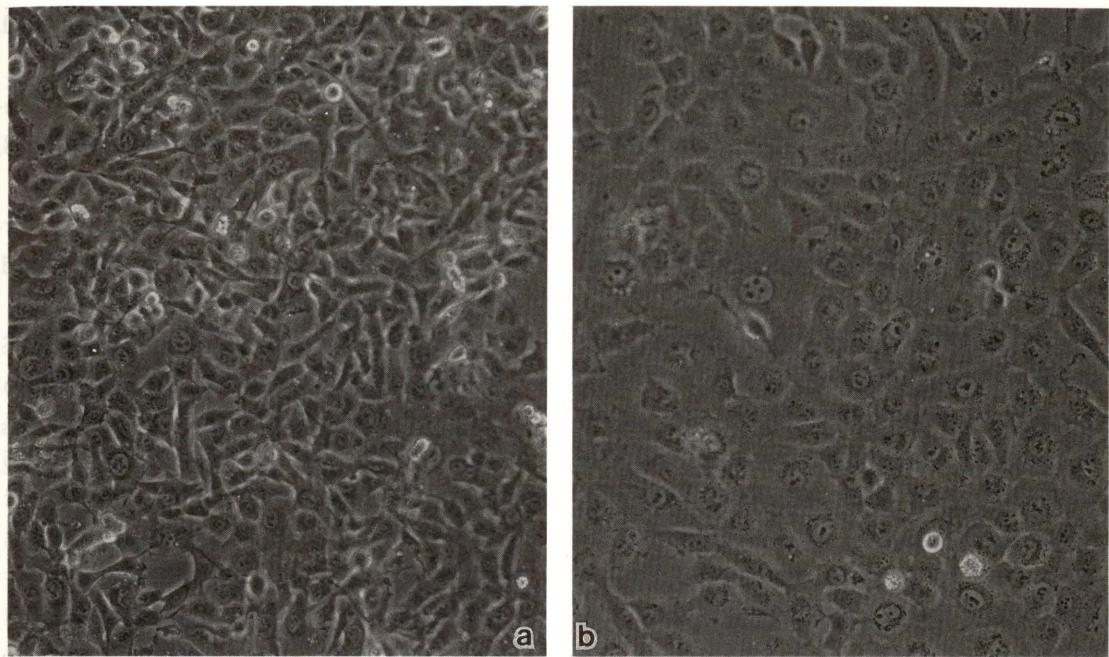


図2 ヒト線維肉腫細胞株 HT1080(a)と正常ヒト線維芽細胞由来の1番染色体を移入したクローン(b)の細胞形態

参考文献

- 1) Klein, G., Bregula, U., Wiener, F., Harris, H. : *J. Cell Sci.* 8 : 659-672, 1971.
- 2) Harris, H. : *Cancer Res.* 48 : 3302-3306, 1988.
- 3) Harris, H., Klein, G. : *Nature (Lond.)* 224 : 1314-1316, 1969.
- 4) 押村光雄: *組織培養* 13 : 2-6, 1987.
- 5) Stanbridge, E. J., Flandermeyer, R. R., Daniels, D. W., Nelson-Rees, W. A. : *Somat. Cell Genet.* 17 : 699-712, 1981.
- 6) Klinger, H. P. : *Cytogenet. Cell Genet.* 32 : 68-84, 1982.
- 7) Benedict, W. F., Weissman, B. E., Mark, C., Stanbridge, E. J. : *Cancer Res.* 44 : 3471-3479, 1984.
- 8) Weissman, B. E. : (ed. by J. C. Barrett) *Mechanisms of Environmental Carcinogenesis*, CRC Press : 31-45, 1987.
- 9) Stanbridge, E. J. : *Adv. Viral Oncology* 6, Raven Press : 83-101, 1987.
- 10) 押村光雄, 清水素行: *Biomedica* 4 : 77-82, 1989.
- 11) Oshimura, M. : *Cancer Res.* 48 : 1623-1632, 1988.
- 12) Srivatsan, E. S., Benedict, W. E., Stanbridge, E. J. : *Cancer Res.* 46 : 6174-6179, 1986.
- 13) Paterson, H., Reeves, B., Brown, R., Hall, A., Furth, M., Bos, J., Jones, P., Marshall, C. : *Cell* 51 : 803-812, 1987.
- 14) Saxon, P. J., Srivatsan, E. S., Stanbridge, E. J. : *EMBO J.* 15 : 3461-3466, 1986.
- 15) Weissman, B. E., Saxon, P. J., Pasquale, S. R., Jones, G. R., Geiser, A. G., Stanbridge, E. J. : *Science* 236 : 175-180, 1987.
- 16) Koi, M., Morita, H., Yamada, H., Satoh, H., Barrett, J. C., Oshimura, M. : *Mol. Carcinogenesis* 2 : 12-21, 1989.
- 17) Oshimura, M., Kugoh, H., Koi, M., Shimizu, M., Yamada, H., Satoh, H., Barrett, J. C. : *J. Cell. Biochem. (in press)*.

- 18) Yamada, H., Wake, N., Fujimoto, S., Morita, H., Oshimura, M. : (Submitted)
- 19) Oshimura, M. et al. (未発表).
- 20) Koi, M., Shimizu, M., Morita, H., Yamada, H., Oshimura, M. : Jpn. J. Cancer Res. 80 : 413-418, 1989.
- 21) 押村光雄, 児井 稔: 実験医学 (羊土社) 7 : 89-92, 1989.
- 22) Cavenee, W. K., Koufos, A., Hansen, M. F. : Mut. Res. 168 : 3-14, 1986.
- 23) 横田 淳: 癌 '88 : 159-164, 1988.
- 24) Fong, C. -T., Dracopoli, N. C., White, P. S., Merrill, P. T., Griffith, R. C., Housman, D. E., Brodeur, G. M. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 3753-3757, 1989.
- 25) Zbar, B., Brauch, H., Talmadge, C., Linehan, M. : Nature (Lond.) 327 : 721-724, 1987.
- 26) Yokota, J., Wada, M., Shimosato, Y., Terada, M., Sugimura, T. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 9252-9256, 1987.
- 27) Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smiths, A. M. M., Bos, J. L. : N. Engl. J. Med. 319 : 525-532, 1988.

環境変異原研究11 : 41-45 (1989)

シンポジウム 「発がんに伴う DNA 变化: 染色体異常およびがん遺伝子」

ヒトがんにおける染色体欠失

国立がんセンター研究所がん転移研究室 横田 淳

1. はじめに

近年, ヒトがん細胞における染色体特定領域の欠失とがん化との関連が注目されている。遺伝性腫瘍など特定の腫瘍では以前から染色体の特定領域に欠失があることが指摘されており, 欠失部位にあるがん抑制遺伝子(antioncogene)の不活化によるがん化機構が想定されていた。特に網膜芽細胞腫でその研究が進んでおり, ヒト第13染色体長腕から網膜芽細胞腫で欠失している遺伝子(RB遺伝子)が既に単離され, この遺伝子が網膜芽細胞腫で不活化していることを示唆するデータが蓄積されてきている。染色体欠失の研究が遺伝子レベルへと急速に展開し, その結果は染色体欠失ががん化を抑制している遺伝子を完全に不活化するための二段階目の変化であることを裏付けている。また, 分子遺伝学的解析法の進歩により種々の固形がんの染色体異常が遺伝子レベルで分析できるようになり, 遺伝性腫瘍だけでなく, 一般的な成人腫瘍にも同様の染色体欠失が高頻度に起こっていることがわかつてき。そこで, 現在では多くのがんの発症に染色体欠失が関与していると考えられるようになつた¹⁻⁷⁾。我々も分子遺伝学的な手法を用いて, 種々のがんにおける染色体欠失について解析している。ここでは最も頻度の高い成人腫瘍のひとつである肺がんを例にあげ, 我々の研究成果を中心に染色体欠失の研究について概説したい。特に, 肺小細胞がんにおける第3, 13, 17染色体の欠失について述べ, さらに第13染色体にある RB 遺伝子が肺小細胞がんでも不活化していることを示唆するデータを紹介する。

2. 肺小細胞がんにおける第3染色体短腕の欠失

肺がんの染色体異常として肺小細胞がんにおける第3染色体短腕の部分欠失が1982年に Whang - Peng らによって報告されている⁸⁾。これは核型分析(karyotype analysis)で示されたものだが, 肺小細胞がんで100%(12/12)起こり, 他の組織型の肺がんでは起こらない(0/5)と報告されていて注目されていた。しかし, 多くのグループにより追試が行われた結果, 欠失があるというグループとないというグループがあつて最近まで論議を呼んでいた。また腺がんなど他の組織型の肺がんにも起こっているとの報告もあり, 特異性についても異論があった。その原因はおそらく固形がんの核型分析が手技的に複雑なことがあると思われる。更に, 多くは株化されたがん細胞の分析結果なので生体内的がん細胞で実際に起こっているか疑問視する人も多かった。

3. 遺伝子レベルで染色体欠失を同定できる RFLP 分析

このような疑問をすべて解決するような分析法が1982年 Cavenee らによって開発された⁹⁾。即ち, DNA 多型性(polymorphism)を利用して染色体欠失の部位を遺伝子レベルで同定する RFLP (restriction fragment length polymorphism)分析である。RFLP 分析は染色体欠失部位の同定のみならず, 遺伝性疾患の遺伝子部位の同定, 個人の識別(親子鑑定, 犯人の同定など)など様々な領域で応用されているので, まずその原理を説明する。RFLP とは, 細胞の DNA を適当な制限酵素(restriction endonuclease)で切断したときに, 遺伝子配列の個体差のために生ずる, DNA 断片(fragment)の長さ(length)の多型性(polymorphi-

sm)のことである。この長さの違いを Southern blot hybridization 法で検出すれば各個人で違ったパターンが得られる。更に、対になった相同染色体のそれとも識別できる。染色体上の位置がわかっている DNA フラグメントをマーカーとして同一患者の正常組織 DNA とがん組織 DNA のパターンを比較すれば染色体の欠失を検出できる。即ち、長さの異なる 2 本のバンドのうちどちらか一方の消失ががん組織 DNA で観察される。筆者らは、この RFLP 分析でヒト肺がんにおける染色体欠失の有無について検索しているので、肺小細胞がんで第 3 染色体短腕(3p)と第 17 染色体短腕(17p)の欠失を認めた症例を図 1 に示して、その方法を具体的に説明する。患者の腫瘍組織及び正常組織から得られた DNA を制限酵素 *Msp*I で切断し、アガロースゲル電気泳動後ニトロセルロースフィルターにトランスファーして ³²P で標識した多型性 DNA マーカー pHF12-32(3p を認識する)または pHF12-2(17p を認識する)をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うと、正常組織 DNA では対になった染色体が大小 2 本のバンドとして検出される。これに対して、腫瘍組織 DNA では大きい方のバンドがほとんど消失している。バンドがすかに残っているのは、腫瘍組織内に正常細胞が少し混入しているためである。この結果から、この症例では腫瘍細胞で特異的に 3p と 17p が欠失していることがわかる。

この方法を利用して、この 2, 3 年の間に種々の固型腫瘍の染色体分析がなされ、予想以上に多くのがんで染色体欠失が起こっていることが明らかにされた。更にその頻度はそれぞれのがんで、今まで言われていた遺伝子の異常(がん遺伝子など)より高く、がん化の原因と考えられる変化ではないかと注目されている。

4. RFLP 分析で確認された肺小細胞がんにおける第 3 染色体短腕(3p)の欠失

前述したように、核型分析で議論になっていた 3p 欠失の有無について RFLP 分析で結論が出た。その結果は米国、英国のグループと筆者らのグ

表 1 肺がんにおける第 3 染色体短腕の欠失

文献	頻度	
	小細胞がん	非小細胞がん
Naylor et al. (10)	9/9	0/2
Yokota et al. (11)	7/7	5/8
Kok et al. (12)	7/7	12/12
Braugh et al. (13)	13/13	4/15

ループからほぼ同時期に発表されたが、どの結果も同様で肺小細胞がんでは 3p の欠失が 100% 起こっていることを示していた。即ち、米国の Naylor らは 9 例中 9 例、英国の Kok らは 7 例中 7 例、そして筆者らも 7 例中 7 例で 3p の欠失を見出しました¹⁰⁻¹²。核型分析の疑問点はすべて解消されたわけで、肺小細胞がんでは生体内のがん細胞すべて 3p の欠失を伴っていることが遺伝子レベルで証明されたわけである。しかし、その特異性に関しては各グループで結果が異なっており、小細胞がん以外の肺がん(腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんなど)では、米国の 15 例中 4 例に対し、英国では 12 例すべてに 3p の欠失を検出している^{12, 13}(表 1)。筆者らの検討でも腺がんでの 6 例中 5 例を含む非小細胞がん 8 例中 5 例に欠失があり、少なくとも小細胞がんに特異的な変化ではないようである¹¹。肺がんすべてに共通な変化かどうかは今後のより詳細な遺伝子レベルでの検討が必要である。特定染色体領域の欠失が遺伝子レベルで 100% 起こっていたのは、しかも欧米と日本の結果が全く一致していたのは肺小細胞がんが初めてであり、3p にがん化に関わる重要な遺伝子が存在することを強く示している。3p の欠失は腎臓がんでもほぼ 100% 起こっており、また腎臓がんをしばしば合併する遺伝性疾患の von Hippel Lindau 病の原因遺伝子も 3p にあることが RFLP を利用した連鎖検定(linkage analysis)で明らかになっている¹⁴⁻¹⁶。さらに我々は、最近、3p の欠失は子宮頸がんでも 100% の症例で起こっていることを見出しました¹⁷。肺小細胞がんと腎臓がん、さらに子宮頸がんの発症に同じ遺伝子が関わっているのか、近くにそれ

表 2 肺がんにおける第 3, 13, 17 染色体の欠失

組織型	欠失の頻度		
	3p	13q	17p
小細胞がん	15/15	15/16	16/16
非小細胞がん	5/8	10/31	3/12

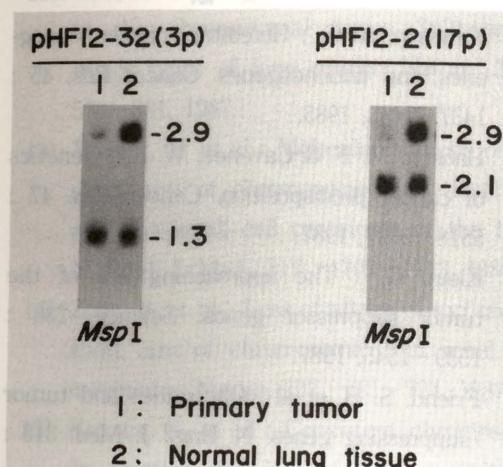


図 1 3p and 17p Deletion in Stage I Small Cell Lung Cancer

ぞれ別の遺伝子があるのか、興味が持たれている。今後の研究は遺伝子の単離が焦点であり、その結果からがん化の機構もより具体的に分子レベルで明らかになると思われる。

5. RFLP で明らかになった肺小細胞がんにおける第 13, 17 染色体の欠失

肺小細胞がんの染色体異常は、核型分析で 3p 以外にも指摘されていたが、複雑なためか統一的な見解はなかった。筆者らは RFLP 分析で 3p 以外の種々の染色体領域についても欠失の有無について検索した結果、肺小細胞がんでは 3p のみならず第 13 染色体長腕(13q)、第 17 染色体短腕(17p)も同時にほぼ 100% の症例で欠失していることを見出しました¹¹(表 2)。特に、これらの欠失は未治療例や stage I の症例にも検出され(図 1)、また *N-myc* 遺伝子の增幅より先に起こっていることがわかったので、肺小細胞がんのがん化に直接関わる

表 3 種々のヒトがんにおける第 3, 13, 17 染色体の欠失

欠失部位	がん	頻度(%)	文献
3p	肺小細胞がん	100	10-13
	非小細胞肺がん	—	11-13
	腎臓がん	76-100	14, 15
	子宮頸がん	100	17
13q	肺小細胞がん	91	11
	網膜芽細胞腫	75	18
	骨肉腫	64	19
	乳がん	40	20
17p	肺小細胞がん	100	11
	骨肉腫	75	19
	大腸がん	75	21, 22

重要な変化であると考えている。

特に 3p は、前述したように von Hippel Lindau 病の遺伝子がある領域で、腎臓がんでもほぼ 100% の症例で欠失が見られている。また、13q は網膜芽細胞腫、骨肉腫、乳がんなどでも欠失しており、がん抑制遺伝子として単離された *RB* 遺伝子が存在する部位である^{5-7, 18-20}。更に、17p は骨肉腫、大腸がんなどでも高率に欠失している染色体領域である^{19, 21, 22}(表 3)。組織型の異なるがんの発症に同じ遺伝子が関与しているのか、それとも染色体レベルでは同じ領域でもその中に異なる遺伝子が関与しているのか、今のところ結論は出ていない。それぞれの染色体領域から遺伝子が単離され、その変化を解析することによって明らかになってくると思われる。

6. 肺小細胞がんにおける *RB* 遺伝子の発現異常

染色体欠失が実際にがん抑制遺伝子を不活化しているという直接証拠は今のところない。しかし、ヒトの第 13 染色体長腕 q 14 領域から単離された *RB* 遺伝子は、網膜芽細胞腫で mRNA レベルで発現異常がしばしば観察され、その結果正常な蛋白が作られなくなっている^{5-7, 24}。この結果は、*RB* 遺伝子ががん抑制遺伝子であり、その不活化が網膜芽細胞腫の発症と密接に関わっていることを強く支持している。

肺がんでも類似の変化が起こっていることが予想される。肺小細胞がんで欠失している 3p と 17p

Pからはまだ遺伝子が単離されていないので遺伝子レベルの解析はできないが、13qにはRB遺伝子があり、肺小細胞がんでも網膜芽細胞腫と同様にRB遺伝子が異常を起こしている可能性もある。そこで筆者らはRB遺伝子産物に対する抗体を作製し、肺小細胞がん由来培養株9例を用いてRB遺伝子の発現について解析した。その結果、肺小細胞がんではRB蛋白を全く発現していないことをつきとめた²⁵⁾。mRNAの発現はあるが、大きさの異なるもの、量的に少ないものなど様々であり、残存するRB遺伝子に異常が起こっていることが強く示唆された。現在、遺伝子レベルでの異常について解析中だが、これらの変化は網膜芽細胞腫におけるRB遺伝子の変化と全く同じであり、RB遺伝子の不活化が肺小細胞がんの発症にも関与していることが強く示唆される。

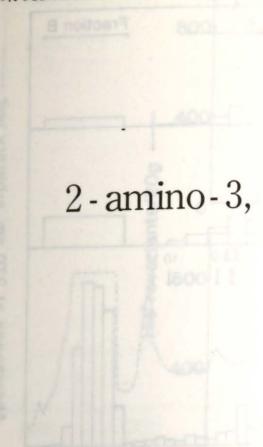
7. おわりに

がん遺伝子、がん抑制遺伝子の研究はこの10年間に急速な進歩を遂げ、ヒトがんの病態が遺伝子レベルの変化と対応してとらえられるようになってきた。細胞のがん化及びその悪性化の原因となる遺伝子異常が把握されれば、がんの状態をより適格に判定する診断法や根治的な治療法の開発も十分に期待される。肺がんでは特に肺小細胞がんを中心に解析が進んでおり、細胞の悪性度・薬剤感受性なども遺伝子レベルでとらえられてきている。例えば、*myc*遺伝子群の増幅ないし過剰発現はがん細胞に二次的に起こる変化で、がんの悪性化に関与している²⁶⁾。ここでは特に染色体欠失という現象に焦点を合わせて概説したが、がん細胞における染色体欠失はがん抑制遺伝子の不活化を導く重要な変化であることがわかってきていている。更に欠失は、調べた限りすべてのがん細胞に共通して起こっていることから、細胞のがん化するための必須の変化であるらしい。染色体欠失の意義を解明することは、発がんの機構を把握するためには極めて重要である。今後の研究で欠失した領域から次々と遺伝子が単離されてくると思われるが、それらの遺伝子がどのような異常を起こして

いるか明らかになれば染色体欠失の意味も解明されるであろう。今後の研究の発展に期待したい。また、その研究に取り組む者の一人として、筆者らの研究ががん研究発展の一助になれば幸いであると考えている。

参考文献

- 1) Knudson, A. G. : Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* 45 : 1437-1443, 1985.
- 2) Hansen, M. F. & Cavenee, W. K. : Genetics of cancer predisposition. *Cancer Res.* 47 : 5518-5527, 1987.
- 3) Klein, G. : The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science*, 238 : 1539-1545, 1987.
- 4) Friend, S. H. et al : Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N. Engl. J. Med.* 318 : 618-622, 1988.
- 5) Friend, S. H. et al : A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323 : 643-646, 1986.
- 6) Lee, W.-H. et al : Human retinoblastoma susceptibility gene : Cloning, identification, and sequence. *Science*, 235 : 1394-1399.
- 7) Fung, Y.-K.T. et al : Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, 236 : 1657-1661, 1987.
- 8) Whang-Peng, J. et al : Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer : Deletion 3p(14-23). *Science* 215 : 181-182, 1982.
- 9) Cavenee, W. K. et al : Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305 : 779-784, 1983.
- 10) Naylor, S. L. et al : Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature*, 329 : 451-454, 1987.
- 11) Yokota, J. et al : Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 9252-9256, 1987.
- 12) Kok, K. et al : Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature*, 330 : 578-581, 1987.
- 13) Braugh, H. et al : Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small-cell carcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.*, 317 : 1109-1113, 1987.
- 14) Zbar, B. et al : Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature*, 327 : 721-724, 1987.
- 15) Kovacs, G. et al : Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 1571-1575, 1988.
- 16) Seizinger, B.R. et al : Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature*, 332 : 268-269, 1988.
- 17) Yokota, J. et al : Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.*, 49 : 3598-3601, 1989.
- 18) Benedict, W. F. et al : Complete or partial homozygosity of chromosome 13 in primary retinoblastoma. *Cancer Res.*, 47 : 4189-4191, 1987.
- 19) Toguchida, J. et al : Chromosomal reorganization for the expression of recessive mutation of retinoblastoma susceptibility gene in the development of osteosarcoma. *Cancer Res.* 48 : 3939-3943, 1988.
- 20) Lundberg, C. et al : Loss of heterozygosity in human ductal breast tumors indicates a recessive mutation on chromosome 13. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 2372-2376, 1987.
- 21) Fearon, E. R. et al : Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science*, 238 : 193-197, 1987.
- 22) Monpezat, J.-Ph. et al : Loss of alleles on chromosome 18 and on the short arm of chromosome 17 in polyploid colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer*, 41 : 404-408, 1988.
- 23) Yokota, J. et al : Altered expression of the retinoblastoma (RB) gene in small-cell carcinoma of the lung. *Oncogene*, 3 : 471-475, 1988.
- 24) Lee, W.-H. et al : The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*, 329 : 642-645, 1987.
- 25) Yokota, J. et al : Heterogeneity of lung cancer cells with respect to the amplification and rearrangement of *myc* family oncogenes. *Oncogene*, 2 : 607-611, 1988.



コーヒー煎り豆における 2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoline (MeIQ) の生成とその含量

東京薬科大学 高橋伸也, 加藤哲太, 菊川清見

1. はじめに

畜肉, 魚肉, 大豆タンパクなどのタンパク性食品の加熱によって, ヘテロサイクリックアミン変異原物質が生成することが報告されており, これまでに12種類のヘテロサイクリックアミン変異原物質が明らかにされている¹⁻³。市販のコーヒー煎り豆には, その熱湯抽出物中に *Salmonella typhimurium* TA100 株に陽性の変異原物質メチルグリオキザール⁴⁾がみい出されているが, コーヒー煎り豆は高温で加熱加工して作られており, 加熱によって生成する変異原物質も含有している可能性がある。我々は, コーヒー煎り豆とインスタントコーヒーの熱湯抽出物中にブルーコットンに吸着し, 代謝活性化を受けて *Salmonella typhimurium* TA98 株に陽性の新しい型の変異原物質が存在することを報告した⁵⁾。今回, この変異原物質の本体について追跡し, コーヒー中には 2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoline (MeIQ) およびその他の少なくとも 5 種類の未知ヘテロサイクリックアミン様変異原物質が存在し, これらはコーヒー豆の加熱によって生成することを明らかにした。

2. 材料と方法

ドラム中で熱風によりばい煎(熱風ばい煎)したコーヒー煎り豆と炭火によりばい煎(炭火焼)したコーヒー煎り豆は, 市販品をそのまま用いた。高温加熱コーヒー煎り豆は, 热風ばい煎したコ

ヒー煎り豆をフライパンで400°Cまで加熱した。コーヒー煎り豆中のヘテロサイクリックアミン様変異原物質の精製は, Fig. 1 に示すように, 抽出, ブルーコットン吸着, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC), Amberlite XAD-2 カラムクロマトグラフィーおよび Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを組み合わせて行った。

HPLC は, YMC S-343 ODS column (2cm i. d. × 25cm), YMC A-303 ODS column (4.6mm

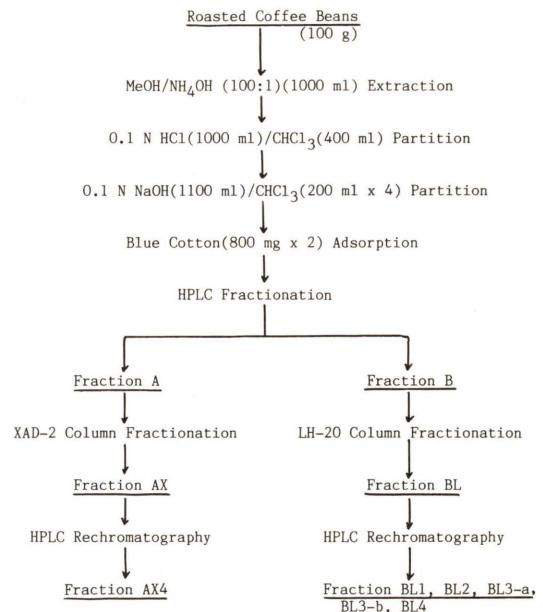


Fig. 1. Procedure for Purification of Heterocyclic Amine Mutagens of Roasted Coffee Beans.

i. d. × 25cm) [山村化学研究所], Inertsil ODS column (4.6mm i. d. × 25cm) [ガスクロ工業]を用い, 島津 LC-6A liquid chromatograph で行った。溶出溶媒には 0.01M triethylamine bicarbonate (pH 7.3) /MeOH (2:3) [solvent A], 0.01M triethylamine bicarbonate (pH 7.3) /MeOH (1:1) [solvent B], 0.01M triethylamine bicarbonate (pH 7.3) /MeOH (3:2) [solvent C], 0.025M H_3PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 3.0) /CH₃CN (9:1) [solvent D], 0.025M H_3PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 3.0) /CH₃CN (4:1) [solvent E], 0.025M H_3PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 3.0) /CH₃CN (3:1) [solvent F], 0.01M HCOONH₄ /CH₃CN (3:2) [solvent G], MeOH [solvent H]を用いた。UV 吸収ピークは, 島津 SPD-6A UV spectrophotometric detector で検出した。

3. 結果と考察

変異原物質の検索

熱風ばい煎したコーヒー煎り豆、炭火焼コーヒー煎り豆および高温加熱したコーヒー煎り豆に含まれる変異原物質を、MeOH-NH₄OH抽出、酸性CHCl₃分配、アルカリ性CHCl₃分配、ブルーコットン吸着を行い精製した後、分取用カラムを用いてHPLCを行った (Fig. 2)。いずれのサンプルにおいてもAフラクションおよびBフラクションの双方に変異原活性が現われ、両フラクションの活性は、加熱条件が強くなるに従い増加し、特に高温加熱したコーヒー煎り豆ではBフラクションに非常に強い活性が認められた。AおよびBフラクションにおける変異原活性の回収率は、熱風ばい煎したコーヒー煎り豆で55%および25%，炭火焼コーヒー煎り豆で59%および35%，高温加熱したコーヒー煎り豆で21%および55%であった。これら変異原物質は塩基性ヘテロサイクリックアミン様物質と考えられるが、既知のヘテロサイクリックアミン変異原物質 1-12は、Aフラクションにすべて溶出され、これらの既知変異原物質より低極性の位置にBフラクションが溶出された。以下高温加熱したコーヒー煎り豆を用いて、フラクションAおよびBの変異原物質を追跡した。

A フラクションの変異原物質

A フラクションの変異原物質について XAD-2 カラムで UV 吸収物質の多くを除去し AX としたのち、4 段階の HPLC を行い、TA98+S9 mix での活性と 270 nm における UV 吸収を測定した (Fig. 3)。その結果、変異原活性を示す単一の

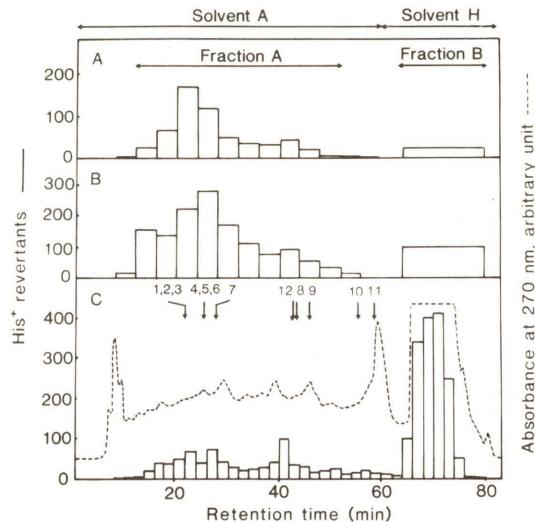


Fig. 2. HPLC of the Mutagens in Roasted Coffee Beans : Hot Air-roasted (A) , Charcoal-roasted (B) and High Temperature-roasted (C).

Roasted coffee beans were extracted with methyl alcohol/ammonium hydroxide (100 : 1) and subsequently extracted into the acidic solution and into the chloroform after alkalization and finally purified by blue cotton adsorption. The mutagens in 50g of hot air-roasted coffee beans (A), 100 g of charcoal-roasted coffee beans (B) and 10 g of high temperature-roasted coffee beans (C) were separated by HPLC on a YMC S-343 ODS column using solvents A and H. The mutagenicity of each fraction was assayed with *Salmonella typhimurium* TA98 with S9 mix. Ultraviolet absorbing-peaks were detected at 270 nm. Authentic heterocyclic amine mutagens are 1, IQ ; 2, MeIQx ; 3, Glu-P-2 ; 4, 7, 8-DiMeIQx ; 5, 4, 8-DiMeIQx ; 6, MeIQ ; 7, Glu-P-1 ; 8, A α C ; 9, Trp-P-2 ; 10, Trp-P-1 ; 11, MeA α C ; and 12, PhIP.

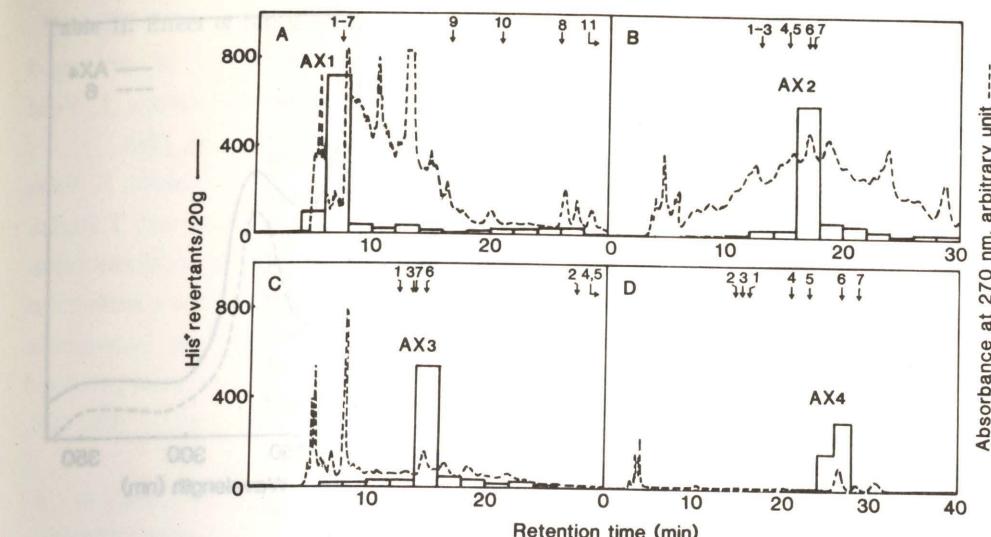


Fig. 3. Rechromatography of XAD-2 Fraction AX of High Temperature-roasted Coffee Beans.

A : Fraction A (20g equivalent amount of coffee beans) (Fig. 2) was purified by XAD-2 adsorption (fraction AX), and fraction AX was loaded to YMC A-303 ODS column and eluted with solvent E at a flow rate of 0.5 ml/min. The recovery of the mutagenic activity in fraction AX₁ was 74%. B : Fraction AX₁ was loaded to an Inertsil ODS column and eluted with solvent B at a flow rate of 0.5 ml/min. The recovery of the mutagenic activity in fraction AX₂ was 72%. C : Fraction AX₂ was loaded to the same column and eluted with solvent D at a flow rate of 0.5 ml/min. The recovery of mutagenic activity in fraction AX₃ was 87%. D : Fraction AX₃ was loaded to the same column and eluted with solvent C at a flow rate of 0.7 ml/min. The recovery of the mutagenic activity in fraction AX₄ was 91%.

The mutagenicity of each 1 ml fraction was measured with *Salmonella typhimurium* TA98 with S9 mix. Ultraviolet absorbing peaks were detected at 270nm. The numbering of authentic mutagens is the same as in Fig. 2.

UV 吸収ピーク AX₄ が認められ、この retention time は標品 6, すなわち MeIQ と一致した。なおこれら各々段階において変異原活性の 70% 以上が回収できた。

Fig. 3D の条件で AX₄ と標品 MeIQ との cochromatography を行ったところ、単一ピークとして現われた。AX₄ の UV 吸収スペクトル (Fig. 4) は 268 nm に吸収極大を示し、これは標品 MeIQ のスペクトルと一致した。また AX₄ と標品 MeIQ との変異原活性を TA98 株、TA100 株を用いて S9 mix 存在下および非存在下で測定した結果、同程度の変異原活性 [AX₄ : 748, MeIQ : 886 (His⁺ revertants/5 × 10⁻⁴ absorbance unit at 270 nm)] が TA98 + S9 mix の系でのみ認められ、

た。以上、cochromatography, UVスペクトル、および活性発現の結果より、AX₄ は MeIQ であると同定した。

A フラクションの活性に基づき、コーヒー煎り豆 10 g 当量における MeIQ 含量を算出し Table I に示した。MeIQ は焼いわしや焼肉中に検出されているが、コーヒー煎り豆にも同程度の MeIQ が含まれていることが分かった。

B フラクションの変異原物質

B フラクションは、まず LH-20 カラムを用いて、クリーンアップを行い、多くの UV 吸収物質を除去した (変異原活性の回収率: 77%)。このサンプル BL について、HPLC を行った結果 (Fig. 5A)、BL1、BL2、BL3 および BL4 の 4 つの活性フ

Fig. 4. Ultraviolet Absorption Spectrum of HPLC Fraction AX₄ of High Temperature-roasted Coffee Beans.

HPLC fraction AX₄ of high temperature-roasted coffee beans (Fig. 3D) and authentic MeIQ (6) were dissolved in methyl alcohol for measurement of the spectrum.

Table I. MeIQ Content in Roasted Coffee Beans.

Sample	MeIQ (ng/10 g)*
Hot-air-roasted	0.16
Charcoal-roasted	0.32
High-temperature-roasted	1.5

* Based on mutagenicity of HPLC fraction A (Fig. 2)

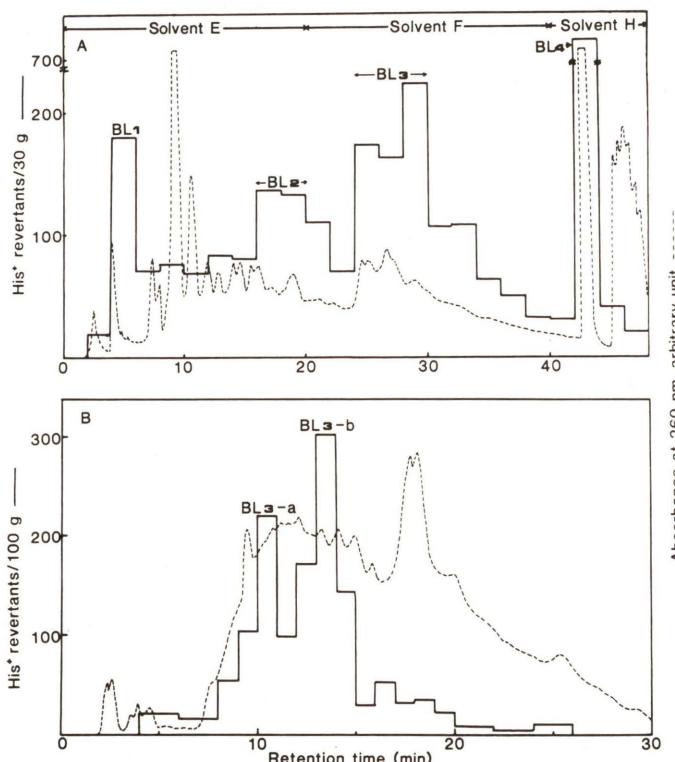
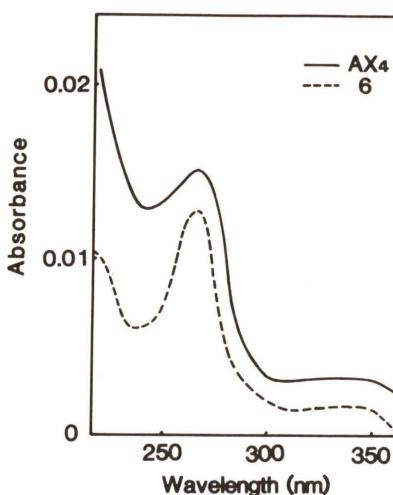


Fig. 5. Rechromatography of LH-20 Fraction BL of High Temperature-roasted Coffee Beans.

A : Fraction B (30g equivalent amount of coffee beans) was purified by LH-20 column (fraction BL), and fraction BL was loaded to Inertsil ODS column and eluted with solvent E, F and H at a flow rate of 1.0 ml/min. The total recovery of the mutagenic activity in fraction BL1, BL2, BL3 and BL4 was 77%.

B : Fraction BL3 was rechromatographed on an Inertsil ODS column by elution with solvent G at a flow rate of 1.0 ml/min. The mutagenicity of each 1 ml fraction was measured on *Salmonella typhimurium* TA98 with S9 mix. Ultraviolet-absorbing peaks were detected at 260 nm.

Table II. Effect of Nitrite Treatment on the Mutagenicity of Fractions B, BL1, BL2, BL3-a, BL3-b and BL4.

Sample	His ⁺ revertant colonies/plate (% remaining)		
	Control	Treatment I	Treatment II
Fraction B	724	370(51.1)	285(39.3)
Fraction BL1	931	875(94.0)	315(33.8)
Fraction BL2	729	422(57.9)	309(42.4)
Fraction BL3-a	807	624(77.3)	101(12.5)
Fraction BL3-b	972	501(51.5)	290(29.8)
Fraction BL4	1345	715(53.2)	750(55.8)
Trp-P-1	909	0(0.0)	0(0.0)
MeIQ	1185	1054(88.9)	858(72.4)

Fractions B (5.0g equivalents of coffee beans), BL1 (150g equivalents of coffee beans), BL2 (70g equivalents of coffee beans), BL3-a (400g equivalents of coffee beans), BL3-b (300g equivalents of coffee beans), BL4 (50g equivalents of coffee beans), and authentic mutagens Trp-P-1 and MeIQ were treated with nitrite in two ways.

Treatment I : with 0.5mM NaNO₂ in 0.25 N HCl at 37°C for 1 hr; and Treatment II : with 2.5mM NaNO₂ in 1N HCl at 50°C for 5 hr. The mutagenicity was tested on *Salmonella typhimurium* TA98 with S9 mix.

ラクションが認められ、これらのフラクションに活性の77%が回収された。活性フラクションBL3についてrechromatographyを行った結果、BL3-aとBL3-bが認められ (Fig. 5B), BL3には2つの変異原物質が含まれることが分かった。BL2, BL3-a, およびBL3-bは、さらにrechromatographyを行うことにより、いずれも変異原物質本体に対応すると考えられるシャープなUV吸収ピークが認められたが、いずれも微量で、それ以上の検討は行えなかった。なお、これらの未知変異原物質は、MeIQの加熱によって生成するものではないことが分かった。

Bフラクションに含まれる変異原物質について亜硝酸処理を行い、その性質について検討した結果をTable IIに示す。津田ら⁶⁾は、Trp-P-1のようなインドール系変異原物質は亜硝酸処理によってその活性を失い、MeIQのようなキノリン系変異原物質の活性は亜硝酸処理の影響を受けないと報告している。Bフラクションの変異原物質は、亜硝酸処理によって活性が消失しておらず、インドール型のヘテロサイクリックアミン変異原物質

ではないと考えられる。

4. おわりに

高温加熱したコーヒー煎り豆中には、新たに2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoline (MeIQ) をはじめとする、多種のヘテロサイクリックアミン様変異原物質が存在することが明らかになった。市販の熱風ばい煎したコーヒー煎り豆および炭火焼コーヒー煎り豆中にも、高温加熱したコーヒー煎り豆に比して含量は少ないがこれらの変異原物質が含まれており、コーヒーの安全性を考えるうえで興味ある知見と考えられる。

参考文献

- 1) Sugimura, T. and M. Nagao : The use of mutagenicity to evaluate carcinogenic hazards in our daily lives. In Mutagenicity : New horizons in genetic toxicology ; Heddle, J. A., Ed., Academic Press : New York, 1982, pp 73-88.
- 2) Sugimura, T. and S. Sato : Mutagens-carc-

- inogens in foods. *Cancer Res. (Suppl.)*, 43 : 2415-2421, 1983.
- 3) Felton, J. S., M. G. Knize, N. H. Shen, P. R. Lewis, B. D. Andresen, J. Happe and F. T. Hatch : The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef : 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, 7 : 1081-1086, 1986.
- 4) Fujita, Y., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura : Implication of hydrogen peroxide in the mutagenicity of coffee. *Mutat. Res.*, 144 : 227-230, 1985.
- 5) Kikugawa, K., T. Kato and H. Hayatsu : Screening of mutagenicity of processed foods by the use of blue cotton. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 26 : 432-436, 1985.
- 6) Tsuda, M., C. Negishi, R. Makino, S. Sato, Z. Yamaizumi, T. Hirayama and T. Sugimura : Use of nitrite and hypochlorite treatments in determination of the contributions of IQ-type and non-IQ-type heterocyclic amines to mutagenicities in crude pyrolyzed materials. *Mutat. Res.*, 147 : 335-341, 1985.

環境変異原研究11: 53-58(1989)

ヘテロサイクリックアミンのDNA傷害作用に対する クロロフィリンの効果 —ショウジョウバエ修復能欠損株を用いて—

岡山大学薬学部 根岸友恵, 糸目千穂, 早津彦哉

1. はじめに

野菜類の摂取と発癌リスクの低下との関連については、疫学的な知見からも示唆されている¹⁾。また野菜の成分であり、最近注目を浴びている食物繊維や、各種ビタミン類に抗癌あるいは抗変異原活性が存在することも明らかにされてきている^{2, 3)}。一方我々は、緑黄色野菜の主要な成分であり、その含有量は乾燥重量の約1%を占めるクロロフィル及びその発色基であるクロロフィリンに注目した。これらの構造は、図1に示したように、ポルフィリン環を有し、平面構造を持つと考えられる。これは、従来我々の研究室で抗変異原活性を見出しているヘミンや銅フタロシアニンなどと類似した構造であり、平面構造を有する多環性の物質と複合体を形成することが予想される⁴⁻⁶⁾。実際、Amesテストを用いてクロロフィルあるいはクロロフィリンが抗変異原活性を示すことは、我々の研究を含めて⁷⁾、いくつかの報告がある⁸⁻¹⁰⁾。またヒトリンパ球を用いた実験で、大気汚染物質に由来する姉妹染色体交換(SCEs)の発現をクロロフィリンが抑えるという報告もなされている¹¹⁾。最近我々はショウジョウバエ細胞突然変異検出系¹²⁾のうち、翅毛スポットテスト¹³⁾を用いて、クロロフィル及びクロロフィリンがTrp-P-2の変異原性を抑制することを示した¹⁴⁾。ショウジョウバエの系では、検体を経口摂取した時の作用を見ることになるので、バクテリアの系に比べてヒトが食物から受けける影響を推

測するのにより近いモデルであると考えられる。今回我々は、ショウジョウバエの体細胞DNA傷害作用を検出するin vivo rec assay^{15, 16)}を用いて、種々のヘテロサイクリックアミンのDNA損傷活性を検出し、次にクロロフィリン同時投与における活性の変化について調べた。

2. 方 法

In vivo rec assayに用いるDNA傷害修復能欠損株sc Z w^(TE) mei-9^a mei-41^b / C(1)DX, y fは、武田薬品工業中央研究所の藤川和男博士より戴いた。この系統のハエは、雄のみDNA傷害に対して、除去修復も複製後修復もできなくなっている。一方雌は修復に関して正常であるので、もしこのハエの幼虫に修復可能なDNA傷害を与えると、

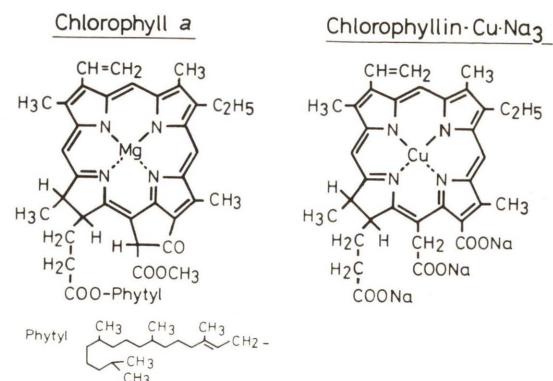


図1 クロロフィルa及びクロロフィリン銅3Na塩の構造

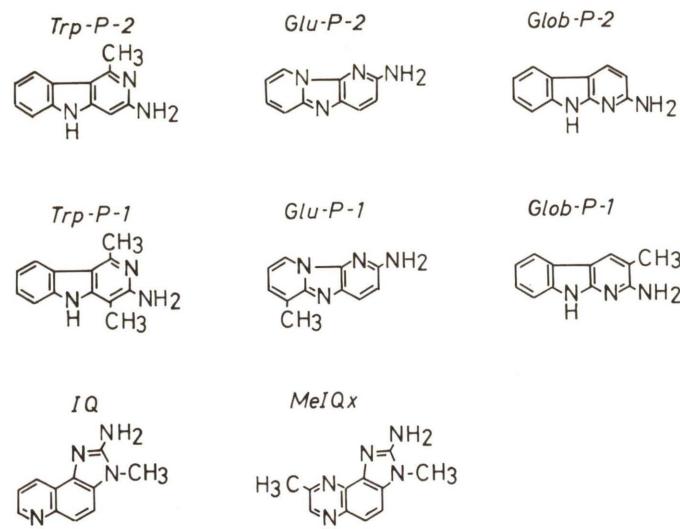


図2 ヘテロサイクリックアミン類の構造

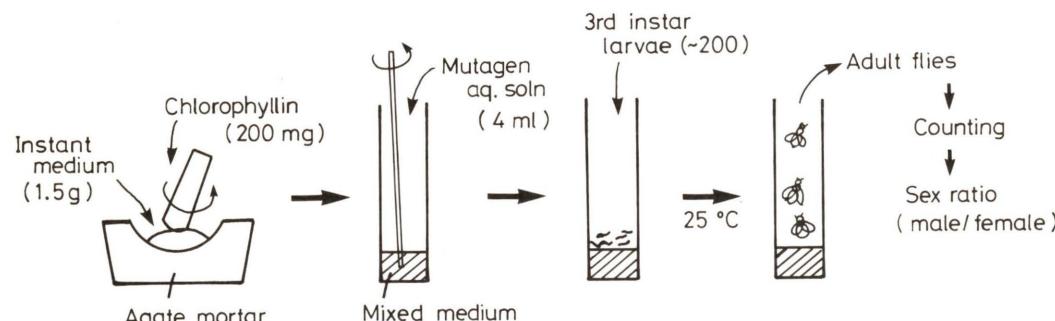


図3 実験方法

成虫になる雄の個体数が減少していくことになる^{15, 16)}。従って成虫になった雌雄の比を求ることによりヘテロサイクリックアミンのgenotoxicityを簡便に検出することができる。対照群としては、雄も正常な修復機能を有するsc Z w^{+(TE)} / C(1)DX, y fを用いた。この系統のハエは大阪大学医学部の梁治子博士より分与していただいた。

用いたヘテロサイクリックアミン類の構造は図2に示した。このうちTrp化合物、Glu化合物、Glob化合物は、国立がんセンター研究所の長尾美奈子博士よりいただいた。またIQ及びMeIQxは、“がん特別研究”の研究資材特別委員会を通じて分与していただいた。本研究では、半井化学製銅クロロフィリン3Na塩をクロロフィ

リンとして用いた。

処理方法は、既に報告した翅毛スポットテストの場合と同様である¹⁴⁾。簡単に図3に示した。ヘテロサイクリックアミン類はエタノール: Tween80 = 2:1溶液を溶媒として用いて溶かし、最終的にはエタノール3.3%, Tween80 1.7%を含む変異原水溶液とした。インスタント培地はFormula 4-24[®](Carolina Biological Supply Co.)の粉末を用いた。用時調整した培地に、常法¹³⁾により集めた3令幼虫を200匹前後(エッペンドルフチューブのふたに軽く山盛り一杯分)を入れ、25°C、暗所で飼育する。羽化して出てきたハエの雌雄の数を計数し、性比(雄/雌)を求めた。

Table 1. Inhibition of Trp-P-2 DNA-damaging effect by chlorophyllin

Amount of Trp-P-2 (μmol/bottle)	Sex ratio (male/female)			
	Rec ⁻ (repair ⁻) Trp-P-2 only	Rec ⁻ (wild) Trp-P-2 + Chlorophyllin	Rec ⁺ (wild) Trp-P-2 only	Rec ⁺ (wild) Trp-P-2 + Chlorophyllin
0	1.08	1.00	1.17	1.24
0.1	1.03	1.26	—	—
0.5	0.89	0.89	0.86	1.06
2	0.48	0.72	1.02	0.98
5	0.08	0.68	0.93	0.95
10	0.06	0.54	1.07	0.87

Chlorophyllin: 200mg/bottle

3. 結果

表1にTrp-P-2のgenotoxicityとそれに対するクロロフィリン同時投与の効果を示した。Rec⁻の系統では3~4回の、Rec⁺の系統では2回の実験値を平均した値である。例えば、Trp-P-2もクロロフィリンもいずれも無添加の場合、実際に計数したハエの数はRec⁻の系統で、雄346:雌319、Rec⁺の系統で雄396:雌398であった。Rec⁻の性比のみTrp-P-2の投与量に応じて減少していることから、Trp-P-2はショウジョウバエに対して、除去修復あるいは複製後修復により修復され得るようなDNA損傷(genotoxicity)を与えることがわかった。この時クロロフィリンを200mg同時に培地中に添加すると、Trp-P-2のgenotoxicityは顕著に抑制され、10μmol Trp-P-2の活性でみると、雄の生存率は約10倍上昇していることがわかる。同様の実験をTrp-P-2以外の7種のヘテロサイクリックアミンに対して行った結果が図4である。横軸に各飼育びんの培地中に加えたヘテロサイクリックアミンの量、縦軸に成虫の性比(雄/雌)をとて片対数グラフで示した。またこの図4から求めた各ヘテロサイクリックアミンのgenotoxicityの強さとクロロフィリン添加効果の比較を表2にまとめた。この時用いたヘテロサイクリックアミンの量では、ショウジョウバエに対して毒性が現れていないことは、Rec⁺の成虫の総数に変化がないことで確かめている。さらに観察している傷害が修復可能なものであり、雄特有のものではないことは、Rec⁺成虫の性比がほぼ1に一

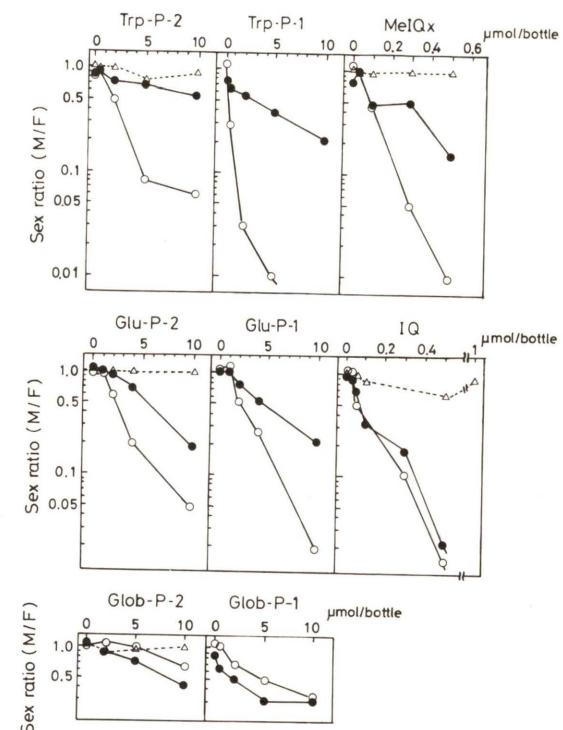


図4 各種ヘテロサイクリックアミンのgenotoxicityとそれに対するクロロフィリン添加の影響。
○—○: ヘテロサイクリックアミンのみ、Rec⁻系統のハエ。●—●: ヘテロサイクリックアミン+クロロフィリン200mg、Rec⁻系統のハエ。△---△: ヘテロサイクリックアミンのみ、Rec⁺系統のハエ。

定していることから言える。

Genotoxicityの強さはヘテロサイクリックアミンによって異なり、IQ, MeIQxは強く、Trp化合物

Table 2. Chlorophyllin effects on the genotoxicity of various heterocyclic amines

Mutagen	Survival of Rec ⁻ -fly		Recovery
	μ mol/bottle	Only	
Trp-P-2	4.6	0.1	0.68
Trp-P-1	1.0	0.1	0.60
Glu-P-2	3.5	0.1	0.35
Glu-P-1	3.0	0.1	0.39
Glob-P-2	10	0.64	0.42
Glob-P-1	10	0.34	0.31
MeIQx	0.24	0.1	0.49
IQ	0.31	0.1	0.16
			0.06

結果

物と Glu 化合物は大体同程度の強さであり、Glob 化合物は弱い活性しか示さなかった。Yoo ら¹⁷⁾によって報告された翅毛スポットテストの結果では、これらヘテロサイクリックアミン間に変異原性の強さの差は見られていないので、むしろ、バクテリアに対する変異原性の強さの相対関係¹⁸⁾に似ていると言える。クロロフィリン添加による抑制効果は、Trp 化合物が顕著であり、MeIQx と Glu 化合物では多少効果が弱かった。一方 IQ 及び Glob 化合物に対しては、クロロフィリンの効果は観察されなかった。

4. 考察

今回の実験で、各種ヘテロサイクリックアミンはショウジョウバエに対して経口摂取により DNA に傷害を与えることがわかった。またこの傷害は、除去修復あるいは複製後修復により修復され得るような傷害であることも明らかとなった。いずれの修復機構で修復されるかは、どちらか一方の修復機能を欠いた株を使うことによって決められると考え、現在検討中である。

DNA 傷害の強さは各ヘテロサイクリックアミン間で差があり、その相対関係は、ショウジョウバエ細胞突然変異の結果よりむしろバクテリアを用いた変異原性試験の結果と似ている^{17, 18)}。この事からバクテリアで観察される変異原性は DNA に対する損傷をより直接的に反映していると言えるかもしれない。

これらヘテロサイクリックアミンの genotoxicity に対するクロロフィリンの抑制効果は、Trp 化合物については顕著に観察され、変異原性抑制効果と同じ結果を得た。また MeIQx の genotoxicity に対してもかなりの抑制効果がみられたが、IQ, Glob 化合物では全く見られなかった。これら化合物の変異原活性に対するクロロフィリンの効果が Rec assay の結果と同じになるかどうかは、今後翅毛スポットテストを行って調べる予定である。

クロロフィリンの抑制効果発現の機構は、in vitro の実験から次のように考えている。すなわち、クロロフィリンがヘミンなどと同じ広い平面構造を有することから、クロロフィリンが Trp 化合物のような平面構造を持つ複素環化合物と、平面同志で複合体を形成し、活性の発現を不能にしているのではないかと考えられる。実際、Trp-P-2 とクロロフィリンの混合水溶液の吸収スペクトルの変化から、複合体形成を示唆する結果を得ている^{14, 19)}。また、我々の研究室で開発し、応用への研究を進めているクロロフィリン-AH-セファロース（クロロフィリンを AH-セファロースにリガンドとして結合させたもので、グリーンセファロースと称している）を用いた実験でも、クロロフィリンが Trp 化合物や MeIQx を吸着することを示している。このグリーンセファロースについては、第17回日本環境変異原学会（東京）で糸目らが発表しており、現在論文を準備中である。

IQ はこのグリーンセファロースに吸着しないことから、本実験で観察された genotoxicity の抑制は、クロロフィリンが変異原物質を吸着することによって起こると説明することができる。しかし Glob 化合物についてはグリーンセファロースに吸着が起こるにもかかわらず、抑制効果がみられないという矛盾した点があり、今後の課題となっている。

クロロフィリンあるいはクロロフィルがヘテロサイクリックアミンなどの発癌物質を体内でも吸着し、複合体を形成してそれらの活性の発現を抑えるとしたら、クロロフィルは野菜で、クロロフィリンは食品添加物で、食品と一緒に摂取する可能性が高いことから、癌の予防という面でも注目すべき事であると思われる。現在ラットに Trp-P-2 とクロロフィリンを同時に飼料に混入して与え、Trp-P-2 の排泄などがどのような影響を受けるか検討中である。

参考文献

- Phillips, R. L. (1975) Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among Seventh-Day Adventists. *Cancer Res.*, 35, 3513-3522
- Committee on Diet, Nutrition and Cancer (1982) *Diet, Nutrition and Cancer*. National Academy Press, Washington, DC.
- Hayatsu, H., Arimoto, S. and Negishi, T. (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Res.*, 202, 429-446
- Arimoto, S. and Hayatsu, H. (1989) Role of hemin in the inhibition of mutagenic activity of aminoazaarenes. *Mutation Res.*, 213, 217-226
- Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H. and Arimoto, S. (1983) Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine. *Mutation Res.*, 119, 944-947
- Hayatsu, H., Kobayashi, H., Michi-ue, A. and Arimoto, S. (1986) Affinity of aromatic compounds having three fused rings to copper phthalocyanine trisulfonate. *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 944-947
- Arimoto, S., Ohara, Y., Namba, T., Negishi, T. and Hayatsu, H. (1980) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 233-238
- Lai, C.-N., Burler, M. A. and Matney, T. S. (1980) Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll contents. *Mutation Res.*, 77, 245-250
- Terwel, L. and van der Hoeven, C. M. (1985) Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Res.*, 152, 1-4
- Ong, T. M., Whang, W. Z., Stewart, J. and Brockman, H. E. (1986) Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. *Mutation Res.*, 173, 111-115
- Hadnagy, W. and Seemayer, N. H. (1987) Antimutagenicity of chlorophyllin against airborne pollutants. *Mutation Res., Abstracts*, 203, 205-206
- Würgler, F. E. and Vogel, E. W. (1986) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In de Serres, F. J. (ed.), *Chemical Mutagens*, Vol. 10, Plenum Press, New York, pp. 1-72
- Graf, J., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. and Kale, P. G. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ.*

- Mutagenesis, 6, 153-188
- 14) Negishi, T., Arimoto, S., Nishizaki, C. and Hayatsu, H. (1989) Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2). Carcinogenesis, 10, 145-149
- 15) Fujikawa, K. (1988) A novel methodology of chemical mutagenicity assays in *Drosophila melanogaster*. J. Food Hyg. Soc. Japan, 29, 115-124
- 16) 藤川和男 (1988) ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究環境変異原研究, 10, 15-25
- 17) Yoo, M.-A., Ryo, H., Todo, T. and Kondo, S. (1985) Mutagenic potency of heterocyclic amines in the *Drosophila* wing spot test and its correlation to carcinogenic potency. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 76, 468-473
- 18) Sugimura, T. (1985) Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. Mutation Res., 150, 33-41
- 19) Negishi, T., Arimoto, S., Nishizaki, C. and Hayatsu, H. (1989) Inhibition of the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2) in *Drosophila* by chlorophyll. In Kuroda, Y., Shankel, D. M. and Water, M. D. (eds.), Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II, Plenum Press, New York, in press

ダイエタリーファイバーの変異原吸着作用 : in vitro と in vivo の比較

秋田大学医学部公衆衛生学教室 蜂谷紀之, 権 太浩, 滝澤行雄

緒 言

食物中の非消化性成分であるダイエタリーファイバーが大腸癌の発生を抑制する可能性が疫学的に指摘されてきた^{1, 2)}。大腸化学発癌に対する、ダイエタリーファイバーの抑制効果を示すいくつかの報告^{3, 4)}はこれを実験的に支持しているものの、その発癌抑制機構は未だ明らかではない。ダイエタリーファイバーが示すいくつかの性質のうち、本稿では発癌物質吸着効果^{5, 6)}に着目し、トウモロコシの精製ふすまなどについて各種変異原物質に対するその吸着特異性を調べるとともに、ラット消化管内におけるその吸着作用の有効性を検討した。得られた結果は、in vitro に見られる吸着性は in vivo 系にそのまま適用できないことを示していた。

実験方法

繊維試料

トウモロコシの精製ふすま⁶⁾は、200メッシュ以上の目の細かいもの(以下200メッシュ)とそれより粗い80~145メッシュのもの(以下80メッシュ)を用いた。セルロースは Solka-floc (ファイザー社), Avicel(旭化成㈱), Sigmacell-Type 100 (Sigma), 100~200メッシュの瀧紙粉末A, 40~100メッシュの瀧紙粉末D(いずれも東洋瀧紙㈱)を用いた。飼料中繊維質は、ラット、マウス用の通常固体飼料(日本クレア CE 2)を水とともに粉碎後200メッシュで分離・乾燥したものを用いた。変異原性試験

Salmonella typhimurium TA98, TA100 を用

い、プレインキュベーションを行なわないプレート試験とした他は既報⁷⁾と同じである。被験試料は dimethyl sulfoxide (DMSO, 倍同仁化学研究所, 吸収スペクトル用)に溶解し、プレートあたり 0.1ml を添加した。S9mix 中の S9 濃度は、5% (25 μ l/plate)~10% (50 μ l/plate)とした。

in vitro 吸着性試験

変異原物質はそれぞれ適当な濃度で 10ml の滅菌蒸溜水あるいは 3mM Na-りん酸緩衝液(pH 5.8)に溶解した後、100mg の繊維試料を加えて室温で 3 時間振盪し、3200rpm, 10 分間の遠心分離によって上清と繊維に分けた。変異原吸着率は上清中の未吸着変異原活性から算出した。一方繊維は乾燥後、50ml のメタノール: アンモニア(50:1)で 30 分間抽出し、遠心分離によって繊維を除き、蒸発乾固した残渣を 10ml の DMSO に溶解して変異原活性を測定し、回収率を求めた。なおメタノールは残留農薬試験用メタノール 1000(和光純薬工業㈱)を用いた。

変異原を吸着したトウモロコシ精製ふすまのラットへの投与

雄の Sprague-Dawley ラット (SPF) は夏目製作所製の代謝ケージで飼育した。ファイバーフリーの粉末基本飼料の組成(1kg 中)は、 α -スター(日本食品化工㈱)450g, カゼイン(オリエンタル酵母㈱)220g, 広糖(和光純薬㈱)200g, コーン油(日本食品化工㈱)80g, ミネラル混合-Harper 配合(オリエンタル酵母㈱)40g, ビタミン混合-Harper 配合(オリエンタル酵母㈱)8.5g, 塩化コリン(東京化成工業㈱)1.5g, とした。ラットは予備

飼育では通常の固体飼料(日本クレア CE 2)を与え、変異原吸着トウモロコシふすまを投与する2日前からファイバーフリーの粉末飼料に変更した。

変異原を吸着したトウモロコシ精製ふすまの調製は、100 μgのTrp-P-1 (3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido[4, 3-b]indole), あるいは10.0 μgのIQ (2-amino-3-methyl-imidazo[4, 5-f]quinoline), あるいは5.0 μgのdinitropyrene異性体混合物(和光純薬株) (以下DNP)を3.0gのセルファー(80メッシュ)とともに300mlの蒸溜水中で3時間振盪して吸着させた。このふすまはガラス纖維漉紙(Whatman, GF/A)で漉過し、乾燥させて変異原吸着ふすまを得るとともに、ろ液の変異原活性からふすま上の変異原吸着量を算出した。変異原吸着ふすまは、ファイバーフリーの粉末基本飼料に25%の割合で混じ、粉末基本飼料を摂取もしくは一晩絶食させたラットに与えた。翌日飼料の摂取を確認し、変異原を含まないファイバ含有飼料と交換した。

ラット排泄物からの変異原の回収

変異原吸着ふすまを投与したラットは投与開始から最長6日間糞便と尿を毎日摂取し、1日ごとに変異原活性を回収した。

尿からの回収：尿は早津ら⁸⁾の青綿吸着法により回収した。すなわち、尿100mlに対して青綿(フナコシ薬品株)を200mg加えて30分間攪拌・吸着して青綿を除き、さらに青綿100mgで同様の操作を繰り返した。これら青綿は脱水後、300mgあたり20mlのメタノール：アンモニウム(50:1)で30分間抽出し、蒸発乾固後、得られた残渣を5.0mlのDMSOに溶解した。

糞便からの回収：一日分の糞便(約4g)は少量の蒸溜水を加えて乳鉢で粉碎・懸濁し、200メッシュの篩でふすま(分画F)を捕集した後、約400mlの蒸溜水でこれを洗浄した。得られた水層は3500rpm、10分間の遠心分離により残渣(分画R)と水溶性成分(分画A)に分離した。このうち、水溶性の分画Aについては尿の場合と同様に青綿による吸着-抽出を行った。ふすま(分画F)と残渣(分画R)は乾燥させた後、300mlのメタノール：

アンモニウム(50:1)で抽出し、ガラス纖維漉紙で漉過して蒸発乾固した。この蒸発乾固残渣はそれぞれ、50mlのジエチルエーテル(株)同仁化学研究所、油脂酸価・過酸化物価測定用)に溶解し、等量の1N NaOHを加えて強く振盪しエーテル層と水層に分けた。エーテル層は蒸発乾固後5.0mlのDMSOに溶解して分画F-1および分画R-1とした。水層は2倍量の1N HClを加え、100mlのジエチルエーテルで再び抽出し、同様にしてエーテル層から5.0mlのDMSO溶液すなわち分画F-2および分画R-2を得た。

これらラット排泄物の各分画については、その見かけの変異原性を測定するとともに、投与した変異原の一定量に各分画を加え、その変異原性に対する各分画の阻害効果を調べた。各分画の変異原性は見かけの変異原活性をこの阻害率にしたがって補正したものを用いた。なお、添加回収実験によると上記方法によるTrp-P-1の見かけの変異原性回収率(非補正値)は50.5%であった。

実験結果

I トウモロコシ精製ふすまおよびセルロースによるin vitroの変異原吸着性

表1に18種類の変異原について、蒸留水中でのトウモロコシ精製ふすまに対する吸着性と吸着体からのメタノール：アンモニウム溶出による回収率を示す。表1の未吸着率および吸着回収率は変異原活性が濃度に対して直線的に増加するときの値である。これらのうち、食品中の癌原物質であるヘテロサイクリックアミンはTrp-P-1, Trp-P-2がいずれも99%以上の吸着率を示したのをはじめ、IQ, Glu-P-1, Glu-P-2の吸着率はいずれも95%以上であった。またB(a)P, DNP, DAB, DMBAの吸着率も90%以上となった。一方これに対し、ENNG, アジ化ナトリウムなどの芳香環を持たない一部のアルキル化剤の吸着性は低かった。また吸着した活性のうちメタノール：アンモニウムで溶出する溶出率は、ふすまの吸着率とほぼ平行した傾向を示した。

メッシュサイズの異なるトウモロコシふすまお

表1 トウモロコシ精製ふすまによる各種変異原のin vitro吸着性

変異原	試験	吸着前の変異原濃度と活性		非吸着活性 Rev./plate	吸着率 (%)	溶出活性と回収率 Rev./plate
		μg/0.1ml	Rev./plate			
2AA	9+	0.5	105 (100 %)	27 (25.7 %)	(74.3 %)	18 (17.1 %)
AF-2	9-	0.2	678 (100 %)	341 (50.3 %)	(49.7 %)	210 (31.0 %)
B(a)P	0+	2.0	427 (100 %)	16 (3.8 %)	(96.2 %)	454 (106 %)
DAB	9+	100	112 (100 %)	5 (4.5 %)	(95.5 %)	131 (117 %)
DMBA	9+	20	263 (100 %)	20 (7.6 %)	(92.4 %)	155 (58.9 %)
DNP	9-	0.001	753 (100 %)	29 (3.9 %)	(96.1 %)	659 (87.5 %)
ENNG	0-	2.0	421 (100 %)	352 (83.6 %)	(16.4 %)	5 (1.2 %)
Glu-P-1	9+	0.05	7383 (100 %)	211 (2.9 %)	(97.1 %)	4889 (66.2 %)
Glu-P-2	9+	0.05	535 (100 %)	26 (4.9 %)	(95.1 %)	337 (63.0 %)
ICR-170	9-	10	1556 (100 %)	574 (36.9 %)	(63.1 %)	15 (1.0 %)
ICR-191	9-	5.0	618 (100 %)	9 (1.5 %)	(98.5 %)	96 (11.2 %)
IQ	9+	0.002	1211 (100 %)	27 (2.2 %)	(97.8 %)	1044 (86.2 %)
MNNG	0-	2.0	7936 (100 %)	2631 (33.2 %)	(66.8 %)	57 (0.7 %)
Na Azide	0-	1.0	706 (100 %)	570 (80.7 %)	(19.3 %)	6 (0.9 %)
4NPD	9-	8.0	1056 (100 %)	454 (43.0 %)	(57.0 %)	592 (56.1 %)
4NQO	0-	0.08	504 (100 %)	311 (61.7 %)	(38.3 %)	51 (10.1 %)
Trp-P-1	9+	0.05	1687 (100 %)	8 (0.5 %)	(99.5 %)	1819 (108 %)
Trp-P-2	9+	0.005	1210 (100 %)	1 (0.1 %)	(99.5 %)	961 (79.4 %)

変異原略号: 2AA, 2-aminoanthracene; AF-2, furylfuramide, B(a)P, benzo(a)pyrene; DAB, 4-dimethylaminoazobenzene; DMBA, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DNP, dinitropyrene(mix.); ENNG, N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; Glu-P-1, 2-amino-6-methylpyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole; Glu-P-2, 2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole; MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; 4NPD, 4-nitro-o-phenylenediamine; 4NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide; Trp-P-1, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole; Trp-P-2, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole; IQ, 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline

試験: 9+, TA98 +S9mix; 9-, TA98 -S9mix; 0+, TA100 +S9mix; 0-, TA100 -S9mix

表2 各種纖維のTrp-P-1の吸着性(in vitro)

纖維	吸着前の変異原濃度と活性		非吸着活性 Rev./plate	吸着率 (%)	溶出活性と回収率 Rev./plate
	μg/0.1ml	Rev./plate			
トウモロコシ精製ふすま, 200 mesh	0.05	885 (100 %)	13 (1.5 %)	(98.5 %)	856 (96.7 %)
トウモロコシ精製ふすま, 80 mesh	0.02	411 (100 %)	4 (1.0 %)	(99.0 %)	359 (87.3 %)
沪紙粉末A (100 mesh)	0.05	885 (100 %)	66 (7.5 %)	(92.5 %)	563 (63.6 %)
沪紙粉末D (40 mesh)	0.05	885 (100 %)	50 (5.6 %)	(94.4 %)	541 (61.1 %)
Avicel	0.05	885 (100 %)	10 (1.1 %)	(98.9 %)	592 (66.9 %)
Solka-floc	0.05	885 (100 %)	7 (0.8 %)	(99.2 %)	662 (74.8 %)
Sigmacell	0.05	885 (100 %)	61 (6.9 %)	(93.1 %)	355 (40.1 %)
飼料中纖維	0.05	885 (100 %)	27 (3.1 %)	(96.9 %)	591 (66.8 %)

より5つのセルロース標品を含む8種類の纖維試料についてTrp-P-1の吸着性を比較した結果を表2に示す。この結果、ラットの通常固体飼料中纖維質を含むいずれの纖維試料も90%以上の高い吸着率を示した。一方メタノール：アンモニウムによる溶出率は纖維ごとに差異があり、吸着-溶

出による変異原回収率は200メッシュの精製ふすまがもっとも高く、次いで80メッシュのふすまであった。また各種セルロース標品もSigmacellを除き60~70%以上の回収率を示した。

トウモロコシふすまの変異原吸着性に及ぼす要因の一つとしてpHの影響を調べた。図1は、あ

らかじめ IQ を吸着させたふすまを各種 pH の 3.0 mM りん酸緩衝液中で 3 時間振盪し、IQ の離脱性を調べたものである。この結果、pH 4.0 以下では IQ の緩衝液への遊離が促進された。

2 ラット腸管内におけるトウモロコシ精製ふすまからの変異原の離脱性

in vivoにおいては、変異原をふすまに吸着させて経口投与し、ふすまが消化管を通過して糞便として排泄されるまでの間の離脱性を測定した。吸着体としては、in vitro の吸着率および回収率がもっとも高く、変異原活性について直線的な作用量関係が得られる Trp-P-1, IQ, DNP について調べた。

投与したラットの糞便はふすま(分画 F), 残渣(分画 R), 水溶性成分(分画 A)に分離し尿とともに変異原活性を測定した。このうち採取日によつては F-1, 2, R-1, 2 の各分画で変異原性抑制作用が認められることがあった。各試料の変異原性値はそれぞれの変異原性阻害率で補正し、実験期間を通しての合計値として表 3 に示した。

表 3 に見られるように、Trp-P-1 吸着ふすまの投与実験では、ふすまに結合した形で回収された活性は 1.27% で、98.73% がふすまから消失していた。Trp-P-1 の場合、糞便の残渣成分に吸着していた活性および水溶性分画中の遊離の活性はふすま分画の活性より少なく、全糞便中に見いだされた Trp-P-1 変異原性回収率も投与量の 1.61% のみであった。一方、尿への排泄量は糞便よりやや高く、投与した活性の 2.77% が尿中に検出された。変異原を投与しないラットの尿では変異原性は検出されず、したがってここで見いだされた尿中変異原活性はトウモロコシ精製ふすま上に吸着して経口摂取された Trp-P-1 が消化管から吸収され、尿中に排泄されたものとみなされる。これらの結果は、トウモロコシ精製ふすま上の Trp-P-1 はラット消化管内でそのほとんど(98%以上)が纖維から離脱し、体内に吸収されて代謝されたことを示唆している。

別のヘテロサイクリックアミンである IQ を吸着したふすまの投与においても、その変異原活性

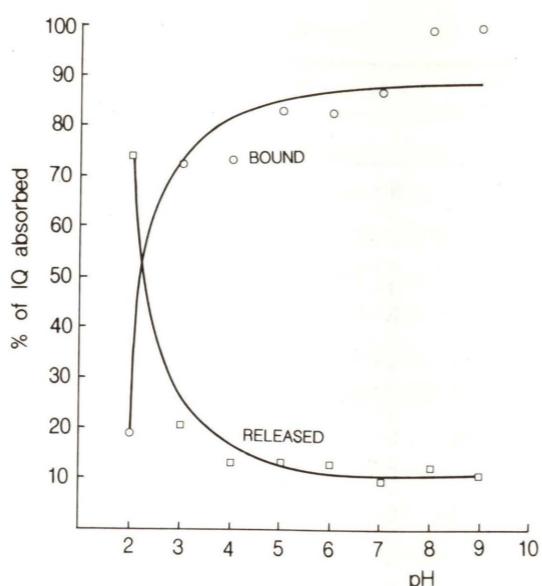


図 1 トウモロコシ精製ふすま上に吸着させた IQ に対する緩衝液 pH の影響

の回収率はさらに低かった。すなわち IQ の回収率は糞便中ふすまで 0.24% であり、消化管内ではふすまの IQ 保持性はほとんど認められなかった。総糞便および尿中排泄率も Trp-P-1 より低かった。

糞便からの低い回収率がヘテロサイクリックアミンに特異的なものである可能性を検討するため、異なるタイプの変異原物質でありまた強力な発癌物質でもある DNP について同様の測定を行なった。しかしながら表 3 に示すように、糞便中ふすまの DNP 吸着率は 0.04% であり、これは総糞便中および尿中回収率などとともに 3 化合物中最低であった。

考 察

トウモロコシ精製ふすまは in vitro において Trp-P-1, IQ, DNP などの変異原を高率に吸着したが、これら変異原を吸着させて経口投与したラット消化管内では、これらは容易にふすまから離脱し、排泄された糞便中のふすま上にはほとんど残らなかった。ふすまから遊離したこれら変異原のほとんどは、消化管内で代謝もしくは吸収され、一部の活性は尿中から検出された。Trp-P-

1⁹⁾ および IQ¹⁰⁾ の消化管内代謝産物の中には変異原性を有するものがあり、ふすま上に検出された活性の少なくとも一部は、いったん遊離した変異原が代謝され、再度ふすまに結合したものである可能性もある。すなわち、in vivo でのふすまの正味の変異原保持率は、観察された値よりさらに小さいかかもしれない。

ラットに経口投与した各変異原の活性がその糞便中に回収できなかったことの理由としては、糞便中の変異原妨害因子の影響も考慮しなければならない¹¹⁾。しかしながら、このことは活性の消失のごく一部を説明しても、投与量の 98% 以上が糞便から消失したことは説明できない。溶媒抽出法は、糞便中に添加した Trp-P-1 活性の 50.5% を回収した。この方法による糞便中の変異原性の回収は必ずしも完全なものではないが、これによって結論が左右されるものではなかった。さらに表 3 では、変異原抑制効果の一部については、補正されており、その阻害因子の影響はさらに小さくなっている。

ラットに経口投与した Trp-P-1⁹⁾ あるいは IQ¹²⁾ の変異原活性のうち、糞尿中に排泄される割合は非常に低いことが報告されており本研究での観察ともほぼ一致する。

なお、飲料水に添加した Trp-P-1 の変異原活性がラット糞便中のトウモロコシ精製ふすまにどれだけ吸着しているかを調べた別の実験において、Sep-Pak カートリッジ法によって糞便中の変異原と阻害因子を完全に分別したが、この場合の糞便中ふすまの変異原吸着率も本研究で得られたものと大きな違いはなかった¹³⁾。

in vitro におけるトウモロコシ精製ふすまの変異原吸着性は食物纖維等の一般的な性質である⁵⁾。しかしこれら纖維質などの吸着効果が強く現われるのは、蒸留水中での吸着の場合である。これに対して、例えば pH 4 以下でトウモロコシ精製ふすまからの IQ の離脱が促進されたように、一般に纖維質への変異原吸着性は溶液のイオン強度、pH、共存する物質などの影響を大きく受け¹⁴⁻¹⁶⁾。したがって生体内においては、ダイエ

表 3 変異原を吸着させたトウモロコシ精製ふすまを投与したラット排泄物中の変異原活性

変異原	分画	量 /rat	総変異原活性 His ⁺ Rev.	回収率 %
Trp-P-1	投与量	92.3 μg	1069000	100
	総糞便	20 g	17200 (13600)	1.61 (1.27)
	(分画 F)		(2000)	(0.19)
	(分画 R)		(1600)	(0.15)
	(分画 A)			
	尿	40 ml	29600	2.77
	合計		46800	4.38
IQ	投与量	8.49 μg	4930000	100
	総糞便	20 g	20480 (11830)	0.42 (0.24)
	(分画 F)		(1400)	(0.03)
	(分画 R)		(7250)	(0.15)
	(分画 A)			
	尿	50 ml	32600	0.66
	合計		53100	1.08
DNP	投与量	3.95 μg	3050000	100
	総糞便	35 g	3000 (1300)	0.10 (0.04)
	(分画 F)		(1400)	(0.06)
	(分画 R)		(300)	(0.01)
	(分画 A)			
	尿	82 ml	1900	0.06
	合計		4900	0.16

変異原活性は TA98 株を用い、Trp-P-1 と IQ については +S9mix, DNP については -S9mix にて試験した

タリーファイバーと変異原物質は、強く結合し合うというよりおそらく物理的吸着と遊離を繰り返していると考えるべきである。

さらに、ダイエタリーファイバーの吸着作用の性質も考える必要がある。トウモロコシ精製ふすまの吸着作用は、化合物の変異原性強度などとは無関係である。また、単純アルキル化剤などの中には吸着率の低いものもあるが、一般には非特異的な吸着といえる。おそらく、消化管内では纖維質への吸着について変異原・癌原物質と競合するような雑多な物質があり、前者のみを効果的に取りのぞく機能を期待することは難しいであろう。

大腸発癌抑制因子としてのダイエタリーファイバーの作用機構については、本研究で検討した発癌物質などの吸着効果のほか、腸管内細菌の代謝に及ぼす影響、腸内容の容積の増加による発癌物質などの希釈効果、腸管内の発癌物質の代謝に及ぼす影響、などの可能性が考えられている^{17, 18)}。一方、ダイエタリーファイバーの発癌抑制効果はファイバーの種類によって異なることが実験的¹⁹⁾、疫学的²⁰⁾ に観察されており、おそらく非特

異的吸着作用の役割は大きくはないと考えられる。

大腸癌は欧米型社会におけるもっとも主要な癌の一つであり、近年わが国における増加傾向も著しい。したがって大腸癌抑制因子としてのダイエタリーファイバー摂取の有効性ならびにその機構の解明は、早急に解明すべき重要な課題として残されていることを強調したい。

参考文献

- 1) Modan, B., V. Barell, F. Lubin, M. Modan, R. A. Greenberg and S. Graham, Low fiber intake as an etiologic factor in cancer of the colon, *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 15-18, 1975.
- 2) Dales, L. G., G. D. Freedman, H. K. Ury, S. Grossman and S. R. Williams, A case-control study of relationship of diet and other traits to colorectal cancer in American blacks, *Am. J. Epidemiol.*, 109, 132-144, 1979.
- 3) Reddy, B. S. and H. Mori, Effect of dietary wheat bran and dehydrated citrus fiber on 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced intestinal carcinogenesis in F-344 rats, *Carcinogenesis*, 2, 21-25, 1981.
- 4) Reddy, B. S., H. Mori and M. Nicolais, Effect of dietary wheat bran and dehydrated citrus fiber on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in Fisher 344 rats, *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 553-557, 1981.
- 5) Kada, T., M. Kato, K. Akikawa and S. Kiriyama, Adsorption of pyrolysis mutagens by vegetable fibers, *Mutation Res.*, 141, 149-152, 1984.
- 6) Takeuchi, M., M. Hara, T. Inoue and T. Kada, Adsorption of mutagens by refined corn bran, *Mutation Res.*, 204, 263-267, 1988.
- 7) Takizawa and Hachiya, Bacterial reversion assay and micronucleus test carried out on hydrogenated glucose syrups 'Malti-Towa' (powder) and maltitol crystal, *Mutation Res.*, 137, 133-137, 1984.
- 8) Hayatsu, H., Y. Matsui, Y. Ohara, T. Oka and T. Hayatsu, Characterization of mutagenic fractions in beef extract and in cooked ground beef, Use of blue-cotton for efficient extraction *Gann*, 74, 472-482, 1983.
- 9) Rafter, J. J. and J. Gustafsson, Metabolism of the dietary carcinogen Trp-P-1 in rats, *Carcinogenesis*, 7, 1291-1295, 1986.
- 10) Bashir, M., D. G. I. Kingston, R. J. Carman, R. J. van Tassell and T. D. Wilkins, Anaerobic metabolism of 2-amino-3-methyl-3*H*-imidazo [4, 5-*f*] quinoline (IQ) by human fecal flora, *Mutation Res.*, 190, 187-190, 1987.
- 11) Hayatsu, H., S. Arimoto, K. Togawa and M. Makita, Inhibitory effect of the ether extract of human feces on mutagens : Inhibition by oleic and linoleic acids, *Mutation Res.*, 81, 287-293, 1981.
- 12) Sjödin, P. and M. Jägerstad, A balance study of ¹⁴C-labelled 3*H*-imidazo [4, 5-*f*] quinolin-2-mines (IQ and MeIQ) in rats, *Fd. Chem. Toxicol.*, 22, 207-210, 1984.
- 13) Hachiya, N., Quan T. -H., M. Aida and Y. Takizawa, Low efficiency of Trp-P-1 binding of a dietary fiber in the gastrointestinal tract of rat, Abstracts of Second International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, (Ohito, Japan) 148, 1988.
- 14) Smith-Barbaro, P., D. Hanson and B. S. Reddy, Carcinogen binding to various types of dietary fiber, *J. Natl. Cancer Inst.*, 67, 495-497, 1981.
- 15) Barnes, W. S., J. Maiello and J. H. Weisburger, In vitro binding of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo [4, 5-*f*] quinoline to dietary fibers, *J. Natl. Cancer Inst.*, 70, 757-760, 1983.
- 16) Morotomi, M. and M. Mutai, In vitro binding of potent mutagenic pyrolyzates to intestinal bacteria, *J. Natl. Cancer Inst.* 77, 195-201, 1986.
- 17) Reddy, B. S., Dietary fiber and colon carcinogenesis : A critical review, in : G. V. Vahouny and D. Kritchevsky (Eds.), *Dietary Fiber in Health and Disease*, Plenum, New York, pp. 265-285, 1982.
- 18) Freeman, H. J., Dietary fibers and colon cancer, in : H. Autrup and G. M. Williams (Eds.) *Experimental Colon Carcinogenesis*, CRC Press, Boca Raton pp. 267-279, 1983.
- 19) Reddy, B. S., Y. Maeura and M. Wayman, Effect of dietary corn bran and autohydrolyzed lignin on 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced intestinal carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 419-423, 1983.
- 20) Slattery, M. L., A. W. Sorenson, A. W. Mahoney, T. K. French and J. C. Street, Diet and colon cancer : Assessment of risk by fiber type and food Source, *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 1474-1480, 1988.

ニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示す
Salmonella typhimurium TA98, TA100 の
新しい誘導株の樹立

国立衛生試験所 変異遺伝部 渡辺雅彦, 能美健彦, 石館 基

1. はじめに

我々の身の回りには遺伝子DNAに損傷を与える物質(変異原)が多数存在しており、私たちは好むと好まざるとにかかわらず、これらの物質に暴露されながら生活している。芳香族アミン、ニトロアレーン類はこうした環境変異原の一グループであり、これらの中には実験動物に発癌性を示す化合物も少なくない^{1, 2)}。2-アセチルアミノフルオレン、2-アミノナフタレン、そして焦げた食品中から単離されたヘテロサイクリックアミンなどは微生物、哺乳類細胞に変異原性を示し、実験動物に発癌性を示す代表的な芳香族アミンである。ニトロアレーンは、自動車の排気ガス、焼却場の煙、都市の大気、河川の底質、ストーブを焚く室内の空気、あるいはヤキトリの焦げた部分にも含まれている。変異原性、発癌性を示すニトロアレーンとして2-ニトロフルオレン(2-NF)、1,8-ジニトロピレン(1,8-DNP)などがよく知られている。

芳香族アミン、ニトロアレーンはそれ自身がDNAに反応するわけではなく、その代謝産物が突然変異を起こす。2-アミノフルオレン(2-AF)は微生物細胞外でN-ヒドロキシ体に酸化されて細胞内に入り、その後O-アセチル転移酸素(O-ATase)によって活性化され、最終的に生じたニトレンiumイオンがDNAを攻撃するものと考えられている。2-NFは、微生物細胞内ではニトロ還元酵素(NRase)によってN-ヒドロキシ体に還元

され、その後は2-AFの場合と同一の経路で活性化されると考えられる。事実、2-AFはO-ATase欠損株であるTA98/1, 8-DNP₆³⁻⁶⁾に対し、親株であるTA98よりも弱い変異原性を示し⁷⁾、2-NFはTA98/1, 8-DNP₆およびNRase欠損株であるTA98NR⁸⁻¹⁰⁾に対し、TA98よりも弱い変異原性を示す^{4, 11, 12)}。従ってNRaseは2-NFの、O-ATaseは2-AFと2-NF両方の変異原性発現の律速段階と考えることが出来る。

我々は*S. typhimurium* TA1538株からNRase、O-ATaseの遺伝子をクローン化し¹³⁾、それぞれの遺伝子を持つマルチコピープラスミドをTA98、TA100株へ導入し、芳香族アミン、ニトロアレーンに対し高い感受性を示す指標菌株を作製した^{14, 15)}。以下、この高感受性菌株の作製法および性質、さらにその有用性などについて報告する。

2. 材料および方法

*Salmonella typhimurium*由来のNRase遺伝子、O-ATase遺伝子のクローニングは、主にManistisらの方法¹⁶⁾に従った。まず、*S. typhimurium* TA1538から染色体DNAを調製した。これをSau3AIで部分分解後、マルチコピープラスミドpBR322のBamHI部位に組み込み遺伝子ライブラリーを作製した。これを用いてTA1538NRおよびTA1538/1, 8-DNP(TA98NR, TA98/1, 8-DNP₆からpKM101を除去したもの)を形質転換し、2-NF(50μg/ml)に対して高い致死感受性を示す

コロニーを選択した(親株 TA1538 は使用した濃度の 2-NF に対し致死的であるが、欠損株 TA1538NR および TA1538/1, 8-DNP は耐性である)。得られたコロニーから、組換えプラスミドを取得し、再度 TA1538NR および TA1538/1, 8-DNP を形質転換した。この再形質転換株をその後の変異原性試験、並びにプラスミド DNA および細胞質画分(超音波破碎菌体の 100000×g 上清画分)の調製に用いた。

上記クローニングによって得られた NRase 高生産性プラスミドおよび O-ATase 高生産性プラスミドについて、制限酵素地図を作製した。次にサブクローニングを行い、酵素遺伝子領域を推定し、その遺伝子を含む断片を、ベクタープラスミド pBR322 の Pst I または Sca I 部位に組込み、新たにテトラサイクリン耐性(Tc^r)、アンピシリン感受性(Ap^s)組換えプラスミドを作製した。これは、初めに得られたクローニングプラスミドが Ap^r、Tc^s であるため、pKM101(Ap^r)を持つ TA98、TA100 において、pKM101 との共存が困難なためである。テトラサイクリン耐性となった組換えプラスミドを TA98、TA100 株に導入し、高感受性株(YG1021, YG1024, YG1026, YG1029)を作製した。

ニトロフラゾン還元酵素(NFR NRase)活性は McCalla らの方法¹⁷⁾に従って測定した。2-Hydroxyamino-6-methyldipyrido [1, 2-*a*: 3', 2'-*d*] -imidazole (N-OH-Glu-P-1) O-ATase 活性は、斎藤らの方法¹⁸⁾に従って測定した。イソニアジド(INH)および 2-AF N-ATase 活性測定は Hein らの方法^{19, 20)}に従った。

サルモネラ変異原性試験(Ames 試験)は、Ames らの方法に従い、37°C、20分間のプレインキュベーション法で行った^{21, 22)}。S 9 はフェノバルビタールおよび 5, 6-ベンゾフラン処理した SD ラットから調製されたものをキッコーマンより購入した。

本研究において得られた新しい形質転換株とその名称を表 1 に示した。

表 1 新しい形質転換株とその名称

名称	宿主(プラスミド)
YG1020	TA98(pBR322-Ap ^s)
YG1021	TA98(pYG216)
YG1024	TA98(pYG219)
YG1025	TA100(pBR322-Ap ^s)
YG1026	TA100(pYG216)
YG1029	TA100(pYG219)

3. 結 果

TA1538NR をライブラリー DNA で形質転換し、得られた約 2500 個の形質転換コロニーから、2-NF に対し高い致死感受性を示す 2 つのコロニーを選択した。このコロニーから得られたプラスミドをそれぞれ 'pYG111', 'pYG112' とした。このプラスミドを用い、TA1538NR を再形質転換し、その NFR NRase 活性を測定した(表 2)。クローニングプラスミド pYG111 を持つ TA1538NR 株は、ベクタープラスミド pBR322 を持った TA1538 株より約 40 倍高い酵素活性を示したが、pYG112 を持つ TA1538NR は、対照株と同程度の活性にとどまった。

TA1538/1, 8-DNP 株を宿主とする約 10000 個の形質転換コロニーから、2-NF に対し高い致死感受性を示す 4 つのコロニーを選択した。このコロニーから得られたプラスミドをそれぞれ 'pYG121', 'pYG122', 'pYG123', 'pYG124' とした。このうち pYG121 および pYG122 を用いて TA1538/1, 8-DNP 株の再形質転換を行った。この再形質転換株の、N-OH-Glu-P-1 O-ATase 活性を表 2 に示す。pYG121, pYG122 いずれかのプラスミドを持つ株は対照株よりも約 50 倍高い酵素活性を示した。

クローニングプラスミドを持つ再形質転換株を用いて、2-NF, 1-NP, 1, 8-DNP および 4-ニトロキノリン 1-オキシド(4-NQO)の Ames 試験を行った結果を表 2 に示す。NRase 活性が高い再形質転換株 TA1538NR(pYG111)は、2-NF, 1-NP に対して高い感受性を示した。一方、O-ATase 活性が高い TA1538/1, 8-DNP(pYG121)および TA1538/1, 8-DNP(pYG122)は、2-NF, 1, 8-DNP に対して高い感受性を示した。

表 2 クローニングプラスミド pYG111, pYG112, pYG121, pYG122 の酵素活性ならびに Ames 試験に及ぼす効果

菌株名	酵素活性 (nmol/min/mg protein)		誘発復帰変異株数/nmol			
	NFR NRase	N-OH-Glu-P-1 O-ATase	2-NF	1-NP	1, 8-DNP	4-NQO
TA1538(pBR322)	11	0.6	19	23	44600	152
TA1538NR(pBR322)	0		2	0	35400	181
TA1538NR(pYG111)	450		490	3240	46500	203
TA1538NR(pYG112)	7		36	209	29300	72
TA1538/1, 8-DNP(pBR322)		0.0	4	14	471	136
TA1538/1, 8-DNP(pYG121)	33.1		362	52	337000	98
TA1538/1, 8-DNP(pYG122)	28.0		326	73	559000	87

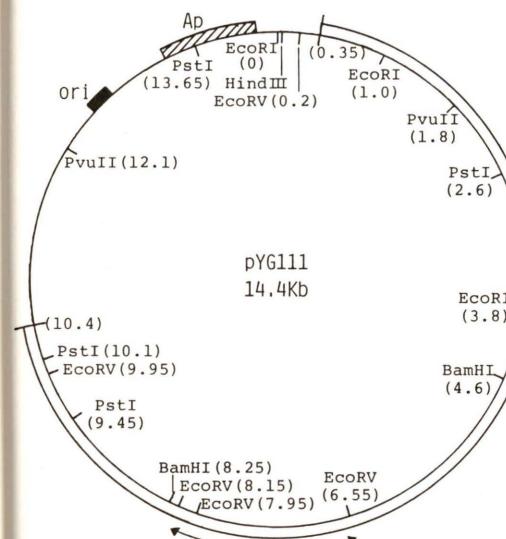


図 1 pYG111 の制限酵素地図

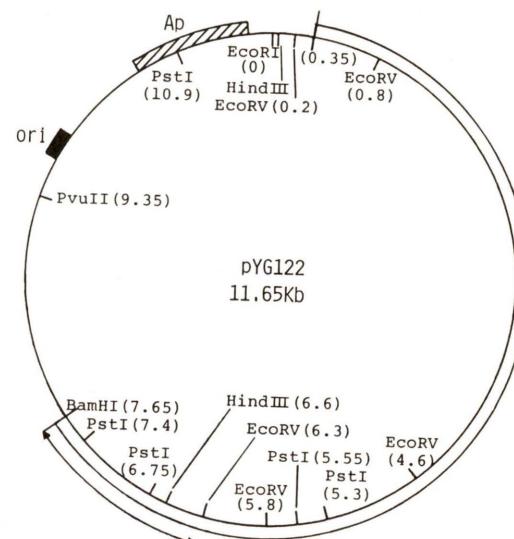


図 2 pYG122 の制限酵素地図

pYG111, pYG122 の制限酵素地図を図 1, 2 に示す。クローニングされた DNA 断片(insert)は、pYG111 が 10.05Kb, pYG122 が 7.3Kb であった。pYG121 の insert は 5.75Kb であり、同様の O-ATase 高生産性をもつ pYG122 と類似の切断パターンを示す領域が存在した(データ省略)。

pYG111 からサブクローニングによって得られたプラスミドを持つ TA1538NR 株の NRase 活性ならびに 2-NF に対する感受性を図 3 に示す。pYG111 の 6.55Kb から 8.15Kb にまたがる insert DNA をもつ pYG215 を導入した TA1538NR 株は、pYG111 を持つ株と同程度の高い酵素活性、感受性を示した。さらに pYG216 を TA98, TA100 へ導入し、YG1021

Name	Subcloned DNA fragment	sensitivity to 2-NF	nitroreductase activity
pYG111	0.35 10.4	S	450
pYG211	3.8 10.4	S	481
pYG214	6.55 10.4	S	394
pYG215	6.55 8.15	S	368
pYG222	6.55 7.95	R	N.D.
pYG216	2.6 9.45	S	602
pYG217	2.6 9.45	S	475

図3 pYG111のサブクローニングプラスミド。sensitivity to 2-NF, nitroreductase activityは、各プラスミドをTA1538NRに導入し、2-NFのAmes試験(S:400以上の誘発復帰変異/nmol, R:3以下の誘発復帰変異/nmol)ならびにニトロフラゾン還元酵素活性測定(nmol/min/mg protein)を行った結果である。

Name	Sensitivity 0-Acetyltransferase to 2-NF activity	
pYG122	EcoRI (0) Insert EcoRV (6.3) BamHI (7.65)	326 28.0
pYG213		2270 228
pYG218		116 4.8
pYG219		716 54.6
pBR322	○ Tc ori Ap ○	4 0.0
(TA1538(pBR322))	19	0.6

図4 pYG122のサブクローニングプラスミド。sensitivity to 2-NF, 0-acetyltransferase activityは、各プラスミドをTA1538/1,8-DNPに導入し、2-NFのAmes試験(誘発復帰変異株数/nmol)ならびにN-OH-Glu-P-1 0-アセチル転移酵素活性測定(nmol/min/mg protein)を行った結果である。

(=TA98(pYG216))およびYG1026(=TA100(pYG216))を得た。両株のNRase活性を調べると684および650 nmol/min/mg proteinであり、TA1538NR(pYG216)同様の高い酵素活性を示した。

pYG122からサブクローニングによって得られ

たプラスミドを持つTA1538/1,8-DNP株の0-ATase活性ならびに2-NFに対する感受性を図4に示す。pYG122の6.3 Kbから7.65 Kbにまたがる1.35KbのDNA(図2参照)をもつpYG213を導入したTA1538/1,8-DNP株は、対照株TA1538(pBR322)の約400倍、TA1538/1,8-DNP(pYG

表3 アセチル転移酵素高産性株のN-およびO-アセチル転移活性

菌株名	N-アセチル転移活性(nmol/min/mg protein)		O-アセチル転移活性(nmol/min/mg protein)
	INH	2-AF	
TA1538(pBR322)	2	0	0.6
TA1538/1,8-DNP(pBR322)	0	0	0.0
TA1538/1,8-DNP(pYG121)	126	7	33.1
TA1538/1,8-DNP(pYG122)	94	5	28.0
TA1538/1,8-DNP(pYG213)	1880	88	228
TA1538/1,8-DNP(pYG219)	325	17	54.6

122)の約8倍と非常に高いO-ATase活性を示し、2-NFの変異誘発作用に対する感受性も対照株の100倍、TA1538/1,8-DNP(pYG122)の7倍を示したため、1.35Kb領域にO-ATase遺伝子が存在するものと考えた。そこで、この1.35Kb領域をpBR322のSca I siteに組込み、新たにTA98、TA100に導入可能なTc^r Ap^sプラスミドpYG218、pYG219を作製した。しかし、同じ1.35Kb DNAを持つプラスミドであっても、そのプラスミドpYG213、pYG218、pYG219を持つTA1538/1,8-DNP株のO-ATase活性ならびに2-NFの誘発作用に対する感受性はそれぞれ大きく異なり、pYG213 > pYG219 > pYG122 > pYG218の順に高い酵素活性、感受性を示した(図4)。この結果から、pYG219がTA98、TA100に導入可能であり、かつO-ATase高生産性を持っていると判断し、pYG219をTA98、TA100に導入し、YG1024(=TA98(pYG219))、YG1029(=TA100(pYG219))を得た。これらの2株についてO-ATase活性を調べたところ、47.4および68.3 nmol/min/mg proteinというTA1538/1,8-DNP(pYG219)と同レベルの高い活性を示した。なお、表3に示すとおり、O-ATase高生産株は、INHおよび2-AF N-ATase活性も高いことから、このO-ATaseはN-ATase活性も持つことが明らかとなった。

以上の様に、我々は新しくNRase高生産性TA98、TA100株としてYG1021、YG1026、およびO-ATase高生産性TA98、TA100株としてYG1024、YG1029を樹立した。そこで、これら4つの高感受性菌株を用い、ニトロアレーンなどの

芳香属ニトロ化合物として2-NF、1-NP、1,8-DNP、2-ニトロナフタレン(2-NN)、4-NQOのAmes試験を行なった。またO-ATase高生産株は、芳香属ヒドロキシルアミン、芳香属アミンに対しても高感受性であることが予想されるため、これを用いてさらにN-hydroxy-2-AF(N-OH-AF)、N-OH-Glu-P-1、2-AF、Glu-P-1、2-アミノアントラセン(2-AA)のAmes試験も行った(芳香属アミンは芳香属ヒドロキシルアミンへの代謝活性化が必要とされるため、S 9を使用した)。これらの結果を表4に要約する。YG1021、YG1026は2-NF、1-NP、2-NNに対してそれぞれの対照株YG1020、YG1025より4~70倍の高い感受性を示したが、1,8-DNP、4-NQOに対しては対照株と同程度の感受性を示した。YG1024、YG1029は2-NF、1-NP、1,8-DNP、2-NN、N-OH-AF、N-OH-Glu-P-1、2-AF、Glu-P-1、2-AAに対して対照株より3~60倍の高い感受性を示したが、4-NQOに対しては対照株と同程度であった。

4. 考察

'Classical' NRase欠損株として知られるTA98NRなどのNR株は、NFR NRase活性がなく、また2-NF、1-NPの変異原性に関して耐性を示すが、1,8-DNPおよび4-NQOに対しては感受性を示す(表2)。今回のクローニングによって得られたpYG111、pYG215、pYG216などpYG111の1.6Kb領域(図1の矢印部分)をもつプラスミドが導入された菌株は、宿主のいかんにかかわらず

表4 新しい試験菌株を用いた Ames 試験の結果

化合物	誘発復帰変異原株数/nmol					
	YG1020	YG1021	YG1024	YG1025	YG1026	YG1029
2-NF	47	926	1430	28	163	855
1-NP	373	24700	3040	74	3050	875
1,8-DNP	231000	285000	4780000	21900	24900	500000
2-NN	2.9	20.5	12.9	11.2	42.7	36.5
4NQO	333	249	345	2470	1950	2160
N-OH-AF	2080		50700	82		5170
N-OH-Glu-P-1	7800		69400	84		3000
2-AF+S9	63		2410	20		551
Glu-P-1+S9	8090		144000	430		5970
2-AA+S9	351		6060	292		7450

YG1020 = TA98(pBR322-Ap^s)

YG1021 = TA98(pYG216)

YG1024 = TA98(pYG219)

YG1025 = TA100(pBR322-Ap^s)

YG1026 = TA100(pYG216)

YG1029 = TA100(pYG219)

ず、高いNFR NRase活性を示した(図3および本文)。これらの菌株は Ames 試験において 2-NF, 1-NP に対して高い感受性を示すが、1,8-DNP, 4-NQO に対しては対照株および欠損株と同等の感受性にとどまっている(表2, 4)。以上より、この1.6Kb領域には‘classical’ NRase遺伝子がコードされていることが強く示唆される。なお、DNA シークエンス分析結果より、pYG111 の 8.15Kb と 7.95Kb の間から、6.55Kb の方向にタンパクがコードされていることが予想されており、これは、6.55Kb – 7.95Kb の insert を持つ pYG222 が何の効果も持たないことと一致する。

YG1021 がその対照株 YG1020 (=TA98 (pBR322-Ap^s)) の20倍の感受性を 2-NF に対して示したのに対して、YG1026 は対照株 YG1025 (=TA100(pBR322-Ap^s)) の6倍の感受性にとどまっているが(表4)、これは TA100(81nmol/min/mg protein) が TA98(18 nmol/min/mg protein) よりかなり高いNRase活性を持っていること、すなわち対照株自体の感受性が相対的に上昇していることによるものと思われる。

Acetyl-CoA : N-hydroxyarylamine *O*-acetyl transferase 欠損株として知られる TA98 / 1,8-DNP₆などの1,8-DNP株は、N-OH-Glu-P-1 *O*-ATase, INH および 2-AF *N*-ATase 活性がなく、また 2-NF, 1,8-DNP の変異原性に関しては

耐性を示すが、4-NQO に対しては感受性である(表2, 3)。今回のクローニングによって得られた pYG121, pYG122, および pYG213, pYG219 など pYG122 の 1.35Kb 領域(図2の矢印部分)を持ったプラスミドが導入された菌株は、宿主のいかんにかかわらず、高い N-OH-Glu-P-1 *O*-ATase, INH および 2-AF *N*-ATase 活性を示した(表3および本文)。またこれらの菌株は Ames 試験において 2-NF, 1,8-DNP に対して高い感受性を示したが、4-NQO に対しては対照株および欠損株と同等の感受性にとどまっている(表2, 4)。以上より、pYG122 の 1.35Kb 領域には acetyl-CoA : N-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase 遺伝子がコードされていることが強く示唆される。しかし、一方、同じ insert を持つ pYG213, pYG218, pYG219 で活性が大きく異なることから(図4)、1.35Kb 領域がこの *O*-ATase 遺伝子の全てをカバーしているのではなく、一部ベクター遺伝子の助けを借りて発現していることが予想される。なお、DNA シークエンスおよびシークエンスに使用したプラスミドを導入した株の ATase 活性測定結果より、pYG122 の 6.3Kb から 7.65Kb の方向にタンパクがコードされ、その開始部位は 6.3Kb よりも上流にあること、さらにタンパクが *O*-ATase, *N*-ATase 活性を持つためには 6.3Kb よりも下流の coding region だけで充分であること

が予想されている。

今回得られた高感受性菌株は、環境中などに含まれる微量のニトロアレーン、芳香族アミンの検出、ならびに各種化合物の代謝活性化経路の推定に極めて有用な「道具」であると思われる。Josephy らは、prostaglandin H synthase (PHS) によって活性化される benzidine の変異原性の検出に *O*-ATase 高産性株を用い、PHS による活性化機構の研究を行っている²³⁾。また、河川底質および尿中の変異原性の検出において、YG1024 などが高感受度であるなど、様々な分野において有用性が示されつつある。一方、遺伝子および酵素の分子レベルの解析および生物学的意義、さらには哺乳類細胞への遺伝子導入と高感受性細胞の構築、バクテリアとの比較検討など今後広い分野の研究に発展可能と思われる。

5. 謝 辞

N-OH-Glu-P-1, N-OH-AF, 1,8-DNP を快く後恵与下さいました東京大学薬学部の首藤紘一博士、慶應大学医学部の加藤隆一博士、国立衛生試験所合成化学部の宮田直樹博士に深く感謝申し上げます。S. *typhimurium* TA1538, TA98, TA100 を御恵与下さいました University of California の Ames 博士ならびに TA98NR, TA98/1, 8-DNP₆ を御恵与下さいました Case Western Reserve University の Rosenkranz 博士に深く感謝申し上げます。(この研究の一部はヒューマンサイエンス振興財団の援助による)

参 考 文 献

- King, C. M., L. J. Romano, D. Schuetzle Eds. : Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes. Elsevier, 1988.
- Rosenkranz, H. S., R. Mermelstein : Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. Mutation Res., 114 : 217–267, 1983.
- McCoy, E. C., H. S. Rosenkranz, R. Mermelstein : Evidence for the existence of a family of bacterial nitroreductases capable of activating nitrated polycyclics to mutagens. Environ. Mutagen., 3 : 421–427, 1981.
- McCoy, E. C., G. D. McCoy, H. S. Rosenkranz : Esterification of arylhydroxylamines : evidence for a specific gene product in mutagenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 180 : 1362–1367, 1982.
- Saito, K., Y. Yamazoe, T. Kamataki, R. Kato : Mechanism of activation of proximate mutagens in Ames' tester strains : the acetyl-CoA dependent enzyme in *Salmonella typhimurium* TA98 deficient in TA98/1,8-DNP₆ catalyzes DNA-binding as the cause of mutagenicity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 116 : 141–147, 1983.
- Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki, R. Kato : Metabolic activation of mutagenic N-hydroxyarylamines by *O*-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA98. Archiv. Biochem. Biophys., 239 : 286–295, 1985.
- Vance, W. A., Y. Y. Wang, H. S. Okamoto : Disubstituted amino-, nitroso-, and nitrofluorenes : a physicochemical basis for structure-activity relationships in *Salmonella typhimurium*. Environ. Mutagen., 9 : 123–141, 1987.
- Rosenkranz, H. S., W. T. Speck : Mutagenicity of metronidazole : activation by mammalian liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 66 : 520–525, 1975.
- Rosenkranz, H. S., E. C. McCoy, D. R. Sanders, M. Butler, D. K. Kiriazides, R. Mermelstein : Nitropyrenes : isolation, identification, and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners. Science, 209 : 1039–1043, 1980.
- Mermelstein, R., D. K. Kiriazides, M. Butler, E. C. McCoy, H. S. Rosenkranz : The

- extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria. *Mutation Res.*, 89 : 187-196, 1981.
- 11) Wang, C. Y., M.-S. Lee, C. M. King, P. O. Warner : Evidence for nitroaromatics as direct-acting mutagens of airborne particulates. *Chemosphere*, 9 : 83-87, 1980.
- 12) Pederson, T. C., J.-S. Siak : The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts. *J. Appl. Toxicol.*, 1 : 54-60, 1981.
- 13) Watanabe, M., T. Nohmi, M. Ishidate, Jr. : New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147 : 974-979, 1987.
- 14) Watanabe, M., M. Ishidate, Jr., T. Nohmi : A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes : construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutation Res.*, in press., 1989.
- 15) Watanabe, M., M. Ishidate, Jr., T. Nohmi : in preparation.
- 16) Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook : Molecular cloning. A laboratory manual., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 17) McCalla, D. R., A. Reuvers, C. Kaiser : Mode of action of nitrofurazone. *J. Bacteriol.*, 104 : 1126-1134, 1970.
- 18) Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki, R. Kato : A new assay for *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase : reduction of *N*-hydroxyarylaminies through *N*-acetoxyarylaminies. *Anal. Biochem.*, 152 : 226-231, 1986.
- 19) Hein, D. W., M. Hirata, I. B. Glowinski, W. W. Weber : Biochemical evidence for the coexistence of monomorphic and polymorphic *N*-acetyltransferase activities on a common protein in rabbit liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 220 : 1-7, 1982.
- 20) Hein, D. W., J. G. Omichinski, J. A. Brewster, W. W. Weber : A unique pharmacogenetic expression of the *N*-acetylation polymorphism in the inbred hamster. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 220 : 8-15, 1982.
- 21) Ames, B. N., J. McCann, E. Yamasaki : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, 31 : 347-364, 1975.
- 22) Maron, D. M., B. N. Ames : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113 : 173-215, 1983.
- 23) Josephy, P. D., A. L. H. Chiu, T. E. Eling : Prostaglandin H synthase-dependent mutagenic activation of benzidine in a *Salmonella typhimurium* Ames tester strain possessing elevated *N*-acetyltransferase levels. *Cancer Res.*, 49 : 853-856, 1989.

環境変異原研究11 : 75-80(1989)

癌遺伝子 *v-Ha-ras* を導入した BALB 3T3 細胞株 (Bhas 42) を用いる 発癌プロモーター検索系の開発

食品薬品安全センター 秦野研究所、細胞生物部 佐々木澄志、田中憲穂
国立衛生試験所 変異原性部 水沢 博、石館 基

1. はじめに

近年、癌遺伝子 *ras* がイニシエーション過程に関与していることがわかつてき^{2, 3, 5)}。これは BALB 3T3 細胞に *v-Ha-ras* 遺伝子を導入後、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を添加することで BALB 3T3 細胞の形質転換の促進が観察されることからも示唆される¹¹⁾。この実験から以下の 2 つのことが導かれる。1) 化学物質によるイニシエーションは、*v-Ha-ras* 遺伝子の導入と置き換えることが可能である。2) TPA 处理をしていないシャーレの中には、*v-Ha-ras* 遺伝子が導入された細胞が存在しているにも関わらず接触阻止能を維持しているために、形態的に正常細胞と区別できない細胞が存在する。ただし、この細胞は TPA を添加することで形質転換する。以上のことから、TPA により形質転換を誘導する細胞株を樹立することは、Initiated cell のモデル細胞系となり得る。そこで、BALB 3T3 細胞に *v-Ha-ras* と pSV2-neo 遺伝子をリン酸カルシウム沈澱法を用いて共導入後、G-418 培地で選択することで目的の細胞をクローニングし、Bhas 42 細胞と名付けた¹¹⁾。

動物実験で観察される二段階発癌を細胞レベルで分析するために、培養細胞を用いた形質転換の実験系が開発されてきた。この系は癌化機構を解析するだけでなく、イニシエーターやプロモーターのスクリーニングにも応用できる。しかし、

細胞の維持の難しさ、培地中に含まれる血清の影響などの数多くの問題点があるために、必ずしも再現性の高い実験系とは言えない^{1, 7, 9, 13, 14)}。

そこで本研究では、Bhas 42 と BALB 3T3 細胞を同時に播種し、TPA を添加することで再現性の高い形質転換実験系の確立を試みた。また、3-methylcholanthrene (MCA) 处理後、TPA を添加する通常の二段階形質転換実験系と Bhas 42 形質転換実験系とを比較することで、プロモーター検索系への応用を検討した¹²⁾。

2. 材料と方法

(1) 細胞および遺伝子

BALB 3T3 A31-1-1 細胞 (JCRB0601)⁶⁾ は、JCRB 細胞バンクから入手した。細胞は牛胎児血清 10% を含む Eagle MEM 培地で培養した。*v-Ha-ras*⁴⁾ および pSV2-neo 遺伝子¹⁵⁾ は平川忠博士 (味の素) から供与を受けた。

(2) 遺伝子導入と細胞のクローニング

DNA の導入は、Wigler らのリン酸カルシウム沈澱法を変法して行なった¹⁶⁾。10⁶ 個の BALB 3T3 細胞を 100mm シャーレに播種した。20 時間後、培地を交換した。4 時間後、DNA (牛胸腺 DNA 10 μg, *v-Ha-ras* DNA 10 μg, pSV2-neo DNA 1 μg) を添加した。6 時間インキュベート後、DNA-リン酸カルシウム沈澱を除き、30% DMSO を含む MEM で 30 秒処理した⁸⁾。18 時間培

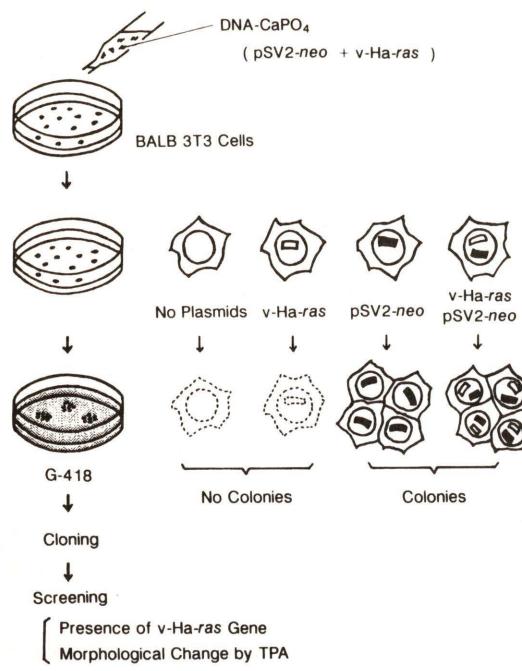


図 1 v-Ha-ras 遺伝子導入 BALB 3T3 細胞を樹立する方法

養後, G-418($400\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加し, 2週間培養した。G-418 耐性コロニーをクローニングし, ドットハイブリダイゼーション法による v-Ha-ras DNA の存在と TPA($1000\text{ng}/\text{ml}$)による形態変化を指標として, 目的の細胞をスクリーニングした(図 1)¹¹⁾。

(3) Bhas 42 細胞を用いる形質転換実験系

60mm シャーレに, 10^4 個の BALB 3T3 細胞と 10^2 個の Bhas 42 細胞とを同時に播種した。まいてから 8 日目に TPA ($1000\text{ng}/\text{ml}$) を添加し, 2 週間処理した。細胞播種後, 6 週間に固定, ギムザ染色をして形質転換巣を判定した。培地交換は, 最初の 4 週間までは 1 週間に 2 回, 後の 2 週間は 1 週間に 1 回行なった(図 2)。形質転換率は, Bhas 42 細胞だけを同時にまいておき, コロニー形成率あたりの形質転換巣の割合で表した¹²⁾。

(4) BALB 3T3 細胞を用いる二段階形質転換実験系

10^4 個の BALB 3T3 細胞を播種した。18から 24

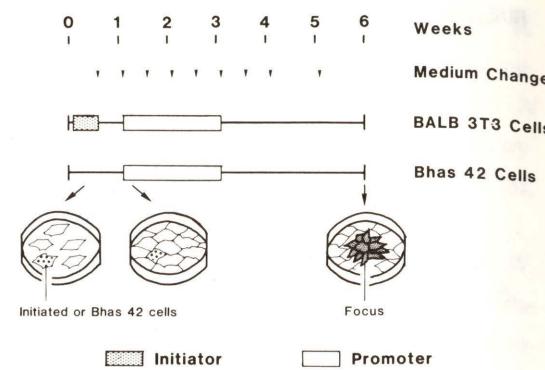


図 2 BALB 3T3 細胞と Bhas 42 細胞の形質転換実験系

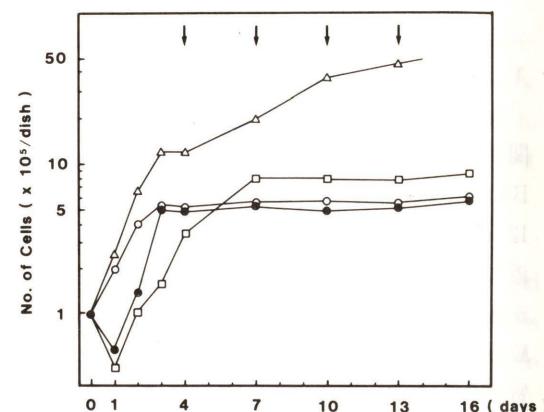


図 3 遺伝子導入 BALB 3T3 クローン細胞の増殖曲線
 (●) BALB 3T3 細胞, (○) pSV2-neo 遺伝子導入 BALB 3T3 細胞, (□) Bhas 42 細胞, (△) v-Ha-ras 遺伝子導入 BALB 3T3 形質転換細胞。
 10^5 個の細胞を 35mm シャーレに播種し, 細胞数を数えた。矢印は培地交換を示す。

時間後に MCA を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した。72時間処理後, 新鮮培地に代え, 4 日間培養した。まいてから 8 日目に TPA ($1000\text{ng}/\text{ml}$) を添加し, 2 週間処理した。培養と固定, 染色は上記と同様に行なった(図 2)。形質転換率は, シャーレあたりの形質転換巣の数で表した^{10, 12)}。

3. 結 果

(1) Bhas 42 細胞の性質決定

Bhas 42 細胞は BALB 3T3 細胞および pSV2-neo 導入細胞と同様に, シャーレに一杯になると

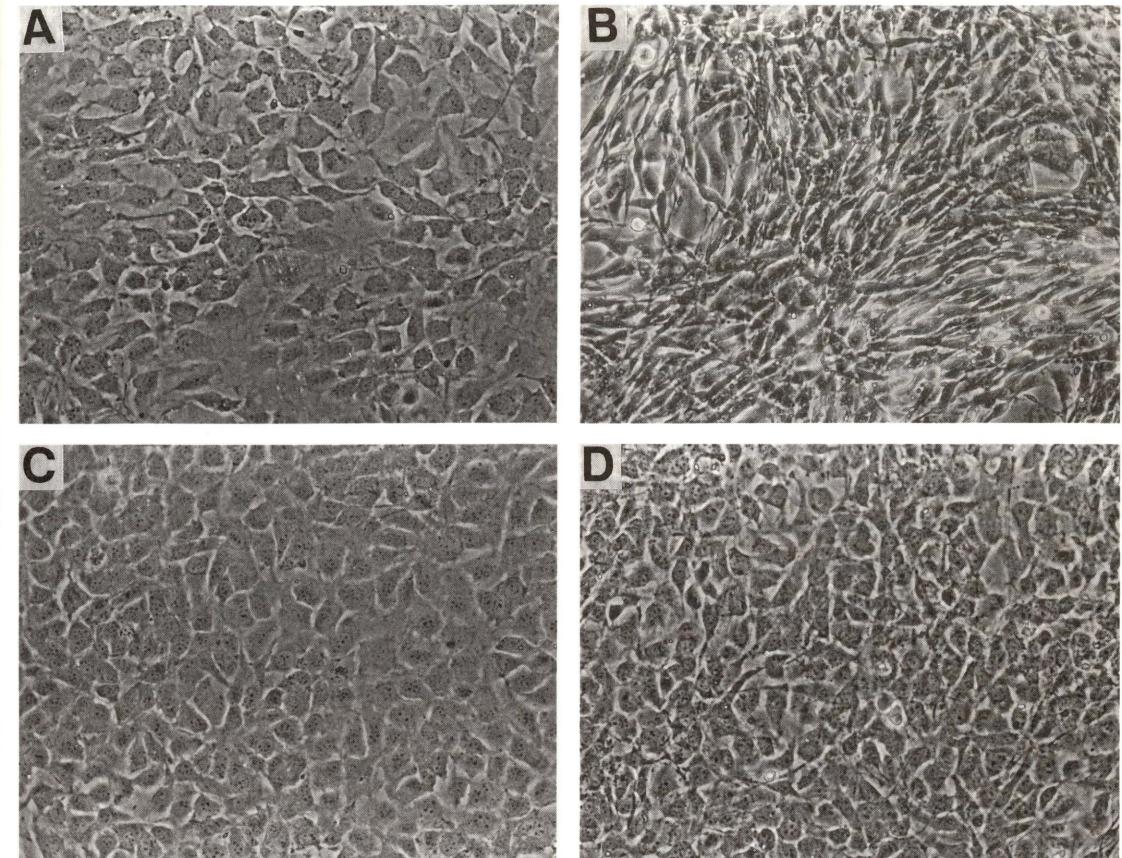


図 4 TPA 添加($1000\text{ng}/\text{ml}$, 5 日間処理)による形態変化

A : Bhas 42 細胞 (対照), B : Bhas 42 細胞 (TPA 处理), C : BALB 3T3 細胞 (対照), D : BALB 3T3 細胞 (TPA 处理)。

増殖が止まり, 単層状態を維持した。Bhas 42 細胞の細胞密度は, BALB 3T3 細胞の約 1.5 倍であった。一方, Bhas 30 細胞 (v-Ha-ras 導入形質転換細胞) は接触阻止能に感受性を示さず, 多層に重なり合って増殖を続けた(図 3)^{11, 12)}。

Bhas 42 細胞は BALB 3T3 細胞と同じ様に, 鮫和密度状態では単層の石疊状形態を示す(図 4 A)。鮫和密度状態の Bhas 42 紡錐に TPA ($1000\text{ng}/\text{ml}$) を添加すると, 急激に形態変化を起こした(図 4 B)。TPA により Bhas 42 細胞は, 添加後 36 時間に紡錐状となり, 3 日目から重なり合って増殖が観察され, 1 週間でほぼ典型的な形質転換様形態(細胞どうしの配列の乱れと交叉, 重なり合って増殖, 紡錐状形態)になった。一方,

BALB 3T3 細胞は TPA 处理しても単に細胞密度が高くなるだけであった(図 4 C, D)^{11, 12)}。

(2) Bhas 42 形質転換実験系と BALB 3T3 二段階形質転換実験系との比較

二段階形質転換実験系で得られた形質転換巣は, それぞれさまざまな形態を示すために判定が難しい。それゆえ判定に主観があり, 研究者によって同じ結果を見ているにも関わらずデータが異なってしまうことがある⁷⁾。しかし, Bhas 42 細胞はクローニングしてあるため, 殆どの形質転換巣が塩基性に染色され, 重なり合って増殖, 紡錐状を示す典型的な形質転換した細胞形態として観察され, 判定が客観的に行なうことができた(図 5)¹²⁾。

一般に形質転換の実験は、用いる血清のロットに大きく影響される^{1, 7, 9, 13, 14)}。6種類の血清を用い、同時に2つの実験を行なった。二段階形質転換実験系では、血清によって形質転換率に約10倍の開きがあった。一方、Bhas 42細胞の形質転換率は血清のロットに殆ど左右されず約20%であった¹²⁾。

通常の形質転換実験系においては、形質転換の過程で種々の要因が影響を与えるため、形質転換率が実験ごとに変わってしまい再現性が乏しい^{1, 7, 14)}。Bhas 42形質転換実験系では、BALB 3T3細胞とBhas 42細胞とを共培養しただけでは形質転換を誘導しなかった。しかし、TPA(1000ng/ml)で2週間処理すると、Bhas 42細胞は約20%の頻度で形質転換した(図5)。形質転換率は、用量(1-1000ng/ml)および処理時間(3-14日)に依存して高くなり、高い再現性を示した¹²⁾。

4. 考察

BALB 3T3細胞にv-Ha-ras遺伝子を導入して樹立したBhas 42細胞株に、プロモーター処理を行なうと、形質転換の促進が観察されることがわかった^{11, 12)}。Bhas 42細胞は、v-Ha-ras遺伝子とプロモーターの干渉作用を検討する有用な細胞であると考えられる。

また、Initiated cellのモデルであるBhas 42細胞を応用することで、再現性の高い形質転換実験系を開発することができた¹²⁾。従来より、BALB 3T3細胞に限らず形質転換を指標とした実験系は、再現性の面から不安定な系であることが知られている^{1, 7, 14)}。Bhas 42細胞を用いる系では、イニシエーターを最初に処理する通常の二段階形質転換実験系と比較して、1)形質転換巣の判定が客観的で容易に行なえる 2)形質転換率は血清のロットに依存しない 3)実験ごとにばらつきが少なく安定した結果を得られる、などの利点を有していた¹²⁾。以上の結果より、Bhas 42細胞による形質転換実験系は、発癌プロモーターのスクリーニングに適していると考えられる。今回の実験で我々は、BALB 3T3細胞とv-Ha-ras遺伝子を用

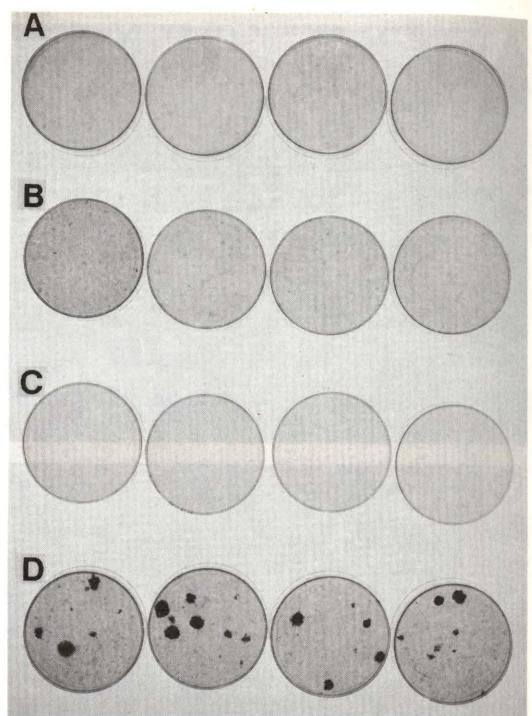


図5 Bhas 42細胞のTPAによる形質転換
A段: 10^4 個のBALB 3T3細胞と 10^2 個のBALB 3T3細胞とを同時にまいて培養した(対照)。B段: A段と同様に細胞を播種し、TPAを添加した。C段: 10^4 個のBALB 3T3細胞と 10^2 個のBhas 42細胞とを同時にまいて培養した(対照)。D段: C段と同様に細胞を播種し、TPAを加えた。TPAは1000ng/mlで2週間処理した。全ての細胞は6週間培養した。

いてプロモーター検索系の開発を行なったが、目的に応じて別の細胞や遺伝子をうまく組み合わせることにより、今まで難しかった形質転換実験が改良されることと思われる。

参考文献

- 1) Tu, A. S. and Sivak, A. Syrian hamster embryo cell transformation as a screening assay: sources of variability. In "Carcinogenesis Vol. 2, Mammalian Cell Transformation, Mechanisms of Carcinogenesis and Assays for Carcinogens", Barrett, J. C. and Tennant, R. W. eds. Raven Press, New York, New York, pp. 411-421 (1985).
- 2) Brown, K., Quintanilla, M., Ramsden, M., Kerr, I. B., Young, S. and Balmain, A. v-ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. Cell, 46: 447-456 (1986).
- 3) Dotto, G. P., Parada, L. F. and Weinberg, R. A. Specific growth response of ras transformed embryo fibroblasts to tumour promoters. Nature, 318: 472-475, (1985).
- 4) Ellis, R. W., DeFeo, D., Maryak, J. M., Young H A., Shih, T. Y., Chang, E. H., Lowy, D. R. and Scolnick, E. M. Dual evolutionary origin for the rat genetic sequences of Harvey murine sarcoma virus. J. Virol., 36: 408-420 (1980).
- 5) Hsiao, W. -L. W., Gattoni-Celli, S. and Weinstein, I. B. Oncogene-induced transformation of C3H10T1/2 cells is enhanced by tumor promoters. Science, 226: 552-555 (1984).
- 6) Kakunaga, T. and Crow, J. D. Cell variants showing differential susceptibility to ultraviolet light-induced transformation. Science, 209: 505-507 (1980).
- 7) "IARC Scientific Publications No. 67, Transformation Assay of Established Cell Lines: Mechanisms and Application" Kakunaga, T. and Yamasaki, H. eds, International Agency for Research on Cancer, Lyon, (1985).
- 8) Lewis, W. H., Srinivasan, P. R., Stokoe, N. and Siminovitch, L. Parameters governing the transfer of the genes for thymidine kinase and dehydrofolate reductase into mouse cells using metaphase chromosome or DNA. Somatic Cell Genet., 6: 333-347 (1980).
- 9) Oshiro, Y., Balwierz, P. S. and Piper, C. E. Selection of fetal bovine serum for use in the C3H/10T1/2 CL8 cell transformation assay system. Environ. Mutag., 4: 569-574 (1982).
- 10) Sasaki, K., Chida, K., Hashiba, H., Kamata, N., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. Enhancement by 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ of chemically induced transformation of BALB 3T3 cells without induction of ornithine decarboxylase or activation of protein kinase C. Cancer Res., 46: 604-610 (1986).
- 11) Sasaki, K., Mizusawa, H. and Inshidate, M. Isolation and characterization of ras transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 79: 921-930 (1988).
- 12) Sasaki, K., Mizusawa, H., Inshidate, M. and Tanaka, N. Establishment of a highly reproducible transformation assay of a ras-transfected BALB 3T3 clone by treatment with promoters. In "Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II", Kuroda, Y., Shankel, D. M. and Waters, M. D. eds. Plenum Press, New York, New York, pp. 413-418 (1990).
- 13) Schuman, R. F., Pienta, R. J., Pooley, J. A. and Lebherz III, W. B. Effect of fetal bovine serum on 3-methylcholanthrene-induced transformation of hamster cells in vitro. In Vitro, 15: 730-735 (1979).
- 14) Sivak, A., Charest, M. C., Rodenko, L., Silveira, D. M., Simons, I. and Wood, A. M. BALB/c-3T3 as target cells for chemically induced neoplastic transformation. In "Advances in Modern Environmental Toxicology, Vol. 1, Mammalian Cell Transformation by Chemical Carcinogenesis", Mishra, N., Dunkel, V. and Mehlman, M. eds. Senate Press, Princeton Junction, New Jersey, pp. 133-180 (1980).

- 15) Southern, P. J. and Berg, P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1 : 327-341 (1982).
- 16) Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. and Chasin, L. DNA mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 1373-1376 (1979).

無アルブミン血症ラットにおける
アルブミン産生肝細胞の出現を指標とした
体細胞突然変異検出系

国立がんセンター研究所 発がん研究部 落合 雅子, 新田 紀子, 島 礼
Peter J. Wirth, 鈴木 美加
杉村 隆, 長尾美奈子
佐々木研究所 長瀬 すみ

はじめに

無アルブミン血症ラット (*Nagase analbuminemic rat, NAR*) は長瀬らにより, SDラットから樹立された¹⁾。血清蛋白質量は, 正常のSDラットとほぼ同じであるが, 血清中のアルブミン量は正常SDラットの数千分の一であり, また高脂血症を示し, これらの形質は常染色体性劣性遺伝する¹⁾。江角らは, NARのアルブミン遺伝子のH1イントロンには, 図1に示すような7塩基対の欠損があることを報告した²⁾。この部位は, スプライシングのdonor siteの一部を含むと思われる。NARの肝細胞質にアルブミンmRNAがほとんど存在しないのは, mRNAがスプライシングを受ける際U₁snRNAとdonor siteのsequenceとの間で安定なcomplexができず正常なスプライシングが進行しないためと考えられている。その結果アルブミンが合成できないと推測されている。

NARに3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (3'-MeDAB)や2-acetylaminofluorene (2-AAF)を

投与した場合, 多くのアルブミン陽性肝細胞が出現することが報告されている³⁾。我々は, NARの肝臓におけるアルブミン陽性細胞の出現を指標とするこの系を, 体細胞突然変異検出系として用い, 食品中に存在する肝発がん物質投与による突然変異誘発と発がんの関係を解析した。

1. 雄NARに肝発がん物質を投与した場合のアルブミン陽性細胞の出現

アルブミン陽性細胞は, 肝臓をホルマリン固定してパラフィン包埋し, 抗ラットアルブミン抗体 (Cappel社) を用いてABC法⁴⁾による免疫染色を行い, 観察した。

図2 aに示すように, 正常のSDラットでは, アルブミンはすべての肝細胞で産生されているので, 全細胞が染色される。しかし, 発がん物質を投与していないNARではほとんどの肝細胞が染まらず, ごくまれに, 陽性細胞が認められた (図2 b)。3'-MeDABを投与した場合には, 図2 c

SD (Alb ⁺)	—TGCTACGGCACAGTGGTAGGTTCCGCGAGCTA—
NAR(Alb ⁻)	—TGCTACGGCACAGTGGTAG CGAGCTA—
Exon (H)	

図1 SDラット及びNARのアルブミン遺伝子のH1イントロン付近の塩基配列

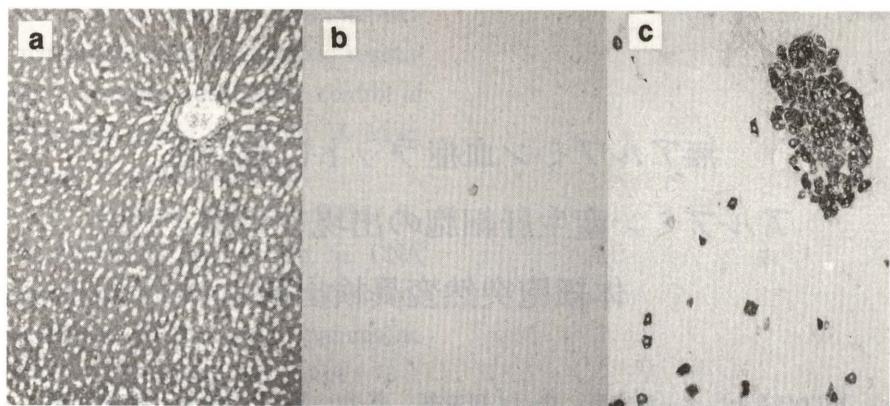


図2 抗ラットアルブミン抗体で免疫染色した肝臓(×200)
a ; 正常SDラット, b ; 発癌物質を投与していないNAR, c ; 3'-MeDABを19週間投与したNAR

のようにアルブミン陽性細胞が多数出現した。アルブミン陽性細胞は、singletで存在している場合がほとんどであるが、まれに、図2 c右上に見られるようなクラスターの形成が観察された。アルブミン陽性細胞クラスターは、1つの細胞がアルブミン陽性細胞に変化し、それが増殖して形成されたと考えている。アルブミン産生という形質が細胞増殖をへても変わらないことは、少なくともこの変化が遺伝子変化であるための必要条件である。クラスターもsingletも、各々1回の突然変異により生じたと仮定し、各々を1個のフォーカスとして数え、突然変異率を算出した。

肝発がん物質としては、すでに無アルブミンラットでの発癌性のわかっている3'-MeDABを陽性コントロールに用いた。その他にMeIQx⁵⁾、Glu-P-1⁶⁾を各々0.06%、0.04%、0.05%飼料に混入して雄NARに投与し、経時的にと殺した。図3は3'-MeDAB、MeIQx、Glu-P-1を投与した場合の突然変異率を示す。発がん物質を投与しない群でも、加齢と共にアルブミン陽性細胞クラスターが増加した。肝発がん物質を投与した場合、非投与群と比べて数倍から十数倍に突然変異率が上昇した。3'-MeDAB、MeIQx、Glu-P-1は、投与後19週で、10³個の肝細胞当たり各々、15.2、13.0、18.6個のフォーカスを生じ、どれもほぼ同じ頻度で突然変異が誘発された。3'-MeDAB投与群では、19週で

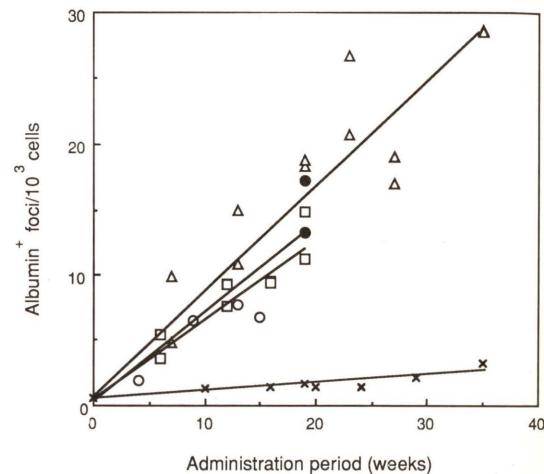


図3 雄NARに発癌物質を投与した場合の突然変異率
1点が1匹のラットにおける値を示す。
× ; 非投与群, ○ ; 3'-MeDAB投与群, ● ;
3'-MeDAB投与群(肝癌を持つ), □ ; MeIQx投
与群, △ ; Glu-P-1投与群

肝癌を生じたが、MeIQx及びGlu-P-1投与群では、肝癌を生じなかった。アルブミン陽性細胞クラスターが生じるのは、1つの細胞が突然変異によりアルブミン陽性細胞になった後、発がん物質のプロモーター作用により細胞が増殖刺激を受けた可能性が考えられた。そこで、20個以上のアルブミン陽性細胞からなるクラスターの出現頻度を調べた。図4 aに示すように、3'-MeDAB、MeIQxおよびGlu-P-1投与群

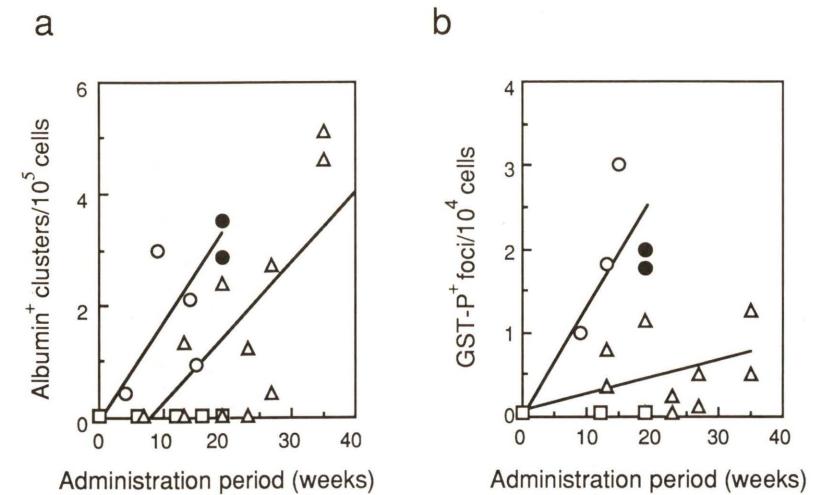


図4 雄NARに発癌物質を投与した場合のアルブミン陽性細胞クラスターおよび、GST-P陽性フォーカスの出現頻度
a ; アルブミン陽性細胞クラスター, b ; GST-P陽性フォーカス, ○ ; 3'-MeDAB投与群, ● ; 肝癌を持っていた3'-MeDAB投与群のラット, □ ; MeIQx投与群, △ ; Glu-P-1投与群

におけるアルブミン陽性細胞クラスターの出現頻度は3物質間でかなり違う。すなわち、MeIQx投与群では、まったくアルブミン陽性細胞クラスターを生じなかったが、3'-MeDAB投与群では、19週で10⁵の肝細胞当たり、3.2個生じた。Glu-P-1投与群では、3'-MeDAB投与群より遅れて出現し、35週投与後で10⁵個の肝細胞当たり4.9個生じた。

3'-MeDAB投与群のみで肝癌が生じたことと、3'-MeDAB投与群でもっともアルブミン陽性細胞クラスターが生じたことに関連があるのではないかと考えた。そこで、アルブミン陽性細胞クラスター形成能と肝癌発生の関連を調べるために、肝癌の前癌病変の指標として使用されるグルタチオニ-S-トランスフェラーゼ胎盤型(GST-P)について抗ラットGST-Yf抗体(BIOPREP社)を用いて免疫染色を行い、直径0.2mm以上のGST-P陽性フォーカスの出現頻度を調べた。直径0.2mm以上のGST-P陽性フォーカスは、約60個以上の細胞からなる。図4 bに示すようにGST-P陽性フォーカスは、MeIQx投与群では全く出現しなかった。また、3'-MeDABおよびGlu-P-1投与群では19週で、各々10⁴個の肝細胞当たり、1.9および0.9個出現し、これら3つの発がん

物質で、アルブミン陽性細胞クラスターの出現頻度と同じ傾向を示した。これらのことより、アルブミン陽性細胞クラスター形成能の各物質による違いは、プロモーター作用の違いを示している可能性がある。

2. 肝発がん物質をNARに投与した場合のアルブミン陽性細胞出現における性差

3'-MeDABおよびMeIQxを各々0.06%および0.04%の濃度で飼料に混入し、雌NARに投与した。突然変異率、アルブミン陽性細胞クラスター・GST-P陽性フォーカスの出現頻度を調べた。雌NARにおいても、3'-MeDAB、MeIQx投与群は、非投与群に比べて高い突然変異率を示した。又、3'-MeDAB投与群では、アルブミン陽性細胞クラスター、GST-P陽性フォーカスが出現したが、MeIQx投与群では、どちらも出現しなかった。3'-MeDAB、MeIQxは雌NARにおいても突然変異率、アルブミン陽性細胞クラスター・GST-P陽性フォーカスの出現で雄NARと同様の傾向を示した。

3'-MeDABをNARに投与した場合の性差を調べてみた。雄は19週で2匹、24週で4匹に肝癌が

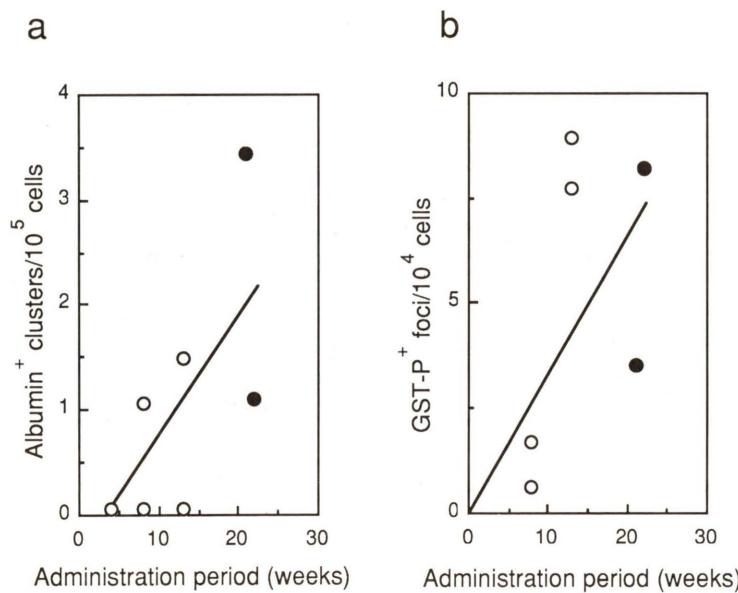


図5 雌NARにDENを投与した場合のアルブミン陽性細胞クラスター、GST-P陽性フォーカスの出現頻度
a ; アルブミン陽性細胞クラスター、b ; GST-P陽性フォーカス、○ ; DEN投与群、● ; 肝癌をもっていたDEN投与群のラット

見られた。一方、雌は26週で2匹、31週で1匹に肝癌が見られ、3'-MeDABでは、雄の方に肝癌が発生しやすい傾向が見られた。GST-P陽性フォーカスの出現頻度は雄の方が若干高かったが、雌は雄に比べて突然変異率が低いことはなかった。アルブミン陽性細胞クラスターの出現頻度は雄の方が高く、クラスターが早く出現した。雄の方が肝癌になりやすいのは、プロモーション作用に感受性が高いためと考えられる。

3. DEN投与によるアルブミン陽性細胞クラスターの出現

Diethylnitrosamine (DEN)を、雄NARに投与してもアルブミン陽性細胞は出現しない³⁾。雌NARにDENを0.01%の濃度で飲料水中に混ぜて投与し、突然変異率、アルブミン陽性細胞クラスターの出現頻度、GST-P陽性フォーカスの出現頻度について調べた。突然変異率は、非投与群と差はなかった。しかし、図5 aに示すように投与後8週めより、アルブミン陽性細胞クラスターが出現した。図5 bに示すように、投与後8週で

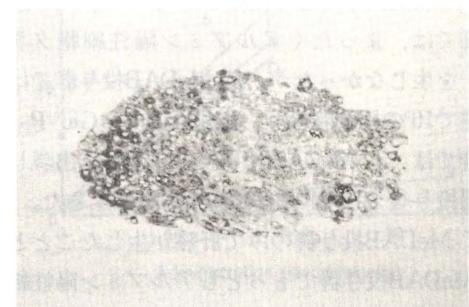


図6 DEN投与により生じたアルブミン陽性細胞クラスター(×100)
13週間投与の肝臓

GST-P陽性フォーカスが出現し、19,21週では肝癌が発生した。図6に示すように、DEN投与群で出現したアルブミン陽性細胞クラスターの周囲には、3'-MeDABなど変異を誘発する物質を投与した場合と異なり、singletの細胞はほとんど存在しない。自然突然変異で生じたアルブミン陽性細胞が、DENのプロモーター作用により増殖刺激を受けてアルブミン陽性細胞クラスターを形成したと思われる。DENのような塩基置換型変異原は、こ

の系でアルブミン陽性細胞を増加させないのかもしれないが、プロモーター作用は、アルブミン陽性細胞クラスター形成能を見ることにより、検出可能である。

おわりに

NARにおけるアルブミン産生肝細胞の出現を指標としたこの体細胞突然変異検出系では、牧野らの報告した3'-MeDAB, 2-AAF及びここで示したGlu-P-1, MeIQxが変異原性を示すが、DENは変異を誘発しない。DENは塩基置換型の変異原であり、他の4つはフレームシフト型変異原であることから、この系はフレームシフト型変異原のみを検出する可能性がある。

アルブミン陽性細胞クラスターの出現頻度は、肝臓の前癌病変の指標として使われるGST-P陽性フォーカスの出現頻度の上昇と同じ傾向を示し、プロモーター作用の指標にできる可能性がある。アルブミン陽性細胞への変化の機構は、今、検討中である。

今後は、肝発がん物質以外の発がん物質を投与しても、アルブミン陽性細胞が生じるか否かを調べる必要があろう。

謝 辞

本研究には、文部省科研費(がん特別研究)および厚生省・対がん10か年総合戦略の援助を受けた。

参考文献

- 1) Nagase, S., Shimamune, K., and Shumiya, S. (1979) Albumin-deficient rat mutant.

- 2) Esumi, H., Takahashi, Y., Sato, S., Nagase, S., and Sugimura, T. (1983) A seven-base-pair deletion in an intron of the albumin gene of analbuminemic rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80 : 95-99.
- 3) Makino, R., Sato, S., Esumi, H., Negishi, C., Takano, M., Sugimura, T., Nagase, S., and Tanaka, H. (1986) Presence of albumin-positive cells in the liver of analbuminemic rats and their increase on treatment with hepatocarcinogens. Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 77 : 153-159.
- 4) Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., 29 : 577-580.
- 5) Kato, T., Ohgaki, H., Hasegawa, H., Sato, S., Takayama, S., and Sugimura, T. (1988) Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. Carcinogenesis, 9 : 71-73.
- 6) Takayama, S., Masuda, M., Mogami, M., Ohgaki, H., Sato, S., and Sugimura, T. (1984) Induction of cancers in the intestine, liver and various other organs of rats by feeding mutagens from glutamic acid pyrolysate. Gann, 75 : 207-213.

哺乳動物試験分科会 (MMS 分科会) ニュース

国立衛生試験所 変異遺伝部 祖父尼俊雄

本分科会の昭和63年度の活動状況を紹介する。定例研究会は、恒例の通り年2回、第13回および第14回定例会として、末尾に記載したようなプログラムで開催した。第13回定例会(昭和63年5月20日、於浜松市)は、土川分科会会長が自ら企画されたにもかかわらず、病気のため当日参加できないことになったが、定例会は滞りなく終了した。小核共同研究グループからは、投与経路差についての結果が報告され、熱心に討論が行われた。招待講演として、大阪大学医学部、北村先生が「マウスSteel遺伝子座の作用機序」について、放射線医学総合研究所、広部先生が「マウス表皮メラノサイトの分化における毛色遺伝子の役割」について講演された。いずれも当分科会に密接に関連する内容で、基礎的且つ重要な研究結果を紹介して頂き、非常に有益であった。第14回定例会は日本環境変異原学会第17回大会の前日(11月3日、於日本教育会館)を行った。会場その他のご支援を頂いた大会委員長長尾先生に深謝申し上げる。この定例会はミニシンポジウム形式で行い、『哺乳動物生殖細胞での突然変異について考える』というタイトルの下に、2つの研究発表が行われ、引き続き招待講演として、愛知コロニー・発達障害研究所の孫田先生より「生殖細胞における異常染色体の分離と淘汰について」という演題の講演が行われた。非常に重要なテーマでありながら、研究者が限られており、この方面の研究を広めるためにもこのような企画の重要性を痛感した。最後に、西会員より帰朝報告が行われ、密度の高い研究会となった。

第14回定例研究会では、初めての試みとして「MMS 分科会会報、(Mammalian Mutagenicity

Study Group Communications)」の第1号を刊行し、参加者に配布した(会報代 1,000円)。研究発表の抄録を簡易印刷したものだが、発表の理解および後の記録として有用であり、でき得る限り今後も継承して行きたい。

小核試験共同研究として、投与経路差についての検討が終了し、化合物毎に17の論文が作製され、Summary Reportと共にMutation Researchに受理された。校正も終了したので、近々掲載の運びとなる。次回の共同研究として、投与回数を検討することが決まり、すでにそのデータが集計されつつある。これらの共同研究の成果は第5回 ICEMにて発表の予定であり、目下そのための準備が進められている。

スポットテスト共同研究の成果についても、データのまとめが終了し、目下論文の作製が行われ、誌上発表に向かって作業が行われている。また、次回の共同研究についても methyl methanesulfonateをとりあげて行うことが提案されており、共同研究の準備が進められている。

MMS 分科会の活動の1つとして「染色体異常の分類と判定」についてのワークショップを行ったが、それをふまえて「化学物質による染色体異常アトラス」を発刊することとした。昭和62年より具体的な作業に入ったが、63年9月に J EMS・MMS 分科会編として朝倉書店より発刊の運びとなった。本発刊に尽力された会員諸氏に深謝する。J EMS 会員には割引値段で頒布しており、写真が豊富であるため、非常に役立つとの声も聞かれている。

冒頭でふれたが、本分科会会長の土川清先生が病気のため手術を受けられたが、その後経過が順

調で、現在では以前と変わらず研究に精を出されている。会員一同大いに安堵している次第である。

他方、不幸な出来事として、本分科会会員である津吉俊氏が本年1月にクモ膜下出血で急逝され

た。小核共同研究にも参加され、本分科会の重要なメンバーの1人として活躍されていたが、あの若さあまりの突然のことで言葉もない。謹んでご冥福をお祈り申し上げる。

定例研究会概要

第13回定例研究会

日 時：昭和63年5月20日（金）13:30～16:30
場 所：浜松市福祉文化会館、2階、集会室
〒432 浜松市成子町36-1
(TEL: 0534-52-3131)

1. 総会

(1)会計報告、(2)事務局報告

2. 小核試験共同研究経過報告

3. [招待講演]

1)マウスSteel遺伝子座の作用機序

北村 幸彦（大阪大学医学部、バイオメディカル教育研究センター）

2)マウス表皮メラノサイトの分化における毛色遺伝子の役割

広部 知久（放射線医学総合研究所、生物研究部）

第14回定例研究会

日 時：昭和63年11月3日（木）15:30～19:00
場 所：日本教育会館
〒101 東京都千代田区一ツ橋2-6-2
(TEL: 03-230-2831)

1. 事務連絡

2. スポットテスト共同研究経過報告

3. 小核試験共同研究経過報告

4. 研究発表：

『哺乳動物生殖細胞での突然変異について考える』

1)アルキルニトロソウレアによるマウス生殖細胞の遺伝子突然変異誘発

渋谷 徹（食薬センター・秦野研）

室田 哲郎（三菱化成総合研究所）

2)マウス・スポットテストの使用系統における生殖細胞の自然突然変異－アンケート調査

の報告－

土川 清（国立遺伝研）

[招待講演]

生殖細胞における異常染色体の分離と淘汰について

孫田 信一（愛知コロニー・発達障害研）

（総合討論）

5. 帰朝報告

神経芽細胞腫におけるN-myc遺伝子の増幅単位の分離と解析

西 義介（日本たばこ・生命科学研）

哺乳動物試験分科会（MMS分科会）

会長：土川 清

幹事：乾 直道、大島 稔彦、菊池 康基、

渋谷 徹、島田 弘康、須藤 鎮世、

祖父尼俊雄、林 真、一ツ町晋也

事務局：国立衛生試験所・変異遺伝部

(TEL: 03-700-1141, Ext. 435)

日本学術会議だより

No.10

第14期最初の総会開催される

昭和63年8月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議の第14期が7月22日から発足し、7月25日～27日の3日間、第14期最初の総会が開催されましたので、その総会等についてお知らせします。

日本学術会議第105回総会報告

7月22日の第14期の発足に伴い、同日付けで内閣総理大臣による日本学術会議会員の発令が行われた（辞令の交付式は、総会日程の関係で7月25日に挙行）。第14期の会員は、選出制度が学術研究団体を基礎とする推薦方式に変わって後、2回目の会員である。この第14期会員による最初の総会である、第105回総会が、7月25、26、27日の3日間、本会議講堂で開催された。

第1日目（25日）。午前中の新会員への辞令交付式に続いて、13時に総会が開会され、直ちに、会長及び両副会長の選挙が行われた。会員による互選の結果、会長には、第13期の会長であった近藤次郎第5部会員が再選された。また、人文科学部門の副会長には、大石泰彦第3部会員が、自然科学部門の副会長には、渡邊格第4部会員がそれぞれ選出された。選挙終了後、近藤会長から、「一生懸命務めるつもりなので、会員の方々の御協力をよろしくお願いしたい。」との就任のあいさつがあり、また、大石、渡邊両副会長からもそれぞれ就任のあいさつがあった。

総会終了後、直ちに、各部会が開催され、各部の役員である部長、副部長、幹事の選出が行われた。（第14期の役員については、別掲を参照。）

第2日目（26日）。10時に総会が開会され、始めに、近藤会長が、第13期の会長という資格で第13期の総括的な活動報告を行った後、3年間を振り返り特に印象の深いものとして、脳死問題に関する討議、ICSU総会招致に関する科学者の自由交流問題、学術会議の予算等について、その所感を述べた。続いて、会員推薦管理会報告として、久保亮五委員長の代理として事務総長が、第14期会員の推薦を決定するまでの経過報告等を行った。

引き続き、会長から3日目の総会で提案・審議する予定の「第14期活動計画委員会の設置について（申合せ案）」に関する各部での事前討議について並びに各常置委員会の委員定数の決定に基づく各部での委員の選出について、それぞれ各部へ付託がなされた。

総会終了後、直ちに各部会が開催され、前述の申合せ案の討議及び各常置委員会の選出等が行われた。

第3日目（27日）。10時に総会が開会され、会長から前述

の「第14期活動計画委員会の設置について（申合せ案）」の提案が行われた。この申合せ案は、第14期の活動に関する基本的計画の立案を任務とする臨時の委員会を次の定例総会までの間、設置するということを内容としている。この提案は、その構成等に関する若干の討議の後、原案どおり可決された。

総会終了後、直ちに各部会が開催され、設置が決定された第14期活動計画委員会の選出等が行われた。

なお、この第14期活動計画委員会は、総会期間中に第1回の会議を開き、全会員を対象にした第14期の学術会議の活動に関するアンケートの実施を決めるなど、早速その活動を開始した。

第14期日本学術会議会員の辞令交付式等について

第105回総会に先立ち、第14期日本学術会議会員の辞令交付式が7月25日（月）10時35分から、総理大臣官邸ホールで行われた。辞令交付式は、まず、第1部から第7部までの会員の氏名が順次読み上げられた後、会員全員を代表して最年長者である山本正男第1部会員が竹下登内閣総理大臣の代理としての小渕恵三内閣官房長官から、辞令の交付を受けた。その後、小渕長官から、第14期会員に対する期待を込めた内閣総理大臣あいさつの代読があり、続いて、山本正男会員から、会員を代表して国民の期待に沿うよう努力したい旨のあいさつがあつた。式は終了した。出席会員は190人であった。なお、第14期日本学術会議会員の発令は、第14期の始期である7月22日付けであるが、総会日程との関係で、総会初日の7月25日に辞令交付式を行ったものである。

26日には、午後の各部会終了後、18時から、小渕内閣官房長官主催による歓迎パーティーが本会議のホールで行われた。小渕長官のあいさつがあり、続いて、脇村日本学士院長の代理としての石井良助学士院会員から祝辞があつた。これに対し近藤会長によるユーモアに富んだ答礼のあいさつがあり、沢田敏男日本学術振興会会长の乾杯の音頭でパーティーが進められ、活発かつ友好的な歓談が行われた。

第14期日本学術会議役員

会長 近藤次郎（第5部・経営工学）
副会長（人文科学部門）大石泰彦（第3部・経済政策）
副会長（自然科学部門）渡邊 格（第4部・生物科学）
《各部役員》
第1部 部長 黒田 俊雄（歴史学）
副部長 北川 隆吉（社会学）
幹事 一番ヶ瀬康子（社会学）
" 肥田野 直（心理学）
第2部 部長 西原 道雄（民事法学）
副部長 川田 侃（政治学）
幹事 経塚作太郎（国際関係法学）
" 山下 健次（公法学）
第3部 部長 島袋 嘉昌（経営学）
副部長 大石嘉一郎（経済史）
幹事 木村 栄一（商学）
" 則武 保夫（財政学・金融論）
第4部 部長 中嶋 貞雄（物理科学）
副部長 田中 郁三（化学）
幹事 樋口 敬二（地球物理学）
" 平本 幸男（生物科学）
第5部 部長 岡村 総吾（電子工学）
副部長 高村 仁一（金属工学）
幹事 市川 淳信（計測・制御工学）
" 藤本 盛久（建築学）
第6部 部長 江川 友治（農芸化学）
副部長 中川昭一郎（農業総合科学）
幹事 飯田 格（農学）
" 水間 豊（畜産学）
第7部 部長 小坂 樹徳（内科系科学）
副部長 水越 治（外科系科学）
幹事 伊藤 正男（生理科学）
" 岡田 晃（社会医学）
(注) カッコ内は、所属部・専門

「対外報告」について

本会議では、第13期になってから、その意思の表出の形態の一つとして、各部・委員会がその審議結果をとりまとめたものを、総会又は運営審議会の承認を得て、外部に発表する「報告」（通称「対外報告」と言っている。）というものができるようになった。ただし、この対外報告は、日本学術会議全体の意思の表出ではなくて、当該対外報告をとりまとめた部・委員会限りのものである。

第13期には、数多くの対外報告が総会又は運営審議会の承認を得て出されている。ここでは、すでに、この日本学術会議だよりで紹介されているものを除いた対外報告の題目のみを以下に紹介する。

- 物理学研究連絡委員会報告—大型ハドロン計画の推進について
- 化学研究連絡委員会報告—全国的視野に立つ化学の新しい研究体制について
- 第5常置委員会報告—公文書館専門職員養成体制の整備について
- 遺伝医学研究連絡委員会報告—「医学教育の改善に関する調査研究協力者会議最終まとめ」についての意見
- 第4部報告—上級研究員制度（仮称）の新設について（基礎科学振興・充実のための方策）

第14期日本学術会議会員の概要について

この度任命された210人の第14期日本学術会議会員の概要を以下に紹介する。（カッコ内は前期）

- 性別 男子 208人（207人）
女子 2人（3人）
- 年齢別
50~54歳 5人 55~59歳 39人
60~64歳 85人 65~69歳 67人
70~74歳 13人 75~79歳 1人
〔最年長 76歳（77歳）
最年少 51歳（48歳）〕
平均年齢 63.1歳（61.6歳）
- 勤務機関及び職名別
(1) 大学関係
国立大学 73人（101人）
公立大学 5人（6人）
私立大学 88人（77人）
その他 1人（3人）
計 167人（187人）
(2) 国公私立試験研究機関・病院等
8人（9人）
(3) その他
法人・団体関係 13人（3人）
民間会社 7人（3人）
無職 15人（8人）
計 35人（14人）
- 前・元・新別
前会員 109人（41人）
元会員 4人（6人）
新会員 97人（163人）
- 地方別（居住地）
北海道 3人（5人）
東北 6人（6人）
関東 132人（134人）
中部 15人（12人）
近畿 42人（40人）
中国・四国 4人（6人）
九州・沖縄 8人（7人）

(注) 詳細については、日本学術会議月報7月号を参照

- 第5部報告—工学系の大学における産・官・学の研究協力の在り方について
- 生命科学と生命工学特別委員会報告—生命科学の研究と教育の推進方策について
- 情報学、学術文献情報、学術データ情報研究連絡委員会報告—情報学振興総合機構の構想について（中間報告）
- 商学研究連絡委員会報告—大学における商学教育の課題と方向
- 電子・通信工学研究連絡委員会報告—通信工学の体系化に向けて

御意見・お問い合わせ等がありましたら下記までお寄せください。

〒106 港区六本木7-22-34
日本学術会議広報委員会 電話 03(403) 6291

日本学術会議だより

16.11

第14期活動計画決まる

昭和63年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、このたび開催した第106回総会において、第14期活動計画と新しい特別委員会の設置を決定しましたので、その概要をお知らせいたします。

日本学術会議第106回総会報告

日本学術会議第106回総会（第14期・第2回）は、10月19~21日の3日間開催された。

今回の総会の主な任務は、第14期日本学術会議の活動の指針となる第14期活動計画を審議し、決定することであった。そのために、「第14期活動計画（申合せ）」と「臨時（特別）委員会の設置について（申合せ）」の2つの総会提案が用意された。

この2つの提案の内容は、前回の臨時総会（本年7月）で設置された第14期活動計画委員会が、慎重に審議を重ねて作成したものであり、またその間に2回の連合部会及び各部会を開いて各会員の意見を聴取の上、調整したものである。

この2つの提案については、第1日目の午前中の総会で、近藤会長から、提案説明が行われるとともに、同日の午後の各部会で審議が行われた。

次いで、この2つの提案は、第2日目の午前中の総会の審議に付され、最終的推敲を期す質疑の後、採決が行われ、いずれも圧倒的多数の賛成で可決された（第14期活動計画及び設置された7特別委員会の名称は別掲参照）。

この総会決定により、新たに設置された7特別委員会については、第2日目の午後に開催された各部会で、各部ごとに割り当てられた委員定数により、委員の選出が行われた。

次いで、翌第3日目の午前中には、各特別委員会の第1回目の会議が開かれ、それぞれ委員長・幹事の選出が行われるとともに、今後の審議予定等について審議がなされるなど、早速その活動が開始された。

第2日目の午後には、1時から2時間半にわたって「総会中の自由討議」が行われた。これは、会員のための勉強会で、総会行事の一環として行われてきたものである。今回は、第14期活動計画案を審議する過程で、会員間で特に討議が活発に行われ、関心が高かった課題を取り上げて行われた。まず、島袋嘉昌第3部会員（経営学）から「学術的・総合研究」について意見の発表の後、関連して、石井吉徳第5部会員（資源開発工学）から発言があり、続いて、井口潔第7部会員（外科系科学）から「人間の科学」について、川田侃第2部会員（政治学）から「紛争学・平和学」について、中川昭一郎第6部会員（農業総合科学）から「農業・農村問題」について、大島康行第4部会員（生物科学）から「IGBP（地球圈・生物圏国際協同研究計画）」について、それぞれ意見の発表が行われた。

第14期活動計画

我が国の科学・技術は戦後目覚しい発展をとげ、経済の高度成長とともに、国民生活の向上に多大の貢献をしてきた。しかしながら、近年世界的規模での経済・社会環境や地球生態系の激しい変化を背景に、科学・技術の在り方に様々な問題が生じている。その中には、科学・技術と人間との係わり方の根源を問い合わせるものや、学問諸分野の再編成を求めるものも含まれている。また、国際社会における我が国の地位の向上も加わって、学術の面での我が国の貢献に対する国際的期待はますます強まっている。

日本学術会議は、創設以来、科学者や学術研究団体との連携の下に、その目的・職務の遂行に努力し、我が国の学術研究体制の整備についての重要な勧告等を行い、研究所の設立などを含めて数々の業績をあげてきた。また、国際協力事業への参加を始めとして、世界の学界と提携しつつ学術の進展に貢献してきた。しかしながら、創設後40年を迎えた現在、学術を取り巻く状況は、国際的にも国内的にも著しい変化を生じた。このような状況を踏まえて、第14期日本学術会議は、本会議の創設以来の基本的精神を引き継ぎ坚持しながら、なお一層の成果をあげるべく努力するものである。

日本学術会議は、我が国の学術に関する重要な事項を自主的に調査審議し、その実現を図る機関としての使命と役割を確認した上で、会員の科学的知見を結集し、時代の要請に即応しつつ将来を見通した基本的理念を確立し、我が国における学術研究の一層の推進を図るために、本会議の本来の目的を、次の視点から実現することが必要であると認識した。

人文・社会及び自然科学を網羅した日本学術会議は、全学問的視野に立ち、学術研究団体を基盤とする科学者の代表機関であることを認識して、全科学者の参加と意見の集約を真摯に図らなければならない。さらに、本会議が集約した科学者の意見が政策に反映するよう、他の学術関係諸機関と協議の上、その役割分担を明確にしつつ、これらとの連携の強化を図る必要がある。

また、学術研究団体を基盤とする日本学術会議は、関係ある学術研究団体等から推薦された科学者を中心として構成される研究連絡委員会の重要性を認識し、その活動を強化するとともに、学術研究団体の活動を助長し、研究基盤の強化を図り、高度化する学術の発展に貢献する必要がある。

我が国の科学者を内外に代表する機関である日本学術会

議は、国際社会における我が国の地位の向上と海外諸国との期待にこたえて、学術の分野における国際協力を飛躍的に拡大する必要がある。

日本学術会議は、真理を探究するという理念に立脚し、社会に開かれた学術の在り方と国際性を重視し、その健全な発展を図るために、学問・思想の自由の尊重と研究の創意への十分な配慮の下に、長期的かつ大所高所の視点に立ち、創造性豊かな研究を発展させることが必要である。

日本学術会議は、以上の諸点を踏まえ、科学者の総意を代表してその精神を高揚し、21世紀に向けて学術体制及び研究・開発の望ましい在り方を検討して、我が国の学術政策に指針を与えることにより、国民の期待にこたえるとともに、人類の福祉と世界の平和に貢献することを期するものである。

1. 重点目標

第14期活動計画の重点目標は、次のとおりとする。

(1) 人類の福祉・平和及び自然との係わりを重視する学術の振興

科学・技術の著しい発展は、人間生活を豊かにするとともに、現代社会の高度な複雑化とあいまって、人間社会に新たな緊張をもたらし、人類の福祉・平和及び自然環境を脅かすのではないかとの疑念を招いている。人類の福祉・平和及び自然との係わりについて十分に配慮しつつ、学術の総合的振興を図ることは、21世紀へ向けての極めて重要な課題である。これは、人文・社会及び自然科学を網羅した本会議の特長を十分に発揮してこそ可能となるものである。学術の振興と発展の人間、社会及び自然への望ましい貢献、好ましくない影響の防止について具体的構想を樹立し、あわせてこれに対応する社会の体制整備に明確な指針を提示する。

なおまた、今日の社会的現実が提起している複雑な問題を解決するには、既成の個別的研究領域のみでは十分に対応し得ない。直接に関係する研究だけでなく、広く諸科学が積極的に関与すべきであることを十分に考慮し、多くの研究領域が、その独自性を保ち一層の深化を図るとともに、共同の努力を行い、研究の内容、学問体系の変革にまで進むことによって、総合的な研究の在り方を追求することが必要である。

(2) 基礎研究の推進と諸科学の整合的発展

学術の発展には、基礎研究の推進が不可欠であることは言をまたない。我が国の学術の国際的地位の確立を目指し、その発展に向けた長期展望・将来計画を策定するための基盤となる基礎研究の推進に、積極的に取り組む必要がある。

また、学術の領域は広範多岐であり、それぞれの領域ごとに方法論も異なり、研究者の求めるものに大きな違いがあることを十分に考慮し、それぞれの研究者の声を聞き、それに適した育成策を講ずる必要がある。それと同時に、学術研究の動向を考慮し、いわゆる学際領域や学問の総合化に留意しつつ、諸科学の整合的発展を図ることが重要である。

以上ため、第13期においては、学術研究動向に関する調査研究を行い、我が国の学術水準の国際比較やその発展を阻害する諸因子などを指摘した。今期においては、この調査結果を検討しつつ、これを基礎にして、創造性の基礎となる個人の着想を重視し、革新的研究の強化等を積極的に図るとともに、一方においては、学術研究体制や社会・産業構造等に内在する創造性を阻む負の要因の解消に向けての建設的提言を行

うなど、学術の向上発達のための具体的方策を審議提言していくことが必要である。

(3) 国際関係の重視と国際的寄与の拡大

学術研究は、本来、真理の探究を目指す知的活動であり、その成果は広く人類共通の資産として共有されてきた。そのことから、学術の国際交流は、学術研究にとって内在的な要請であり、その在り方に常に関心を払う必要があることは言うまでもない。

一方で、我が国の国際的地位の向上に伴い、その学術研究が国際的貢献を果たすことに対する要請は、一層強まってきている。特に国際平和の推進や環境問題の解決等、いわゆる地球的あるいは国際的規模の課題について、我が国の研究を充実させつつ、全世界の科学者との協力を拡大することへの要請が増大してきている。

国際的あるいは二国間の共同研究、技術協力、技術移転等の在り方は、各国の政治、経済、社会に重大な影響を及ぼす。偏ったナショナリズムの立場を排しつつ、学術の健全な発展を促進するための国際的コンセンサスの追求に我が国も努力をするとともに、相互協力と相互依存の下の国際社会に対応していくために開かれた我が国自体の学術研究体制の整備が求められている。

以上のような状況から、本会議が築いてきた国際学術交流・協力の在り方についての諸原則と実績を踏まえつつ、学術の国際交流・協力の飛躍的な拡充強化を図り、国際的寄与を格段に拡大することが極めて重要である。

2. 具体的課題（要旨）

次の課題を選定した。

- (1) 科学者の倫理と社会的責任
- (2) 学術研究の長期的展望
- (3) 研究者の養成
- (4) 研究基盤の強化と研究の活性化
- (5) 学術情報・資料の整備
- (6) 学術研究の国際交流・協力の飛躍的拡大
- (7) 國際対応への積極的取組み
- (8) 平和及び国際摩擦
- (9) 人間の科学
- (10) 医療技術と社会
- (11) 生命科学と生命工学
- (12) 農業・農村問題
- (13) 資源・エネルギー問題
- (14) 人間活動と地球環境
- (15) 高度技術化社会

3. 具体的課題への対処及び臨時（特別）委員会設置の基本方針等（省略）

◆今回の総会決定により設置された特別委員会◆

- ・ 平和及び国際摩擦に関する特別委員会
- ・ 医療技術と社会に関する特別委員会
- ・ 生命科学と生命工学特別委員会
- ・ 農業・農村問題特別委員会
- ・ 資源・エネルギー問題特別委員会
- ・ 人間活動と地球環境に関する特別委員会
- ・ 高度技術化社会特別委員会

御意見・お問い合わせ等がありましたら下記までお寄せください。

〒106 港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話 03(403) 6291

日本学術会議だより

No.12

第14期特別委員会の活動始まる

平成元年2月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議では、昨年の10月の総会において設置された第14期の各特別委員会が活動を始めましたが、今回の日本学術会議だよりでは、これらの特別委員会に加えて、本会議が行っている国際的活動等についてお知らせいたします。

第14期の特別委員会

昨年10月の第106回総会で決定された、日本学術会議の第14期活動計画では、活動の重点目標として、①人類の福祉・平和及び自然との係わりを重視する学術の振興、②基礎研究の推進と諸科学の整合的発展、③国際関係の重視と国際的寄与の拡大、の3本の柱を掲げるとともに、これらの重点目標を踏まえて、多方面の科学者によって構成される日本学術会議にふさわしく各分野にわたって広く対応し、かつ、第14期中に適切な形で報告・提言に取りまとめるべき具体的課題として15の課題を選定している。

この度設置された7つの特別委員会は、上記の具体的課題のうち、従来から常設されている6つの常設委員会（別掲参照）で取り扱うものを除き、かつ、緊急に調査審議を行う必要のある7課題に対応するものである。

各特別委員会の名称及び任務等は次のとおりである。

◆平和及び国際摩擦に関する特別委員会

委員長：川田 侃（第2部会員）

（任務）国際的視野と我が国が置かれている地域的状況や特性を踏まえて、国際摩擦（文化的・政治経済的・技術的等）の解決と平和に関する総合的な研究の推進の在り方やその体制等について検討する。

◆医療技術と社会に関する特別委員会

委員長：水越 治（第7部会員）

（任務）医療技術の急速な進展は、自然科学の分野だけでなく、人文・社会科学の領域にも種々の問題を提起している。様々な医療技術に係わる社会的側面を総合的に検討する。

◆生命科学と生命工学特別委員会

委員長：井上英二（第7部会員）

（任務）生命科学と生命工学の推進方策を検討するとともに、これらの急速な進歩を踏まえ、それらと人間・社会及び自然との係わりについても総合的に検討する。

◆農業・農村問題特別委員会

委員長：水間 豊（第6部会員）

（任務）農業・農村のもつ食糧生産や環境保全等の多面的機能について、近年の国際的・国内的状況を踏まえつつ、文化・経済・自然・都市との係わりで

幅広く検討する。

◆資源・エネルギー問題特別委員会

委員長：上之園親佐（第5部会員）

（任務）資源・エネルギーの開発と利用の問題を検討する。それに伴う自然及び人間社会への好ましくない影響を防止するという観点からも問題を検討する。

◆人間活動と地球環境に関する特別委員会

委員長：吉野正敏（第4部会員）

（任務）近年、経済社会活動の拡大等を背景に、人間活動が環境に及ぼす影響が地球的規模で広がっており、深刻化する可能性を強めている。このような状況を踏まえ、人間活動と地球環境の問題等を検討する。

◆高度技術化社会特別委員会

委員長：佐藤 豪（第5部会員）

（任務）エレクトロニクス、メカニクス等の技術の発展・普及が社会に及ぼす影響、社会の情報化・技術化と人間との調和等について検討する。また、巨大な技術システムとヒューマン・ファクターとの関連についても安全確保と人間性確保の立場から検討する。

これらの各特別委員会は、発足以来現在までに各々2～3回の会議を開催するとともに、委員会によっては、シンポジウムやヒヤリングを実施して、それぞれの任務に沿った具体的な審議課題や今後の審議計画等について熱心に審議を進めている。今後の審議の成果が大いに期待されるところであり、今後、審議成果が発表され次第、紹介していく予定である。

なお、以上の7つの特別委員会のほかに、先般の総会の申合せにより、本年の4月総会において、人間の科学特別委員会（仮称）を追加設置する予定である。この「人間の科学」については、その具体的検討方法が複雑であるので、あらかじめ若干の整理を行った後に、特別委員会を発足させることにしたものであり、現在、検討会を設置して問題点の整理を行っているところである。

常置委員会

日本学術会議は、別掲の特別委員会のほかに、6つの常置委員会を設置している。各常置委員会は、本会議の目的及び職務・権限に即して、恒常に調査・審議を進めていく必要がある事項について、個々の委員会の職務を明確にした上で設置されている。各常置委員会の名称と任務等は、次のとおりである。

●第1常置委員会（委員長：大石泰彦（副会長・第3部会員））

（任務）研究連絡委員会活動活性化の方策及び日本学術会議の組織等に関することを審議する。

●第2常置委員会（委員長：星野安三郎（第2部会員））

（任務）学問・思想の自由並びに科学者の倫理と社会的責任及び地位の向上に関する事を審議する。

●第3常置委員会（委員長：渡邊富士夫（第7部会員））

（任務）学術の動向の現状分析及び学術の発展の長期的動向に関する事を審議する。

●第4常置委員会（委員長：樋口敬二（第4部会員））

（任務）創造的研究醸成のための学術体制に関する事項及び学術関係諸機関との連携に関する事を審議する。

●第5常置委員会（委員長：市川惇信（第5部会員））

（任務）学術情報・資料に関する事を審議する。

●第6常置委員会（委員長：染谷恭次郎（第3部会員））

（任務）国際学術交流・協力に関する事を審議する。

これらの常置委員会は、昨年7月、第14期発足の際に、委員を決定するとともに、役員を選出して、直ちに活動を開始した。各常置委員会は、上記のそれぞれの任務に従い、また、前期からの委員会ごとの申送りを尊重しつつ、さらに、第14期の全体の活動計画に沿いながら、第14期の活動方針及び活動計画をたて、それに基づき銳意活動を進めている。

これらの常置委員会は、第13期には、勧告、要望あるいは見解等をとりまとめるなど多くの成果をあげたが、第14期の活動も注目されるところである。

平成元年(1989年)度共同主催国際会議

世界の代表的な科学者が一堂に会し、最新の研究情報を交換する学術関係の国際会議が、我が国でも数多く開催されている。日本学術会議では、これらのうち、毎年おおむね4件について関係学・協会と共同主催している。平成元年(1989年)度には、次の4国際会議を開催する。

■第14回高エネルギー加速器国際会議

- ・開催期間：平成元年8月21日～26日
- ・開催場所：学園センタービル等（つくば市）
- ・参加者数：国外300人、国内250人、計550人
- ・共催団体：（社）日本物理学会

■第40回国際電気化学会

- ・開催期間：平成元年9月17日～22日
- ・開催場所：国立京都国際会館（京都市）
- ・参加者数：国外200人、国内350人、計550人
- ・共催団体：（社）電気化学会

■第7回国際人工臓器学会世界会議

- ・開催期間：平成元年10月1日～4日
- ・開催場所：京王プラザホテル（札幌市）
- ・参加者数：国外300人、国内700人、計1,000人
- ・共催団体：日本人工臓器学会

■第9回結晶成長国際会議

- ・開催期間：平成元年8月20日～25日
- ・開催場所：ホテル仙台プラザ（仙台市）
- ・参加者数：国外300人、国内600人、計900人
- ・共催団体：日本結晶成長学会、（社）応用物理学会

二国間学術交流事業

日本学術会議では、二国間学術交流事業として、毎年2か国を選んで代表団を派遣している。その目的は、「諸外国における学術研究の動向及び現状を把握するとともに、学術研究に関する基本的、全般的な事項について相手国科学者等と意見を交換することにより、我が国の学術の整合的な発展に寄与する。」ことにある。

この事業は、昭和58年度から実施されており、これまでにアメリカ、マレーシア、西ドイツ、インドネシア、スウェーデン、タイ、フランス、大韓民国、連合王国、シンガポールの10か国に代表団を派遣してきた。

昭和63年度は、10月29日から11月7日まで、チェコスロバキア及びポーランドへ、会長以下6名の会員から成る代表団を、また11月27日から12月4日まで、カナダへ、会長以下5名の会員から成る代表団をそれぞれ派遣した。

各代表団は、訪問国において、科学技術政策や教育を担当する行政機関、研究所、大学等を訪れ、関係者との間で学術関係の情報交換を行うとともに、両国の学術研究の問題点等について意見交換を行った。

チェコスロバキア及びポーランドでは、本会議としては初めての社会主義国との訪問であり、各訪問先で、今回の本会議代表団の訪問はこれら2か国それぞれとの間の学術交流について新しい段階を開く契機となり、非常に意義深いものであることが強調されるとともに、政治・社会体制を超えた学術交流の在り方等について、熱心に意見交換が行われた。

カナダでは、各訪問先で、近年の我が国の産業の発展と科学技術の役割の観点から、本会議の役割と活動を含め、我が国の学術体制に関する質問が多く出されるとともに、両国間の今後より積極的な学術交流・協力をめぐって活発に意見交換が行われた。

今回の成果は、代表団訪問時だけのものではなく、本会議と訪問国関係諸機関との今後の継続的な交流への発展、相互理解の促進・緊密化等の形で現れてくるものであり、我が国の学術研究の国際交流・協力の進展に大きく役立つものと期待される。

「熱工学の研究動向と熱技術の進展」の刊行

本書は、本会議の熱工学研究連絡委員会が、関係学協会の協力の基に刊行した「熱工学白書」ともいべきものです。〔1冊1,000円（送料200円）〕

※本書は、〔財〕日本学術協力財團で取り扱っています。

第2・第4土曜日閉庁のお知らせ

「行政機関の休日に関する法律」の施行に伴い、日本学術会議事務局では、本年1月から毎月第2・第4土曜日が休みとなります。御理解、御協力をお願いいたします。

御意見・お問い合わせ等がありましたら下記までお寄せください。

〒106 港区六本木7-22-34
日本学術会議広報委員会 電話03(403)6291

付記

日本環境変異原学会入会申込書

平成 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

フリガナ		
氏名	印	
ローマ字つづり		
生年月日、性別	年 月 日	男 女

所属機関 部局 職名	(和)	
	(英)	
所属機関 所在地	〒	電話
	(和)	
	(英)	
自宅 住所	〒	電話
	(和)	
	(英)	
会誌送付先 ① 所属機関 ② 自宅		

学	学部	学部学校名	卒業年次		年
歴	大学院	課程学校名	修了年次		年
学位					取得年年
研究領域 (下記にあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)					
1. 変異原 2. 検出系 3. 毒性 4. 発生異常 5. 汚染 6. 疫学 7. 遺伝 8. がん 9. 微生物 10. 高等動物 11. 高等植物 12. 食品 13. 気体・粉じん 14. 医薬品 15. 農薬 16. 代謝 17. 分子機構 18. その他()					
研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)					
加入学会名 (本学会以外の)					
推薦者 (日本環境変異原学会評議員)					
氏名 (署名) 印					
入会申込者との関係 (数行ご記入ください)					

日本環境変異原学会奨励賞受賞者

- 第1回 昭和54年度
長尾美奈子 「食品の変異因子に関する研究」
- 第2回 昭和55年度
石館 基 「環境変異原及び癌原物質の染色体異常によるスクリーニング」
常盤 寛 「大気中の変異原性汚染物質の実態と研究」
- 第3回 昭和56年度
賀田 恒夫 「環境変異原検出に関する Rec-assay の開発とその応用」
- 第4回 昭和57年度
松島泰次郎 「変異原性検出による化学物質の発癌性評価についての研究」
早津 彦哉 「環境中の変異原物質の作用機序に関する化学的研究」
- 第5回 昭和58年度
葛西 宏 「加熱食品中の強力な変異原イミダゾキノリンおよびイミダゾキノキサリンの発見」
- 第6回 昭和59年度
大西 克成 「環境中のニトロピレン類の検出及び代謝に関する研究」
- 第7回 昭和60年度
若林 敬二 「食品中の新しい変異原前駆物質の研究」
- 第8回 昭和61年度
林 真 「in vivo 小核試験法の基礎と応用に関する研究」
森本 兼彌 「ヒト末梢リンパ球における姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発に関する研究」
- 第9回 昭和62年度
梁 治子 「ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究」
藤川 和男 「ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究」
- 第10回 昭和63年度
土川 清 「マウス・スポットテスト系の確立」
降旗 千恵 「環境変異原・癌原物質の in vivo 短期評価法の開発と応用」
山添 康 「環境変異原の酵素的活性化機構の研究」

環境変異原研究 第11巻 第1号 1989年
平成元年10月15日 発行
発行者 日本環境変異原学会
編集責任者 長尾美奈子
国立がんセンター研究所発がん研究部
〒104 東京都中央区築地5丁目1番1号
TEL 03-542-2511
印刷所 学術企画印刷株式会社
〒112 東京都文京区小石川2-5-12
TEL 03-815-4841

ISSN 0910-0865