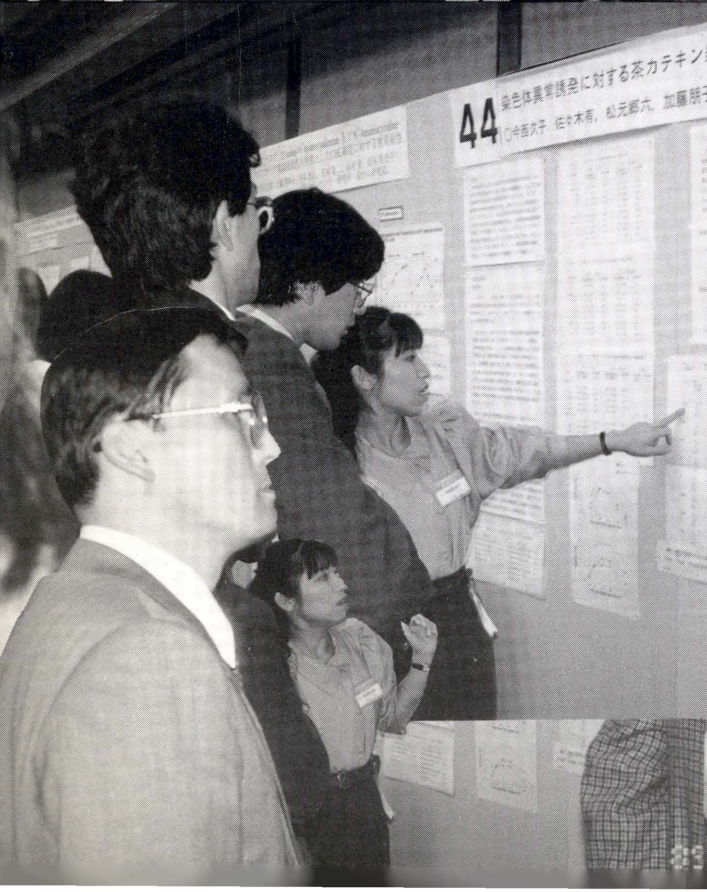


# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

Vol.12 No.1 1990







# 環境変異原研究

第 12 卷 第 1 号 1990 年

## 目 次

日本環境変異原学会第 18 回大会

### 特別講演記念論文

- Environmental Mutagens and Risk Assessment  
Joellen Lewtas, Jane E. Gallagher, David M. DeMarini..... 1

### 平成元年度学会奨励賞受賞者論文

- 哺乳動物試験に影響を及ぼす要因の解析とその協力研究の推進 祖父尼俊雄..... 11  
ポルフィリン類による多環性化合物の変異原活性阻害の研究 有元佐賀恵..... 23

### シンポジウム「環境変異原の検出・曝露評価の現状と問題点」

- Development of Sensitive Determination Methods for  
Environmental Contaminants  
Masatoshi Morita, Hiroyasu Ito, Yasuyuki Shibata..... 35  
ブルーレーヨンを用いた河川水の変異原性モニタリング法  
——淀川水系中の変異原物質について—— 阪本 博, 早津 彦哉..... 41  
空気中の変異原の曝露評価 ——計測法を中心に—— 松下 秀鶴..... 47

### ワークショップ「新しい環境変異原の研究手法」

- 遺伝子工学的手法を用いた新しいサルモネラ指標菌株の開発  
能美健彦, 渡辺雅彦, Pirkko Einistö, 松岡厚子, 祖父尼俊雄, 石館 基..... 51  
遺伝子工学的手法を用いた新しいサルモネラ指標菌株の開発と応用  
——Microsuspension 法及び Spiral assay 法への応用—— 後藤 純雄..... 67  
In vitro 小核試験 鈴木 勇司..... 75  
ガス・蒸気曝露による変異原性試験法 松島泰次郎..... 89

### 日本学術会議だより

### 付記

- 日本環境変異原学会 会 則  
" 役 員 名 簿  
" 評 議 員 名 簿  
" 入会申し込み書



特別講演念記論文

## Environmental Mutagens and Risk Assessment

Joellen Lewtas, J. E. Gallagher, D. M. DeMarini

### Abstract

Recognition that most human exposures to environmental chemicals occur as complex mixtures has stimulated research and the development of new methods to assess exposure, dosimetry, and genotoxic effects. Risk assessment of environmental mixtures relies on data for either individual chemicals present in the mixture, the whole mixture, or fractions thereof. In the case of very complex mixtures, it is nearly impossible to quantitate all of the constituent chemicals, the potential for human exposure, dose, and how these factors effect risk assessment. New genetic and molecular methods are being applied to each aspect of research to develop new methods for the assessment of cancer risk from human exposure to complex mixtures. Short-term genetic bioassay methods utilizing new engineered bacterial strains are being used to assess total human exposure to mutagens in the environment. New DNA adduct methods are being used in exposure-dosimetry studies of complex mixtures in humans and in experimental systems. Finally, new advances in sequencing the genetic mutations induced by environmental mutagens will improve our understanding of the relationship between DNA adducts, DNA damage and repair, mutation induction, and tumor initiation.

Combustion emissions represent one of the most extensively studied complex environmental exposures in humans, animals, and short-term genetic bioassays. We have developed a comparative potency method for cancer risk assessment of combustion and related emissions using human lung cancer data for populations exposed to these mixtures. The constant relative potency hypothesis invoked in this method is being tested using new human, animal, and short-term bioassay data. New molecular and genetic methods are now being applied to studies of air pollution in the U.S., Japan and China, in integrated multidisciplinary studies of human exposure, and in evaluating potential cancer risk.

**Key words:** risk assessment, environmental mutagens, complex mixtures, mutagenesis, cancer, air pollution, combustion emissions, source apportionment, DNA adducts

### 1. Introduction

The recognition that most human exposure to environmental chemicals occurs as exposures to complex mixtures has stimulated research on the toxicology of complex mixtures (NRC, 1988). Integrated multidisciplinary studies are now beginning to assess human exposure, dosimetry, and cancer risk to complex mixtures of pollutants and to apportion the human exposure and risk to various sources. Strategies that hold promise for incorporation of genetic bioassay data in the risk assessment of complex mixtures include 1) biomonitoring environmental levels, fate,

transformation and human exposure; 2) characterization of the genotoxic components of complex mixtures using advanced chemical and bioassay methods; 3) molecular dosimetry of complex mixtures, and 4) mechanistic studies of the effects of complex mixtures induced by both genetic and nongenetic mechanisms. Important advances in understanding the genetic and carcinogenic effects of complex environmental mixtures will increasingly rely on the successful implementation of interdisciplinary strategies, including state-of-the-art genetic and molecular methodologies.

MD 68, Genetic Toxicology Division, Health Effects Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC 27711, U.S.A.



## TWO - STAGE CANCER MODEL

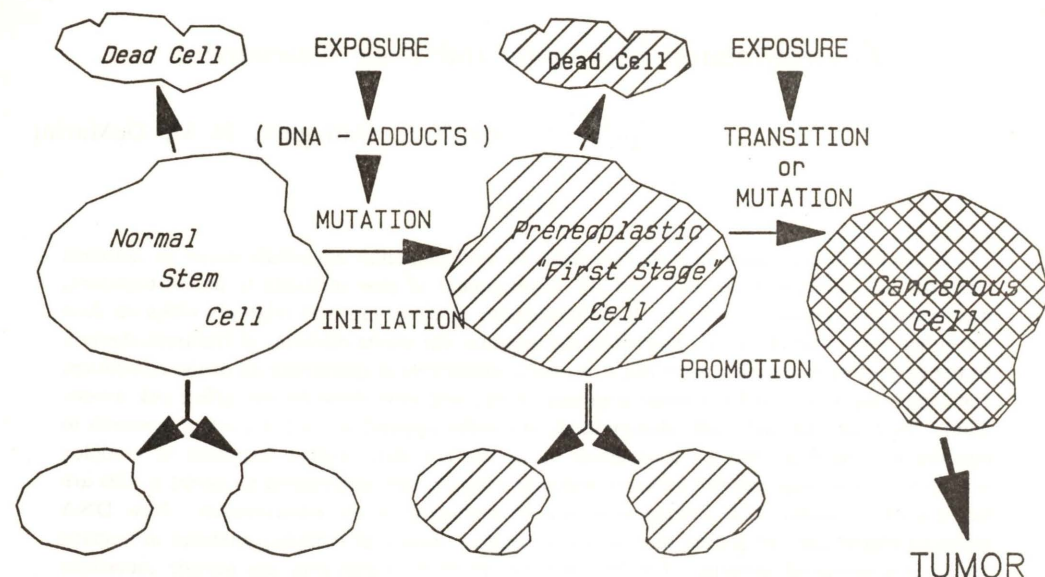


Fig. 1. The two-stage cancer model illustrating the relationship between exposure, DNA adduct formation and mutation which is proposed to induce the first transition from a normal stem cell to a preneoplastic "first stage" cell. The second transition to a cancerous cell may require additional exposure, cell proliferation, and/or a second mutation.

### 2. Risk Assessment

Assessment of human risk from exposure to environmental mutagens may focus on cancer, deleterious heritable mutations, or other adverse human health effects that could result from exposure to mutagens. Cancer risk assessment is the most thoroughly developed of the possible types of risk assessment. Initially, cancer risk assessment was a qualitative procedure, exemplified by the IARC monograph series (IARC, 1977-1989), which uses a weight of evidence approach to the classification of chemicals or mixtures into categories. Human, animal, and other experimental data, particularly short-term tests for genotoxic activity, are considered in establishing first the strength of evidence that the agents are carcinogenic. The extent of carcinogenic activity (e.g. potency) and the mechanism of cancer induction is not generally factored into this evaluation. After evaluating the strength of evidence for carcinogenicity in humans and animals and sum-

marizing the genetic activity data in short-term tests, an overall evaluation of the total body of evidence is taken into account in categorizing the agents into one of several groups: 1, 2A, 2B, 3, and 4. Group 1 carcinogens are those where there is sufficient evidence that an agent is a human carcinogen. Group 2A (probably carcinogenic to humans) and Group 2B (possibly carcinogenic in humans) rely more heavily on the evidence in animals together with supporting evidence of genotoxic activity in short term tests.

Quantitative cancer risk assessment as developed and applied by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) in the 1980's (Anderson *et al.*, 1983) was based on a methodology developed by Crump (1981) to estimate cancer risk from chronic animal experiments. This approach is referred to as the linearized multistage model and is widely used to establish upper bounds on suspected cancer risk. One of the important deficiencies of this model is that it is not derived from

an underlying biological theory of cancer induction and does not take into account agent-induced stimulation of cell proliferation.

A two-stage model of carcinogenesis proposed by Armitage and Doll (1957) was based on the biological evidence that stem cells are transformed into premalignant cells. They proposed that these premalignant cells divide at a constant rate, producing an exponential growth of preneoplastic clones. A preneoplastic cell is then transformed into a cancer cell, which may ultimately develop into a tumor. More recently, Moolgavkar and Knudson (1981) have proposed a mathematical model that is based on the biological evidence linking mutation induction and tumor formation as depicted in Fig. 1. This model assumes that the first critical event in a series of steps that can lead to cancer is the induction of a mutation in the DNA of a normal stem cell, resulting a preneoplastic cell. The second critical step is the transformation of a preneoplastic cell into a malignant cancer cell. Thorslund *et al.* (1987) in reviewing the biologically based cancer risk models point out the many advantages of the two-stage cancer model for risk assessment. Importantly, the parameters in the model are interpretable in biological terms and may potentially be estimated from experimental cellular data including mutation and cell transformation data. Cell proliferation and cellular toxicity (death) data may also be incorporated into this model.

### 3. Predicting Cancer Risk Using Short-Term Bioassays

One important issue for genetic toxicologists in applying these strategies is the issue of predictability. Evidence has accumulated since the 1960's to support the theory that electrophilic chemicals react covalently with nucleophilic centers in DNA and subsequently induce mutations. Extensive studies by the Millers (1971) showed that these electrophilic chemical mutagens were also animal carcinogens. The basis for using short-term genetic bioassays to detect carcinogens is the theory that electrophilic chemicals covalently binding or reacting with DNA will result in the induction of mutations that subsequently

serve as the initiating event in the induction of cancer. Studies of hundreds of chemicals in the 1970's demonstrated a high correlation between mutagenicity in bacteria and carcinogenicity in animals (McCann *et al.*, 1975; Bartch, 1976; Sugimura *et al.*, 1976).

Despite a preponderance of evidence for the utility of genetic bioassays in detecting potential carcinogens, a recent report on 73 chemicals tested in both animal cancer bioassays and short-term tests for genetic toxicity by Tennant *et al.* (1987) has called into question the predictability of genetic bioassays. This study and the many papers published in response to these questions (Ashby and Tennant, 1988; Brockman and DeMarini, 1988) have been evaluated by DeMarini *et al.* (1989) in the context of the utility of genetic bioassays for the evaluation of complex mixtures. Issues that pertain to the utility of short-term genetic bioassays include 1) concordance between carcinogenicity results in rats and mice and the concordance between these rodents and short-term genetic bioassays (Brockman and DeMarini, 1988); 2) influence of chemical class on the sensitivity and specificity of genetic bioassays (Claxton *et al.*, 1988); and 3) genotoxic and nongenotoxic carcinogens (Ashby, 1988).

We cannot expect bioassays that detect, by definition, genotoxic agents to detect agents that may induce cancer by a mechanism that does not involve interaction with DNA, mutation induction, or other genetic effects. This issue of the predictability of genetic bioassays needs to be kept in mind when considering the nature of the complex mixture under study and the specific questions being addressed in the research.

### 4. Assessment of Exposure to Mutagens Using Biomonitoring

The development of short-term genetic bioassays in the mid-1970's led rapidly to the use of these assays in environmental monitoring. The essential elements of these bioassays that facilitates their application to environmental monitoring is their simplicity, rapidity, low cost, and small sample size requirements. The genetic bioassay used most widely has been the *Salmonella typhi-*



murium plate-incorporation assay described by Bruce Ames in 1975 (Ames *et al.*, 1975) and initially validated as a bioassay to screen for carcinogens (McCann *et al.*, 1975). This bioassay was rapidly adopted across the world and applied to environmental studies of complex mixtures. In air and water pollution monitoring studies, this bioassay was used to detect and quantitate the mutagenic activity associated with environmental pollutants (Lewtas, 1990).

The relatively small sample mass requirements (milligram quantities) was one of the important attributes that facilitated application of bacterial mutation assays to environmental monitoring. Recent advances in personal exposure monitoring have resulted in the need for assay methods that could be applied to even smaller, microgram, quantities of environmental samples (Lewtas, 1989; Lewtas *et al.*, 1990). Microsuspension bacterial mutation assays have been developed to meet these needs through simple modifications of the *Salmonella typhimurium* preincubation assay by reducing the assay volume by 10–100 fold (Kado *et al.*, 1983; Lewtas *et al.*, 1990). These microsuspension assays have utilized new engineered bacterial strains in human exposure monitoring, indoor air pollution monitoring and in monitoring trends in air pollution over relatively short time periods (Lewtas *et al.*, 1987; Matsushita *et al.*, 1990; Lewtas, 1990).

Biomonitoring of ambient air using bacterial mutation assays is being used for the first time in source apportionment studies to determine which emission sources are the major contributors to the mutagenic activity of ambient air (Lewis *et al.*, 1988). Source apportionment uses a combination of mathematical and analytical procedures to determine the contribution of specific emission sources to the whole mixture and has been applied most extensively in air pollution studies. Two different methods have been used to apportion the contributions of source emissions to ambient air quality: source dispersion modeling, which relies on monitoring source emissions, and modeling ambient dispersion and receptor modeling, which relies on ambient monitoring and source tracer

species (Gordon, 1988).

The receptor-modeling approach to source apportionment has been combined with biomonitoring and is being employed in the U.S. Environmental Protection Agency's Integrated Air Cancer Project (Lewis *et al.*, 1988; Lewtas, 1989). This approach has been shown to be effective in apportioning the mutagenicity in a simple airshed with mobile sources and woodstove emissions. In this case, the number of sources is small and well characterized with respect to tracer chemicals. In addition, emissions from mobile sources and wood burning contain unique elemental tracers that improve the accuracy of the source apportionment calculations. The unique feature in these recent receptor modeling studies is that mutagenicity data from biomonitoring is being used directly in the model together with elemental tracers (e.g., K and Pb). This has made possible the direct apportionment of mutagenic activity in the woodstove-impacted airsheds. Future field studies are in progress to extend this methodology to more complex airsheds.

#### 5. Molecular Dosimetry of Environmental Mutagens

Highly sensitive methods are now being used to measure protein and DNA adducts that may result from exposures to environmental pollutants. Several combustion emissions constituents, including polycyclic aromatic hydrocarbons (e.g., benzo(a)pyrene) and nitrogen-containing aromatic compounds (e.g., nitrosamines, and 4-aminobiphenyl), can be detected either as protein or DNA adducts (Harris, 1985). The postlabeling assay for DNA adducts is particularly applicable to complex mixtures because the assay does not depend upon prior identification of the specific chemicals in the mixture that may result in the formation of adducts (Randerath *et al.*, 1985).

Multiple DNA adducts have been detected in humans, animals or cells exposed to complex mixtures (Gallagher *et al.*, 1990; Lewtas and Gallagher, 1990; Perera *et al.*, 1990). This is consistent with bioassay-directed fractionation studies of complex mixtures that have shown the presence of many genotoxic com-

pounds and isomers in several chemical fractions (Schuetzle and Lewtas, 1986). A challenge for the future will be the separation and identification of specific adducts after exposures to the multiple chemicals present in complex mixtures. The level of DNA adducts detectable by postlabeling, 1 adduct in  $10^9$ – $10^{10}$  nucleotides, is far below the current detection limits for direct chemical identification of the adducts.

A number of methods are currently being explored to identify specific types of DNA adducts by selectively using enzymatic digestion methods to identify enzyme-sensitive adducts. We have used this approach to identify arylamine adducts that can form from either nitroaromatic compounds or aromatic amines (Gallagher *et al.*, 1989). Using this approach, Gallagher *et al.* (1990) have shown that the formation of specific nitroarene DNA adducts can be enriched through incubation of diesel particle extracts and xanthine oxidase with calf thymus DNA. These adducts have also been shown to be nuclease P1 sensitive. A second approach is to use DNA adduct standards in co-elution experiments to identify specific adduct regions. Adducts resulting from treatment with complex mixtures that migrate in the same chromatographic region as the major BaP adduct were quantitated in DNA isolated from skin and lung tissue of mice treated by a skin application protocol (Gallagher *et al.*, 1990). The complex mixtures were combustion-related emissions containing a known concentration of BaP. Future research will be aimed at resolving and identifying the nature and source of these adducts.

DNA adduct dosimetry studies using this postlabeling assay are being conducted simultaneously in comparative microbial mutagenesis and tumorigenesis assays of combustion emission and airborne particle extracts (Lewtas and Gallagher, 1990). Complex mixtures that are potent mutagens and tumor initiators form higher concentrations of adducts in DNA isolated from rodent skin and lung tissue than do those that are less potent (Gallagher, unpublished). These new dosimetry methods for complex mixtures may provide a critical data link between exposure

and dose in human, animal, and *in vitro* studies, further reducing the large uncertainties in current risk assessment methodologies.

#### 6. Mechanistic Studies of the Effects of Complex Mixtures Induced by Both Genetic and Non Genetic Mechanisms

The predictability of short-term genetic bioassays has become an issue (DeMarini *et al.*, 1989) that is critical to the application of these bioassays in the assessment of complex mixtures. It is becoming clear that bioassays that detect genetic effects (e.g., mutations, DNA damage, chromosomal effects) will not be able to predict the potential carcinogenicity of chemicals or mixtures that induce cancer through a non genetic mechanism (e.g., induction of hormones, viruses, etc.). Certain classes of chemicals, particularly chlorinated hydrocarbons, are often not detected as gene mutagens (Claxton *et al.*, 1988). Recently, DeMarini and coworkers (DeMarini *et al.*, 1990; Houk and DeMarini, 1987) have reported that a number of the carcinogenic chlorinated pesticides and chlorophenols that are not mutagenic in *Salmonella* do induce prophage lambda in *E. coli*. The mechanism responsible for this phage induction may involve the formation of free-radicals by the quinone metabolites (DeMarini *et al.*, 1990). Free radicals are known to cause DNA strand breaks that are thought to result in prophage induction.

It is critical to have some knowledge of the nature of the chemicals present in a complex mixture or to evaluate an unknown mixture for toxicity and potential carcinogenicity by using a series of bioassays that detect a wide range of genetic and non genetic events. Often a battery of bioassays is selected to detect the same genetic events, albeit in different biological systems. Recent studies make it clear that it may be more important to select a battery of bioassays that detect different genetic and non genetic effects related to carcinogenesis when using these assays in a predictive role.

Recent advances in molecular methods using the polymerase chain reaction (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) have made it possible to rapidly amplify sections of genes to facilitate



the direct DNA sequencing of mutants. Several investigators are now sequencing the mutations occurring at the *hisD* gene in *Salmonella typhimurium* using this method (Bell *et al.*, 1989, 1990; Cubula and Koch, 1990; Fuscoe *et al.*, 1988). Bell *et al.* (1990) have recently determined the mutational spectra for 1-nitropyrene-induced revertants of TA98 and spontaneous mutants. This approach is now being applied to understand the mutational spectra induced by complex mixtures (DeMarini, personal communication).

#### 7. Cancer Risk Assessment of Complex Mixtures of Environmental Mutagens: The Comparative Potency Method

One approach to risk assessment of complex mixtures is to analyze the mixture for the presence of compounds for which their are published cancer unit risks (human cancer potency values). The risk of the mixture is determined from a sum of a series of products of (concentration of each chemical)  $\times$  (human cancer potency) (US EPA, 1986). The additivity assumption is invoked when using this approach because there is generally not sufficient data available to factor in synergistic or antagonistic interactions. The disadvantage of this method is that it misses the identification and assessment of previously unidentified and potentially important carcinogens.

A more direct approach to the quantitative risk assessment of complex mixtures is to conduct experimental carcinogenesis and mutagenesis assays on the mixture itself (NRC, 1988). Combustion emissions represent one of the best studied complex environmental exposures in humans, animals, short-term genetic bioassays. In order to develop a comparative data base for risk assessment, mutagenesis and carcinogenesis bioassays have been used to evaluate complex mixtures of ambient air and combustion source particle extracts. A comparative potency method has been developed for cancer risk assessment based on a constant relative potency hypothesis using data from a battery of short-term mutagenesis bioassays and animal tumorigenicity studies evaluating

a series of diesel vehicle emissions (Albert *et al.*, 1983; Lewtas, 1985). The same bioassays have been used to evaluate complex emissions for which human lung cancer risk estimations are available from occupational and relatively high dose exposures (emissions from coke ovens, roofing tar pots, and cigarette smoke), thereby providing a comparative basis for estimating lung cancer risk from emissions for which human data are not available.

Recent studies have expanded the combustion emission data set for which comparative mutagenesis and carcinogenesis data are available to include gasoline vehicle emissions, coal, oil, and wood combustion (Lewtas, 1988). It has recently been possible to directly compare the cancer unit risk estimated for diesel emissions by the comparative potency method ( $2.6 \times 10^{-5}$  lifetime risk/microgram particle/ $m^3$ ) to the unit risk estimated by a lifetime carcinogenesis study of rats exposed to diesel exhaust ( $1.2 \times 10^{-5}$ ) (Albert and Chen, 1986). The two cancer unit risks are surprisingly similar, considering that the two methods used different diesel vehicles, different exposure routes, different bioassays, and different risk assessment models.

#### 8. Summary

Risk assessment of environmental mixtures relies on exposure, dosimetry, and health effects data for either individual chemicals present in the mixture, the whole mixture itself, or fractions of the mixture. In the case of very complex mixtures, it is impossible to quantitate all of the constituent chemicals and their human exposure, dose, and health effects for risk assessment. New genetic and molecular methods are being applied to each aspect of research and assessment of cancer risk resulting from exposure to complex mixtures. Short-term genetic bioassay methods utilizing newly engineered bacterial strains are being used to assess total human exposure to mutagens in the environment. New DNA adduct dosimetry methods are being applied to assess human exposure to complex mixtures. In addition, new advances in sequencing the genetic mutations induced by environmental mutagens will im-

prove our understanding of the relationship between DNA adducts, DNA damage and repair, mutation induction, and tumor initiation. New research on the molecular mechanisms involved in cell proliferation and the events critical to tumor progression also need to be incorporated to improve the risk assessment procedures for complex mixtures.

Studies of complex mixtures (e.g., soots and tars) in the early 1900's first employed the use of animal cancer bioassays. The development of short-term genetic bioassays has fostered emerging methodologies and new assessment strategies for complex mixtures. These new strategies are characterized by their multidisciplinary nature. Methodologies developed by engineers, chemists, physicists, and biologists have been integrated into new strategies. Strategies being pursued and developed as a part of the integrated studies provide new evidence on the sources and nature of airborne carcinogens. The use of bioassay methods in exposure and dosimetry assessment will provide direct data on human exposure to genotoxic carcinogens. Molecular methods are being developed to understand the mechanisms of cancer and mutation induction by mixtures.

**Disclaimer:** The research described in this paper has been reviewed by the Health Effects Research Laboratory, US Environmental Protection Agency and approved for publication. Approval does not signify that the contents necessarily reflect the views and policies of the Agency.

#### References

- Albert, R. E. and C. Chen (1986) U.S. EPA diesel studies on inhalation hazards. In: *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, N. Ishinishi, A. Koizumi, R. O. McClellan, and W. Stober, (Eds.), Elsevier Science Publishers, New York, 411-419.
- Ames, B. N., J. McCann, and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, **31**, 347-364.
- Anderson, E. L. and the Cancer Assessment Group of the U.S. Environmental Protection Agency (1983) Quantitative Approaches in Use to Assess Cancer Risk, *Risk Anal.*, **3**, 277-295.
- Ashby, J. (1988) The separate identities of genotoxic and non-genotoxic carcinogens, *Mutagenesis*, **3**, 365-366.
- Ashby, J. and R. W. Tennant (1988) Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents of the U.S. NCI/NTP, *Mutation Res.*, **204**, 17-115.
- Armitage, P. and R. Doll (1957) A Two-Stage Theory of Carcinogenesis in Relation to the Age Distribution of Human Cancer, *Br. J. Cancer*, **11**, 161-169.
- Bartsch, H. (1976) Predictive value of mutagenicity tests in chemical carcinogenesis, *Mutation Res.*, **38**, 177-190.
- Bell, D. A., J. E. Lee and D. M. DeMarini (1989) Use of polymerase chain reaction to amplify a segment of the *hisD3052* gene of *Salmonella typhimurium* for DNA sequence analysis, *Environ. Mol. Mutagen*, **14** (Suppl. 15), 18.
- Bell, D. A., J. G. Levine and D. M. DeMarini (1990) Rapid DNA sequence analysis of revertants of the *hisD3052* allele of *Salmonella typhimurium* TA98 using the polymerase chain reaction and direct sequencing: Application to 1-nitropyrene-induced revertants, *Mutation Res.*, (submitted).
- Brockman, H. E. and D. M. DeMarini (1988) Utility of short-term tests for genetic toxicity in the aftermath of the NTP's analysis of 73 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen*, **11**, 421-435.
- Cebula, T. A. and W. H. Koch (1990) Sequence analysis of *Salmonella typhimurium* revertants. In: *Proceedings of the Fifth International Conference on Environmental Mutagens*, M. L. Mendelsohn (Ed.), Elsevier, New York (in press).
- Claxton, L. D., A. G. Stead and D. Walsh (1988) An analysis by chemical class of *Salmonella* mutagenicity tests as predictors of animal carcinogenicity, *Mutation Res.*, **205**, 197-225.
- Crump, K. S. (1981) An Improved Procedure for Low-Dose Carcinogenic Risk Assessment from Animal Data, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **5**, 695-684.
- DeMarini, D. M., H. G. Brooks and D. G. Parkes (1990) Induction of prophage lambda by chlorophenols, *Environ. Mol. Mutagen*, **15**, 1-9.
- DeMarini, D. M., J. Lewtas and H. E. Brockman (1989) Utility of short-term tests for genetic toxicity, *Cell Biol. Toxicol.*, **5**, 189-200.
- Fuscoe, J. C., R. Wu, N. H. Shen, S. K. Healy and J. S. Felton (1988) Base-change analysis of revertants of the *hisD3052* allele in *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, **201**, 241-251.
- Gallagher, J. E., M. A. Jackson, M. H. George, J. Lewtas and I. Robertson (1989) Differences in detection of DNA adducts in the  $^{32}P$ -postlabeling



- assay after either 1-butanol extraction or nuclease P1 treatment, *Cancer Lett.*, **45**, 7-12.
- Gallagher, J. E., M. A. Jackson, M. H. George and J. Lewtas (1990) Dose related differences in DNA adduct levels in rodent tissues following skin application of complex mixtures from air pollution sources, *Carcinogenesis*, **11**, 63-68.
- Gallagher, J. E., M. J. Kohan, M. H. George, M. A. Jackson and J. Lewtas (1990) Validation/application of <sup>32</sup>P-postlabeling analysis for the detection of DNA adducts resulting from complex air pollution sources containing PAHs and nitrated PAHs, In: *Nitroarenes: Occurrence, Metabolism and Biological Impact*, P. Howard (Ed.), Plenum Press, New York, in press.
- Gordon, G. (1988) Receptor models, *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 1132-42.
- Harris, C. C. (1985) Future directions in the use of DNA adducts as internal dosimeters for monitoring human exposure to environmental mutagens and carcinogens, *Environ. Health Perspect.*, **62**, 185-191.
- Houk, V. S. and D. M. DeMarini (1987) Induction of prophage lambda by chlorinated pesticides, *Mutation Res.*, **182**, 193-201.
- IARC (1987) IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Volumes 1-42, Lyon 440pp.
- Kado, N. Y., D. Langley and E. Eisenstadt (1983) A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay: Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine, *Mutation Res.*, **121**, 25-32.
- Lewis, C. W., R. E. Baumgardner, L. D. Claxton, J. Lewtas and R. K. Stevens (1988) The contribution of woodsmoke and motor vehicle emissions to ambient aerosol mutagenicity, *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 968-971.
- Lewtas, J. (1985) Development of a comparative potency method for cancer risk assessment of complex mixtures using short-term *in vivo* and *in vitro* bioassays, *Toxicol. Indust. Health*, **1**, 193-203.
- Lewtas, J. (1988) Genotoxicity of complex mixtures: Strategies for the identification and comparative assessment of airborne mutagens and carcinogens from combustion sources, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **10**, 571-589.
- Lewtas, J. (1989) Emerging methodologies for assessment of complex mixtures: Application of bioassays in the Integrated Air Cancer Project, *Toxicol. Indust. Health*, **5**, 839-850.
- Lewtas, J. (1990) Environmental Monitoring using Genetic Bioassays In: *Genetic Toxicology: A Treatise*, A. P. Li and R. H. Heflich (Eds.), The Telford Press, Caldwell, NJ 07006 (in press).
- Lewtas, J. and J. Gallagher (1990) Complex mixtures of urban air pollutants: Identification and comparative assessment of mutagenic and tumorigenic chemicals and emission sources, In: *Experimental and Epidemiologic Applications to Risk Assessment of Complex Mixtures*, IARC/WHO, Lyon (in press).
- Lewtas, J., S. Goto, K. Williams, J. C. Chuang, B. A. Petersen and N. K. Wilson (1987) The mutagenicity of indoor air particles in a residential pilot field study, Application and evaluation of new methodologies, *Atmospheric Environment*, **21**, 443-449.
- Lewtas, J., L. Claxton, J. Mumford and G. Lofroth (1990) Bioassay of complex mixtures of indoor air pollutants, In: *Environmental Carcinogens- Methods of Analysis and Exposure Measurement*, V12, Indoor Air, International Agency for Research on Cancer, Lyon, in press.
- Matsushita, H., S. Goto and Y. Takagi (1990) Human exposure to airborne mutagens indoors and outdoors using mutagenesis and chemical analysis methods, In: *Genetic Toxicology of Complex Mixtures: Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures VI*, M. D. Waters, J. Lewtas, S. Nesnow, M. M. Moore and F. B. Daniel (Eds.), Plenum Press, New York, in press.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 5135-5139.
- Miller, E. C. and J. A. Miller (1971) The mutagenicity of chemical carcinogens: Correlations, problems and interpretations, In: *Hollaender, A. (Ed.), Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*, Vol. 1, New York, Plenum Press, pp. 83-94.
- Moolgavkar, S. H. and A. G. Knudson (1981) Mutation and Cancer: A Model for Human Carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 1037-1052.
- NRC (National Research Council) (1988) *Complex Mixtures*, National Academy Press, Washington, DC, pp227.
- Perera, F. P., R. Schulte, R. M. Santella and D. Brenner (1990) DNA adducts and related biomarkers in assessing the risk of complex mixtures, In: *Genetic Toxicology of Complex Mixtures: Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures VI*, M. D. Waters, J. Lewtas, S. Nesnow, M. M. Moore and F. B. Daniel (Eds.), Plenum Press, New York, in press.
- Randerath, K., E. Randerath, H. P. Agrawal, R. C. Gupta, E. Schurdak and M. V. Reddy (1985) Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis, *Environ. Health Perspect.*, **62**, 57-65.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, **239**, 487-491.
- Schuetzle, D. and J. Lewtas (1986) Bioassay-directed chemical analysis in environmental research, *Anal. Chem.*, **58**, 1060A-1075A.
- Sugimura, T., S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino, M. Takeuchi and T. Kawachi (1976) Overlapping of carcinogens and mutagens, In: P. N. Magee, S. Takayama, T. Sugimura, and T. Matsushima (Eds.), *Fundamentals of Cancer Prevention*, Baltimore, MD, University Park Press, pp. 191-213.
- Tennant, R. W., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger, J. K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, B. Anderson and R. Minor (1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays, *Science*, **236**, 933-941.
- Thorslund, T. W., C. C. Brown and G. Charnley (1987) Biologically Motivated Cancer Risk Models, *Risk Anal.*, **7**, 109-119.
- U. S. EPA (1986) Guidelines for the Health Risk Assessment of Chemical Mixtures, *Federal Register*, **51**(185), 34014-34025.



## 哺乳動物試験に影響を及ぼす要因の解析と その協力研究の推進

国立衛生試験所 変異遺伝部 祖父尼 俊 雄

### 1. はじめに

これまでに変異原性試験によって検討された化合物はかなり膨大な数にのぼるが、それらの中には同一化合物でありながら、異なる試験結果が報告されている例が多々みられる。これらについて試験方法を比較すると、使用生物(細胞)種(系統)や試験プロトコルなどが研究者によってかなり異なっており、これらの違いが試験結果に重大な影響を与えている可能性が考えられる。これらの要因は試験結果を評価する上で重要であるにもかかわらず、十分な吟味がなされていない傾向にある。特に、動物個体を用いる試験系では、比較的時間と労力を要することから、研究者個人で検討するのはなかなか困難な状況にある。そのため、多数の研究者が協力して、1つのテーマについて共同研究を行うことは、このような基礎的問題を検討する上で有効な方法である。このような目的のために、哺乳動物試験分科会(前身は哺乳動物試験系研究会)を発足させ、マウスを用いる小核試験を中心として共同研究を行ってきた。

これまでのところ、小核試験の共同研究では4つのテーマについて検討を行った。第1回目は性差について検討を行い、20の機関から44名が参加し、20の化合物について、1983年から1985年にわたって行った。その結果を Mutation Re-

search に 1986 年に発表した (CSGMT, 1986)。第2回目は系統差について、24 機関から 57 名が参加し、6 化合物について、1985 年から 1986 年にわたって行い、この結果は 1988 年に Mutation Research に発表した (CSGMT, 1988)。第3回目は投与経路について、34 機関から 81 名が参加し、17 化合物について、1986 年から 1988 年にかけて行い、同様に Mutation Research に 1989 年に発表した。この時は、サマリーレポート (Hayashi *et al.*, 1989) の他に 17 化合物について個別データを発表したのも、我々の共同研究だけで 1 冊の分冊となった。第4回目は投与回数について、33 機関から 81 名が参加し、11 化合物について、1988 年から 1989 年にかけて行い、この結果についても Mutation Research に投稿した (CSGMT, 1990)。以下に、これら共同研究の結果を要約するが、詳細なデータやそれぞれの問題点については個別の論文を参照されたい。

### 2. 性差

小核試験では一般に雄マウスを用いることが多いが、ヨーロッパのガイドラインなどでは雌雄を用いることが推奨されており、また小核誘発性に雌雄差があるとの報告もある (Henry *et al.*, 1980, Siou *et al.*, 1981)。そのため構造や作用機作の異

〒158 東京都並田谷区上用賀 1-18-1

Analysis of factors affecting mammalian mutagenicity tests and promotion of its collaborative studies

Toshio Sofuni

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan

略記号

2-AAF: 2-acetylaminofluorene, ARA-C: 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine, B(a)P: benzo(a)pyrene, DMBA: 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, EMS: ethyl methanesulfonate, ENU: N-ethyl-N-nitrosourea, 5-FU: 5-fluorouracil, MMS: methyl methanesulfonate, 6-MP: 6-mercaptopurine, MTX: methotrexate.



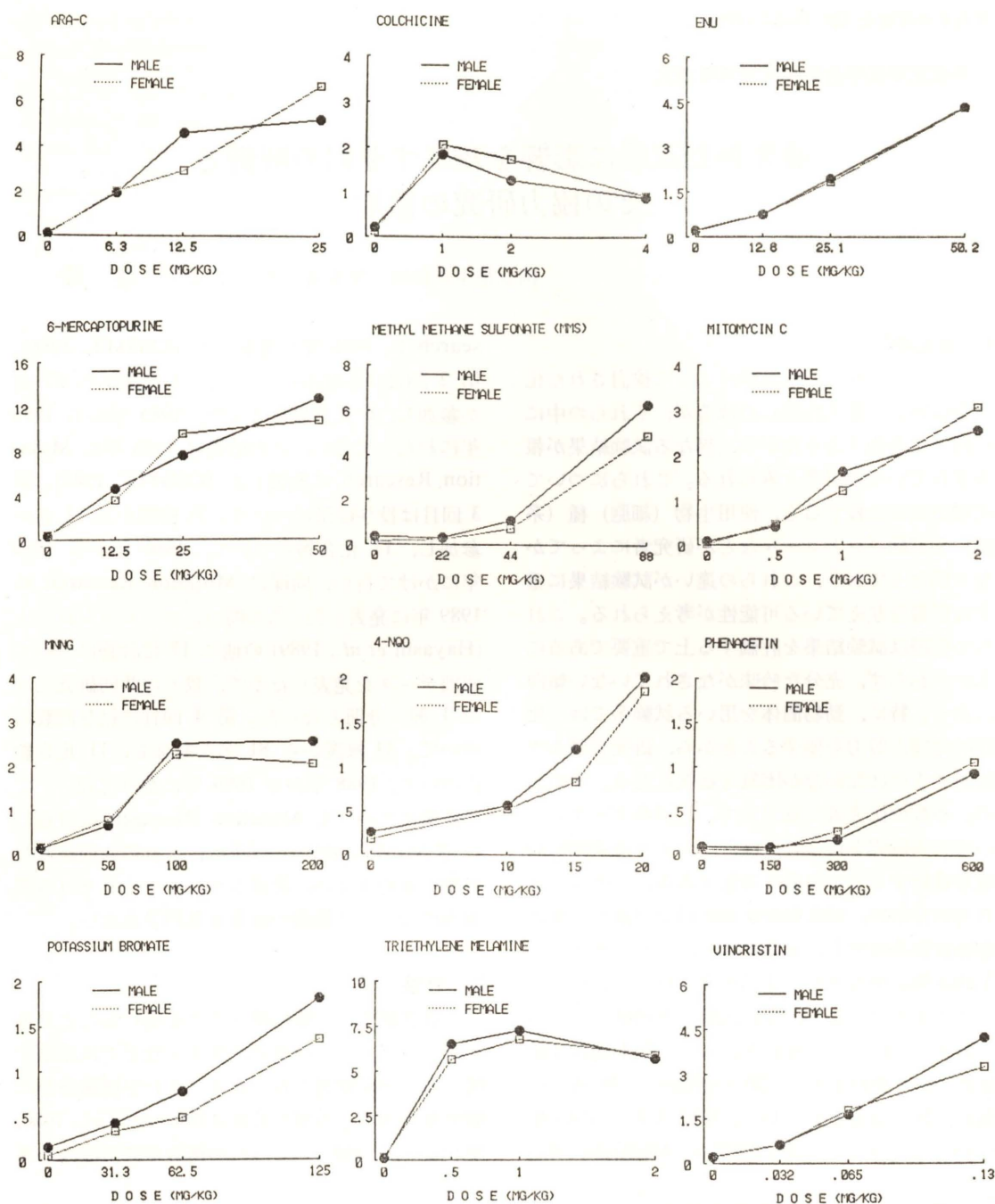


Fig. 1. 12 の化合物についての雌雄マウスにおける小核誘発性の比較. ARA-C: 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-cytosine, ENU: *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, MNNG: *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, 4-NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide.

なる 20 化合物を取り上げ、どの程度小核誘発性に性差がみられるのか検討を行った。

Fig. 1 に 20 化合物のうち 12 についての結果

を示す。これらの化合物の大部分は雌雄で小核誘発性に差がみられていないが、以下の化合物では明らかに雌雄差がみられた。

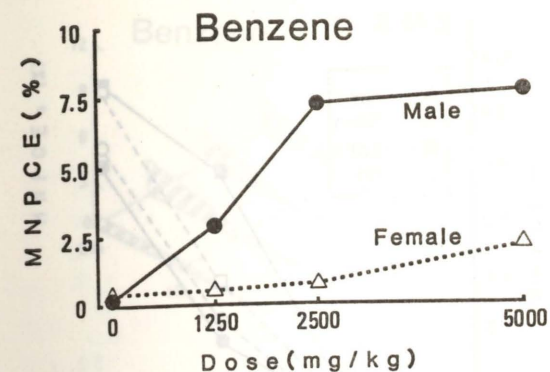


Fig. 2. Benzene の小核誘発性の雌雄差. ddY マウスへの強制経口投与による結果。

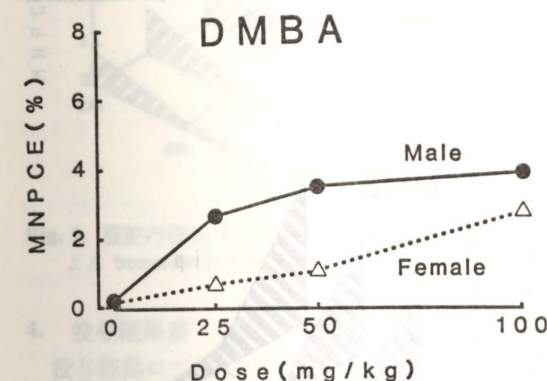


Fig. 3. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) の小核誘発性の雌雄差. ICR マウスへの腹腔内投与による結果。

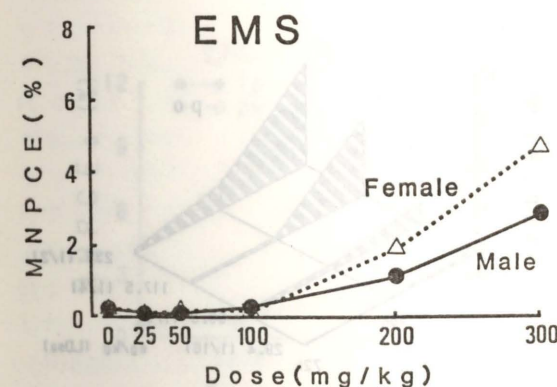


Fig. 4. Ethyl methanesulfonate (EMS) の小核誘発性の雌雄差. ddY マウスへの腹腔内投与による結果。

Benzene を強制経口投与 (po) すると、雌に比べて雄の方が明らかに高い小核誘発性を示した (ddY マウスを使用) (Fig. 2)。DMBA は benzene ほどではないが、同様に雄の方が高い小核誘発性を示した (Fig. 3)。但し、ICR マウスでは明らかに雌雄差がみられたのに対し、ddY マウスでは雌雄差がみられず、系統によって異なる結果が得られた。一方、雌の方が高い小核誘発性を示したのが EMS で (Fig. 4)、この場合は ddY マウスを用いた時に性差がみられたのに対し、BDF1 では明らかな差異は認められなかった。

性差についての結果を要約すると、用いた 20 化合物ではいずれも雌雄共に小核の誘発が認められたが、4 つの化合物、2-AAF, benzene, B(a)P, DMBA では雄の方が明らかに高い小核誘発性を示した。その逆に、雌の方で高い小核誘発性を示したのは、20 化合物のうち EMS の 1 化合物のみであった。その他の化合物は雌雄共に同程度、あるいは雄の方が幾分高い傾向を示した。この結果から、スクリーニングのための試験としては雄のみを用いて十分であるとの結論を得た。

### 3. 系統差

小核に用いるマウスの系統も研究者によってそれぞれまちまちであり、諸外国でもそれぞれの国によって特徴ある系統が用いられている。共同研究では、本邦で用いられている系統から 4 系統、ddY, CD-1, BDF1 および変異原高感受性である MS/Ae (Aeschbacher *et al.*, 1979, Hayashi *et al.*, 1982) を選びだして検討を行った。

Fig. 5 に DMBA についての結果を示す。変異原高感受性系統である MS/Ae で最も小核の出現頻度が高く、他の系統 BDF1, ddY, CD-1 ではほぼ同程度の出現頻度を示した。ENU においてみられるように (Fig. 6)、一般的な傾向として、MS/Ae が高く、ついで BDF1 で、ddY と CD-1 がやや低い小核誘発性を示した。一方、EMS ではいささか例外的で、BDF1 がやや高い傾向を示したが、全体的には 4 系統で同程度の小核誘発性を示した (Fig. 7)。

系統差についての結果を要約すると、今回対象とした 6 化合物、colchicine, DMBA, EMS, ENU,



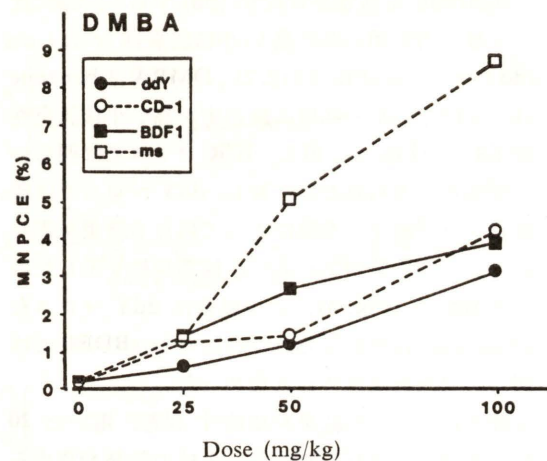


Fig. 5. 4系統のマウスにおける7,12-dimethylbenz(a)-anthracene(DMBA)の小核誘発性。

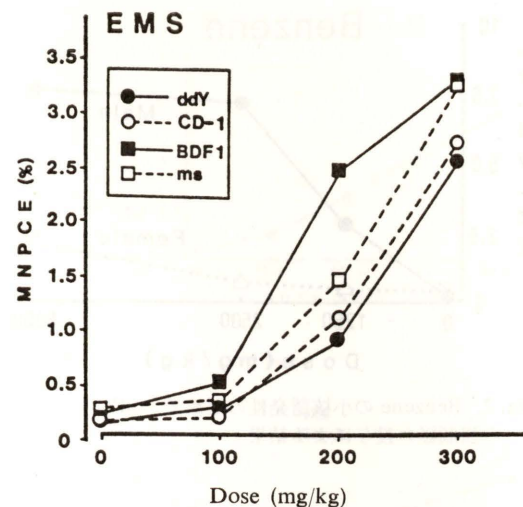


Fig. 7. 4系統のマウスにおけるethyl methanesulfonate (EMS)の小核誘発性。

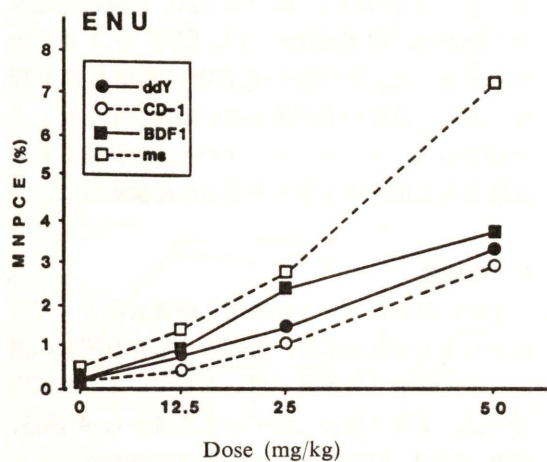


Fig. 6. 4系統のマウスにおけるN-ethyl-N-nitrosourea (ENU)の小核誘発性。

6-MP, potassium chromate はいずれも4系統のマウスに小核を誘発した。しかし、ddYとCD-1が比較的低く、BDF1が中程度の反応性を示したのに対し、MS/Aeマウスが高濃度域で高い誘発性を示すという一般的な特徴があった。但し、MS/Aeでは陰性対照群の値もやや高い傾向にあった。これらの結果から、スクリーニング試験としてはいずれの系統も十分使用できるという結論を得たが、MS/Aeマウスの高い反応性については大いに注目しており、一部の共同研究者によってその遺伝的背景を含めて検討が進められている (Sutou *et al.*, 1989)。

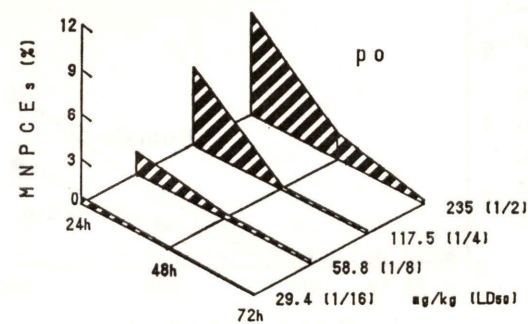
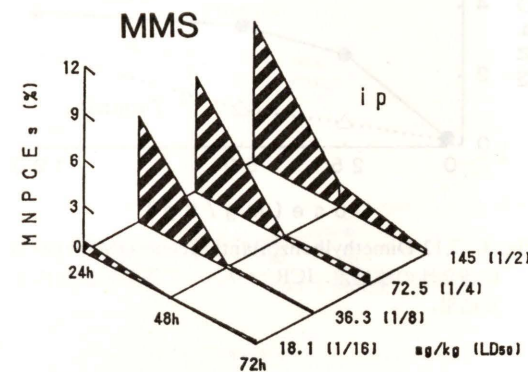


Fig. 8. 腹腔内投与 (上段) と強制経口投与 (下段) によるmethyl methanesulfonate (MMS)の予備試験結果。

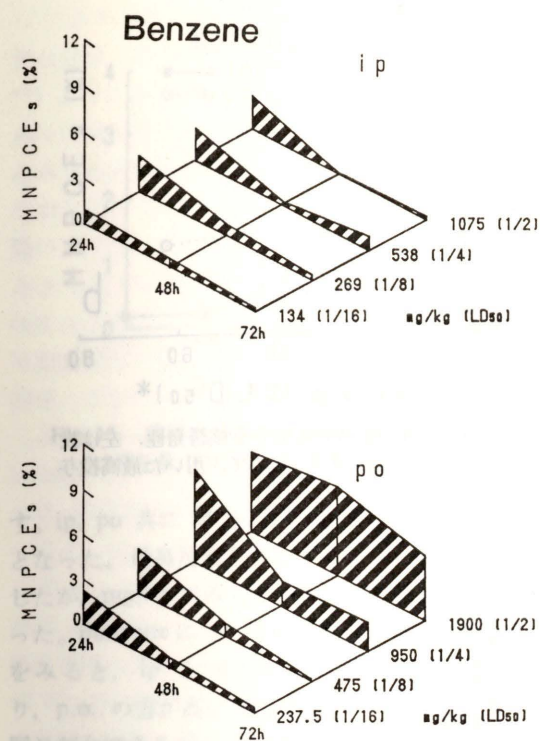


Fig. 9. 腹腔内投与 (上段) と強制経口投与 (下段) によるbenzeneの予備試験結果。

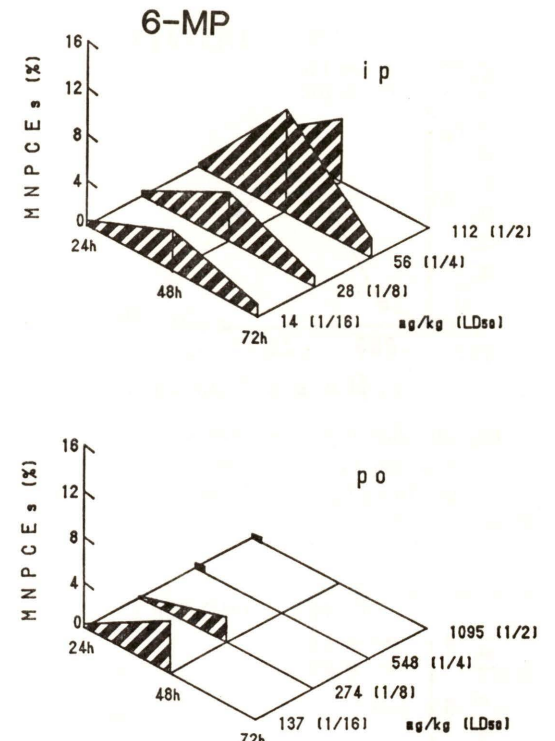


Fig. 10. 腹腔内投与 (上段) と強制経口投与 (下段) による6-mercaptopurine(6-MP)の予備試験結果。

#### 4. 投与経路差

投与経路については2つの投与経路、腹腔内投与 (ip) と強制経口投与 (po) について、2つの系統、MS/AeとCD-1を用いて、17化合物を対象として比較検討を行った。ipとpoではかなり投与量に違いが生じることが予想されたため、

最初にLorke (1983)の方法を用いてそれぞれの化合物についてLD<sub>50</sub>を求め、つぎに用量及び標本作製時期を選定するための予備試験 (Hayashi *et al.*, 1984)を行い、予備試験の結果に基づいて本試験を行った。

Fig. 8にMMSについての予備試験の結果を示

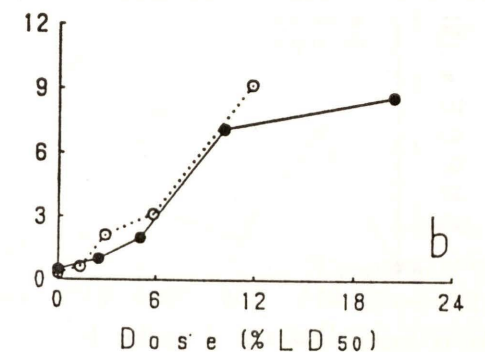
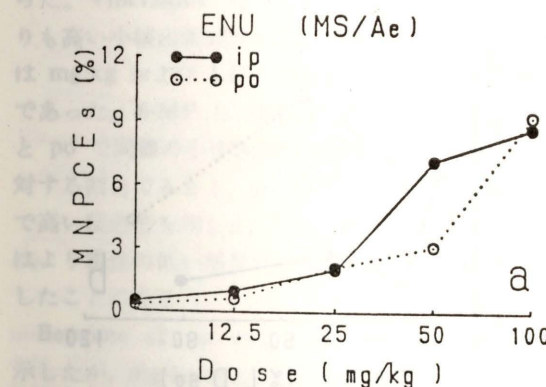


Fig. 11. 腹腔内投与 (ip) と強制経口投与 (po) によるN-ethyl-N-nitrosourea (ENU)の小核誘発性。左は投与量 (mg/kg), 右はLD<sub>50</sub>に対する割合で表示。



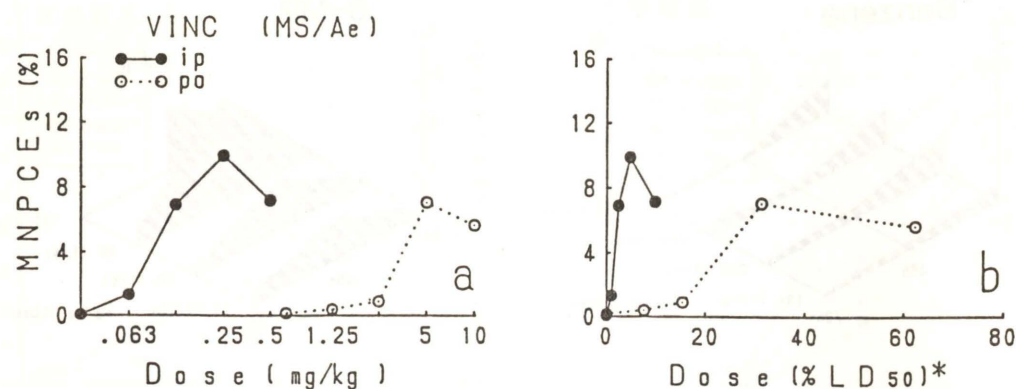


Fig. 12. 腹腔内投与 (ip) と強制経口投与 (po) による vincristine sulfate (VINC) の小核誘発性. 左は投与量 (mg/kg), 右は LD<sub>50</sub> に対する割合で表示. \* LD<sub>50</sub> が求められなかったため、用いた最高投与量, 16 mg/kg を暫定 LD<sub>50</sub> とした.

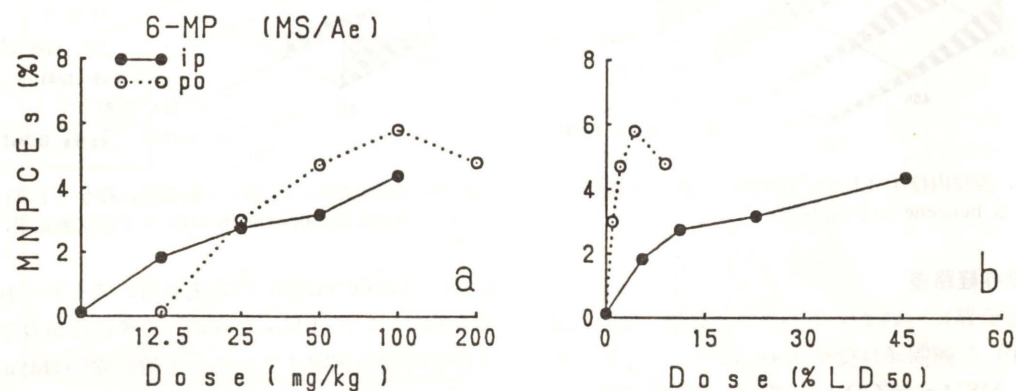


Fig. 13. 腹腔内投与 (ip) と強制経口投与 (po) による 6-mercaptopurine (6-MP) の小核誘発性. 左は投与量 (mg/kg), 右は LD<sub>50</sub> に対する割合で表示.

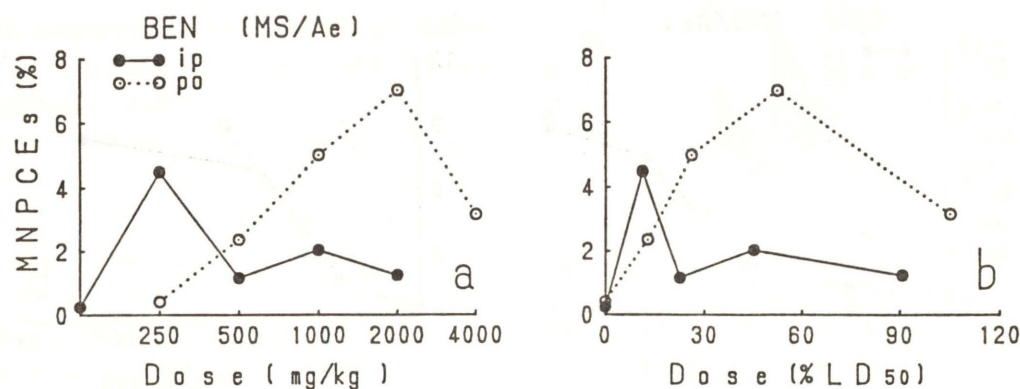


Fig. 14. 腹腔内投与 (ip) と強制経口投与 (po) による benzene (BEN) の小核誘発性. 左は投与量 (mg/kg), 右は LD<sub>50</sub> に対する割合で表示.

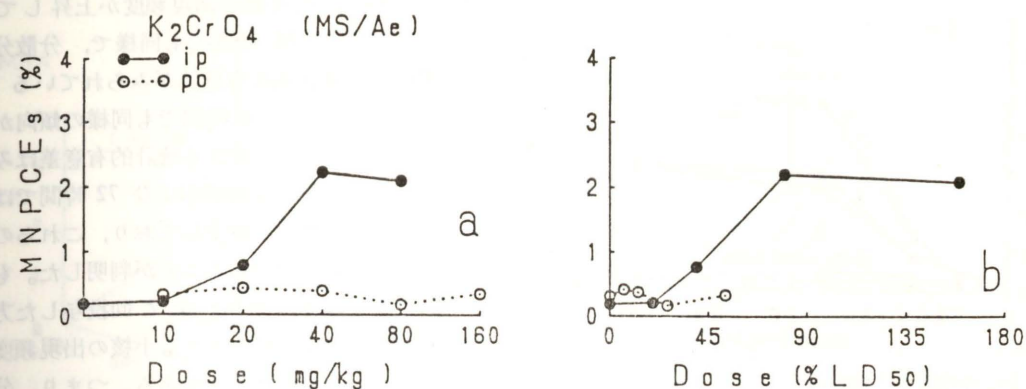


Fig. 15. 腹腔内投与 (ip) と強制経口投与 (po) による potassium chromate (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) の小核誘発性. 左は投与量 (mg/kg), 右は LD<sub>50</sub> に対する割合で表示.

す。ip, po 共に 24 時間が小核出現頻度のピークとなった。最高用量を共に LD<sub>50</sub> の 1/2 に設定したが、mg/kg でみると po の方が投与量が高かった。Benzene についての予備試験結果 (Fig. 9) をみると、ip と po ではかなり反応性が異なり、p.o. の方が高い反応性を示した。LD<sub>50</sub> では同じ割合であるが、これも mg/kg で表すと po の方が高い。6-MP の予備試験によると (Fig. 10), benzene とは逆に ip のほうが反応性が高い傾向にあった。LD<sub>50</sub> では両者とも同じだが、mg/kg でみると po が著しく高い。

各化合物について予備試験の結果をもとにそれぞれ本試験を行った。Fig. 11 に MS/Ae を用いた時の ENU についての結果を示す。ip と po 共に同程度の小核誘発性を示し、この傾向は mg/kg で表示しても LD<sub>50</sub> の割合で表示しても同じであった。Vincristine は ip の方が明らかに po よりも高い小核出現頻度を示し (Fig. 12), その傾向は mg/kg および LD<sub>50</sub> の割合で表示しても同様であった。6-MP は mg/kg でみた場合には ip と po で同様の小核誘発性を示したが、LD<sub>50</sub> に対する割合でみると、po の方がより低いところで高い反応性を示した (Fig. 13)。つまり po ではより毒性の低い用量でより強い小核誘発性を示したことになる。

Benzene は po の方が ip より高い反応性を示したが、mg/kg および LD<sub>50</sub> の割合で表示してもその傾向には変化がみられなかった (Fig. 14)。一方、potassium chromate では ip で明らかな

陽性結果を示したのに対し、po では陰性の結果となった (Fig. 15)。このように陰性結果となったのは、今回対象とした 17 化合物のうち potassium chromate ただ 1 つであった。

投与経路についての結果を要約すると、大部分の化合物は ip と po で共に陽性結果を示した。ただ 1 つの例外は potassium chromate で、po で陰性結果を示した。一方、benzene は CD-1 マウスを用いた時には po で強い小核誘発性を示したが、ip では極めて弱い誘発性を示した。但し、MS/Ae マウスを用いると、ip, po で共に明かな小核誘発性を示した。つまり、MS/Ae マウスを用いて ip 投与すると、今回対象とした 17 化合物が全て陽性結果を示したことになる。投与量でみると、ip の方がより低い濃度で小核を誘発したが、LD<sub>50</sub> に対する割合に換算すると、ip と po との差が少なくなった。つまり毒性が現われる濃度でみると、両者はかなり近似した傾向を示した。このことは LD<sub>50</sub> を基にして投与量を設定すると、ip と po 共にスクリーニングとしては有用であることを示している。

## 5. 投与回数の効果

小核誘発性に対し連投効果を示す化合物のあることはすでに報告されている (Yamamoto *et al.*, 1981) が、最近連投によって小核の誘発性が高まることが注目されている (MacGregor *et al.*, 1989, Tice *et al.*, 1989)。しかし、はたして連投によってのみ小核が誘発される化合物が存在する



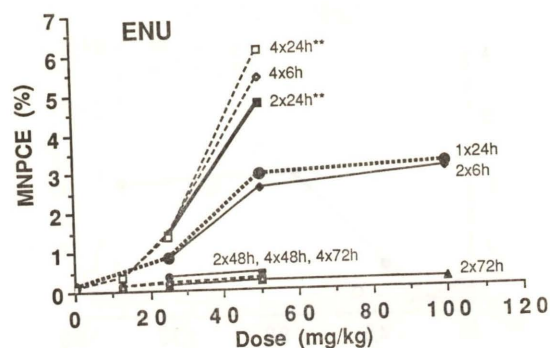


Fig. 16. 単回投与と連続投与による *N*-ethyl-*N*-nitrosourea(ENU) の小核誘発性。最初の数字は投与回数、後の数字は最後の投与から標本作製までの時間。\*\*は分散分析で単回投与との間に統計的に有意差がみられたことを示す。

のか否かは論議の多いところである。また、Schmid (1975) の原法、つまり 2 回投与後 6 時間に標本作製するというプロトコルの有効性が疑問視されている。このような投与回数の小核誘発性に対する効果の有無を検討するために、33 機関が参加し、11 化合物について ip 投与を行って、1 回投与、2 回投与および 4 回投与について比較検討した。

Fig. 16 に ENU についての結果を示す。1 回投与と比較すると、2 回投与の 6 時間、つまり Schmid の原法は 1 回投与と変わりなく、2 回投与の効果はみられていない。しかし、2 回投与の 24

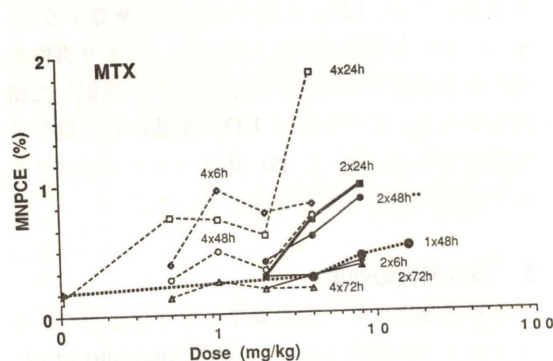


Fig. 17. 単回投与と連続投与による methotrexate (MTX) の小核誘発性。最初の数字は投与回数、後の数字は最後の投与から標本作製までの時間。\*\*は分散分析で単回投与との間に統計的に有意差がみられたことを示す。

時間では明らかに小核の出現頻度が上昇している。4 回投与の 24 時間でも同様に、分散分析 (ANOVA) で統計的に有意差がみられている (\*\*で示す)。4 回投与の 6 時間でも同様の傾向がみられたが、ばらつきが大きく統計的有意差はみられなかった。一方、48 時間および 72 時間では小核の出現頻度は著しく減少しており、これらの標本作成時間は不適切であることが判明した。もう 1 つの重要な点は、50 mg を 2 回投与した方が 100 mg を 1 回投与したよりも小核の出現頻度が有意に高くなっていることである。つまり、分割投与の方がより効果的であることを示している。

MTX は 1 回投与 (1×48 h) に比べて、Schmid の原法 (2×6 h) および 72 時間の標本作製 (2×72 h, 4×72 h) ではほとんど差がないか、あるいは小核の出現頻度が低下する傾向を示した (Fig. 17)。一方、2 回投与の 48 時間では明らかに小核の出現頻度が上昇し、ANOVA による統計処理によっても有意差がみられた。2 回投与の 24 時間では統計的には有意差はないが、同様の傾向を示した。MTX でも 1 回投与の半分の投与量を 2 回に分けて投与した方がより効果があり、分割効果がみられた。4 回投与の 6 時間および 24 時間ではさらに小核の出現頻度が高まる傾向にあるが、統計的に有意差がみられなかった。4 連投によって PCE の頻度が著しく低下し、観察可能なマウスが少なくなったり、また観察できても PCE

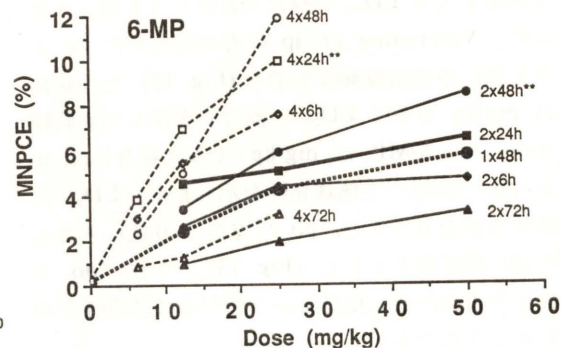


Fig. 18. 単回投与と連続投与による 6-mercaptopurine (6-MP) の小核誘発性。最初の数字は投与回数、後の数字は最後の投与から標本作製までの時間。\*\*は分散分析で単回投与との間に統計的に有意差がみられたことを示す。

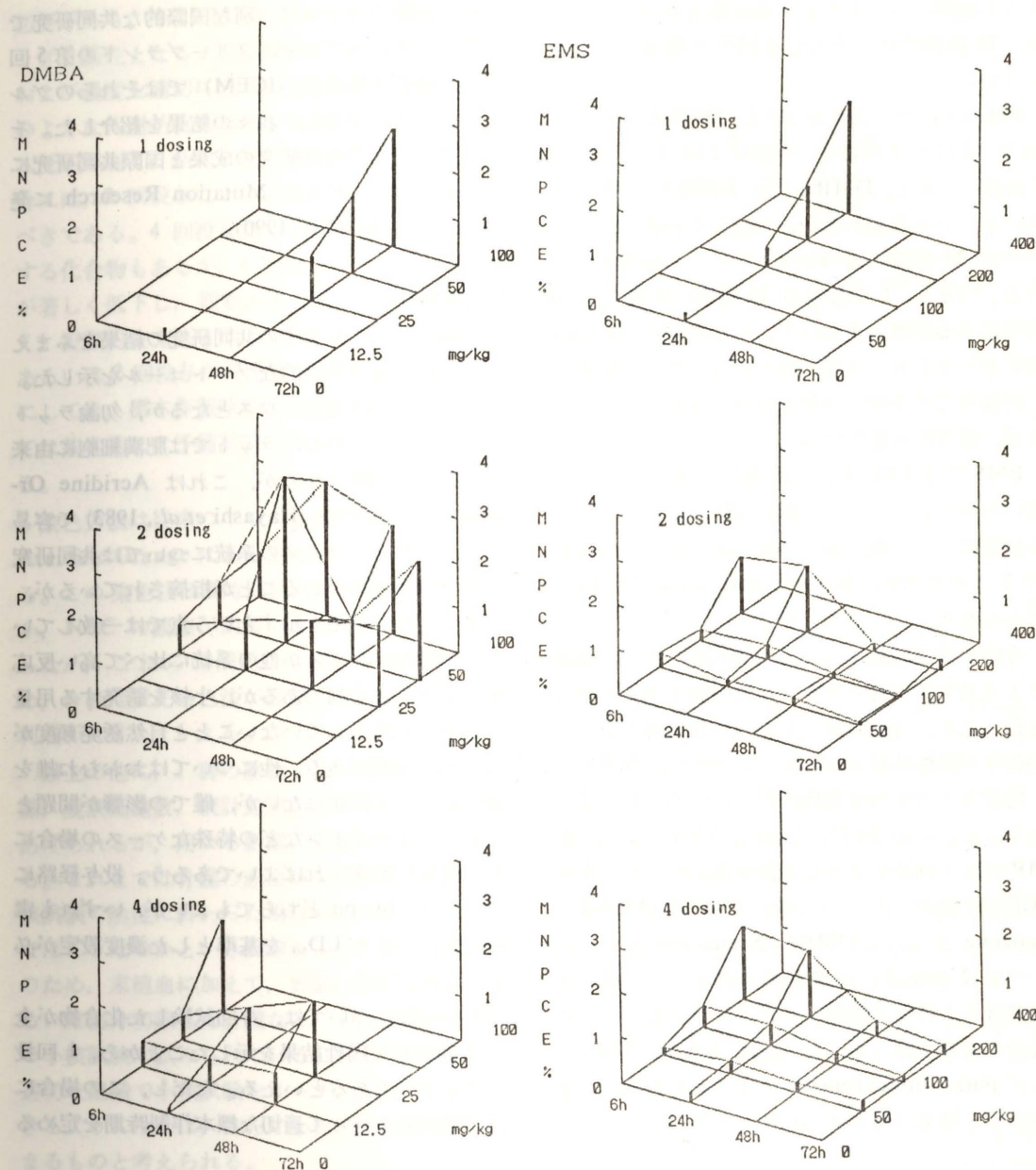


Fig. 19. 単回投与と連続投与による 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) の小核誘発性。上段は単回投与、中段は 2 回投与、下段は 4 回投与。投与量 (mg/kg)、標本作製時間 (h)、小核出現頻度 (MNPCE, %) による 3 次元グラフ。

Fig. 20. 単回投与と連続投与による ethyl methanesulfonate (EMS) の小核誘発性。上段は単回投与、中段は 2 回投与、下段は 4 回投与。投与量 (mg/kg)、標本作製時間 (h)、小核出現頻度 (MNPCE, %) による 3 次元グラフ。

の割合が少ないため、小核の出現頻度が大きくばらつくことに起因するものと思われる。

6-MP では、1 回投与 (1×48 h) に比べると、Schmid 原法 (2×6 h) や 2 回投与の 24 時間では明らかな差はみられなかったが、2 回投与の 48

時間では ANOVA によって統計的に有意差があり、2 連投による効果がみられた (Fig. 18)。但し、ENU や MTX でみられた分割効果は明らかでなかった。6-MP では 4 回投与の 24 時間でも統計的に有意差がみられた。6 時間および 48 時間で



もその傾向がみられたが、統計的有意差はなかった。72 時間ではいずれも小核の出現頻度が低下していた。

Fig. 19 に別の角度からみた DMBA の結果を示す。上段が 1 回投与、中段が 2 回投与、下段が 4 回投与である。DMBA では 1 回投与で 48 時間後にピークが現われるが、それが 2 回投与ではピークが 24 時間の方へシフトしてくる傾向がみられた。つまり、1 回投与の 48 時間の影響が 2 回投与による影響と重なって、2 回投与の 24 時間後にピークとなって現われていると考えられる。2 回投与での小核の出現頻度が一番高くなっているが、統計的有意差はみられていない。

EMS では 1 回、2 回、4 回投与の間にほとんど違いがみられていない (Fig. 20)。このように投与回数によって明らかな差異がみられない例は他に 2 つの化合物、2-AAF, potassium chromate でみられた。

今回の投与回数についての共同研究では、連投による効果が期待できそうな化合物を選んで試験を行ったが、今回対象とした 11 化合物が全て 1 回投与で陽性結果を示した。その中では MTX が 1 回投与での小核誘発性が弱く、かろうじて陽性となった。この MTX を含め、ENU および 6-MP では 1 回投与よりも連投の方が明らかに小核誘発性が高かった。その他に 5-FU, ARA-C, benzene さらには DMBA, phenacetin などにおいても 2 回あるいは 4 回投与によって小核の出現頻度が上昇する傾向がみられたが、必ずしも統計的に有意ではなかった。なお、2-AAF, EMS および potassium chromate の 3 つの化合物では連投による効果は殆どみられなかった。

投与回数のテーマは、別な国際的な共同研究でも取り上げられており、クリーブランドの第 5 回国際環境変異原会議 (ICEM) ではそれらのグループの会合に参加し、我々の結果を紹介した。その結果、我々の共同研究の成果と国際共同研究による成果を一緒にして Mutation Research に発表された (CSGMT, 1990)。

## 6. おわりに

Table 1 にこれまでの共同研究の結果をふまえて、小核試験の基本的なプロトコールを示した。動物種としては当然マウスとなるが、勿論ラットも使用できる。但し、ラットでは肥満細胞に由来する顆粒が問題となるが、これは Acridine Orange の蛍光染色法 (Hayashi *et al.*, 1983) で容易に区別できる。マウスの系統については共同研究以外にも系統差があることが指摘されているが、いずれも陽性結果を示すという点では一致している。MS/Ae マウスが他の系統に比べて高い反応性を示す点是有利であるが、小核を誘発する用量が必ずしも低下していないことと自然誘発頻度が高い点が問題である。性についてはおおむね雄を用いることで問題はないが、雌での影響が問題となるようなホルモンなどの特殊なケースの場合に雌の利用を配慮すればよいであろう。投与経路については、ip, po どちらでもよいが、いずれも毒性兆候、つまり LD<sub>50</sub> を基準とした濃度設定が必要となる。

投与回数については、今回試験した化合物が全て 1 回投与で陽性結果を示したことから、1 回投与でも十分であるといえる。ただし、この場合には予備試験を行って適切な標本作製時期を定める

必要がある。特に、MTX のように 1 回投与でぎりぎり陽性となるような物質では、標本作製時期および濃度を適切に設定しなければならない。このような代謝拮抗剤などを含めて、単回投与による反応が弱く、結果の判定が問題になるような場合には、2 回投与などの連投による効果を検討すべきである。4 回投与でも小核の出現頻度が上昇する化合物もあるが、4 回投与では PCE の頻度が著しく低下し、観察が不可能になる場合が多く、実際的な方法とはいえない。そのため、1 回あるいは 2 回投与が現実的な方法となる。いずれにしても、標本作製時期あるいは投与用量については基本的には予備試験を行って選定すべきである。

染色方法は従来のギムザ染色に加えて、前述の Acridine Orange による蛍光染色法が適切といえる。この染色法は長時間標本を保管できないとか、NEC の観察が困難であるなどの問題点があったが、これらの問題点も解消されつつあるため、今後は蛍光染色法が観察上での正確性からも利点が大いといえる。

以上の他に、1 群の動物の数、検体に用いる溶媒、観察細胞数、統計処理などいくつかの項目があげられるが、用いる組織の問題が特に重要である。これまでは骨髄の赤血球を用いてきたが、小核試験で陰性に終わった場合に、骨髄以外の組織ではどうなのかという問題が投げかけられる。そのため、末梢血に加えて、脾臓、胎児の肝臓、あるいは部分切除した肝臓など、骨髄以外の組織での小核試験が試みられている。もし、骨髄以外の適切な組織で小核試験をルーチンに行うことができるようになれば、さらに小核試験の有用性が高まるものと考えられる。

## 謝辞

第 1 回目の共同研究には 44 名、2 回目には 57 名、第 3 回と 4 回ではそれぞれ 81 名と、多くの研究者の協力によって初めてこのような協力研究を達成することができた。また、それぞれの共同研究の世話人の方々が如何に取りまとめに鋭意努力されたかは語り尽くせない。これら共同研究が続けられたのも、MMS 分科会会員および幹事

の方々の協力、並びに本学会からの支援があってこそである。共同研究者およびご支援下さった多数の方々に深謝申し上げる。

## 参考文献

- Aeschbacher, H. U., D. Gottwick, H. Meier and A. W. Poot (1979) Mutagen-sensitive strain of mice, Mutation Res., 59, 301-304.
- Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1986) Sex difference in the micronucleus test, Mutation Res., 172, 151-163.
- Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1988) Strain difference in the micronucleus test, Mutation Res., 204, 307-316.
- Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1990) Single versus multiple dosing in the micronucleus test: The summary of the fourth collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS, Mutation Res., 234, 205-222.
- Hayash, M., S. Sutou, H. Shimada, S. Sato, Y. F. Sasaki and A. Wakata (1989) Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test, Mutation Res., 223, 329-344.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1982) High-sensitivity in micronucleus induction of a mouse strain (MS), Mutation Res., 105, 253-256.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1983) An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Res., 120, 241-247.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1984) A pilot experiment for the micronucleus test: the multi-sampling at multidose levels method, Mutation Res., 141, 165-169.
- Henry, M., S. Lupo and K. T. Szabo (1980) Sex difference in sensitivity to the cytogenetic effects of ethyl methanesulfonate in mice demonstrated by the micronucleus test, Mutation Res., 69, 385-387.
- Lorke, D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing, Arch. Toxicol., 54, 275-287.
- MacGregor, J. T., C. M. Wehr, P. R. Henika and M. D. Shelby (1989) The in vivo micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fund. Appl. Toxicol., in press.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, Mutation Res., 31, 9-15.
- Siou, G., L. Conan and M. et Haitem (1981) Evaluation of the clastogenic action of benzene by oral administration with 2 cytogenetic techniques in mouse and Chinese hamster, Mutation Res., 90, 273-278.
- Sutou, S. and S. Sato (1989) Maternal inheritance of the ms gene, Mutation Res., 216, 378-379.
- Tice, R. R., G. L. Erexson, C. J. Hilliard, J. L. Hu-

Table 1. Summary of the results of the collaborative study for the in vivo micronucleus test

Species:	Mouse (Rat)
Strain:	Any Strains seem to suffice as a tester
Sex:	Male mice is sufficient for general screening
Administration route:	Both ip or po routes are practically acceptable
Administration time:	Single or double dosing
Sampling time:	To find optimal time by a pilot test
Maximum concentration:	To find optimal level by a pilot test
Staining method:	Giemsa or Acridine Orange
Target organ:	Bone marrow erythrocytes



ston, R. M. Boehm, D. Gulati and M. D. Shelby (1989) Evaluation of treatment protocol and sample time on micronucleus frequencies in mouse bone marrow and peripheral blood, *Mutagenesis*, in press.

Yamamoto, K. I. and Y. Kikuchi (1981) Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei, *Mutation Res.*, **90**, 163-173.

環境変異原研究 **12**: 23-34 (1990)

平成元年度学会奨励賞受賞者論文

## ポルフィリン類による多環性化合物の 変異原活性阻害の研究

岡山大学 薬学部 有元佐賀恵

### 1. 緒言

生活環境に含まれる変異原物質との接触に対して、生体側においても防御機構が存在すると思われる。その一つの可能性として、生体内外においてこれら発癌・変異原物質の作用を抑制する物質の存在が考えられる。従って、そうした物質を明らかにし、積極的に発癌予防への応用を試みるのは意味のあることと思われる。そこでまず、*in vitro* におけるスクリーニングを行い、生体内外における変異原修飾因子の検索を行った。

さらに、見出された物質の修飾作用が見かけ上のものか、意味のある作用かを見極めること、例を挙げると、変異原性に対する効果と、活性検出システムそのものへの破壊効果を見誤らないことは重要と考えられる。そこで、見出した修飾物質の作用メカニズムを追求した。すなわち、修飾機構としては次に示すようにいくつかの可能性が考えられる。①多くの発癌・変異原性物質は生体内において代謝酵素チトクロム P-450 系による作用を受けて活性化体を生成し、DNA との反応を起こす *promutagen* として存在する。従って、代謝酵素の働きを抑制・促進することによって修飾作用を現わす。②生成した活性化体に働きかけて活性修飾する。もしくは、元々の化合物自体が活性な場合は、そのものに働いて修飾する。③*promutagen* に対して化学反応を起こして不活性な物質に変える。これらの可能性について検討した。

### 2. 方法

#### (1) 変異原性試験及び変異原性修飾実験法

変異原性検出は Ames test の Yahagi らの変法を用いた。修飾実験は以下に行った。すなわち、被検化合物 (修飾剤) 50  $\mu$ l, 緩衝液 (0.1 M Na-PO<sub>4</sub> pH 7.4) もしくは S9 mix 0.5 ml, 菌液 0.1 ml 及び変異原性物質 50  $\mu$ l をこの順序で混合した *preincubation mixture* を、37°C, 20 分インキュベート後、ソフトアガー 2 ml を加え、minimal agar plate 上にまく。48 時間後、復帰コロニー数を数えた。

いずれの場合も 2 回以上の独立した実験を行い再現性のあることを確かめた。

#### (2) 変異原性修飾実験における生菌数測定法

バクテリアの *surviving fraction* の測定には次の 2 方法を併用した。Protocol 1 として、変異原と修飾剤を含む *preincubation mixture* を 20 分インキュベート後、0.1 ml のサンプルを取り phosphate buffered saline で 10<sup>4</sup> 倍に希釈し、そのうちの 0.1 ml にソフトアガー 2 ml (ヒスチジン 0.08 mg, ビオチン 0.04 mg を含む) を加え、minimal agar plate 上にまく。48 時間後、ヒスチジン要求性、非要求性いずれのサルモネラ菌ともコロニーを作るので、そのコロニー数を数えた。希釈率より、元の溶液の生菌数を計算した。

Protocol 2 として 10<sup>4</sup> 倍希釈したサンプル 0.1 ml に *preincubation mixture* に用いたと同じ量の変異原、修飾剤、S9 mix または緩衝液を加えてプレートにまき、48 時間後にコロニー数を数えた。

〒700 岡山市津島中 1-1-1

Inhibitory effect of biological porphyrins on the mutagenicity of polycyclic compounds

Sakae Arimoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-Naka, Okayama 760, Japan



Protocol 1 と 2 の結果が一致する場合は protocol 2 の結果を示した。

以上の生菌数測定を行わない場合は、顕微鏡的にバックグラウンドを観察し、生菌数に変化のないことを確かめた。

### (3) ヘテロサイクリックアミンの代謝により生成する直接変異原の調製法

ヘテロサイクリックアミンの水溶液もしくは DMSO 溶液 (0.1 ml) を S9 10  $\mu$ l を含む S9 mix (0.5 ml) と混ぜ、37°C、20 分攪拌し、代謝活性化を行わせた。氷冷アセトン (0.6 ml) を加えて、氷上 15 分置いた。3000 rpm、10 分、2°C で遠心し、上清を集めて乾固した。残さを水にとかして用い、-80°C で凍結保存した。以下、activated Trp-p-2 等と表示する。量としては、出発原料の equivalent で示した。

### (4) Trp-P-2 の代謝活性化に対する hemin の影響

Trp-P-2 20 nmole, hemin 0~200 nmole 及び S9 mix 1 ml (20  $\mu$ l S9) の mixture (全量 1.2 ml) を 37°C、20 分インキュベートし、冷アセトン 1.2 ml 加え、氷上 10 分置く。3000 rpm、3°C、10 分遠心し、上清を取り、乾固した。残さを 0.05 M disodium phosphate - 0.025 M citric acid 緩衝液 (pH 3) 1 ml に溶かしミリポアフィルター (ミリポア製マイレックス HA ポア径 0.45  $\mu$ m) を通す。ろ液 100  $\mu$ l を HPLC にかける。Trp-P-2, Trp-P-2(NHOH) を定量した。HPLC 条件は、逆相カラム  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub>, 溶媒 25% acetonitrile - 20 mM (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.0), 流速 1 ml/min。254 nm の吸光度を検出に用いて、1 分毎にフラクションを取り、Ames test でサルモネラ菌 TA 98 に対する活性を調べた。

### (5) Trp-P-2(NHOH) の分解に対する hemin の影響

Trp-P-2(NHOH) 10.8  $\mu$ M, hemin 10.8  $\mu$ M, pH 7.4 sodium phosphate 緩衝液 0.1 M の mixture (全量 2.04 ml) を吸光度計のセルに入れ、サーモコントローラーで 37°C に保ち、スターラーで攪拌した。時間を追って吸光度の変化を測定した。同時にサンプル 10  $\mu$ l を HPLC にかけて定量した。HPLC 条件は逆相カラム Inertsil

ODS<sub>10</sub>, 溶媒 25% acetonitrile - 20 mM(NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.0), 流速 1 ml/min。検出は 258 nm の吸光度を用いた。

### (6) Trp-P-2(NHOH) の分解に対する myoglobin の影響

反応混合液の組成は、Trp-P-2(NHOH) 2.4  $\mu$ M, myoglobin 2.5  $\mu$ M, pH 5.0 sodium-acetate 0.1 M である。時間を追ってサンプルを抜いてサルモネラ菌 TA98 における変異原性の変化を調べた。また 100  $\mu$ l について HPLC にかける。定量した。HPLC カラムは  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub>, 検出は 254 nm の吸光度で行った。その他は §5 と同様である。

### (7) 紫外・可視吸収曲線の測定

Fig. 6 及び Table 3 では 0.1 M Na-PO<sub>4</sub> pH 7.4, 0.05 M KCl を溶媒とし、濃度 5  $\mu$ M で測定した。

### (8) Trp-P-2 の蛍光に対する hemin の影響

Trp-P-2 (0.2  $\mu$ M), hemin (0, 0.2 or 1  $\mu$ M), 0.1 M Tris-HCl - 0.05 M KCl pH 8.0 中で測定した。Excitation spectra は 403 nm emission に対し、emission spectra は 265 nm excitation に対して測定した。

### (9) 酵素活性測定法

S9 の酵素活性は B (a) P の 3 位 OH 化活性、ならびにアニリンのパラ位水酸化活性を測定した。

## 3. 結果

### (1) ヘミン及びポルフィリン誘導体による食品加熱変異原の阻害

#### (i) ヘミンの Ames test における変異原性阻害作用

Fig. 1 に Trp-P-2 の変異原性に対する、ヘミンの効果を示した。ヘミン量に対して dose-response 的に阻害作用があり、Trp-P-2 0.1 nmole に対してヘミン 10 nmole の添加により 50% の阻害がかかり、ヘミン 50 nmole 添加によりバックグラウンドレベルにまで突然変異率が下がった。同様にその他の食品加熱変異原に対してもヘミンは阻害作用を示した (Table 1)。

また、クロロフィリン、ビリベルディンも同様

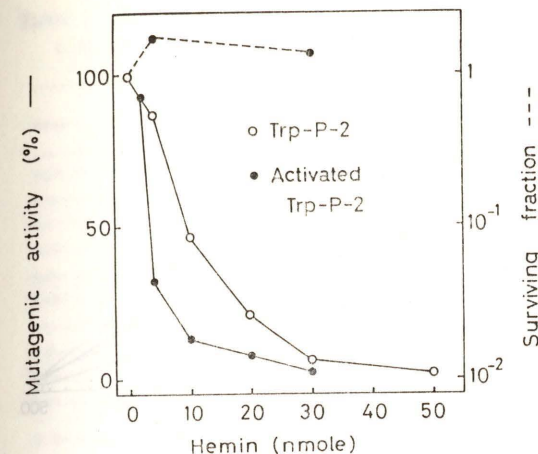


Fig. 1. Trp-P-2 および活性化 Trp-P-2 に対するヘミンの効果。

○: Trp-P-2 0.1 nmole (940 His<sup>+</sup>) *S. typhimurium* TA 98, +S9  
●: 活性化 Trp-P-2 0.1 nmole equivalent (3600 His<sup>+</sup>) *S. typhimurium* TA 98, -S9  
Solid line: 変異原性に対する効果  
Dashed line: サバイバルに対する効果

に 6 種の変異原に阻害活性があった。プロトポルフィリンは Trp-P-1, Trp-P-2 及び AαC に阻害活性があった。ビリルビンは影響がなかった。また、ヘミンの中心金属である Fe の作用を見るため FeCl<sub>2</sub> と FeCl<sub>3</sub> について同様にテストしたが

阻害も促進も見られなかった。

### (ii) ヘミンによる Trp-P-2 の代謝活性化に対する影響

以上述べた阻害メカニズムを明らかにするために、これら食品加熱変異原は全て代謝活性化を必要とすることから、ヘミンによる Trp-P-2 の代謝活性化に対する影響を調べた。

Fig. 2 に Trp-P-2 をヘミンの存在、非存在下 S9 で代謝したときに生成する活性化体を HPLC で調べた結果を示す。ヘミン非存在下では、HPLC のチャートにおける保持時間 8.1 分の Trp-P-2(NHOH) のピーク面積は、9.6 分の Trp-P-2 のピーク面積とほぼ同じである。ところが、5 倍量のヘミンにより Trp-P-2(NHOH) のピークは減少し、出発物質の Trp-P-2 のピークが増大した。このことは 1 分ごとにフラクションを取り Ames test にかけた結果、Trp-P-2(NHOH) のフラクションの直接変異原性がヘミンの存在下で減少し、代りに Trp-P-2 のフラクションの間接変異原性が増加していることから裏付けられた。

Fig. 3 に HPLC による定量結果を示すように、ヘミン量を増加させると、生成する Trp-P-2 (NHOH) 量は減少し、残存 Trp-P-2 量は増加した。以上の結果、ヘミンによる Trp-P-2 の変異原

Table 1. ヘテロサイクリックアミンの変異原性に対するピロール色素の阻害効果

Mutagen	Amount of mutagen (nmole per plate) a)	Dose of pigments required for 50 % inhibition (I <sub>50</sub> ) and for > 95 % inhibition (I <sub>95</sub> ), (nmole/plate)							
		Hemin		Chlorophyllin		Biliverdin		Protoporphyrin	
		I <sub>50</sub>	I <sub>95</sub>	I <sub>50</sub>	I <sub>95</sub>	I <sub>50</sub>	I <sub>95</sub>	I <sub>50</sub>	I <sub>95</sub>
Trp-P-1	1.8	3	75	100	200	200	750	50	300
Trp-P-2	0.1	20	50	200	300	500	2000	100	300
Glu-P-1	1.7	75	200	100	300	300	1000	(-)	(-)
Glu-P-2	9.1	40	100	150	300	200	750	(-)	(-)
AαC	80	30	100	150	300	500	2000	(-)	(-)
MeAαC	250	25	100	200	500	500	2000	50	500

a) Numbers of *S. typhimurium* TA 98 revertants per plate found in the absence of the pigments were 7800-16900 with Trp-P-1, 975-2170 with Trp-P-2, 18200-33000 with Glu-P-1, 3380-8640 with Glu-P-2, 3400-9750 with AαC, and 1370-6500 with MeAαC.



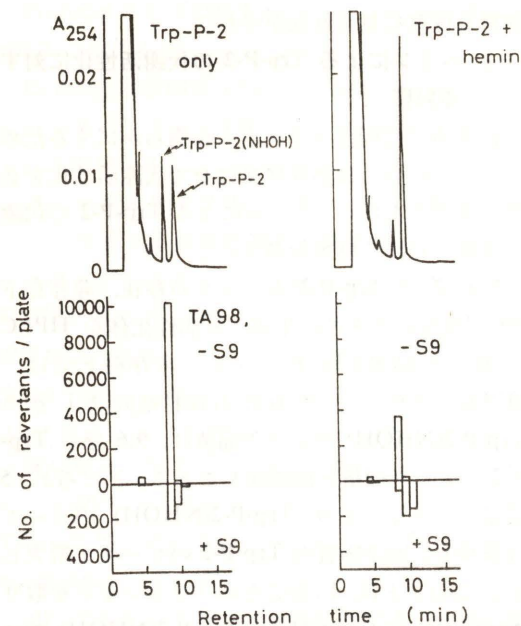


Fig. 2. ヘミンの存在下,あるいは非存在下 Trp-P-2 を S9 で処理したときの HPLC パターン.

ヘミン非存在下 (左), または 100 nmole 存在下 (右), Trp-P-2 (20 nmole) を S9 とインキュベートした. 下図は 1 分毎のフラクションの変異原性を *S. typhimurium* TA 98,  $\pm$ S9 で調べた結果である.

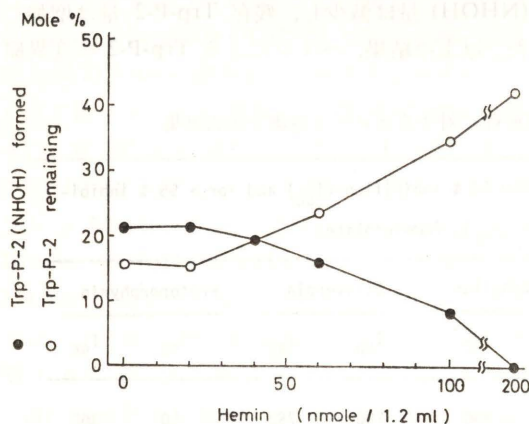


Fig. 3. Trp-P-2 の S9 処理における生成 Trp-P-2 (NHOH) 量と残存 Trp-P-2 量の, ヘミン濃度依存性.

性阻害の第一のメカニズムは代謝活性化の阻害によることが分かった.

### (iii) 代謝活性化体に対するヘミン及びポルフィリン関連化合物の阻害効果

Fig. 1 に, Activated Trp-P-2 に対するヘミン

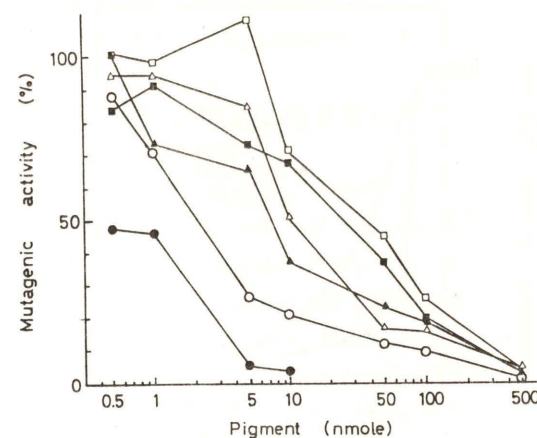


Fig. 4. ヘミンその他のピロール色素による, Trp-P-2 (NHOH) の変異原性阻害.

Trp-P-2 (NHOH) 0.05 nmole (15400 His<sup>+</sup>), *S. typhimurium* TA 98,  $\pm$ S9.

●: ヘミン, ○: プロトポルフィリン, ▲: ビリルデイン, △: ビリルビン, ■: ヘマトポルフィリン, □: Ge-プロトポルフィリン.

の影響を示した. ヘミンは Trp-P-2 に対するよりも少量で Activated Trp-P-2 の活性を阻害した. また, この時の生菌数を調べた結果, サルモネラ菌に対する殺菌作用はなかった. 従って, 変異コロニー数の減少が生菌数の減少による見かけのものでなく, 変異原性に対する阻害の結果であることがわかった.

そこで, Trp-P-2 の活性化体として同定されている Trp-P-2(NHOH) に対するヘミン及びポルフィリン関連化合物の効果を調べ Fig. 4 に示した. いずれも阻害効果があった. ヘミンが最も強く, 中心金属のないプロトポルフィリンは弱くなった. そこで中心金属をゲルマニウムに変えたものをテストしたところプロトポルフィリンよりさらに弱くなったので, 阻害機構に中心金属が何らかの役割を果たしているものと思われる.

Table 2 にその他 7 種の食品加熱変異原の Activated form に対するヘミンの効果を示した. ヘミンはいずれに対しても阻害作用を示した. また, Glu-P-1 の活性化体として同定されている Glu-P-1(NHOH) に対してもヘミンは Activated Glu-P-1 同様に阻害作用を示した.

また, プロトポルフィリン及びクロロフィリンは Table 2 の変異原すべてに対し, またビリル

Table 2. 活性化ヘテロサイクリックアミンの変異原性に対するヘミンの阻害効果

Mutagen	Mutagenicity		Inhibitory dose of hemin (nmol)	
	Amount in nmol or nmol-equivalent	No. of revertants per plate	I <sub>50</sub> <sup>b)</sup>	I <sub>90</sub> <sup>b)</sup>
Trp-P-2(NHOH)	0.05	15400	0.5	5
Activated Trp-P-2	0.1	3600	2.5	18
Glu-P-1(NHOH)	1	6640	8	40
Activated Glu-P-1	1.7	4350	15	130
Activated Glu-P-2	34	2900	25	100
Activated AaC	50	2310	30	100
Activated MeAaC	100	610	7	30
Activated IQ	1.25	6560	15	45
Activated MeIQ	0.695	9940	8	25
Activated MeIQx	1.25	3390	25	100

a) The mutagenicity assays were done in the absence of S9. The volume of the individual assay mixtures was 0.7 ml.

b) I<sub>50</sub> represents the dose of added hemin with which 50% decrease in the number of revertants was obtained, and I<sub>90</sub> that with which 90% decrease was obtained.

ディン は 7 種に対し, ビリルビンは 5 種に対し阻害効果のあることが分かった.

以上により, ヘミン及び関連化合物の活性阻害機構の第 2 として, 代謝活性化体に対する阻害効果を示すことによることが分かった.

### (iv) Trp-P-2(NHOH) の分解に対するヘミンの効果

(iii) における活性化体への阻害作用の本体は何かを調べるために次の実験を行った. Trp-P-2(NHOH) は中性条件下, 酸化的に分解することが知られている. そこで Trp-P-2(NHOH) の安定性に対するヘミンの影響を調べた (Fig. 5). Trp-P-2(NHOH) のみでは 8 分で吸収極大の 258 nm

の吸光度が 50% に減少するのにに対し, ヘミン存在下では 4 分で 50% となる. HPLC による分析を行ったところ, Trp-P-2(NHOH) のみでは 20 分後には O タイムの 36% が残存していたのに対して, ヘミン存在下では 22% 残存に過ぎなかった. すなわち, Trp-P-2(NHOH) の分解がヘミンの添加により促進されることが分かった.

### (v) Trp-P-2 及び Trp-P-2(NHOH) とポルフィリン類との相互作用

ヘミンと Trp-P-2(NHOH) との相互作用の有無を調べるために, Trp-P-2(NHOH) とヘミンとの吸収曲線を調べたのが Fig. 6 である. 個々の溶液の吸収の和と混合溶液の吸収とには明らかな差があり, 何らかの相互作用のあることが分かった. 差スペクトルを右上に示した. 同時にヘミンと Trp-P-2 との差スペクトルを破線で示した. いずれの差スペクトルも Trp-P-2(NHOH) 及び Trp-P-2 の吸収極大付近の 260 nm に谷を, 270 nm にピークを示し, ヘミンの吸収極大付近の 350 nm に谷を, 420 nm にピークを示した. ヘミンと Trp-P-2(NHOH) の混合液を 5 倍に緩衝液で希釈しても差スペクトルは本質的に変わらないが, 50% メタノール緩衝液で希釈すると, 個々の成分の吸収の和と等しくなった. 従って, スペクトル変化は化学反応によるものでなく, 可逆的な変化であることが分かった. Table 3 に Trp-P-2(NHOH) とポルフィリン類との差スペクトルを調べた結果をまとめた. どの場合も同様の相互作

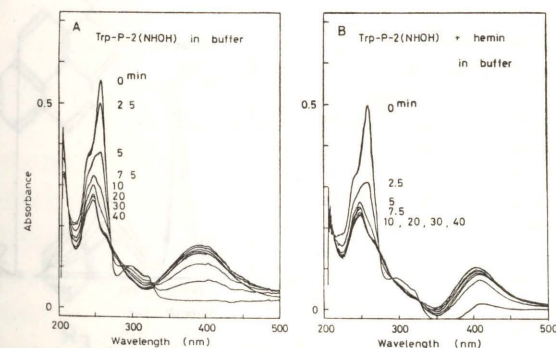


Fig. 5. ヘミンによる Trp-P-2 (NHOH) 分解の促進.

溶媒: 0.1 M リン酸ナトリウム, pH 7.4. 37°C.

A: Trp-P-2 (NHOH) のみ (10.8  $\mu$ M), B: Trp-P-2 (NHOH) (10.8  $\mu$ M)+ヘミン (10.8  $\mu$ M) スペクトルの横の数字はインキュベーション時間 (分) を示す.



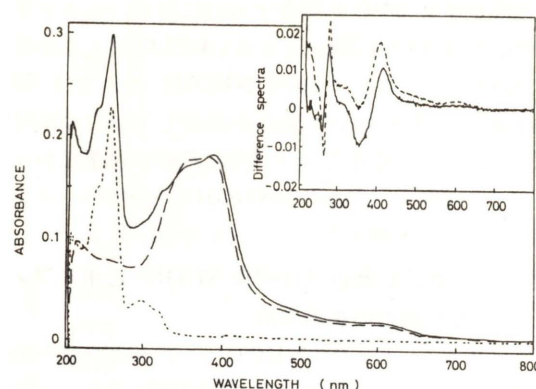


Fig. 6. Trp-P-2 (NHOH), ヘミンおよびその混合液の UV 吸収スペクトル.

溶媒: 0.1 M リン酸ナトリウム-0.05 M KCl, pH 7.4. 点線: Trp-P-2 (NHOH), 破線: ヘミン, 実線: 混合液. 差スペクトルにおいては, 実線: Trp-P-2 (NHOH) とヘミンとの混合液の差スペクトル, 破線: Trp-P-2 とヘミンとの混合液の差スペクトル.

用をしているものと思われる。さらに、Trp-P-2の蛍光に対するヘミンの影響について調べた(Fig. 7)。Trp-P-2の蛍光はヘミンの等モルの添加によりもとの70%に減少した。さらに5倍モルで50%まで消光した。

以上により、ヘミンと Trp-P-2(NHOH) 及び Trp-P-2 との間には何らかの可逆的分子間相互作用が存在すること、それにより変異原性の阻害が起きていると考えられることが分かった。

Table 3. Trp-P-2(NHOH) と色素の混合による吸収スペクトル変化

Pigment added to Trp-P-2 (NHOH)	Changes as observed in difference spectra			
	Peak		Trough	
	nm	$\Delta A^{a)}$	nm	$\Delta A^{a)}$
Hemin	273	+ 0.0162	258	- 0.0060
	416	+ 0.0100	353	- 0.0101
Protoporphyrin	262	+ 0.0156	376	- 0.0157
	486	+ 0.0071		
Hematoporphyrin	259	+ 0.0166	367	- 0.0058
	400	+ 0.0182		
Biliverdin	259	+ 0.0090	422	- 0.0184
Bilirubin	259	+ 0.0108	none	
Ge-Protoporphyrin	260	+ 0.0106	428	- 0.0017
	395	+ 0.0096		

a) These values represent deviations from the calculated sums of absorbances of the individual components, i.e. Trp-P-2 (NHOH) and the pigment.

ヘミンと構造類似の銅フタロシアニントリスル  
フォネートと Trp-P-2 に関して Face to Face の  
Complex 形成を報告したことを考えあわせると、  
ヘミンがポルフィリン環による平面構造をもち、  
Trp-P-2 などの食品加熱変異原も 3 環性縮合環に  
よる平面構造をもつことから、同様の Complex  
形成が起きることは十分に考えられる。

(2) ヘミンによる B(a)P その他の発癌物質の  
変異原性に対する阻害作用

(i) ヘミンの Ames test における変異原性阻害作用

ヘミンは Table 4 に示すように、B(a)P の変異原性に対して TA98 株, TA100 株, いずれの菌株を用いても阻害効果を示した。Fig. 8 にヘミンが阻害を示した変異原をまとめて示した。B(a)-P 以外の多環芳香族炭化水素 (3-Methylcholanthrene, 7,10-Dimethylbenz(a)anthracene, Chrysene) に対しても同様に阻害効果を示した。2-Acetyl-aminofluorene, Aflatoxin B<sub>1</sub> にも陽性であった。以上はいずれも S9 を必要とするので、S9 への阻害の可能性もあるが、S9 による代謝活性化を必要としない 2-Nitrofluorene などにも阻害効果を示すことから、ヘミンと変異原、もしくは変異原の活性化体との直接的な相互作用の可能性も考えられた。

また、ヘミンは 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide(TA100, -S9), 4-Nitro-quinoline-1-oxide(TA100, +S9 and -S9), Nitromin(TA100,

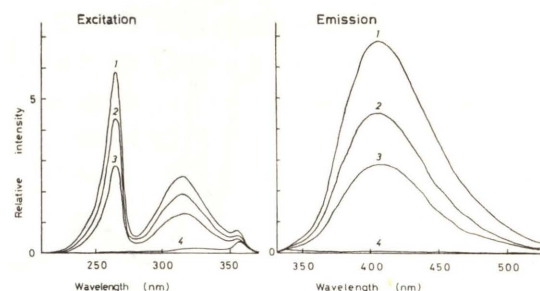


Fig. 7. Trp-P-2 とヘミンの混合液の蛍光スペクトル。  
溶媒: 0.1 M Tris-HCl-0.05 M KCl, pH 8.0.  
line-1: Trp-P-2 (0.2  $\mu$ M), line-2: Trp-P-2 (0.2  
 $\mu$ M)+ヘミン (0.2  $\mu$ M), line-3: Trp-P-2 (0.2  $\mu$ M)+  
ヘミン (1  $\mu$ M), line-4: ヘミン (1  $\mu$ M).

Table 4. ベンツピレンなどの変異原性に対するヘミンの阻害効果

Mutagen	Amount of mutagen (nmole)	Inhibitory dose of hemin (nmole)		Bacterial strain	Amount of S-9 (μl)	His <sup>+</sup> revertants in the absence of hemin <sup>(c)</sup>
		I <sub>50</sub>	I <sub>95</sub> <sup>(b)</sup>			
Benzo(a)pyrene	8	10	50	TA 98	25	738, 1022
Benzo(a)pyrene	30	10	150	TA 100	25	1149, 1034
3-Methylcholanthrene	50	100	300	TA 100	50	1901, 2708
7,10-Dimethylbenz(a)anthracene	100	30-100	300-500	TA 100	50	1215, 1504
Chrysene	120	100	300	TA 100	50	611, 863
2-Acetylaminofluorene	100	100-200	500	TA 98	50	1402, 2109
2-Acetylaminofluorene	300	200	500	TA 100	50	2372, 2573
2-Nitrofluorene	100	200	1000	TA 98	-	3961, 5330
2-Nitrofluorene	50	100	750	TA 100	-	1663, 1890
Aflatoxin B <sub>1</sub>	5	10	500	TA 98	10	636, 1293
Aflatoxin B <sub>1</sub>	0.5	50-70	300-500	TA 100	10	1243, 1661

a) The values in this table represent those per plate.

b)  $I_{50}$  is the dose at which 50% decrease in the His<sup>+</sup> revertants was observed, and  $I_{95}$  is that at which the decrease was more than 95%.

c) The two numbers given for each mutagen are those obtained in two independent inhibition-experiments.

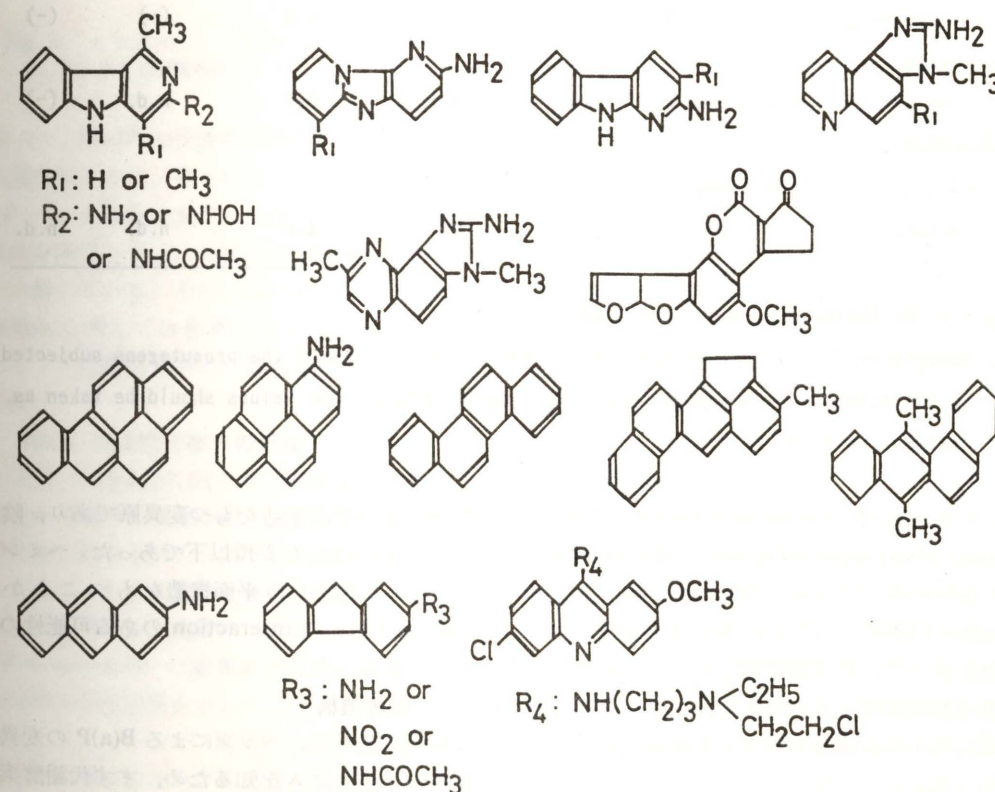


Fig. 8. ヘミンが阻害効果を示した変異原物質.



Table 5. 食品加熱変異原の活性化体の変異原性に対するヘムタンパクの阻害効果

Mutagen	nmol or nmol equivalent (No. of revertants per plate)	Dose for 50% inhibition (nmol) <sup>a)</sup>				
		Myoglobin	Hemoglobin	Cytochrome c	Globin	Albumin
N-OH-Trp-P-2	0.05 (8800)	1.8	0.74	0.23	(-)	n.d.
N-OH-Glu-P-1	1.0 (7100)	16	15	2.8	(-)	(-)
Activated Trp-P-1	0.25 (370) <sup>b)</sup>	2.6	1.9	0.31	(-)	50
Activated Glu-P-2	5.0 (800) <sup>b)</sup>	35	12	6.5	(-)	(-)
Activated MeA $\alpha$ C	80 (2700) <sup>b)</sup>	25	20	4.4	80	(-)
Activated A $\alpha$ C	40 (4700) <sup>b)</sup>	200	32	(-)	(-)	(-)
Activated IQ	0.25 (7100) <sup>b)</sup>	9.5	6.2	0.5	100	(-)
Activated MeIQ	0.10 (1100) <sup>b)</sup>	n.d.	2.9	4.8	(-)	(-)
Activated MeIQx	0.40 (2600) <sup>b)</sup>	n.d.	60	6.0	n.d.	(-)
"beef extract mutagens"	0.4 g equiv. (4600)	n.d.	25	4.6	n.d.	n.d.

a) (-), no inhibition; n.d., not done.

b) Amounts of "activated" mutagens are represented by those of the promutagens subjected to the metabolic activation by S9 mix, and therefore these values should be taken as nmol equivalents.

-S9), N-methyl-N-nitrosourea(TA100, -S9), N-nitrosodi-n-butylamine(TA100, +S9), Quinoxaline-1,4-dioxide(TA100, +S9 and -S9) および carbadox(TA100, -S9) には修飾効果を及ぼさなかった。従って、変異原性検出系そのものに、非特異的な妨害効果を及ぼした結果ではなく、変異原物質に何らかの働きかけをした結果であることが分かった。

また、ヘミンの作用が陽性であったものは全て

3 環以上の平面構造をもつ変異原であり、陰性であったものは全て 2 環以下であった。ヘミンはポルフィリン環という平面構造をもつことから、Face to Face の interaction のある可能性のあることが分かった。

#### (ii) 阻害機構

以上に述べた、ヘミンによる B(a)P の変異原性阻害のメカニズムを知るため、まず代謝酵素に対する影響を調べた。

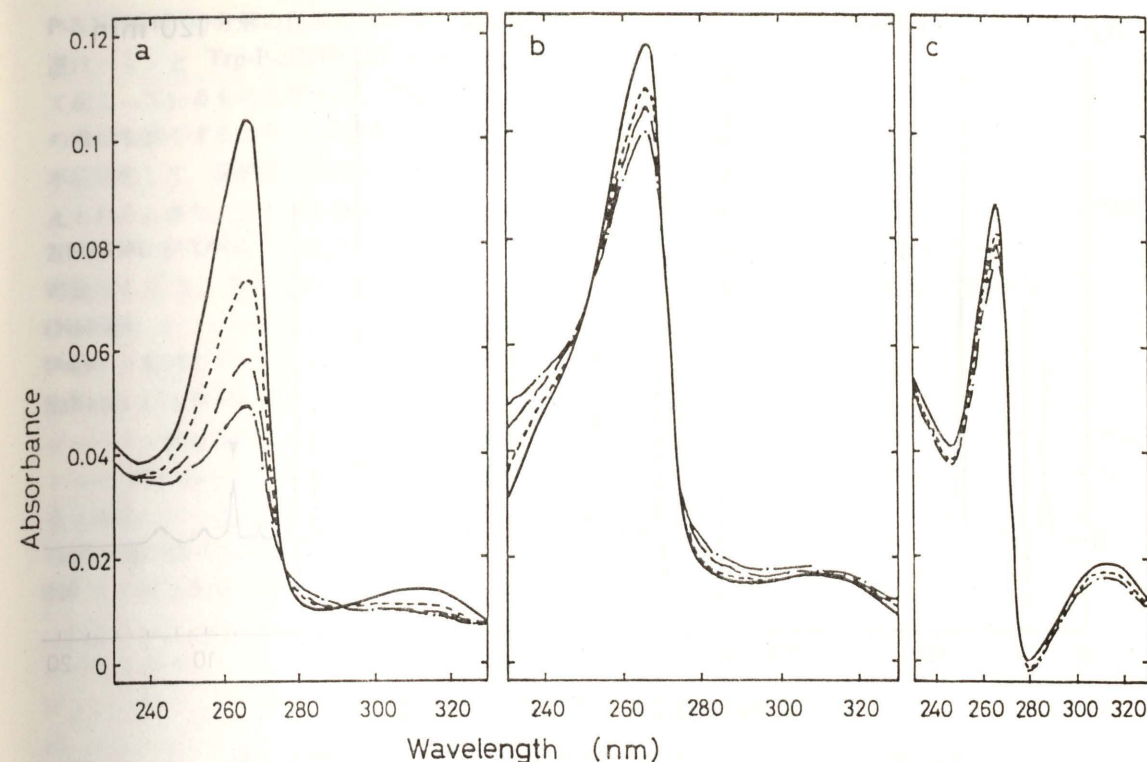


Fig. 9. ミオグロビンの存在による, Trp-P-2 (NHOH) の分解.

a: Trp-P-2 (NHOH)+ミオグロビン, b: Trp-P-2 (NHOH)+グロビン, c: Trp-P-2 (NHOH) alone.

S9 中の B(a)P の代謝酵素活性に与えるヘミンの影響を知るため、B(a)P から 3-ヒドロキシ-B(a)P への水酸化を測定したところ、ヘミンは酵素活性を阻害した。この結果は、Nemoto らの結果と一致している。その一方、アニリンのパラ位の水酸化に対しては影響を与えなかった。従って、ヘミンは酵素選択的に作用を及ぼすことが分かった。

#### (iii) B(a)P の活性化体への影響

B(a)P の発癌性に関する ultimate form とされている B(a)P-7, 8-diol-9,10-epoxide(BPDE) の変異原性に対するヘミンの効果を調べたところ、ヘミンはサルモネラ菌の生菌数に影響を与えることなく BPDE の変異原性を阻害した。さらに、B(a)P-4,5-epoxide の変異原性に対しても、ヘミンは同様に活性阻害を示した。

以上より、ヘミンの B(a)P に対する阻害機構も、活性化酵素系ならびに活性化体双方への阻害作用であることが分かった。

#### (3) ヘムタンパクによる、食品加熱変異原の活性化体に対する阻害作用

ヘムタンパクであるミオグロビン、ヘモグロビン及びチトクロム C は Trp-P-2 などの食品加熱変異原に対し変異原性修飾効果を示さなかったが、代謝活性化した直接変異原には抑制効果を示した。Table 5 に活性化した食品加熱変異原への効果をまとめた。ミオグロビン、ヘモグロビンは全て陽性であり、Trp-P-2 のような単品のみならず、beef extract から抽出した、いろいろな変異原の混ざりから得た活性化体にも効果があった。またチトクロム C は Activated A $\alpha$ C 以外の 9 種に効果があった。これに対し、ミオグロビンからヘムを除いたグロビン部分には活性がないか、あっても弱く、ヘム部分が重要であることが分かった。またアルブミンもほとんど効果がないのでタンパクという大分子の存在による、タンパク吸着等の物理的影響ではないと考えられる。

また、ミオグロビンの阻害作用は還元性物質



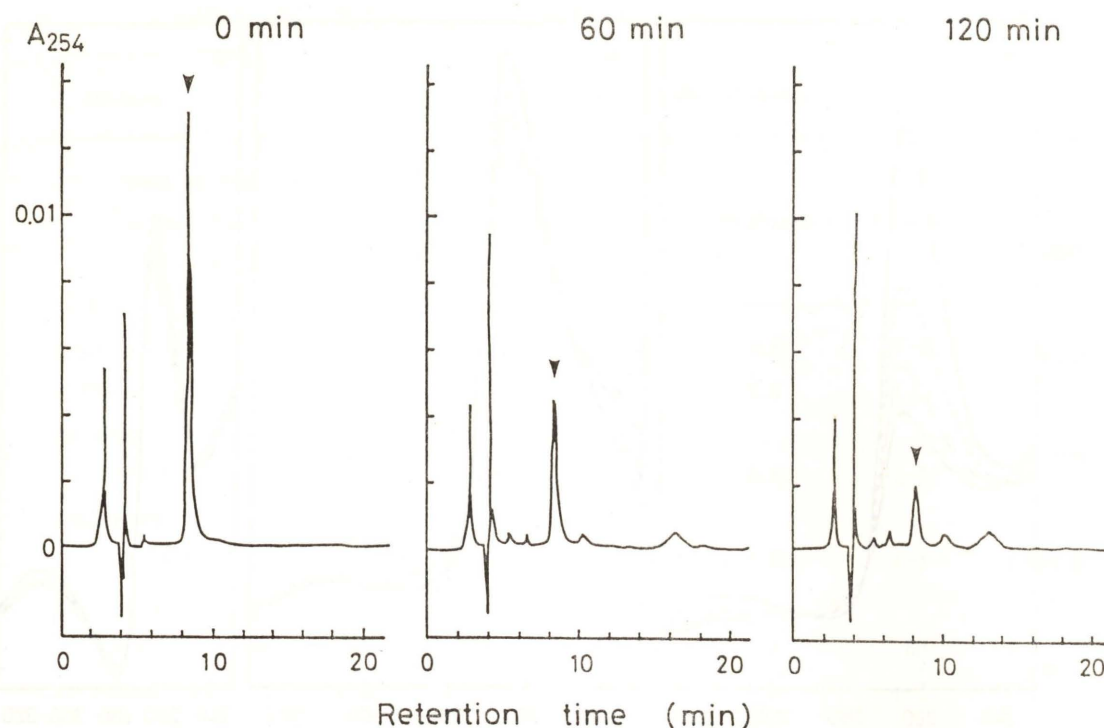


Fig. 10. ミオグロビンによる Trp-P-2 (NHOH) の分解反応の HPLC 分析。  
矢印は Trp-P-2 (NHOH) のピークを示す。

(NADPH, cysteine) の添加により抑えられ、Trp-P-2(NHOH) はもとの活性を示した。NADP<sup>+</sup> ではそのような抑制は見られなかった。従って、ミオグロビンによる Trp-P-2(NHOH) の酸化的分解が考えられた。

そこで、Trp-P-2(NHOH) の安定性に対するミオグロビンの影響を調べた。Trp-P-2(NHOH) は中性で半減期 8 分と不安定なため詳細な分析が困難である。しかし、pH 5 では安定なので、その条件下でのミオグロビンの影響を見たのが Fig. 9 である。Fig. 9c のように、Trp-P-2(NHOH) のみでは吸光度は殆ど変化しなかったが、ミオグロビン存在化では分解が起こり、266 nm の吸光度は 60 分でもとの 56% に減少した。溶液の変異原性を一部抜いて調べたところ、30 分でもとの 72%、60 分で 49%、90 分で 44% に活性が減少した。さらに、別にサンプルを抜いて、HPLC による分析を行ったのが Fig. 10 である。Trp-P-2(NHOH) のピークが時間とともに減少することがはっきりと示された。しかし、ごく弱いピー

クがいくつか現れるものの、分解した Trp-P-2(NHOH) のかわりと思われるピークはなく、活性・UV 吸収ともに弱い、または無いものになったと思われる。ヘムを除いたグロビンでは UV 吸収の減少はミオグロビンと比較して顕著ではなかった。グロビンが変異原性の阻害効果の殆ど無いことを考えあわせると、ミオグロビンのヘムが関与して、Trp-P-2(NHOH) を酸化的に分解している可能性があることが分かった。

#### 4. 考察

ヘミンなどのポルフィリン類の変異原性修飾作用にはいくつかのステップが関与していることが明らかとなった。ヘミンは緒言に述べたうちの①「代謝酵素に働く」②「活性化体に働く」の双方に作用していることが分かった。①のメカニズムとしてはチトクロム P-450 活性を変えているか、あるいはもっとありそうなことは、複合体の形成により酵素の基質とならないようにしている可能性があると思われる。②のメカニズムとして Trp-

P-2(NHOH) の分解の促進が挙げられる。この促進はヘミンと Trp-P-2(NHOH) の複合体を介して起こっているものと思われ、Trp-P-2(NHOH) の寿命を短くすることで DNA へ到達する前に不活性化して、変異原性の発現を妨げていると考えられる。また、この複合体形成により、Trp-P-2(NHOH) が DNA と反応することを妨げている可能性もある。複合体形成について、Trp-P-2(NHOH) とヘミンの差スペクトルはチトクロム P-450 と基質のモデルとのそれに類似している。Sakurai らは P-450 のモデルとしてのグルタチオン-ヘミン複合体にアニリンを加えると差スペクトルの 360 nm にピークが、420 nm に谷ができると報告している。また、Schenkman, Yoshida らは同様の差スペクトルが基質とチトクロム P-450 との相互作用で得られると報告している。

ヘミンによる他の食品加熱変異原への阻害のメカニズム並びに、プロトポルフィリンなどのポルフィリン類による阻害については未だ明かでないが、クロロフィル・クロロフィリンについては、Trp-P-2 との複合体形成を観察しており、今後さらに研究して行きたい。

B(a)P に対するヘミンの阻害機構も代謝活性化のプロセスならびに活性化体への作用の両面と分かった。活性化体への作用の本体については今後の課題であるが、Sayer らが ellagic acid による B(a)P diol epoxide への阻害作用のメカニズムとして、B(a)P diol epoxide と付加体を形成し、分解を促進することを報告している。ヘミンの場合、変異原と complex を形成して、同様の反応が起きている可能性もあると思われる。それにより、まずこれら変異原が活性化酵素の基質となることを妨げ、次いで活性化体と complex を形成し、寿命を短くすることで DNA へ到達する前に不活性化している、あるいは DNA との反応を妨げている可能性がある。今後さらに、アフラトキシン B<sub>1</sub> などの変異原性への阻害作用についても明らかにして行きたい。

ヘムタンパクに関しては、ヘモグロビンが過酸化水素の存在下、uric acid と guaiacol の酸化に介在するとの報告がある。ミオグロビンによる Trp-P-2(NHOH) の分解促進にヘム部分が必要で

あったことから、ミオグロビンの鉄-ヘム部が化合物の酸化的分解に働いていることが示唆される。

既に、いくつかの変異原性の阻害剤 (ellagic acid, palmitoleic acid および N-acetylcysteine) が発癌性を妨げるとの報告がなされており、変異原性阻害剤の検索は抗-発癌剤を見つけるうえで有用と考えられ、さらに研究の進展が望まれるところである。

#### 5. 謝辞

このたびの奨励賞受賞にあたり、学会長松島泰次郎先生、並びに評議員の先生方、会員の皆様方に感謝いたします。また、常に御指導御鞭撻頂きました早津彦哉先生に感謝いたします。

#### 参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, **31**, 347-364.
- Arimoto, S., Y. Ohara, T. Namba, T. Negishi and H. Hayatsu (1980a) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 662-668.
- Arimoto, S., T. Negishi and H. Hayatsu (1980b) Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens, *Cancer Letters*, **11**, 29-33.
- Arimoto, S., N. Nakano, Y. Ohara, K. Tanaka and H. Hayatsu (1982) A solvent effect on the mutagenicity of tryptophan-pyrollysate mutagens in the *Salmonella*/mammalian microsome assay, *Mutation Res.*, **102**, 105-112.
- Arimoto, S., Y. Ohara, K. Hiramoto and H. Hayatsu (1987) Inhibitory effect of myoglobin and hemoglobin on the directacting mutagenicity of protein pyrolysis heterocyclic amine derivatives, *Mutation Res.*, **192**, 253-258.
- Arimoto, S. and H. Hayatsu (1989) Role of hemin in the inhibition of mutagenic activity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole (Trp-P-2) and other aminoazaarenes, *Mutation Res.*, **213**, 217-226.
- Bartosz, G. (1984) Artfactual peroxidase activity in animal tissues, *Clin. Chem.*, **30**, 598.
- Chang, R. L., M.-T. Huang, A. W. Wood, C.-Q. Wong, H. L. Newmark, H. Yagi, J. M. Sayer, D. M. Jerina and A. H. Conney (1985) Effect of ellagic acid and hydroxylated flavonoids on the



- tumorigenicity of benzo(a)pyrene and ( $\pm$ )-7 $\beta$ , 8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ , 10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene on mouse skin and in the newborn mouse, *Carcinogenesis*, **6**, 1127-1133.
- De Flora, S., M. Astengo, D. Serra and C. Benicelli (1986) Inhibition of urethan-induced lung tumors in mice by dietary N-acetylcysteine, *Cancer Letters*, **32**, 235-241.
- Hayatsu, H., H. Kobayashi, A. Michi-ue and S. Arimoto (1986) Affinity of aromatic compounds having three fused rings to copper phthalocyanine trisulfonate, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 944-947.
- Hayatsu, H., S. Arimoto and T. Negishi (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Res.*, **202**, 429-446.
- Howell, R. R. and J. B. Wyngaarden (1960) On the mechanism of peroxidation of uric acid by hemoproteins, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3544-3550.
- Ito, H., K. Kasama, S. Naruse and K. Shimura (1982) Antitumor effect of palmitoleic acid on ehrlich ascites tumor, *Cancer Letters*, **17**, 197-203.
- Mukhtar, H., M. Das, B. J. Del Tito, Jr. and D. R. Bickers (1984) Protection against 3-methyl-cholanthrene-induced skin tumorigenesis in BALB/C mice by ellagic acid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 751-757.
- Nebert, D. W. and H. V. Gelboin (1968) Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture 1. Assay and properties of induced enzyme, *J. Biol. Chem.*, **243**, 6242-6249.
- Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki and H. Hayatsu (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.
- Nemoto, N. and S. Takayama (1982) Inhibition of microsome-mediated benzo[a]pyrene metabolism by hemin, *Gann*, **73**, 887-892.
- Sakurai, H., S. Shimomura and K. Ishizu (1981) Glutathione-hemin complex as a cytochrome P-450 model: characterization of the complex and its aromatic oxidation activities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 1102-1108.
- Sayer, J. M., H. Yagi, A. W. Wood, A. H. Conney and D. M. Jerina (1982) Extremely facile reaction between the ultimate carcinogen benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide and ellagic acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5562-5564.
- Schenkman, J. B. (1970) Studies on the nature of the type I and type II spectral changes in liver microsomes, *Biochemistry*, **9**, 2081-2091.
- 高島英伍 (1976) ヒドロキシル化 (水酸化) 反応, in 生化学実験法講座 12 エネルギー代謝と生体酸化 下 (日本生化学会編), pp. 443-453.
- Wakata, A., N. Oka, K. Hiramoto, A. Yoshioka, K. Negishi, Y. Wataya and H. Hayatsu (1985) DNA strand cleavage *in vitro* by 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, a direct-acting mutagen formed in the metabolism of carcinogenic 3-amino-1-methyl-5H-pyrido-[4,3-b] indole, *Cancer Res.*, **45**, 5867-5871.
- Wilpart, M., A. Speder and M. Roberfroid (1986) Anti-initiation activity of N-acetylcysteine in experimental colonic carcinogenesis, *Cancer Letters*, **31**, 319-324.
- Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*, *Mutation Res.*, **48**, 121-130.
- Yoshida, Y. and H. Kumaoka (1975) Studies on the substrate-induced spectral change of cytochrome P-450 in liver microsomes, *J. Biochem.*, **78**, 455-468.

## Development of Sensitive Determination Methods for Environmental Contaminants

Masatoshi Morita, Hiroyasu Ito and Yasuyuki Shibata

### Abstract

Analytical Instrumentation has been developed for higher sensitivity, selectivity, rapid and easy operation, cheap cost and high sample throughput, automation and imaging and so on. A rarity of spectroscopic methods are used for the identification and quantification of organic materials of the kind and the sensitivity of the method is often very important for the analysis of environmental mutagens and carcinogens since those materials are usually at low concentrations.

### 1. Introduction

Spectroscopic methods and their sensitivity are summarized in Table 1. For volatile materials, gaschromatography/mass spectrometry is the most convenient method for identification and determination. Other gaschromatographic methods are also employed for specific compounds with selective detectors such as electron capture detector, flame photometric detector and NP detector. Gaschromatography with FT-IR is also another choice when mass spectroscopic differentiation is not enough for example in the cis-trans isomerism. It is also worthy to note that gaschromatography, by using capillary column in stead of packed column, has gained ten-fold higher sensitivity.

For non-volatile, thermally unstable compounds, the choice is to use liquid chromatography for separation and detect them with molecular spectrometry such as NMR, UV/VIS, IR and fluorescence spectrometry. The recently develop two-dimensional and three-dimensional FT-NMR is the most powerful identification method if samples are obtained in sufficient quantities (more than microgram). For the smaller quantity samples, UV/VIS, FT-IR fluorescence spectrometry and mass spectrometry are the other choices. Fluorescence spectrometry is often very sensi-

Table 1. Analytical Method and Sensitivity

Analytical method	Detection limit
Nuclear magnetic resonance spectrometry (FT)	10 <sup>-8</sup> g
Infrared spectrometry (FT)	10 <sup>-6</sup> g
Mass spectrometry	10 <sup>-9</sup> g
UV/VIS spectrometry	10 <sup>-6</sup> —10 <sup>-9</sup> g
Fluorescence spectrometry	10 <sup>-8</sup> —10 <sup>-12</sup> g
Gaschromatography	
GC-FID	10 <sup>-8</sup> g
GC-ECD	10 <sup>-9</sup> —10 <sup>-13</sup> g
GC-MS	10 <sup>-10</sup> —10 <sup>-13</sup> g
GC-FPD	10 <sup>-9</sup> —10 <sup>-10</sup> g
GC-TCD	10 <sup>-6</sup> —10 <sup>-8</sup> g
GC-NPD	10 <sup>-8</sup> g
Liquid chromatography (HPLC)	
LC-UV/VIS	up to 10 <sup>-9</sup> g
LC-Fluorescence	up to 10 <sup>-13</sup> g
LC-MS	10 <sup>-6</sup> g

tive and selective and fluorescent carcinogens or mutagens such as benzo(a)pyrene, aflatoxins and Trp-1 are determined by HPLC-FL. The sensitivity is further enhanced by using laser as an excitation source.

Sensitivity improvement in gaschromatography/mass spectrometry is very marked in recent two decades. As shown in Fig. 1, detection limit of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin has been lowered by the factor of



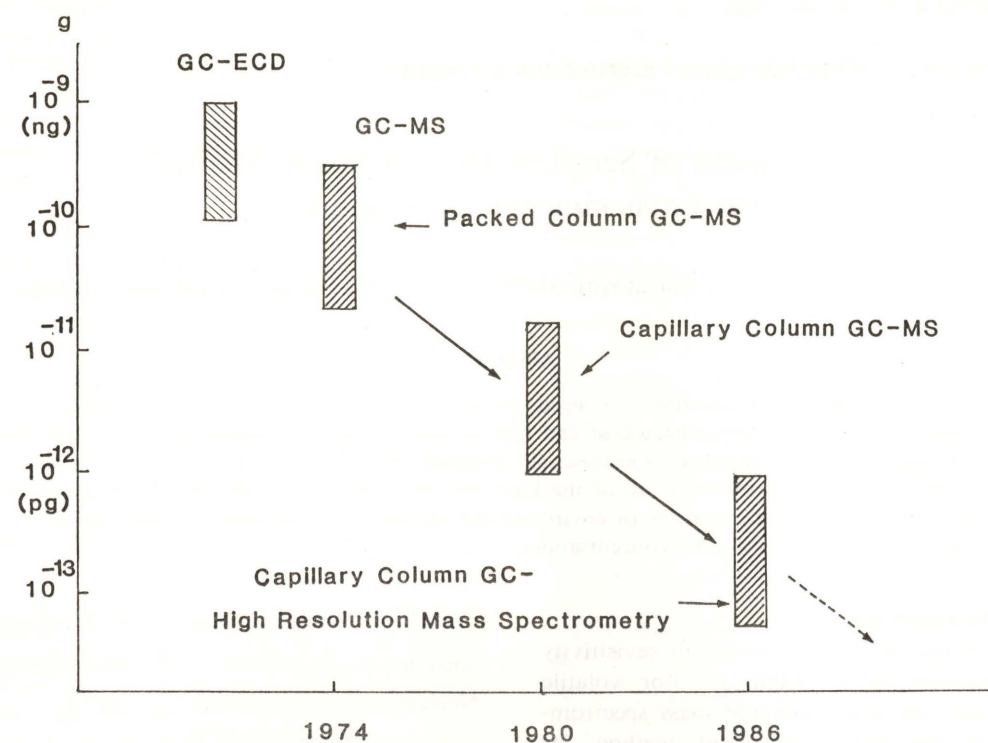


Fig. 1. Detection limit of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin by gaschromatographic method during recent two decades.

$10^4$  in the period. It is also pointed out that the selectivity is improved through the development of separation capability and resolution so that interference by concomitant components can be minimized.

For the determination of element(s), marked development in the analytical sensitivity is given by the use of inductively coupled mass spectrometry. Detection limit of ppm to ppb by conventional method is now lowered to ppt or lower by the method. The method, when it is combined to separation method, can give the information of the chemical state which is important to assess the role of elements in toxicological and nutritional aspects.

In the present paper, we will further discuss two methods in detail, capillary column gaschromatography-high resolution mass spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry since both methods have been applied widely in our laboratory.

## 2. Capillary Column Gaschromatography—high Resolution Mass Spectrometry—its Application to Chlorodibenzodioxins and Chlorodibenzofurans

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and the related compounds are known as the most toxic compounds. Its mutagenicity is not established but its carcinogenicity is shown at low dose levels (NIH, 1980a, 1980b, 1980c, 1980d). Therefore it is necessary to determine TCDD with a very low detection limit, for example 10 ppq in drinking water. The detection limit is solely possible by the recent development of capillary column high resolution GC/MS.

Fig. 2 shows chromatograms of several TCDD isomers by high resolution mass spectrometry with two different gaschromatographic columns. The instrument used here was a Hewlett-Packard 5890 gaschromatography/JEOL JMS-SX102 mass spectrometer with DA5000 data processing system. Two columns are DB-1 fused silica column ( $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.1\text{ }\mu\text{m}$ ) and SP2331 fused silica

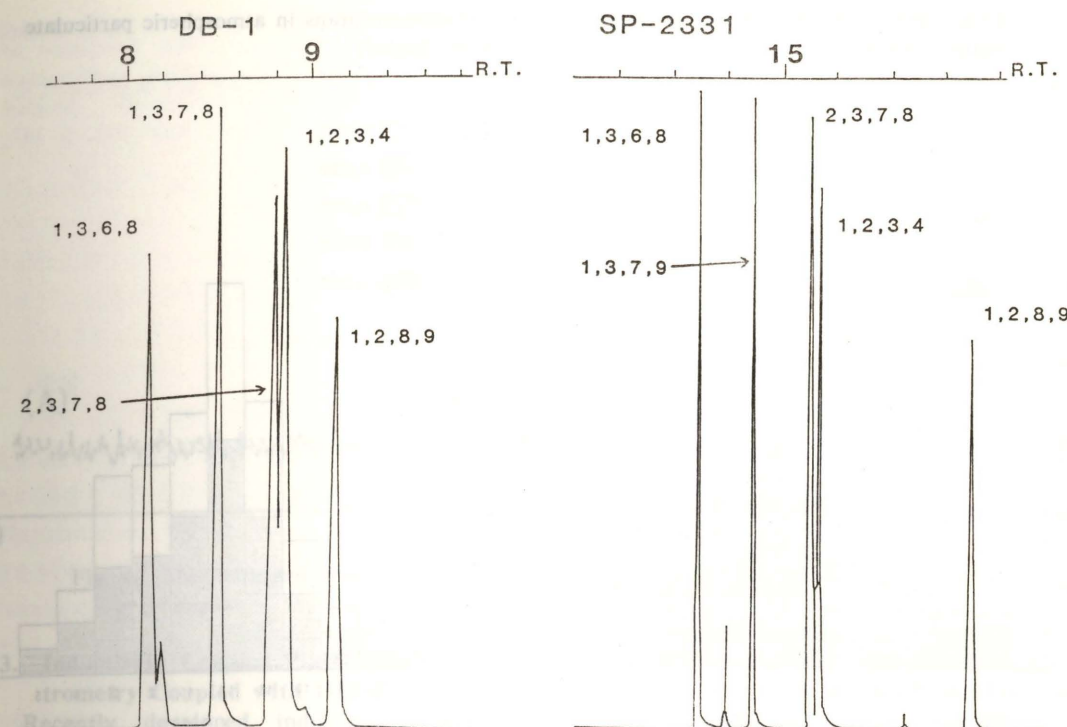


Fig. 2. Separation and detection of selected TCDD isomers on different capillary columns. Each peak corresponds to 1 pg sample.

column ( $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.2\text{ }\mu\text{m}$ ). The mass spectrometer was operated in selected ion monitoring mode (SIM) under the resolution of 10,000. Mass locking was performed by computer control using perfluorokerosene as internal standard. Gaschromatograph was operated by temperature program mode with helium gas as carrier gas. The substantial detection limit for 2,3,7,8-TCDD was c.a. 10 fg for DB-1 column and 50–100 fg for SP-2331 column taking  $s/n=3$  as a detection limit. The inferior detection limit in using SP-2331 column may be attributed to the thermal unstability of the column.

Chlorodibenzodioxins and chlorodibenzofurans were analyzed in ambient air particulate matter which was collected with a high volume sampler in Tokyo central area. The sampler was operated in a constant flow rate for 24 hours during which time approximately  $2000\text{ m}^3$  of air was sampled. Particulate matter on the filter (Pallflex Quartz fiber) was extracted with Soxhlet Extraction by refluxing using toluene as a solvent. The extract was purified by the partition with concentrated

with sulfuric acid, and later by alumina column chromatography. The dichloromethane/hexane fraction was concentrated to a small volume and subjected to GC/MS. As shown in the chromatogram (Fig. 3), chlorodioxins in the atmospheric particulate matter have the similar isomer patterns as those of municipal incinerator origin.

Owing to the high sensitivity of the instrument, 2,3,7,8-TCDD which was hard to detect in the ambient air was demonstrated in the chromatogram. The level of 2,3,7,8-TCDD in the atmospheric particulate matter was  $2\text{--}26\text{ fg/m}^3$  about 0.05% of the total tetrachlorodibenzodioxins (Table 2). Chlorodibenzodioxins and chlorodibenzofurans in atmospheric particulate matter shows season variation as shown in Fig. 3, being high in winter and low in summer. The cause of the variation may be explained by these reasons: photochemical degradation in the atmosphere, vapourization loss during sampling in elevated temperature season, and meteorological and geological effects.

Analysis of chlorodioxins in human mother



Chlorodioxins in atmospheric particulate matter: (pg/m<sup>3</sup>)

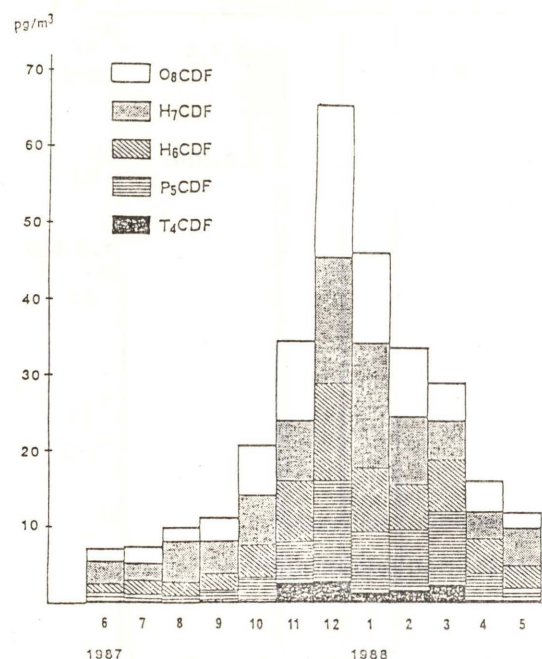


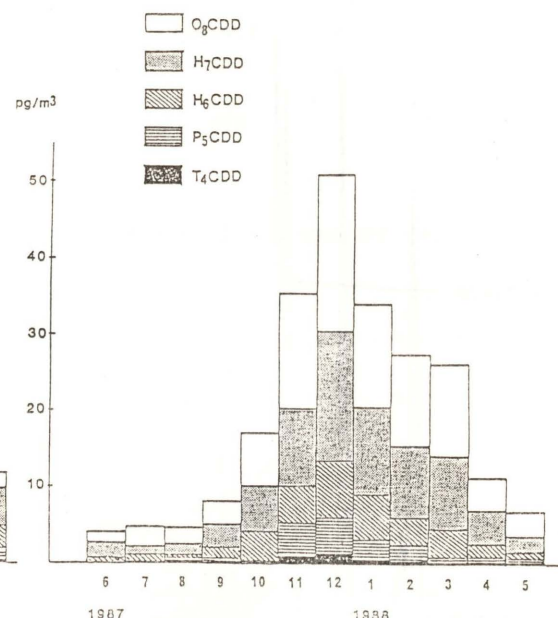
Fig. 3. Monthly change of chlorodibenzofurans and chlorodibenzodioxins in atmospheric particulate matter.

Table 2. Concentration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin in atmospheric particulate matter

	2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-TCDD/ Total TCDD
January	10 (fg/m <sup>3</sup> )	0.3 × 10 <sup>-3</sup>
February	16	0.6
March	13	0.5
April	9	0.8
May	6	0.9
June	3	0.7
July	4	0.5
August	2	0.4
September	4	0.5
October	5	0.3
November	17	0.5
December	26	0.5
Average	9.6	0.5

milk requires more sophisticated clean-up procedure to remove interferents. Several partition methods, chemical treatments and chromatographic combinations are compared. The routine method now being used in our labora-

Chlorodibenzofurans in atmospheric particulate matter: (pg/m<sup>3</sup>)



tory is as follows: Sample is spiked with <sup>13</sup>C-labelled internal standards, (<sup>13</sup>C-2,3,7,8-TCDD, <sup>13</sup>C-OCDD, <sup>13</sup>C-2,3,7,8-TCDF, <sup>13</sup>C-OCDF) saponification with KOH/EtOH (1N) at room temperature, partition with concentrated sulfuric acid, alumina column chromatography and finally fractionated by reverse phase HPLC. The average concentration of 2,3,7,8-TCDD in Japanese mother milk was 5.3 ppt on fat basis.

For determining chlorodibenzodioxins and chlorodibenzofurans in natural water, efficient extraction method is necessary since their concentration is often extremely low. An automated liquid/liquid extractor is used in our laboratory for this purpose. 200 liter water sample was extracted in three days into 150 ml hexane and the hexane layer which is concentrated to 100 μl by evaporation. By the procedure, concentration up to two million folds was possible. The method exhibits recovery of 78.2% for monochlorodibenzofuran. The extraction coupled with high resolution GC/MS will make it possible to determine sub-ppq level of these contaminants.

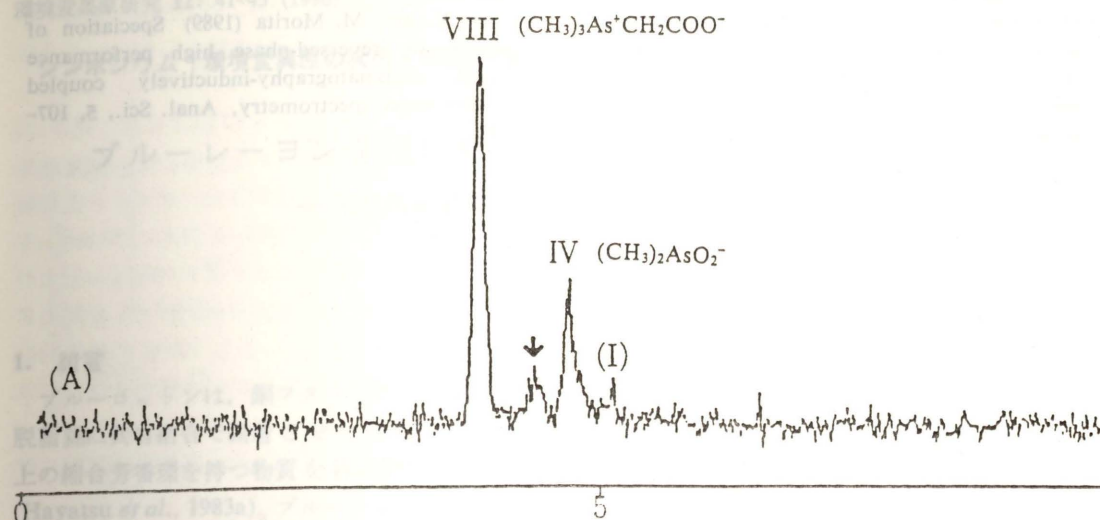


Fig. 4. Chromatogram human urine after eating fish. An Arrow indicates interference by chloride.

### 3. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Coupled with HPLC

Recently developed inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS) is the most sensitive determination of elements with multi-elemental capability. After the first announcement of commercial instruments in 1984, the instruments are improved rapidly in sensitivity. The recent commercial instrument (1989-1990) has the capability of detecting sub-ppt level of element in water. The high sensitivity is making it possible to determine elements in very small samples such as biopsy samples or isolated cell samples. When ICP-MS is coupled to a separation method, chemical species of each element can be determined with high sensitivity. The high sensitivity of ICP-MS coupled with high performance liquid chromatography (HPLC-ICP-MS) has been applied to chemical speciation of several elements including arsenic.

Arsenic is a ubiquitous but toxic elements with metalloid property. Its chemistry is complex and there are many different compounds in both inorganic and organic form. In water and air, it is usually present in the form of pentavalent or trivalent inorganic arsenic, the latter form being considered to be carcinogenic. On the other hand, marine organisms are known to accumulate arsenic in organic form, such as arsenobetaine, arseno-

sugars, and arsenolipids. For the understanding of the toxicological significance of the element, it is necessary to know the chemical form of the element and to determine each chemical species.

Arsenic species were determined by HPLC-ICP-MS. Fifteen arsenic compounds were separated on C-18 column with three different pH buffer solutions (Shibata and Morita 1989). Authentic samples are either synthesized or isolated from marine organism. Detection limits for individual arsenic species were 20-50 pg As. Fig. 4 shows chromatograms of human urine sampled after eating a fish. The major species are shown to be arsenobetaine.

### References

- NIH (1980a) Carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Cas No. 1746-01-6) in Osborne-Mendel rats and B6C3F1 mice (gavage study), National Toxicology Program Technical Report Series No. 209.
- NIH (1980b) Carcinogenesis bioassay of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Cas No. 1746-01-6) in Swiss-Webster mice (dermal study), National Toxicology Program Technical Report Series No. 201.
- NIH (1980c) Bioassay of a mixture of 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin and 1,2,3,7,8,9-hexachlorodibenzo-p-dioxine (gavage) for possible carcinogenicity, National Cancer Institute Car-



cinogenesis Technical Report Series No. 198.  
NIH (1980d) Bioassay of a mixture of 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin and 1,2,3,7,8,9-hexachlorodibenzo-p-dioxine (dermal study) for possible carcinogenicity, National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series

No. 202.  
Shibata Y. and M. Morita (1989) Speciation of arsenic by reversed-phase high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, Anal. Sci., 5, 107-109.

環境変異原研究 12: 41-45 (1990)

## シンポジウム「環境変異原の検出・曝露評価の現状と問題点」

### ブルーレーヨンを用いた河川水の変異原性モニタリング法

——淀川水系中の変異原物質について——

岡山大学 薬学部 阪本 博, 早津彦哉

お本報告は、別途に英文による原報を出版してある (Sakamoto and Hayatsu, 1990)。

#### 1. 緒言

ブルーコットンは、銅フタロシアニン誘導体を脱脂綿に共有結合で固着させたもので、3 環以上の縮合芳香環を持つ物質を特異的に吸着する (Hayatsu *et al.*, 1983a)。ブルーコットンのこの性質を利用して、調理食品 (Hayatsu *et al.*, 1983b; Takahashi *et al.*, 1985) や煙草の煙 (Yamashita *et al.*, 1986) などから変異原性ヘテロサイクリックアミン類の抽出が行われている。またアヘンの加熱分解物中から新しいタイプの多環性変異原物質が、このブルーコットンの利用により単離されている (Friesen *et al.*, 1987)。

ブルーコットンによる河川水の変異原性モニタリングについては、岡山市を流れる旭川について行った結果を以前に簡単に報告している (Hayatsu *et al.*, 1983a)。その後もブルーコットンを利用した方法の有効性を確立するために、旭川におけるモニタリングを繰り返してきた。また、ブルーコットンを用いた海水の変異原性モニタリングも実施した (Kira *et al.*, 1989)。最近、この吸着剤の品質について改善を加え、より強力な吸着剤を開発した。すなわち、銅フタロシアニン誘導体を結合させる支持体としての脱脂綿をレーヨンに変えることによって、ブルーコットンの 2 倍から 3 倍の銅フタロシアニン誘導体を含有するブルーレーヨンをつくった (Hayatsu, 1990)。

この報告は、ブルーレーヨンを用いた河川水の変異原性評価を、阪神地方 1000 万人の飲料水の源である淀川水系について行ったものである。な

#### 2. 材料と方法

ブルーレーヨンはフナコシ薬品より購入した。このブルーレーヨンの銅フタロシアニン誘導体含有量は 25  $\mu\text{mol/g}$  である。ブルーレーヨン 0.5 g を入れた長さ約 20 cm のナイロンネット 6 本を木製の板に取付け、Fig. 1 に示したように河川水中に吊した。24 時間後にこのブルーレーヨンを回収し、蒸留水で洗い、ペーパータオルで水気を取った後、メタノール-濃アンモニア水 (50:1) 80 ml による溶出操作を 2 回繰り返した。2 回の溶出液を合わせ、減圧下で乾固させた後、その残渣

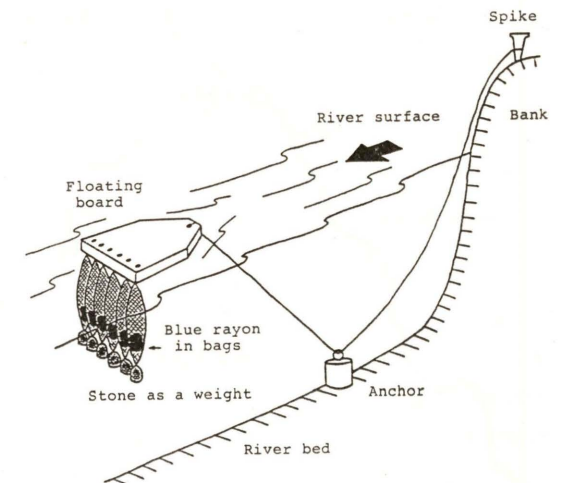


Fig. 1. Blue rayon hung in the river.

〒700 岡山市津島中 1-1-1

Use of Blue Rayon for Monitoring Mutagenicity of River Water. Mutagens in Yodo River  
Hiroshi Sakamoto and Hikoya Hayatsu  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima, Okayama 700, Japan



を少量のメタノールに溶かし、変異原性試験用の試験管に移した。メタノールを蒸発させた後、0.1 ml のジメチルスルホキシドに再溶解させ、変異原性試験を行った。

またこの一連の実験では、各調査地点の河川水を採取し、実験室でのブルーレーヨンによる抽出処理を行った。すなわち河川水 1 l にブルーレーヨン 0.5 g を投入し、30 分間静かに振とうした後ブルーレーヨンを取り出し、さらに新しいブルーレーヨン 0.5 g で抽出操作を繰り返した。この抽出処理を行ったブルーレーヨンを合わせ、前述と同様の方法で溶出処理を行った。この、河川水のバッチ処理による抽出処理条件は、尿中変異原物質の定量的抽出について以前に報告したのと同じである (Kobayashi and Hayatsu, 1984)。河川水の化学的酸素要求量 (COD) は、酸性過マンガン酸カリウム法で測定した (日本水道協会, 1985)。

変異原性試験は、*Salmonella typhimurium* TA 98 を用い、S9 mix 存在下プレインキューベージョ

ン法で行った (Yahagi *et al.*, 1977)。S9 は、PCB-54 (東京化成工業) を腹腔内投与したラットの肝臓から調製した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) には、長さ 10 cm のシリカゲルプレートを使用した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、ガスクロ工業製の逆相カラム-Inertsil ODS-10 (4.6×150 mm)-を用いて行った。溶離液にはアセトニトリルと水の混合溶液を使用し、流速は 1 ml/分、60 分間にアセトニトリル濃度を 30% から 100% に直線的に増加させ、流出液を 254 nm での吸光度測定でモニターした。2 ml ずつをフラクションコレクターで分取し、減圧下で乾固させ、変異原性試験に供した。

### 3. 結果および考察

ブルーレーヨンの吸着効果を見るために、以前にブルーコットンで高い変異原性を検出した岡山市の旭川河口部 (Hayatsu *et al.*, 1983a) におい

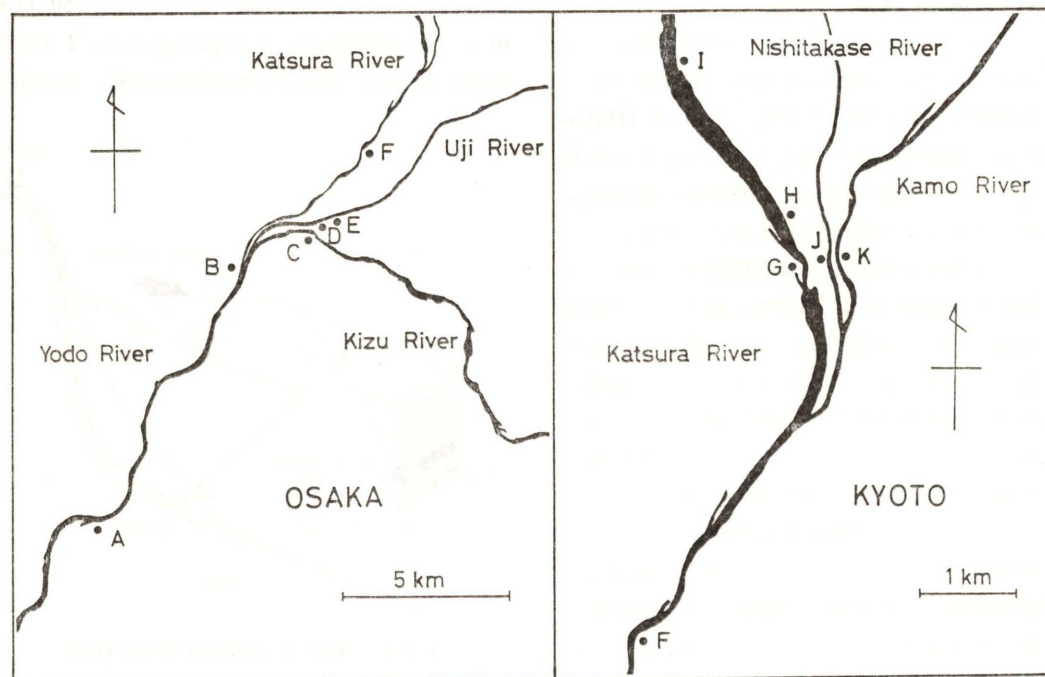


Fig. 2. Sites of monitoring in the Yodo river system. A, Hirakata-ohhashi, Osaka; B, Yamazaki, Osaka; C, Gokou-bashi, Kyoto; D, Gokou-bashi-shimo, Kyoto; E, Gokou-bashi-kami, Kyoto; F, Miyamae-bashi, Kyoto; G, Koga-bashi, Kyoto; H, Toba, Kyoto; I, Kuze-bashi, Kyoto; J, Tenjin-bashi, Kyoto; K, Kyokawa-bashi, Kyoto.

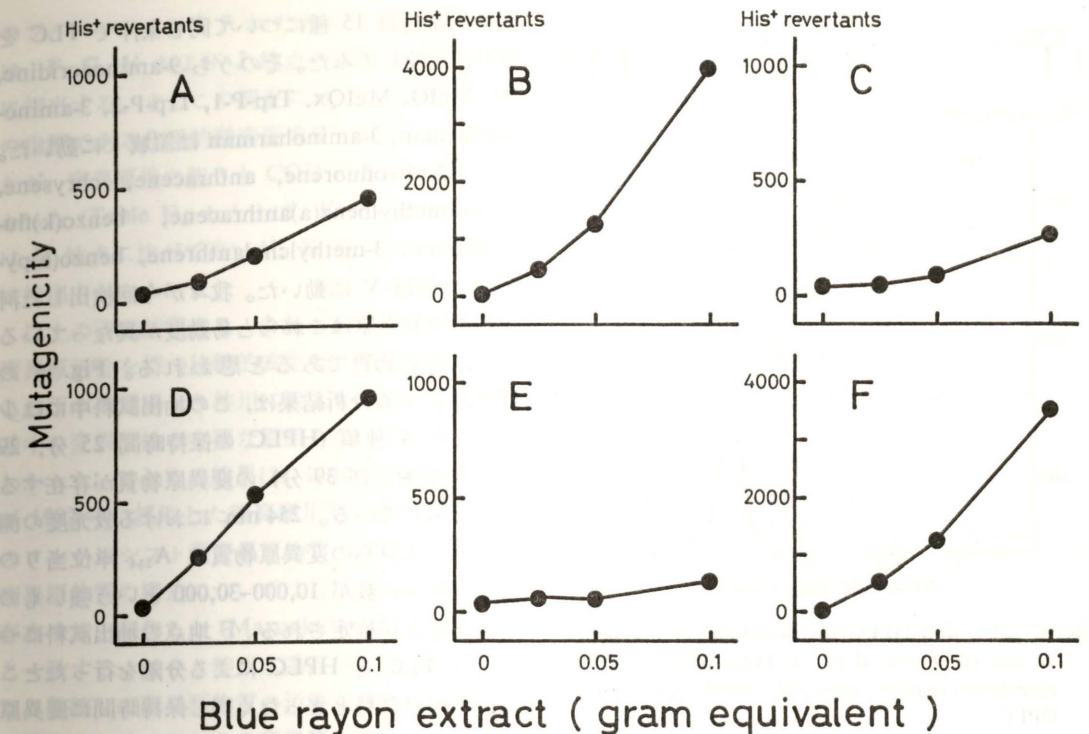


Fig. 3. Mutagenicity at sites A-F as detected by the blue-rayon hanging method. The monitoring was performed on February 2-3, 1988.

て、ブルーレーヨンと無染色レーヨンを並べて 2 日間河川水中に吊し、TA98、+S9 での変異原性を比較した。ブルーレーヨン 1 g での復帰コロニー数は 1,420 を示したが、無染色レーヨン 1 g での復帰コロニー数は 50 であった (ジメチルスルホキシドのみの復帰コロニー数は、 $30 \pm 5$ )。つまり、河川水からの変異原物質の回収に、ブルーレーヨンが非常に有効であることが確認された。水中からの変異原物質の回収条件をいろいろと検討した結果、前述の「材料と方法」に述べた条件、すなわちナイロンネットにブルーレーヨン 0.5 g を入れて 24 時間河川水中に吊す方法に決定した。

1988 年の 2 月に、このブルーレーヨン法による河川水の変異原性調査を関西地方の淀川水系の 6 地点 (A-F; Fig. 2 参照) で実施した。Fig. 3 に示したとおり、調査したすべての地点で有意な変異原性が検出され、その変異原性には、dose response が見られた。とくに、B 地点と F 地点では高い変異原性が検出されたが、これらの地点に

比較すると、その他の地点の変異原性はやや低いと言える。また B 地点で高い変異原性が検出されたのは、そのすぐ上に位置する桂川の影響を強く受けているためと思われる。さらに F 地点での変異原性調査を 1988 年の 8 月と 12 月に行ったところ、やはり高い変異原性が検出され、ブルーレーヨン 0.1 g 当りの復帰コロニー数は、8 月の調査では 1,000、12 月の調査では 5,000 であった。12 月調査においては、変異原物質の流入地点を明らかにするために、F 地点の上流部についても調査を行った。Table 1 にその 6 地点 (F-K) の調査結果を示した。桂川 G 地点の変異原性は F 地点より高く、G 地点のすぐ上流には京都市の下水処理場が位置していた。そこで、下水処理場の放水路 (H) にブルーレーヨンを入れたナイロンネットを吊し、放流水の変異原性を測定した。その結果、H 地点の変異原性が最も高く、またその 2 km 上流の I 地点での変異原性は非常に低いことがわかった。したがって、この下水処理場からの放流水が、淀川水系における変異原性の主要な



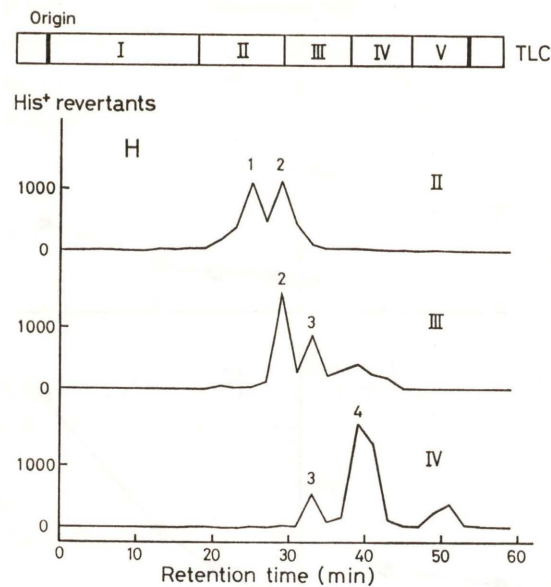


Fig. 4. TLC and HPLC fractionations of mutagens at site H. Zones II-IV of TLC, obtained from blue-rayon extract, were individually subjected to HPLC.

原因の一つと推定された。またこの下水処理場は西高瀬川にも処理水を放流しており、J 地点の変異原性の原因もこの処理場放流水によることが考えられる。

H 地点のブルーレーヨン抽出試料について、TLC と HPLC による分離を試みた。クロロホルム-メタノール (97:3) を展開溶媒とした TLC では、変異原性の高い部分は Rf 値 0.35-0.85 (II-IV 領域; Fig. 4 参照) にあった。そこで既知の多環

性変異原物質 15 種について同じ条件で TLC を行い、比較してみた。そのうち 9-aminoacridine, IQ, MeIQ, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2, 3-amino-norharman, 3-aminoharman は領域 I に動いた。また 2-nitrofluorene, anthracene, chrysene, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, benzo(k)fluoranthene, 3-methylcholanthrene, benzo(a)pyrene は領域 V に動いた。我々が今回検出した河川水中の変異原はこれらと易動度が異なっているため、他の物質であると思われる。Fig. 4 の HPLC による分析結果は、この抽出試料中には少なくとも 4 種類 (HPLC の保持時間 25 分, 29 分, 33 分および 39 分) の変異原物質が存在することを示している。254 nm における吸光度の測定から、これらの変異原物質は  $A_{254}$  単位当りの復帰コロニー数が 10,000-30,000 という強いものであることが推定される。F 地点の抽出試料についても TLC と HPLC による分離を行ったところ、H 地点試料とまったく同じ保持時間に変異原活性の高い分画が得られ、またその 4 つの分画の変異原活性の強さの割合も H 地点試料と同じであった (データ省略)。

この 12 月の調査では、それぞれの地点で採取した河川水についてブルーレーヨン抽出を行い、河川水中に吊す方法と比較してみた。Table 1 に示したように、採取した河川水 1 l について調べた変異原性の強さは、河川水中に吊した時の値によく対応しており、しかも河川水中に吊す方法がより効果的であることがわかる。すなわち 0.5 g

Table 1. Mutagenicity and chemical oxygen demand (COD) of the Katsura river water (December 19-20, 1988)

Site	Mutagenicity (no. of His <sup>+</sup> revertants per plate)				COD (mg/l)
	Hanging method			Batch method with 1 l water	
	0.025	0.05	0.1 (gE) <sup>a)</sup>		
F	808	2,400	5,000	2,500	8.5
G	1,900	4,200	6,100	2,600	7.6
H	2,800	5,700	11,400	3,600	9.9
I	39	52	86	256	4.0
J	864	1,800	2,600	1,700	16.8
K	48	43	69	40	13.2
Solvent control: 46, 40					

<sup>a)</sup> gE represents gram equivalent blue-rayon extracts.

のブルーレーヨンを入れたナイロンネット 6 本は、F, G, H および J 地点の河川水の 50-100 l に相当する。またこの調査においては、有機汚濁の指標である化学的酸素要求量 (COD) を測定したが、変異原性の強さと COD の値には相関がなかった (Table 1)。たとえば、K 地点の COD 値は H 地点に比べて高いが、K 地点には変異原性は検出されなかった。

以上の研究結果より、少なくとも 4 種類の強い変異原活性を持つ比較的安定な多環性化合物が、この下水処理場より桂川に流入しており、淀川水系中の変異原性の主要な原因となっていることがわかった。これらの結果は、以前に Maruoka らが 1982 年に採取した西高瀬川河川水中に 6 種類のフレームシフト型変異原物質 (Maruoka らは変異原物質の構造については言及していない) が存在すると報告した (Maruoka *et al.*, 1986) ことと一致する。つまり淀川水系河川水は、長年にわたり継続して変異原物質の汚染をうけていることが推察される。これらの変異原物質の本体を明らかにし、その由来を突き止めることが今後の課題である。

#### 4. 謝辞

この研究の一部は、日本生命財団の研究助成金の援助によってなされた。

#### 参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, **31**, 347-364.
- Friesen, M., I. K. O'Neill, C. Malaveille, L. Garren, A. Hautefeuille and H. Bartsch (1987) Substituted hydroxyphenanthrenes in opium pyrolysates implicated in oesophageal cancer in Iran: structures and *in vitro* metabolic activation of a novel class of mutagens, *Carcinogenesis*, **8**, 1423-1432.
- Hayatsu, H., T. Oka, A. Wakata, Y. Ohara, T. Hayatsu, H. Kobayashi and S. Arimoto (1983a)

Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine, *Mutation Res.*, **119**, 233-238.

Hayatsu, H., Y. Matsui, Y. Ohara, T. Oka and T. Hayatsu (1983b) Characterization of mutagenic fractions in beef extract and in cooked ground beef. Use of blue-cotton for efficient extraction, *Gann*, **74**, 472-482.

Hayatsu, H. (1990) Blue cotton: Broad possibility in assessing mutagens/carcinogens in the environment, In: G. Obe (Ed.), *Advances in Mutagenesis Research*, vol. 1, Springer Verlag, Berlin, pp. 1-26.

Kira, S., H. Hayatsu and M. Ogata (1989) Detection of mutagenicity in mussels and their ambient water, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **43**, 583-589.

Kobayashi, H. and H. Hayatsu (1984) A time-course study on the mutagenicity of smoker's urine, *Gann*, **75**, 489-493.

Maruoka, S., S. Yamanaka and Y. Yamamoto (1986) Isolation of mutagenic components by high-performance liquid chromatography from XAD extract of water from the Nishitakase river, Kyoto City, Japan, *Sci. Total Environ.*, **57**, 29-38.

日本水道協会 (1985) 上水試験方法 1985 年版, 東京都千代田区九段南 4-8-9, pp. 243-245.

Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo River system, Kyoto-Osaka, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 521-528.

Takahashi, M., K. Wakabayashi, M. Nagao, M. Yamamoto, M. Masui, T. Goto, N. Kinai, I. Tomita and T. Sugimura (1985) Quantification of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in beef extracts by liquid chromatography with electrochemical detection (LCEC), *Carcinogenesis*, **6**, 1195-1199.

Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*, *Mutation Res.*, **48**, 121-130.

Yamashita, M., K. Wakabayashi, M. Nagao, S. Sato, Z. Yamaizumi, M. Takahashi, N. Kinai, I. Tomita and T. Sugimura (1986) Detection of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in cigarette smoke condensate, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **77**, 419-722.



## 空気中の変異原の曝露評価

——計測法を中心に——

国立公衆衛生院 地域環境衛生学部 松下 秀 鶴

### 1. 緒 言

空気、水、食品は人間生存の基本要素であること、これらの中には数多くの発がん物質や変異原物質がそれぞれ極微量ずつ含まれ、これらががん・変異原物質の摂取ががんの発生と深く関わっていることは一般によく認められた事実である。

環境空気中からも、おびただしい種類のがん・変異原物質が検出されており、これらの種類は産業の発展や生活様式の多様化に伴って今後さらに増えつづけるものと推定されている。したがって、空気を介してどのような種類のがん・変異原物質をどの程度吸入しているかをすることは、当該物質群に対するリスクアセスメントやリスクマネジメントの一環として重要である。

従来、環境空気中のがん・変異原物質の調査・研究は、その他の環境媒体（水、食品等）の場合と同様に、特定の物質を除くと、個々の研究室で単発的に行われてきたため、がん・変異原物質による汚染実態や曝露状況に関して体系的知見に乏しい現状にある。しかも、経気道曝露実態の把握には、特に室内汚染の実態把握が必要であるが、この方面の知見は一般環境に関するものに比べてかなり少ない。しかしながら、近年、がん・変異原物質等に対する曝露評価の重要性が認識されるにつれ、室内空気や個人サンプラー試料を用いる曝露評価手法が開発され、試験的に実態調査に適用されつつある。云うまでもなく、これらの実態調査は化学的計測法と変異原性試験等の生物試験

法とを併用して行うことが望ましい。そこでここでは、空気中からどのような種類のがん・変異原物質が検出されているかを手短かに述べたのち、曝露評価手法に関する最近の知見を筆者らの研究成果を中心に述べることにする。

### 2. 空気中のがん・変異原物質

空気中のがん・変異原物質はガス・蒸気状のものと粒子状のものとに大別される。Table 1 は現在までに検出されたがん・変異原物質を化学構造別に分類し、各区分に属する代表的発がん物質類を例示したものである（松下, 1989a）。従来、大気中の発がん物質類の検索は粒子状のもの、すなわち浮遊粒子中に含まれるものを中心になされてきたが、最近ではガス・蒸気状のものも注目され、Table 1 に示す化合物のほか多種のがん・変異原物質の存在が明らかとなりつつある。

これらガス・蒸気状のがん・変異原物質のうち、ホルムアルデヒド等のアルデヒド類はメタノール車の導入問題との関連で今後重要度を増すものと思われる。また近年、有機ハロゲン化合物の使用は質・量ともに増大傾向にあり、これに伴う環境汚染が問題となっている。特に、Trichloroethane, Trichloroethylene 及び Tetrachloroethylene への個人曝露に及ぼす各環境媒体の寄与は空気 99.1%, 食事 0.8%, 飲料水 0.1% であったとの報告（鈴木ら, 1989）からも推察されるように空気の寄与が圧倒的である。このほか、ベン

〒108 東京都港区白金台 4-6-1

Human Exposure Methodologies for Airborne Carcinogens and Mutagens  
Hidetsuru Matsushita

Department of Community Environmental Sciences, National Institute of Public Health, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan



Table 1. 大気中の発がん物質類の化学構造別分類

分 類	代表的発がん物質
ガス・蒸気状発がん物質類	
炭化水素 (芳香族)	ベンゼン
アルデヒド	ホルムアルデヒド, アセトアルデヒド
ニトロ化合物	2-ニトロプロパン, 4-ニトロビフェニル, 2-ニトロフルオレンなど
ニトロソアミン	N-ニトロソジメチルアミン, N-ニトロソメチルエチルアミン, N-ニトロソジエチルアミンなど
有機ハロゲン化合物	塩化ビニル, 四塩化炭素, クロロホルム, トリクロロエチレン, テトラクロロエチレン, 1,2-ジクロロエタン, 塩化メチル, 臭化メチル, ヨウ化メチル, 二臭化エチレンなど
粒子状発がん物質類	
重金属類	クロム, ニッケル, ヒ素, カドミウム, アンチモン, ベリリウム
鉱物質	アスベスト
多環芳香族炭化水素	ベンゾ(a)ピレン, クリセネ, メチルクリセネ, ベンゾ(a)アントラセン, ベンゾ(b)フルオランテン, ベンゾ(j)フルオランテン, ベンゾ(k)フルオランテン, ジベンゾ(a,h)アントラセン, ジベンゾ(a,h)ピレン, ジベンゾ(a,e)ピレンなど
芳香族エポキシド	ベンゾ(a)ピレン-4,5-オキシド
アザヘテロ環式炭化水素	ベンゾ(c)アクリジン, ジベンゾ(a,h)アクリジン, ジベンゾ(a,j)アクリジン, カルバゾール, 7H-ジベンゾ(c,g)カルバゾールなど
芳香族ニトロ化合物	4-ニトロビフェニル, 2-ニトロフルオレン, 2,7-ジニトロフルオレン, 1-ニトロピレン, 4-ニトロピレン, ジニトロピレン(1,3-,1,6-,1,8-)など
ニトロソアミン	N-ニトロソピペリジン, N-ニトロソモルホリン, N-ニトロソノルニコチン
ヘテロサイクリックアミン	Trp-P-1, Trp-P-2
有機ハロゲン化合物	DDT, $\alpha$ -HCH, PCB, PBB, 2,3,7,8-TCDD などのダイオキシン類, 塩素化ジベンゾフラン類

ゼンも注目すべき物質であり、環境庁が行ったある工業地域に対するケーススタディによると個人リスクに対する寄与はベンゼンが最も大きいとしている (環境庁企画調整局, 1989)。また、米国カリフォルニア州 Santa Clara Valley の調査結果でも発がんリスクに対するベンゼンの寄与はその他のガス・蒸気状物質より大きいことが示されている (Hinman *et al.*, 1986)。このほか、ガス・蒸気状の発がん関連物質への曝露に対して室内汚染の影響が大きいことも指摘されている (Wallace *et al.*, 1987)。

一方、大気浮遊粒子に含まれるがん・変異原物質に関しては数多くの報告があり、その種類は数百種類にのぼるものと推定される (Sawicki, 1977; 松下, 1984, 1988; IARC, 1983, 1989; 日本芳香族工業会, 1978)。化合物の種類も Table 1 に示すように多岐にわたっている。これらは自然界起源、燃焼起源、化学工業等の産業起源のものと、大気中での化学反応によるものに分類することが出来る。これら粒子状のがん・変異原物質のう

ち、特に注目されているものは、アスベスト、多環芳香族炭化水素、芳香族ニトロ化合物、ニトロソアミン及び有機ハロゲン系の化合物である。

### 3. 曝露評価のための大気サンプリング

空気中のがん・変異原物質への曝露評価の1次近似は、一般に、大気中の当該物質のモニタリングデータを用いてなされている。我が国でモニタリングされている大気中のがん・変異原物質は Benzo[a]pyrene (BaP) のみである。このモニタリングも月に1~2回、1回24時間サンプリングした大気浮遊粉じんか、各季節に連続する6~7日間に採取した大気浮遊粉じんについてなされているにすぎない。一方、大気中の BaP などの多環芳香族炭化水素 (PAH: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons) は、Fig. 1 に例示するように、発生源の活動状況や気象条件などによって大きく変動するため、同じ月でも日によって大きく変動する (後藤ほか, 1982)。このため、前述のモニタリング結果から求めた BaP の年平均濃度推定値

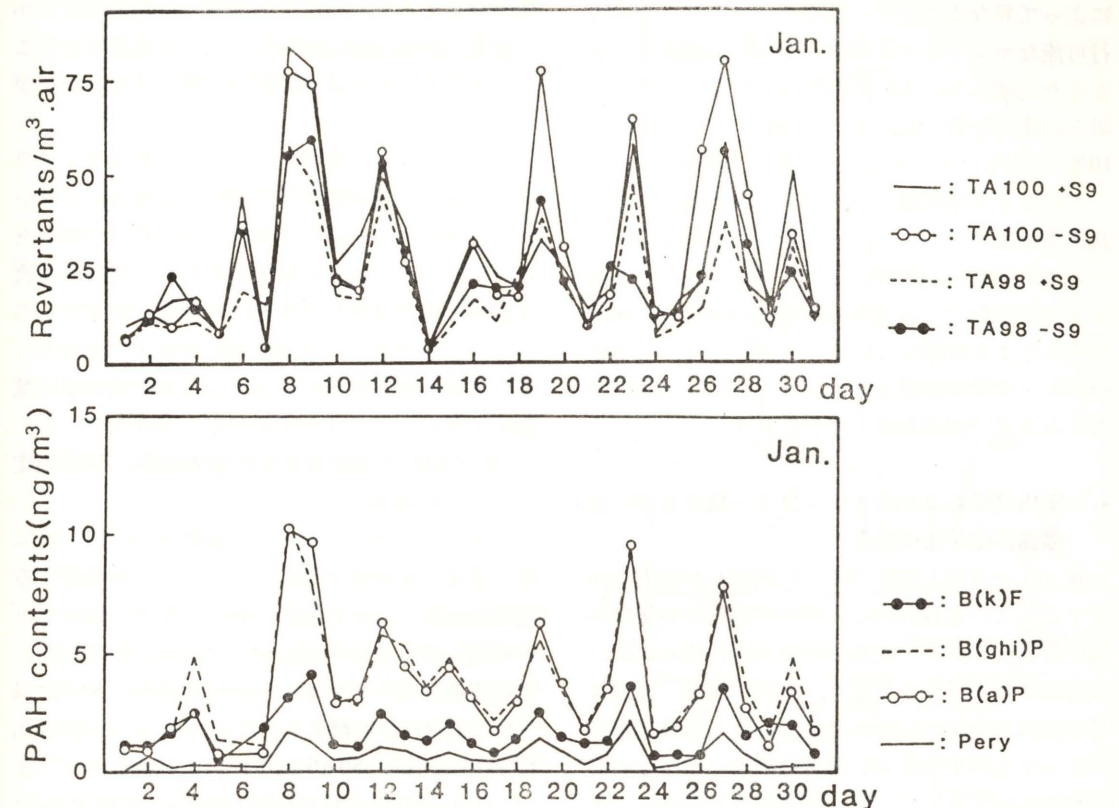


Fig. 1. 東京の大気浮遊粉じんの変異原活性と PAH 濃度の経日変動。

Table 2. サンプリングスケジュールが BaP の年平均推定値の精度におよぼす影響

サンプリング	通年測定値からのずれ	1 年間のサンプリング回数
従来のサンプリング		
月 1 回 (第 3 木曜)	29%	12
月 2 回 (第 1, 第 3 木曜)	18%	24
(第 2, 第 4 木曜)	22%	24
各季節連続する 6 日間	39%	24
(例, 1 月, 4 月, 7 月, 10 月)		
新しいサンプリング		
15 日間隔	7%	25

がどの程度の正確さを有するかが問題となる。

この事を明らかにするために、筆者らは国立公衆衛生院 (東京都港区) の屋上で15ヶ月間、連日、1回24時間ずつ大気浮遊粉じんを採取し (試料採取数 456, 欠測 14 日)、その中の PAH を測定し、それらの測定値をもとに通常のモニタリングによる年平均濃度推定値の正確さの検討を行った。

その結果の1例として、BaP についての結果

を Table 2 に示す。我が国の大気汚染測定網でのサンプリングスケジュール (月1回、第3木曜日) に基づいて得た BaP 年平均濃度は真の年平均濃度 (1年間の全測定値の平均値) から約30%の偏りを示し、月2回 (木曜日) のサンプリングからの値は約20%、各季節にそれぞれ1回ずつ、月~土曜の連続6日間サンプリングからの値は約40%の偏りを与えることを認めた。一方、BaP 濃度は人間活動に大きく依存し、その活動は曜日



によって異なることや、長期モニタリングでの実行可能なサンプリング回数は年 25 回程度であることを考慮して、15 日間隔でサンプリングした場合の検討を行った結果、真の値からの偏りは約 10% となることが判った (松下, 1989a)。

このような等間隔モニタリングの有効性はガス状汚染物質のモニタリングに対しても認められている (井上ほか, 1980)。また、Fig. 1 に示すように大気浮遊粉じんの変異原性の経日変動は PAH のそれとよく類似している。したがって、大気中のがん・変異原物質のモニタリングには等間隔間欠モニタリングが有効と考えられる。

#### 4. 室内試料および個人サンプラー試料を用いる曝露評価手法の開発

我々は一日の大部分 (21~22 時間) を室内空間で過ごしている (森ほか, 1986)。室内の空気は外気に含まれるがん・変異原物質の室内流入によって汚染されるばかりでなく、喫煙、暖房、調理などの室内発生源から放出されるがん・変異原物質によっても汚染される。後者の影響は密閉度の高い空間に於て著しく、例えば東京の冬期の室内中の  $\text{NO}_2$  濃度は外気の濃度と無相関となるばかりでなく、その濃度は外気濃度よりかなり高いことなどが知られている (森ほか, 1986)。また、一日の日常生活は種々の室内空間で営まれ、各空間の汚染状況はそれぞれ異なったレベルにある。したがって、がん・変異原物質への曝露状況をより正

確に推定するためには、各種室内の汚染測定値から推定したり、個人にサンプラーを携帯させることにより得られた試料の値から推定することが望ましい。

しかしながら、室内サンプラーや個人サンプラーから得られる浮遊粒子の量は、大気サンプリングから得られる浮遊粒子の量の 1/50~1/1000 と少ないため、これらの試料中のがん・変異原物質を測定するには新たに高感度計測法を開発する必要がある。筆者らはこの目的に合致する方法として、PAH 高感度自動分析法と高感度変異原性試験法を開発し、若干の環境測定に適用している。

##### (1) PAH 高感度自動分析法の開発と環境測定への適用

室内試料や個人サンプラー試料を得るためには、まず、低騒音で小型のサンプラーを開発する必要がある。この目的のために、筆者らはメーカーの協力のもとに 3 種のサンプラー、すなわち、室内用低騒音サンプラー (5~25 l/min, 50 dB 以下)、室内用浮遊粒子分級サンプラー (20 l/min, 13 段階に分級, 50 dB 以下) および個人サンプラー (1.0~2.0 l/min, 重量約 500 g) を開発した (Matsushita *et al.*, 1990a)。そして、これらのサンプラーによって得られる数十~数百  $\mu\text{g}$  の浮遊粒子中の PAH を多成分自動分析する方法を開発した (田辺ほか, 1987; Matsushita *et al.*, 1990a, 1990b)。

Fig. 2 は PAH 多成分自動分析法の概念図を示

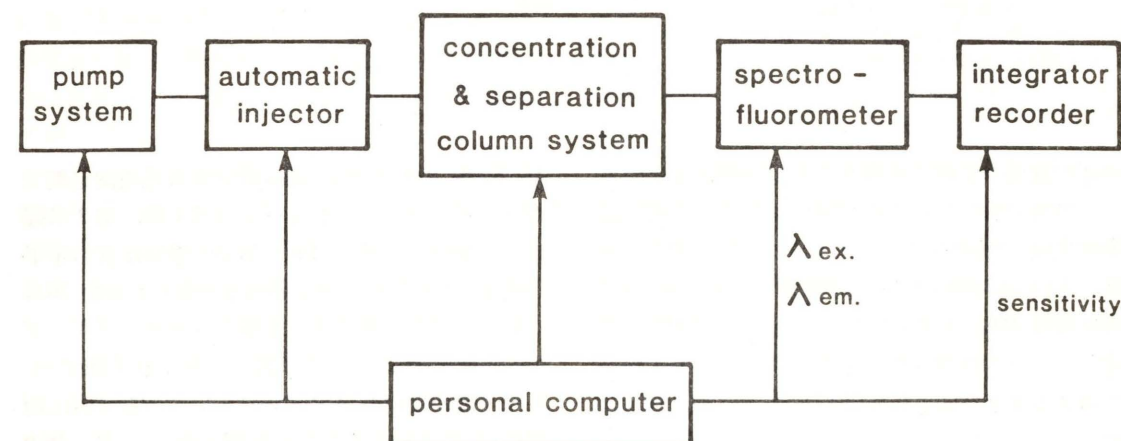
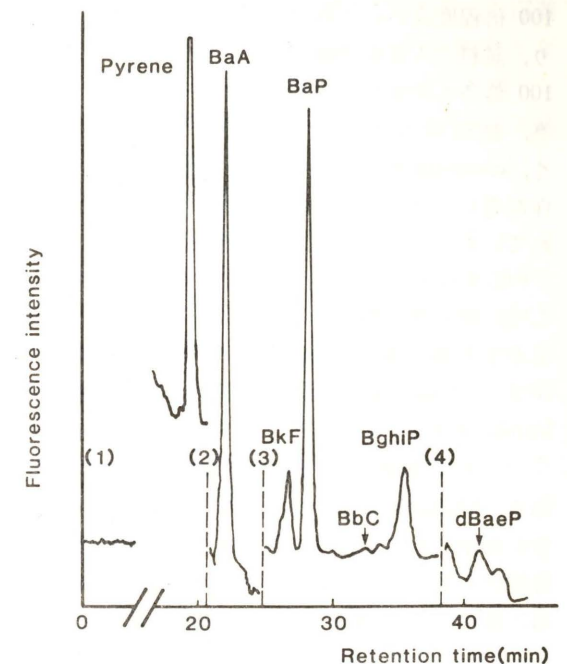


Fig. 2. PAH 多成分自動 HPLC の概念図。

したものである。室内試料等に含まれる PAH は超音波抽出法により抽出され、抽出液を Fig. 2 の automatic injector の部分にセットする。これらの抽出液は約 50 分に 1 回の割合で自動的に濃縮カラムに移され、そこで PAH を濃縮すると同時に、分析妨害物質を除去。次に、濃縮された PAH を分析カラムに移し、ここで PAH を各成分に分離し、分光蛍光光度計で検出し、インテグレーターで定量する。各 PAH の検出はそれぞれの PAH に最適の励起、蛍光波長で行われ、また、PAH を分離分析している間に濃縮カラムを洗浄して次の分析にそなえる方式となっている。これらはすべてパーソナルコンピュータで制御される。1 回の分析時間は約 50 分で、通常、7 種類の PAH が定量出来る。

Fig. 3 は本法で室内浮遊粒子中の PAH を分析した場合の 1 例を示したものである。4 種の発がん物質 [benz(a)anthracene (BaA), benzo(k)fluoranthene (BkF), benzo(a)pyrene (BaP), dibenzo(a,e)pyrene (dBaP)] と 2 種の cocarcinogen [pyrene, benzo(ghi)perylene (BghiP)] のほか、変異原性を示す benzo(b)chrysene (BbC) が検出、定量されることが判るであろう。

本法の実用上の感度は在来の HPLC より 50~



Excitation and emission wavelengths  
 (1) 339.0 (nm) and 373.0 (nm)  
 (2) 292.0 (nm) and 412.0 (nm)  
 (3) 370.0 (nm) and 406.0 (nm)  
 (4) 305.0 (nm) and 398.0 (nm)

Fig. 3. 室内浮遊粉じん中 PAH の高速液体クロマトグラム。

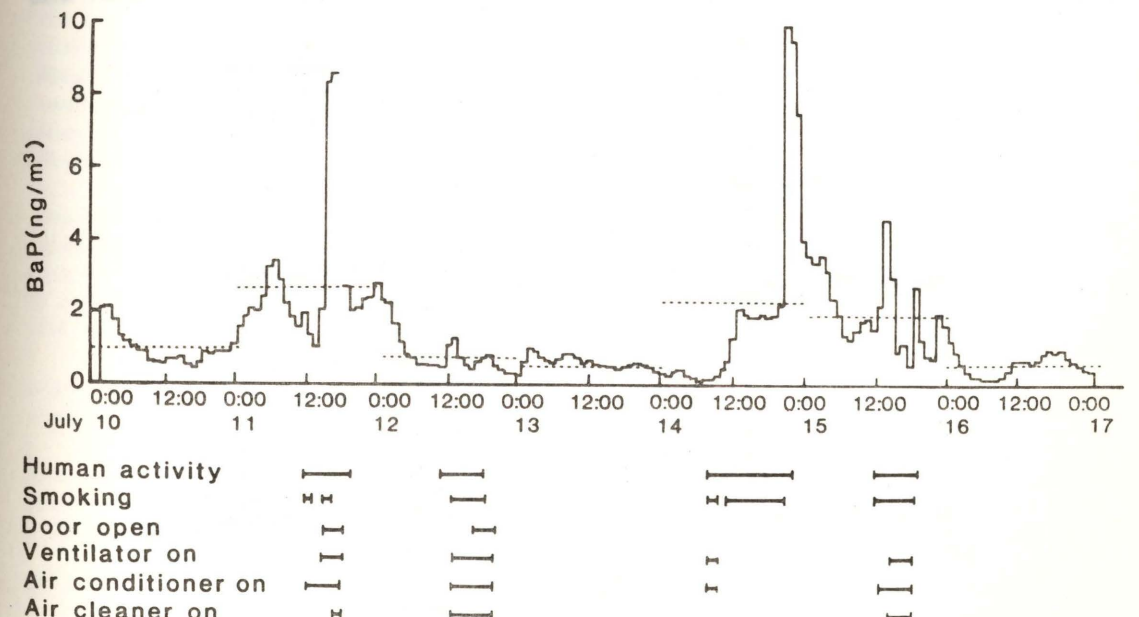


Fig. 4. 喫煙室内の benzo[a]pyrene の経時変動。



100 倍程度高い。これは濃縮カラムの導入により、試料注入量を 500  $\mu$ l 程度と在来法より 50~100 倍多くすることが出来たことによる。この為、抽出液の濃縮操作が不要となるばかりでなく、clean-up 操作もオンライン化したため分析操作が著しく簡略化された。また、本法は自動化されているため、昼夜連続稼動が可能である。

Fig. 4 は本法の室内汚染調査への適用の 1 例として、喫煙者の個室（気積：約 67 m<sup>3</sup>）で浮遊粉じんを 1 時間間隔で採取（サンプラー： $\beta$  線サンプラー、1 回の採取時間：55 分、空気吸引量：15 l/min）することを 1 週間行い、得られた 144 サンプル中の BaP を分析した結果を示したものである（Matsushita *et al.*, 1990c）。Fig. 4 から、室が密閉された条件下で喫煙すると BaP 濃度は急激に上昇するが、換気扇やドアが開放されていると喫煙による BaP 濃度の上昇はあまり大きく

ないことなどが判る。また Fig. 4 中の点線は一日平均濃度を示したものであるが、喫煙日と非喫煙日の BaP 日平均濃度の相異は 2~4 倍程度とその他の室内調査結果（Matsushita *et al.*, 1990a）と類似していた。しかし、喫煙の前と後の室内の BaP ピーク濃度は最高 90 倍も変化した。副流煙中には多種のがん・変異原物質等が含まれている。これらの事実は高濃度のがん・変異原物質への反復曝露の健康影響についても配慮する必要性を強く示唆している。

## (2) 高感度変異原性試験法の開発とその環境評価への適用

Ames 法は大気浮遊粉じんの変異原性を調べるのにすぐれた方法であり、広く使用されている（Alfheim *et al.*, 1983; Alink *et al.*, 1983; Chrisp *et al.*, 1980; 後藤ほか, 1982; Kolber *et al.*, 1980; 大江, 1982; Pitts, Jr. *et al.*, 1982;

Tokiwa *et al.*, 1983; Watts *et al.*, 1988）。しかし本法は、都市大気でも少なくとも 400 m<sup>3</sup> の空気吸引によって得られた浮遊粒子試料を必要とするため、室内試料や個人サンプラー試料には適用出来ない。そこで、筆者の研究室では米国 EPA 健康影響研究所と協力して高感度変異原性試験法の開発につとめ、現在までに次の 3 方法の開発を行った。

その第 1 は *Salmonella typhimurium* strain TM 677 を用いる micro-forward mutation 法であり（Lewtas *et al.*, 1987; 高木ほか, 1988）、20 l/min で 24 時間サンプリングした室内浮遊粉じんの変異原性を測定出来る。第 2 の方法は最近、国立衛生試験所で開発されたニトロアレーンやアミノアレーン高感受性菌株、*Salmonella typhimurium* Strains YG1024, YG1029（Watanabe *et al.*, 1989）を用いる micro suspension 法（Goto *et al.*, 1989, 1990）である。この高感受性菌株は大気浮遊粉じんに対して TA100 株や TA98 株より数倍高い感度を有し、かつ、その変異原性は TA100, TA98 株のそれと良好な相関性を有している（松下ほか, 1989b）。また、micro suspension 法は通常の Ames 法より約 10 倍高い感度を有している（Kado *et al.*, 1983, 1986, 1990）。このため、本法は Ames 法より数十倍高感度となり、室内サ

ンプラー（20 l/min）で 8 時間ごとに採取した浮遊粒子試料の変異原性を測定することが可能となる。本法を勤務時間中の室内汚染調査に適用した結果、喫煙室は非喫煙室より一般に変異原性が高く、変動幅も大きいことなどが判明している（Goto *et al.*, 1989, 1990）。

第 3 の方法は第 1 の方法のプレインキュベーション操作をさらにマイクロ化した ultramicro forward mutation 法である。Fig. 5 にその操作の概要を示す。本法は micro forward mutation 法より約 10 倍、Ames 法より約 100 倍、実用的感度が高い（高木ほか, 1989）。このため浮遊粒子の採取に必要な最小空気吸引量は約 3 m<sup>3</sup> となり、個人サンプラー試料の変異原性の測定が可能である。

Fig. 6 は本法の適用の 1 例として、喫煙者および非喫煙者に個人サンプラーを携帯させ、得られた浮遊粒子の変異原性を測定した結果を示したものである。この図から、変異原への被曝度は、1 日 10 本喫煙者 > 6 本喫煙者 > 受動喫煙者 > 非喫煙・非受動喫煙者の順になることが判る（Matsushita *et al.*, 1990c）。現在、上記 3 方法は、Ames 法と較べて、試験操作がやや煩雑であり、熟練度が要求されるが、今後さらに高感度で簡易な変異原性試験法が開発される可能性が高いことを考え

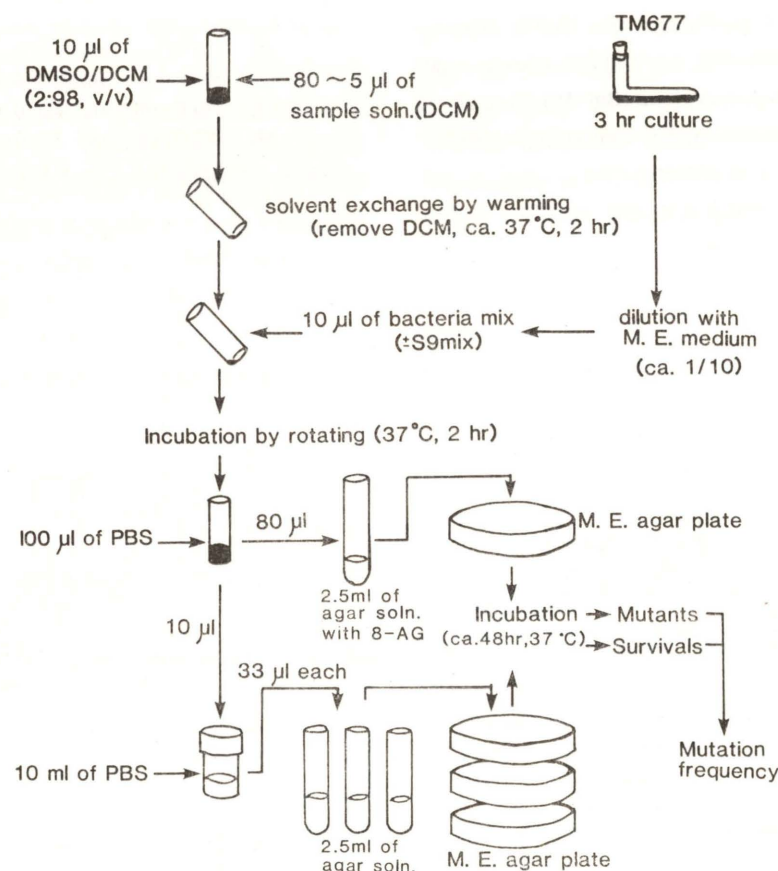


Fig. 5. Ultramicro forward mutation 法の模式図。

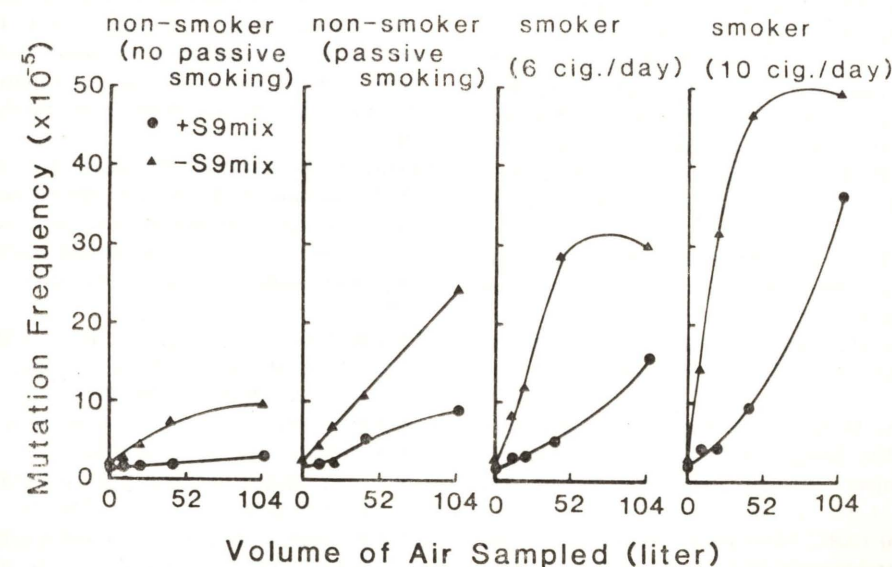


Fig. 6. 個人サンプラーで捕集された浮遊粉じんの変異原性。



ると、変異原性を指標とする曝露モニタリングが行われるようになる日も遠くないように思われる。

## 5. 結 言

がん・変異原物質への曝露評価は、当該物質群に対するリスクアセスメントの一環として重要であるばかりでなく、主要発生源の同定や高濃度曝露群の検出にも重要である。現在、空気中のがん・変異原物質への曝露評価手法は化学計測法、生物試験法とも十分、開発されているとはいえない。しかし、曝露評価に対する関心が急激に高まりつつあることを考えるとき、評価方法も急速に発達、普及し、曝露実態に対する知見も集積され、がん一次予防対策のための有益な基礎資料として活用されるようになるものと考えられる。

## 参 考 文 献

- Alfheim, I., G. Löfroth, M. Moller (1983) Bioassay of extracts of ambient particulate matter, *Environ. Health Persp.*, **47**, 227-238.
- Alink, G. M., H. H. Smit, J. J. van Houdt, J. R. Kolkman, J. S. M. Boleij (1983) Mutagenic activity of airborne particulates at non-industrial locations, *Mutation Res.*, **116**, 21-34.
- Chrisp, C. E., G. L. Fisher (1980) Mutagenicity of airborne particles, *Mutation Res.*, **76**, 143-164.
- 後藤純雄, 加藤幸彦, 折井章子, 田中一幸, 久松由東, 松下秀鶴 (1982) 大気浮遊粉じんの変異原性の経日変動, *大気汚染学会誌*, **17**, 295-303.
- Goto, S., O. Endo, J. Lewtas, H. Matsushita (1989) Micro suspension assay using a new *Salmonella typhimurium* strain for the evaluation of mutagenicity of airborne particulates indoors, *Abstracts of the International Conference on Genetic Toxicology of Complex Mixtures*, Washington, D.C., p. 29.
- Goto, S., Y. Takagi, O. Endo, J. Lewtas, H. Matsushita (1990) Highly sensitive bioassay for evaluating airborne mutagens indoors, *Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, Tronto, Vol. 2, pp. 163-168.
- Hinman, K., D. Schwartz, E. Soffer (1986) Santa Clara Valley Integrated Environmental Management Project, Revised Stage One Report, US EPA, pp. 1-37.
- IARC (1983) IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Polynuclear aromatic compounds, Part 1, *Environmental and experimental data*, Vol. 32, IARC, Lyon, pp. 1-451.
- IARC (1989) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, Diesel and gasoline exhausts and some nitroarenes, Vol. 46, IARC, Lyon, pp. 41-78.
- 井上力太, 私市和俊, 渡辺有治, 奥山信孝 (1980) 等間隔間欠サンプリング法による大気汚染評価について, *大気汚染学会誌*, **15**, 254-261.
- Kado, N. Y., D. Langley, E. Eisenstadt (1983) A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay: Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine, *Mutation Res.*, **121**, 25-32.
- Kado, N. Y., G. N. Guirguis, C. P. Flessel, R. C. Chan, K. Chang, J. Wesolowski (1986) Mutagenicity of fine (<2.5  $\mu$ m) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micro preincubation (micro suspension) procedure, *Environ. Mut.*, **8**, 53-66.
- Kado, N. Y., S. D. Colome, D. P. H. Hsieh, M. T. Kleinman, P. Jagues (1990) Indoor-outdoor and personal mutagenic activity associated with particles less than 10  $\mu$ m aerodynamic diameter (PM 10) in non-smokers' homes, *Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, Tronto, Vol. 2, pp. 305-310.
- 環境庁企画調整局 (1989) 総合化学物質対策検討調査—総合化学物質管理手法基礎調査, 昭和 63 年度環境庁委託業務結果報告書, pp. 36-42.
- Kolber, A., T. Wolf, T. Hughes, E. Pellizzari, C. Sparacino, M. Waters, J. L. Huisinigh, L. Claxton (1980) Collection, chemical fractionation and mutagenicity bioassay of ambient air particulate, IN: Waters, M. D., S. S. Sandhu, J. L. Huisinigh, L. Claxton, S. Nesnow (Eds.), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures*, II, Plenum Press, New York, pp. 21-43.
- Lewtas, J., S. Goto, K. Williams, J. C. Chauang, B. A. Peterson, N. K. Wilson (1987) The mutagenicity of indoor air particulates in a residential pilot field study: Application and evaluation of new methodologies, *Atmos. Environ.*, **21**, 443-449.
- 松下秀鶴 (1984) 大気と発癌, IN: 新しい発癌のメカニズムと評価, 林 裕造, 黒木登志夫 (編), サイエンスフォーラム, 東京, pp. 380-411.
- 松下秀鶴 (1988) ニトロアレーン類の環境分布および被曝量の推定, IN: 大気汚染物質のレビュー; ニトロアレーン, 昭和 62 年度環境庁委託業務結果報告書, 日本科学技術情報センター, pp. 199-236.
- 松下秀鶴 (1989a) 空気中のがん・変異原物質とその曝露評価手法の進歩, *大気汚染学会誌*, **24**, 108-119.
- 松下秀鶴, 後藤純雄, 田辺 潔, 遠藤 治, 杉田和俊, 松下洋久, 石田雅久 (1989b) 沿道大気浮遊粉じんの変異原性ならびに若干の多環芳香族炭化水素および多環芳香族ニトロ化合物の含量, IN: ディーゼル排出ガス影響調査, 昭和 63 年度環境庁委託業務結果報告書, 結核予防会結核研究所, pp. 24-36.
- Matsushita, H., K. Tanabe, S. Goto (1990a) Highly sensitive methods for the evaluation of carcinogens and mutagens indoors, IN: H. Kasuga (Ed.), *Indoor Air Quality*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 371-382.
- Matsushita, H., K. Tanabe, M. Koyano, J. Laquindanum, C. Y. Lim-Sylianco (1990b) Automatic analysis for airborne polynuclear aromatic hydrocarbons indoors and its application to human exposure assessment, *Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, Tronto, Vol. 2, pp. 287-292.
- Matsushita, H., S. Goto, O. Endo, K. Tanabe, M. Koyano, Y. Takagi, M. Murata, J. Lewtas (1990c) Biological and chemical methodologies for assessing human exposure to airborne mutagens indoors, *Proceedings of the 5th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, Tronto, Vol. 2, pp. 225-230.
- 森 忠司, 吉川政雄, 松下秀鶴 (1986) NO<sub>2</sub> の個人被曝量に及ぼす各種生活空間の影響, *大気汚染学会誌*, **21**, 446-453.
- 日本芳香族工業会 (1978) 芳香族及びタール工業ハンドブック, 日本芳香族工業会, 東京, pp. 351-403.
- 大江 武 (1982) 大気浮遊粉じん中タールの突然変異原性に関する研究—*Salmonella typhimurium* TA98 および TA100 による年間を通じての測定結果, *日本公衛誌*, **29**, 261-272.
- Pitts, Jr., J. N., W. Harger, D. M. Lokensgard, D. R. Fitz, G. M. Scorziell, V. Mejia (1982) Diurnal variations in the mutagenicity of airborne particulate organic matter in California's south coast basin, *Mutation Res.*, **104**, 35-41.
- Sawicki, E. (1977) Chemical composition and potential genotoxic aspects of polluted atmospheres, IN: *Air Pollution and Cancer in Man*, IARC Scientific Publication IARC, Lyon, No. 16, pp. 127-157.
- 鈴木武夫, 齊藤行生, 松下秀鶴, 真柄泰基, 坂部美雄, 河村太郎 (1989) 生活環境における発がん関連物質への曝露実態の総合的把握と評価に関する研究, 昭和 63 年度対がん 10 年総合戦略プロジェクト研究報告書, 厚生省, pp. 73-76.
- 高木敬彦, 後藤純雄, 村田元秀, 松下秀鶴, J. Lewtas (1988) 室内空気浮遊粒子の変異原性測定への micro forward mutation 法の適用, *大気汚染学会誌*, **23**, 24-31.
- 高木敬彦, 後藤純雄, 郭 錦堂, 杉田佐和子, 村田元秀, J. Lewtas, 松下秀鶴 (1989) Ultramicro forward mutation 法を用いた微量室内空気浮遊粒子の変異原性, *大気汚染学会誌*, **24**, 244-251.
- 田辺 潔, 郭 錦堂, 今宮俊一郎, 松下秀鶴 (1987) カラム濃縮—高速液体クロマトグラフィー—分光蛍光法による極微量空気浮遊粒子中の PAH の分析, *大気汚染学会誌*, **22**, 334-339.
- Tokiwa, H., S. Kitamori, K. Horikawa, R. Nakagawa (1983) Some findings on mutagenicity in airborne particulate pollutants, *Environ. Mutagen.*, **5**, 87-100.
- Wallace L. A., E. D. Pellizzari, T. D. Hartwell, C. Sparacino, R. Whitmore, L. Sheldon, H. Zelon, R. Perritt (1987) The TEAM study: Personal exposures to toxic substances in air, drinking water and breath of 400 residents of New Jersey, North Carolina and North Dakota, *Environ. Res.*, **43**, 290-307.
- Watanabe, M., P. Einistö, M. Ishidate, Jr., T. Nohme (1989) Establishment and an application of new substrains of *S. typhimurium* highly sensitive to nitroarenes and aromatic amines, *Abstracts of the International Conference of Genetic Toxicology of Complex Mixtures*, Washington, D.C., p. 41.
- Watts, R. R., R. J. Drago, R. G. Merrill, R. W. Williams, E. Perry, J. Lewtas (1988) Wood smoke impact air: Mutagenicity and chemical analysis of ambient air in a residential area of Juneau, Alaska, *J. Air Pollut. Contr. Assoc.*, **38**, 652-660.



## 遺伝子工学的手法を用いた新しい サルモネラ指標菌株の開発

国立衛生試験所 変異遺伝部 能美健彦, 渡辺雅彦, Pirkko Einistö\*  
松岡厚子, 祖父尼俊雄, 石館 基

### 1. はじめに

「20 世紀は物理学の時代だったが, 21 世紀は生物学の時代になる。」これはアメリカ学士院会長フランク・プレス博士の言葉である。このような生物学への期待が, 1970年代から始まった分子生物学の飛躍的進歩を背景になされていることは言うまでもない。①DNA 塩基配列決定技術の進歩, ②ファージ, プラスミドを用いたベクターの開発, ③制限酵素の発見と利用に代表される数々の革新的な技術開発により“生物の設計図”と呼ばれる遺伝子 DNA 上の変化も, 今日では微生物, 高等生物を問わず分子レベルで解析することが可能になってきた。各種生物の遺伝子 DNA に対する化学物質の影響を調べる環境変異原の研究において, このような遺伝子操作技術が極めて有用であることは論を待たない。

我々は, *Salmonella typhimurium* TA1538 からニトロ還元酵素 (NRase), *O*-アセチル転移酵素 (*O*-ATase) の遺伝子をクローニングし, これら遺伝子を用いてニトロアレーンならびに芳香族アミンに対し特異的に高い感受性を示す TA100 および TA98 の新しい誘導株を開発してきた。以下に開発の経緯ならびに今後の展望について述べてい。

### 2. Complex mixture 中に含まれるニトロアレーンおよび芳香族アミンの変異原性検出

ニトロアレーンおよび芳香族アミンは, いずれも代表的な環境変異原のクラスであり, この中には微生物および哺乳類細胞に対して強い変異原性を示す化合物が少なくない (Weisburger *et al.*, 1988; Rosenkranz and Mermelstein, 1983)。変異原性を有するニトロアレーンとしては 2-nitrofluorene (2-NF), 1,8-dinitropyrene (1,8-DNP) をあげることができる。変異原性を示す芳香族アミンとしては 2-acetylaminofluorene (2-AAF), 2-aminonaphthalene, Glu-P-1 をあげることができる。こうしたニトロアレーンおよび芳香族アミン系の変異原は, 大気, 水, 食品, 尿などの complex mixture 中に存在していることが知られており, その動態を把握することは環境変異原研究の重要な一課題であると思われる (Rosenkranz and Mermelstein, 1983; Tokiwa and Ohnishi, 1986)。

Complex mixture 中に含まれるニトロアレーン, 芳香族アミンの変異原性検出には, 従来, *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 が汎用されてきた (Wang *et al.*, 1980; Pederson and Siak, 1981)。TA100 および TA98 は比較的感受性の高い菌株であるが, 環境中に実際に存在する微量の

〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Development of new derivatives of *Salmonella typhimurium* TA100 and TA98 highly sensitive to mutagenic nitroarenes and aromatic amines

Takehiko Nohmi, Masahiko Watanabe, Pirkko Einistö\*, Atsuko Matsuoka, Toshio Sofuni and Motoi Ishidate, Jr.

Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan

\* 現: Institute of Occupational Health, Topeliuksenkatu 41 a A, SF-00250, Helsinki, Finland



ニトロアレーン, 芳香族アミンの変異原性を検出するためには, 通常, 大量のサンプルの採取, 抽出が不可欠であり, より高い検出感度を有する指標菌株の開発が望まれていた。

### 3. 変異原性発現の律速因子であるニトロ還元酵素と O-アセチル転移酵素

ニトロアレーン, 芳香族アミンは直接 DNA に作用して変異原性を発現するわけではなく, 細胞内で代謝された後にその産物が DNA を攻撃することが知られている (Fig. 1)。2-NF はバクテリアの持つ NRase により N-水酸化体へ還元され, その後 O-ATase により活性化され, 最終的に生じたニトロニウムイオンが DNA を攻撃するものと考えられている (Weisburger, 1988)。一方, 芳香族アミンの 2-aminofluorene (2-AF) は微生物細胞の外でチトクローム P-450 などの酸化酵素により N-水酸化された後, N-水酸化体が微生物細胞内に入り, その後はニトロアレーンと同一の経路を経て DNA に作用する (Kato and Yamazoe, 1988)。実際 NRase 活性の低い TA98 NR 株では, 2-nitronaphthalene (2-NN), 2-NF, 1-nitropyrene (1-NP) に対する感受性が低下している (Rosenkranz and Mermelstein, 1983)。O-ATase 活性の低い TA98/1,8-DNP 株では, 2-NF, 1,8-DNP などのニトロアレーンだけでなく, 2-AF, 2,4-diaminoanisole, 2-aminoanthracene (2-AA) などの芳香族アミンに対する感受性も低

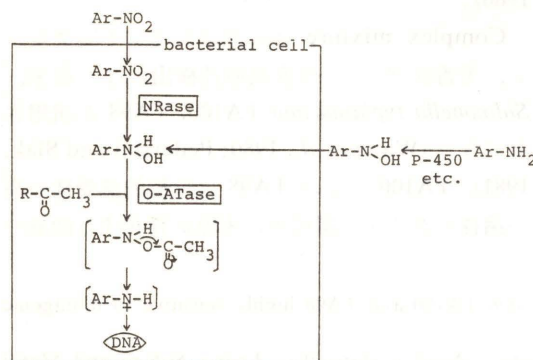


Fig. 1. *Salmonella typhimurium* 細胞内での芳香族ニトロ化合物ならびに芳香族ヒドロキシルアミンの代謝活性化経路。NRase, O-ATase はニトロ還元酵素, O-アセチル転移酵素をあらわす。

下していることが報告されている (McCoy *et al.*, 1983; Vance *et al.*, 1987)。

これらの結果から我々は, NRase はニトロアレーンの変異原性発現において律速因子として働いており, NRase を多量に発現する菌株はニトロアレーンに対し特異的に高感受性になるものと考えた。同様に, O-ATase はニトロアレーン, 芳香族アミン両者の律速因子として働いており, O-ATase を高度に発現している株はニトロアレーンおよび芳香族アミンの両者に対し高感受性を示し得るものと推測した。

そこで, *Salmonella typhimurium* TA1538 から NRase および O-ATase の遺伝子をクローニングし, それぞれの遺伝子を持つマルチコピープラスミドを, TA100 と TA98 へ導入することにより, ニトロアレーンおよび芳香族アミンに対し特異的に高感受性を示す指標菌株を作製することを試みた (Watanabe *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1990a)。

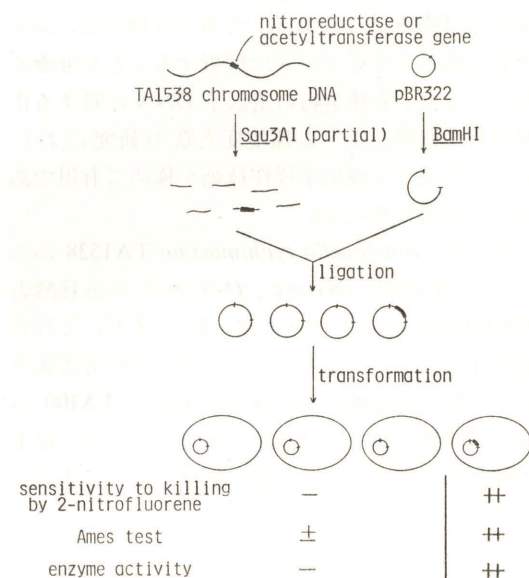


Fig. 2. *Salmonella typhimurium* TA1538 のニトロ還元酵素, O-アセチル転移酵素遺伝子のクローニング。pBR322 プラスミドを用いて作った遺伝子ライブラリーを TA1538NR 株あるいは TA1538/1,8-DNP 株へ導入し, 2-ニトロフルオレンに致死感受性を示す形質転換株を選択した。その後エームス試験, 酵素活性測定を行い目的の遺伝子がプラスミド上にある事を確認した。

### 4. ニトロ還元酵素遺伝子と O-アセチル転移酵素遺伝子のクローニング

NRase および O-ATase 遺伝子のクローニングは, これら酵素の欠損株である TA1538NR 株, TA1538/1,8-DNP 株の 2-NF に対する致死感受性を回復させる遺伝子を検索する方法によった (Fig. 2)。

まず TA1538 の染色体 DNA を抽出し, 制限酵素 *Sau* 3A1 で部分分解した後, *Bam*HI で開環した pBR322 プラスミドに連結し遺伝子ライブラリーを作製した。TA1538NR 株および TA1538/1,8-DNP 株は 2-NF の致死作用に対し抵抗性になっており, 2-NF (50  $\mu$ g/ml) を含む培地上で生育できるが, NRase 遺伝子と O-ATase 遺伝子を1コピー持つと考えられる TA1538 株は, この濃度の 2-NF を含む培地上では増殖できない。このことを利用し, TA1538NR 株と TA1538/1,8-DNP 株をライブラリー DNA で形質転換した後, 形質転換株を 2-NF (50  $\mu$ g/ml) を含む培地上にレプリカし, この培地上で増殖できなくなった形質転換株を選択した。選抜した形質転換株からプラスミド DNA を抽出し, 再度 TA1538NR 株あるいは TA1538/1,8-DNP 株を形質転換して, 再現性良く 2-NF に対し感受性を示す株を選抜した。更に 2-NF の変異誘発作用に対する感受性, 酵素活性を測定し, プラスミド上に NRase, O-ATase の遺伝子が存在することを確認した。

こうした方法により, NRase をコードしたプラスミド pYG111 を得た。pYG111 は 14.4 kb のプラスミドで, pBR322 由来の複製開始点と ampicillin 耐性遺伝子を持つ他に, 約 10 kb の TA1538 由来の染色体 DNA を持っていた。各種欠失変異体を用いた実験から NRase は pYG111 の 1.6 kb 領域に存在していることが判明した。TA100 および TA98 株はこの pYG111 と同じ ampicillin 耐性のプラスミド pKM101 を持っている。そこで, この 1.6 kb 領域を含む 6.85 kb フラグメントを別の pBR322 の *Pst*I site へサブクローニングし, tetracycline 耐性を持った pYG216 を作製した。pYG216 を TA98 と TA100 に導入し, 形質転換株を YG1021 および YG1026 と命名した。これらの菌株は, 親株である TA

1538 よりも約 50 倍高い nitrofurazone-nitroreductase 活性を示した。

同様に, O-ATase についてもその遺伝子を持ったプラスミド pYG122 を単離した。pYG122 は 11.65 kb のプラスミドで pBR322 由来の複製開始点と ampicillin 耐性遺伝子を持つほか, 約 7 kb の TA1538 由来の染色体 DNA を持っていた。各種欠失変異体を用いた実験から O-ATase は pYG122 の 1.35 kb 領域に存在していることが判明した。TA100 と TA98 へ導入するため, この 1.35 kb 部分を別の pBR322 の *Sca*I site へ導入し, tetracycline 耐性となったプラスミド pYG219 を作製した。この pYG219 を TA98 と TA100 へ導入し, 形質転換株を YG1024 および YG1029 と命名した。これらの菌株は, 親株である TA1538 よりも約 100 倍高い N-hydroxy-Glu-P-1 O-acetyltransferase 活性を示した。

### 5. ニトロアレーン, 芳香族アミンに対し特異的に高い感受性を示す YG1021, YG1026, YG1024, YG1029

上記の新たに開発した YG 株につき, 代表的な芳香族ニトロ化合物, 芳香族アミノ化合物および構造的にこれらと関連の無い変異原に対する感受性を調べた (Einistö *et al.*, 1991)。

Fig. 3A は, 変異原性を有する代表的な 6 種のニトロ化合物に対する YG 株の感受性を示したものである。YG 株の感受性は, nmol 当りの誘発復帰株数を計算し, TA98 あるいは TA100 の感受性に対する相対的な強さとして棒グラフの形で表してある。NRase 活性の増大した YG1021, YG1026, および O-ATase 活性の増大した YG1024, YG1029 は, TA98, TA100 に比べ 2-NF の場合で約 10 倍, 2-NN の場合で約 3 倍高い感受性を示した。また, 2,6-dinitrotoluene, 1-NP に対し, NRase 活性の増大した YG1021 は TA98 よりもそれぞれ 100 倍, 30 倍高い感受性を示し, O-ATase 活性の増大した YG1024 も約 10 倍高い感受性を示した。YG1024 は 1,8-DNP に対し TA98 よりも約 30 倍高い感受性を示したが, YG1021 は TA98 と同程度の感受性しか示さず, また, 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) に対して



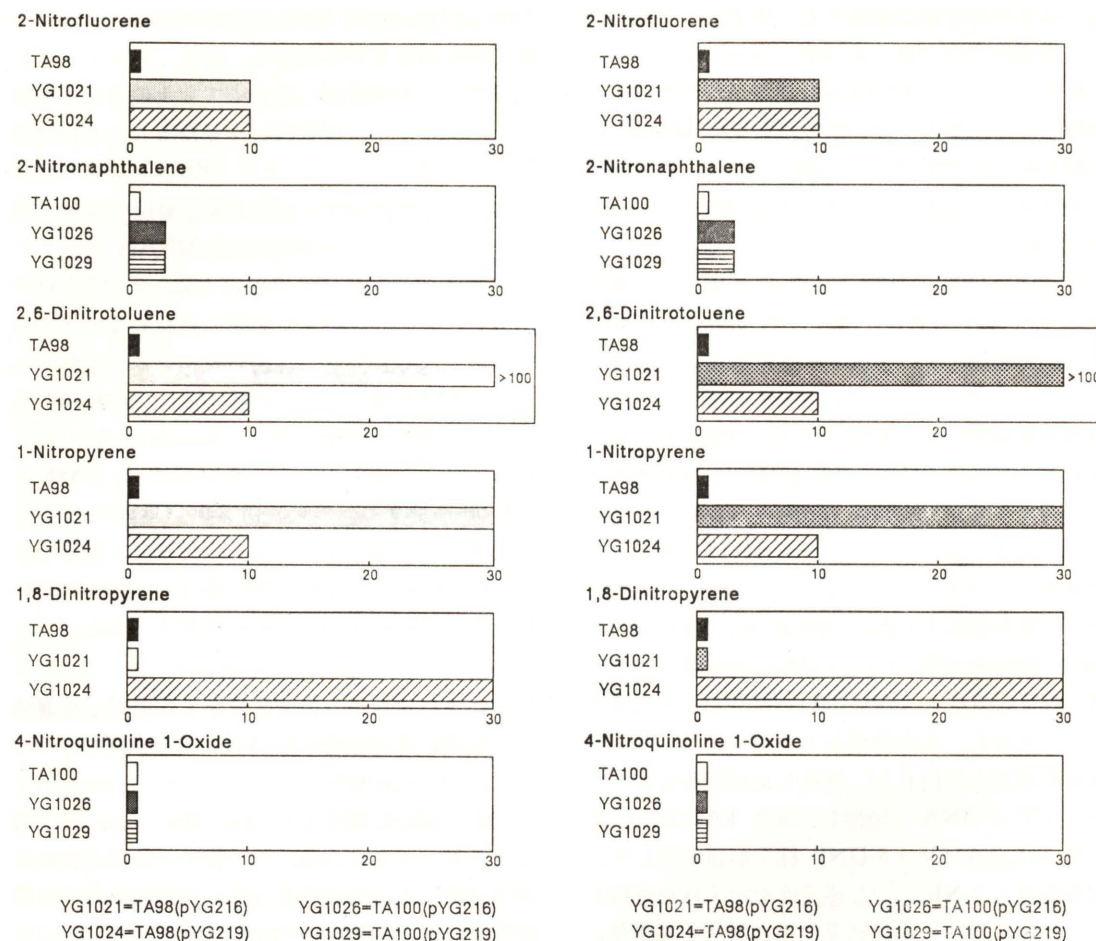


Fig. 3A.

Fig. 3B.

Fig. 3A. 代表的な6種の芳香族ニトロ化合物に対するYG株の感受性. 3B. 3種の芳香族アミン, 3種の芳香族ヒドロキシルアミンに対するYG株の感受性. 各菌株, 各化合物ごとに nmol 当りの誘発復帰株数を計算し, TA100 あるいは TA98 の値を 1 としたときの相対値として YG 株の感受性を示した.

は, YG1026, YG1029 とともに TA100 と同程度の感受性しか示さなかった. このことは, 1,8-DNP の還元, および 4-NQO の代謝活性化が, 他のニトロ化合物とは異なっていることを示唆している. 4-NQO の還元体である 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide については, 大腸菌の seryl-tRNA 合成酵素により活性化されるという報告がある (Tada and Tada, 1975). 現在我々は, 1,8-DNP の還元を触媒する酵素遺伝子の検索を進めている.

Fig. 3B は, 変異原性を有する3種の芳香族アミン, 及び3種の芳香族ヒドロキシルアミンに対

する YG 株の感受性を示したものである. YG 株の感受性は, 先ほどと同様に TA98, TA100 に対する相対的な値として棒グラフの形で示してある.

ニトロ基を持たないこれらの化合物に対し, NRase 活性の増大した YG1021, YG1026 は, TA98, TA100 と同程度の感受性を示したにすぎなかった. 一方, O-ATase 活性の増大した YG1024, YG1029 は TA98, TA100 よりも高い感受性を示し, その差は 2-AF で 30 倍, Glu-P-1 で 10 倍, 2-AA で 20 倍, N-hydroxyaminofluorene で 15 倍, N-hydroxy-Glu-P-1 で 5 倍, N-hy-

droxyphenetidine で 7 倍であった.

他のクラスの変異原に対する感受性を調べたところ, これら YG 株はアルキル化剤 (methylmethane sulfonate, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), 芳香族炭化水素 (benzo[a]pyrene) そして aflatoxin B<sub>1</sub>, 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene, lucidine 等のニトロアレーン, 芳香族アミンとは構造的に異なるクラスの変異原に対しては, 親株と同程度あるいはそれ以下の感受性しか示さなかった. このことから YG1021 および YG1026 はニトロアレーンに対して, YG1024 および YG1029 は芳香族ニトロ, アミノ化合物から生ずる芳香族ヒドロキシルアミンに対して, それぞれ特異的に高い感受性を示す指標菌株であるものと結論した.

## 6. 喫煙者の尿に含まれる変異原の高感受性検出

次に上記の YG 株を用い, 実際に complex mixture 中に含まれる変異原を高感受性に検出できるかを調べるため, 喫煙者および非喫煙者の尿に対する TA98, YG1021, YG1024 の感受性を比較した (Einistö *et al.*, 1990).

健康な成年男子から5人の喫煙者と5人の非喫煙者をつくり, 日を変えて2回 (500 ml×2) 尿を提供してもらい, それぞれのサンプルからブルーレーンを用いて変異原を抽出した (Hayatsu *et al.*, 1989). 抽出物は DMSO に溶解し, S9 mix の存在下で TA98, YG1021, YG1024 を用い変異原性試験を行った. Fig. 4 に示すように, O-ATase 活性の増大した YG1024 は, 喫煙者の尿中変異原に対し YG1021 や TA98 よりも約7倍高い感受性を示した. この結果から ①YG1024 が尿に含まれる変異原の高感受性検出に有効であること, ②喫煙者の尿中には芳香族アミン系の変異原が存在していることが示された. YG1024 は河川水中に含まれる変異原の検出にも有効であることが報告されている (後藤ら, 1989).

## 7. ニトロ還元酵素遺伝子の塩基配列

次に我々は, これら高感受性株の分子の基礎を明らかにするためにクローン化した NRase, O-ATase 遺伝子の塩基配列を決定した.

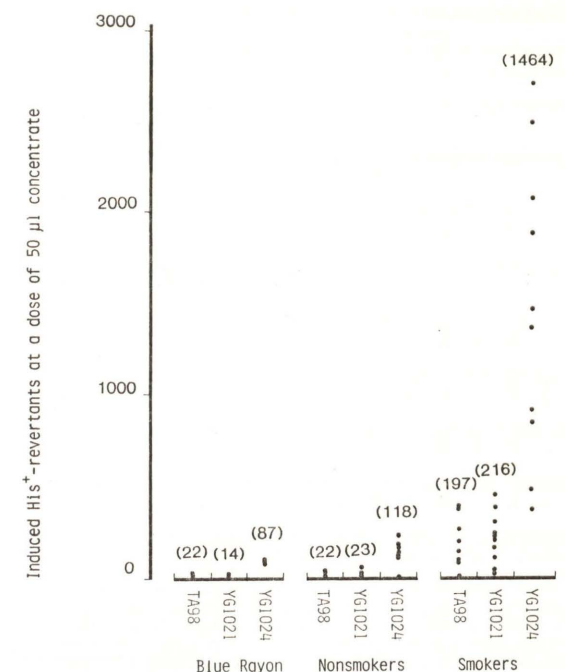


Fig. 4. 喫煙者および非喫煙者の尿中変異原に対する YG1024, YG1021, TA98 の感受性の比較. 喫煙者, 非喫煙者とも濃縮物 50 µl は 42.5 ml の尿に相当する. "Blue Rayon" は, ブルーレーン (1 g) を蒸留水 500 ml で抽出し, 尿のサンプルと同様に処理して得た濃縮物をあらわす. 図中の黒丸は, 各菌株, 各サンプルごとの濃縮物 50 µl 当りの誘発復帰株数を表し, 括弧内の数字はその平均値 (18-20 プレート) を表す.

Fig. 5 は pYG111 にコードされた NRase 遺伝子の塩基配列と, 予想されるアミノ酸の配列を示したものである (Watanabe *et al.*, 1990b). 塩基配列を決定した 1,690bp 領域には 651 ヌクレオチドからなる open reading frame が存在し, NRase は 217 個のアミノ酸によって構成された分子量 23,955 ダルトンの蛋白質と予想された. この分子量は, マキシセル法を用いて測定したタンパク質の分子量 (28 kDa) とよく一致した. open reading frame の前後には -35, -10, Shine-Dargano signal そして rho-independent 転写終結シグナルが見出された. NRase の生理的役割を知る為, NRase のアミノ酸配列を既知の蛋白質約 6,300 個 (NBRF, 蛋白質データベース Release 17.0) と比較したが, 有意な相同性 (homology score が 100 以上) を持つ蛋白質は見



GGATCCCCAAAAGTCCTGGTAAATCAACAAATTTACCCAGCATTTGCGCTGGCTATCATGAATAAGAAACACTGGATTTCAGTCTA 90  
 1.6Kb region  
 TGCGGGCGAGGATATCACCGTCTCGCTACTCAACGATTTGATAAATGACTCATGGAATCTGGTCGTAGACGGGCTGCCTAAAAGAGAGCA 180  
 ACTGCGCTGCGGCGCGCTGATGCAATAACCGTTTCGCGATTTTCCTCCCTTATCTTTTACCGATAACCGGTACCGTCTGATACAA 270  
 AAGGGTACTAAACCAACCGAGGACATTTATGGATATCGTTTCTGCGCTTACAGCGCTACTCCACTAAGGCGTTGCGATCCGAGCAAAA 360  
 (SD) M D I V S V A L Q R Y S T K A F D P S K K  
 ACTGACCGCGAAGAGCGGATATAAATAAAACACTACTACAGTACAGCCCTCCAGCACCAATTTCCAGCGGTGGCACTTTATTTGTCG 450  
 L T A E E A D K I K T L L Q Y S P S S T N S Q P W H F I V A  
 CAGTACGGAAGAAGCAAGCGCGCTAGCAAAATCCGCTGCCGAACTACAGTTTCAACGAACGCAAAATGCTGGACGCTCCCATGT 540  
 S T E E G K A R V A K S A A G N Y T F N E R K M L D A S H V  
 GGTGGTCTTCTGCGCAAAACCGCAATGGATGACGCATGGCTTGGCGCGTCTGATCAGGAAGATGCTGATGGCGGTTTTCGCTACGCC 630  
 V V F C A K T A M D D A W L E R V V D Q E D A D G R F A T P  
 GGAAGCTAAAGCGCAATGATAAAGTTCGCGCTTTTTCGCGGATATGCACCGCGTCTCGCTGAAGATGACCACAGTGGATGGCGAA 720  
 E A K A A N D K G R R F F A D M H R V S L K D D H Q W M A K  
 GCAGGTTTATCTGAACGTCGCGCAATTTCTGCTGGGCGTCCGCGCATGGGTCTCGACGCGTCCCGCTGAAGGTTTCGACGCGGAGGT 810  
 Q V Y L N V G N F L L G V A A M G L D A V P I E G F D A E V  
 GCTCGACGCTGAATTTGGTCTGAAGAAAAAGGCTATACGATCTGGTCTGGTGGCGGTCGCGCATCATAGCGTGGAGGATTCAACGC 900  
 L D A E F G L K E K G Y T S L V V V P V G H H S V E D F N A  
 CGGGTCCGCAATACGCTCTGCGCTTGAACACACTGACGGAAGTTTAAATCCCTGCTAAGCCGAGCGCGCTCGCGCTTTTTCATCA 990  
 G L P K S R L P L E T T L T E V \*  
 CCTTTCTGCCAGGTTTCTCAATGATCAATGGCGCGAAGTGCCAGGTTTATCATCGCTAGTGTAACTTCTCTTTTCAATTTATGAAAAT 1080  
 AAATAACATTTTAAACTGGCAGCGGTTTGGCATATCTGGATACCCCTATCTGGATGAAGGAGAAAAAGGTTGAGACATGTTTATGTAG 1170  
 CCAGCATATGCGCTTTTGGCGCGGAGCTTATTAACAGTCTATCGCTGCTGATGGCGGACGACGCGGTGACACCGGTTTGGCGCTACG 1260  
 ATGGCGATATTTGACACGCGGAGCTTGAACAAACCTCGAAAATCTGATCGCGCAAGCAACGCGGAGGAAGTGGTGGTGGTTTACCG 1350  
 ATCTGCTCGCGCGGACATCAACATAGCGCGCGAAGTGTGATCGCTCAGGTCAGGTTTGTGGTGGCTGGCGTCAACATGACCC 1440  
 TGTGTCTGGAGTTTCTTACTCTGTGAAGAAAGCAAGCAGACGCGCGCATTAACCTACGCCACCAATGCGCGCGTGAATCCATGTCTTTA 1530  
 TCAACACGCTAATAACACAACCATCCGCTGACCTACAGGAGAAATCCCATGATCAAAATTAGTGGCGATTGATTACCGCTGCTGCACGGC 1620  
 CAGGTGGTCTTTCGCTGACCGCGCGGCGGATATGACCATATCATCTGCTAACGCCAACGCGCGCG 1690  
 1.6Kb region

Fig. 5. *Salmonella typhimurium* TA1538 のニトロ還元酵素をコードした 1.6 kb 領域の塩基配列と、予想されるニトロ還元酵素のアミノ酸配列。

出されなかった。また NRase は NADPH を補酵素とするフラビン蛋白と予想されるが、これまでに報告された NADPH 結合 consensus sequence (Hanukoglu and Gutfinger, 1989) は NRase のアミノ酸配列上には存在していなかった。微生物、哺乳類細胞を含めたニトロ還元酵素の多様性について今後も研究を続けて行きたいと考える。

#### 8. 高等生物の N-アセチル転移酵素とアミノ酸配列上の相同性を持つ *S. typhimurium* の O-アセチル転移酵素

同様に pYG122 にコードされた O-ATase 遺伝子の塩基配列を決定した。O-ATase は 281 個のアミノ酸からなる分子量 32 kDa のタンパク質と予想され、この分子量はマキシセル法を用いて測定した分子量 (33 kDa) とよく一致した。

芳香族アミンの代謝に関与する O-ATase はバクテリアだけでなく、高等生物にも存在することが知られている。これら高等生物の O-ATase は *S. typhimurium* の O-ATase と同様に、N-アセチル

ル転移酵素活性を持つことから通常 N-アセチル転移酵素 (N-ATase) と呼ばれている (Weber *et al.*, 1988)。ヒトを含む高等生物の N-ATase にはポリモルフィズムのあることが知られており、コーカサス人の 50% 以上はアセチル化速度の遅い slow acetylator であると言われており (Weber and Hein, 1985)、日本人も約 10% は slow acetylator であると言われている。slow acetylator は芳香族アミン系の薬物および化学物質の代謝能が低い。slow acetylator は常染色体上の劣性遺伝子がホモになっているために生じていると考えられており、現在、幾つか研究グループがその分子機構を明らかにしつつある (Ohsako *et al.*, 1988; Ohsako and Deguchi 1990; Blum *et al.*, 1989b)。

酵素阻害剤を用いた研究から *S. typhimurium* の O-ATase および高等生物の N-ATase は、塩基性アミノ酸によって活性化された cysteine (Cys) 残基が、アセチル供与体である acetyl-CoA と反応するものと考えられている (Saito *et al.*, 1985; Andres *et al.*, 1983)。これまでに、ヒト、ウサギ、ニワトリから N-ATase の遺伝子が

クローニングされ、その塩基配列が報告されている (Grant *et al.*, 1989; Blum *et al.*, 1989a; Ohsako *et al.*, 1988)。*S. typhimurium* の O-ATase の予想されるアミノ酸配列を高等生物の N-ATase と比較すると、O-ATase の N-末端側から 180 番目のアミノ酸までは約 25-30% の相同性を示した。*S. typhimurium* の O-ATase は 5 個の Cys 残基を持つが、このうち高等生物において保存されているものは 69 番目の Cys だけであった。この高度に保存されている Cys 69 の近傍には塩基性アミノ酸である Arg 65 が存在し、このアミノ酸は *S. typhimurium* と高等生物の酵素の間で保存されていた。現在私達は site-directed mutagenesis 法を用いて Cys69, Arg65 を他のアミノ酸に置換し、この変異が *S. typhimurium* の O-ATase 活性にどのような影響を及ぼすのかについて検討中である。

*S. typhimurium* の O-ATase の C-末端側約 100 残基は高等生物の N-ATase と全く相同性を示さなかった。高等生物の N-ATase と *S. typhimurium* の O-ATase は N-アセチル転移酵素活性および O-アセチル転移酵素活性を持つ点では共通しているが、① *S. typhimurium* の O-ATase は N,O-アセチル転移酵素活性を持たない、② 高等生物の N-ATase の acetyl-CoA に対する Km 値は *S. typhimurium* の O-ATase に比べ約 100 倍高いなどの相違を持っている (Kato and Yamazoe, 1988)。相同性を持たない O-ATase の C-

末端側約 100 残基が、このような差異とどのように関連しているのかという点は極めて興味深い。

#### 9. *S. typhimurium* の O-アセチル転移酵素遺伝子のチャイニーズ・ハムスター培養細胞への導入

我々は現在、*S. typhimurium* の O-ATase 遺伝子を哺乳類細胞中で発現させるを試みている。O-ATase 遺伝子をコードした約 1 kb のフラグメントを、pYG221 から切り出し、哺乳類細胞の発現ベクターである pMSG プラスミド (Pharmacia 社) へ導入した。O-ATase 遺伝子を持つ pMSG ベクターは、燐酸カルシウム法にてチャイニーズ・ハムスター培養細胞 (CHL) へ導入し、バクテリアの *gpt* 遺伝子を発現している細胞を選抜した。現在、選抜した細胞について O-ATase 発現の有無を検討しており、近い将来に O-ATase 活性の増大した CHL 細胞を樹立したいと考えている。

#### 10. おわりに

Table 1 は、特定の化学物質とその変異原性発現の律速因子をまとめたものである。多くの塩基対置換型変異原の変異原性発現には大腸菌、*S. typhimurium* と UmuD, C あるいは MucA, B が必要であり、MucA, B をコードした pKM101 がこれら変異原に対する *S. typhimurium* の感受性を増大させていることは良く知られている

Table 1. Mutagens and their rate-limiting factors for mutagenesis

Mutagen or Chemical Compound	Rate-limiting Factor	Strain
Most base change type mutagens	UmuD/C MucA/B	TA100
Nitroarenes	Nitroreductase	YG1021 YG1024
Aromatic amines	O-Acetyltransferase	YG1026 YG1029
Alkylating agents	O <sup>6</sup> -Methylguanine methyltransferase	



(Walker, 1983; Walker, 1984)。YG 株は変異原性発現の律速因子である NRase, O-Aase を多量に産生することにより, ニトロアレーン, 芳香族アミンに対し特異的に高い感受性を示す。これらの新しい菌株は, これまでに 16 カ国, 60 研究機関へ配布され, 大気, 水, 食品, 代謝物, 尿などの complex mixture 中に含まれるニトロアレーンあるいは芳香族アミンの変異原性検出に威力を発揮している。

我々は現在, *S. typhimurium* の O<sup>6</sup>-methyl-guanine DNA methyl 転移酵素遺伝子のクローニングを行っており, 今後はこれを用いてアルキル化剤に高感受性, あるいは抵抗性な指標菌株を開発したいと考えている。

# 参考文献

- Andres, H. H., H. J. Kolb, R. J. Schreiber and L. Weiss (1983) Characterization of the active site, substrate specificity and kinetic properties of acetyl-CoA: N-acetyl-transferase from pigeon liver, *Biochim. Biophys. Acta*, **746**, 193-201.
- Blum, M., D. M. Grant, A. Demierre and U. A. Meyer (1989a) Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA for arylamine N-acetyltransferase from rabbit liver, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3589.
- Blum, M., D. M. Grant, A. Demierre and U. A. Meyer (1989b) N-acetylation pharmacogenetics: A gene deletion causes absence of arylamine N-acetyltransferase in liver of slow acetylators rabbits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9554-9557.
- Einistö, P., T. Nohmi, M. Watanabe and M. Ishidate, Jr. (1990) Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking, *Mutation Res.*, in press.
- Einistö, P., M. Watanabe, M. Ishidate, Jr. and T. Nohmi (1991) Mutagenicity of thirty chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities, *Mutation Res.*, in press.
- Grant, D. M., M. Blum, A. Demierre and U. A. Meyer (1989) Nucleotide sequence of an intronless gene for a human arylamine N-acetyltransferase related to polymorphic drug acetylation, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3978.
- Hanukoglu, I. and T. Gutfinger (1989) cDNA sequence of adrenodoxin reductase: Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases, *Eur. J. Biochem.*, **180**, 479-484.
- Hayatsu, H. (1989) Blue cotton-Broad possibility in assessing mutagens/carcinogens in the environment, In: E. Obe (Eds.), *Advances in Mutagenesis Research*, Springer-Verlag, Berlin, in press.
- Kato, R. and Y. Yamazoe (1988) N-Hydroxy-arylamines O-acetyltransferase in mammalian livers and *Salmonella*, In: C. M. King, L. J. Romano and D. Schuetzle (Eds.), *Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes*, Elsevier, New York, Amsterdam, London, pp. 125-136.
- 後藤里花, 中室克彦, 佐谷戸安好 (1989) 都市河川水の生物評価に関する研究 (2) 日本薬学会第 109 年会講演要旨集 IV, 61.
- McCoy, E. C., M. Anders and H. S. Rosenkranz (1983) The basis of the insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA98/1,8-DNP<sub>6</sub> to the mutagenic action of nitroarenes, *Mutation Res.*, **121**, 17-23.
- Ohsako, S., M. Ohtomi, Y. Sakamoto, K. Uyemura and T. Deguchi (1988) Arylamine N-acetyltransferase from chicken liver II. Cloning of cDNA and expression in chinese hamster ovary cells, *J. Biol. Chem.*, **263**, 7534-7538.
- Ohsako, S. and T. Deguchi (1990) Cloning and expression of cDNA for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferase from human liver, *J. Biol. Chem.*, **265**, 4630-4634.
- Pederson, T. C. and J.-S. Siak (1981) The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts, *J. Appl. Toxicol.*, **1**, 54-60.
- Rosenkranz, H. S. and R. Mermelstein (1983) Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal, *Mutation Res.*, **114**, 217-267.
- Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki and R. Kato (1985) Metabolic activation of mutagenic N-hydroxyarylamines by O-acetyl-transferase in *Salmonella typhimurium* TA98, *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**, 286-295.
- Tada, M. and M. Tada (1975) Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogenic 4-nitroquinoline 1-oxide, *Nature*, **255**, 510-512.
- Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60.
- Vance, W. A., Y. Y. Wang and H. S. Okamoto (1987) Disubstituted amino-, nitroso-, and nitrofluorenes: a physicochemical basis for structure-activity relationships in *Salmonella typhimurium*, *Environ. Mutagen.*, **9**, 123-141.
- Walker, G. C. (1983) Molecular principles underlying the Ames *Salmonella*/microsome test: Elements and design of short-term mutagenesis tests. In: A. R. Kolber, T. K. Wong, L. D. Grant, R. S. DeWoskin and T. J. Hughes (Eds.), *In vitro toxicity testing of environmental agents*, Plenum Press, New York and London, pp. 15-39.
- Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, **48**, 60-93.
- Wang, C. Y., M. S. Lee, C. M. King and P. O. Warner (1980) Evidence for nitroaromatics as direct-acting mutagens of airborne particulates, *Chemosphere*, **9**, 83-87.
- Watanabe, M., T. Nohmi and M. Ishidate, Jr. (1987) New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 974-979.
- Watanabe, M., M. Ishidate, Jr. and T. Nohmi (1989) A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100, *Mutation Res.*, **216**, 211-220.
- Watanabe, M., M. Ishidate, Jr. and T. Nohmi (1990a) Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels, *Mutation Res.*, in press.
- Watanabe, M., M. Ishidate, Jr. and T. Nohmi (1990b) Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1059-1059.
- Weber, W. W., S. S. Mattano and G. N. Levy (1988) Acetylation pharmacogenetics and aromatic amine-induced cancer, In: C. M. King, L. J. Romano and D. Schuetzle (Eds.), *Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes*, Elsevier, New York, Amsterdam, London, pp. 115-123.
- Weber, W. W. and D. W. Hein (1985) N-acetylation pharmacogenetics, *Pharmacol. Rev.*, **37**, 25-79.
- Weisburger, J. H. (1988) Past, present and future role of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human cancer causation, In: C. M. King, L. J. Romano and D. Schuetzle (Eds.), *Carcinogenic and mutagenic responses to aromatic amines and nitroarenes*, Elsevier, New York, Amsterdam, London, pp. 3-19.



## 遺伝子工学的手法を用いた新しいサルモネラ 指標菌株の開発と応用

—Microsuspension 法及び Spiral assay 法への応用—

国立公衆衛生院 地域環境衛生学部 後 藤 純 雄

### 1. はじめに

芳香族ニトロ化合物やアミノ化合物は、それぞれ環境中の重要な癌・変異原物質群を構成している。芳香族ニトロ化合物、特にニトロアレーンはディーゼル排出ガス問題との関連で強い注目を集めており、また、芳香族アミノ化合物の中にも調理に伴って生成するヘテロサイクリックアミンなどがあり、癌・変異原物質や労働衛生上問題となる当該化合物が種々存在している。これらの物質の環境中への放出量は化石燃料などの使用量の増大に伴って年々増加しているものと考えられるため、これらの物質の種類や存在量及び人体暴露量などに関する実態解明が強く望まれている。

環境中の癌・変異原物質による汚染実態を正確に把握するためには、多くの地点で定期的に採取された多数の試料を化学分析や変異原性試験に供し、得られた多数の測定値を総合解析し評価する必要がある。しかし、現在の変異原性試験法には、化学分析法と比べて 1) 多量の試料を必要とすること、2) 多検体測定に多大な時間、労力及び費用を必要とすること、3) 測定精度に劣ることなどの難点があると考えられる。したがって、これらを改善した手法、すなわち高感度かつ簡易的な変異原性試験法の開発が望まれている。

筆者らの研究室では、急増する肺がん死亡率の関連から空気汚染物に対する曝露実態調査研究を

行なっているが、これらの曝露実態調査研究に必要な変異原性試験に関しても上記のような問題が残されている。すなわち、極微量しか採取することの出来ない室内空気試料や個人曝露試料の変異原性を高感度に測定する手法に関しては、現在までに Ames 法 (Maron *et al.*, 1985) の改良法である microsuspension 法 (Kado *et al.*, 1983, 1986), micro forward mutation 法 (Lewtes *et al.*, 1987a) などについての検討が行なわれているが、検出感度や再現性及び簡易性などの面で必ずしも満足し得る試験法が完成されているとはいえない現状にある。

今回は、上記の高感度簡易変異原性試験法に関する研究の一環として、ニトロアレーンや芳香族アミノ化合物に高い変異原感受性を示す YG 系試験菌株 (Watanabe *et al.*, 1989a,b) (*S. typhimurium* YG1024, YG1029 など) を用いた microsuspension 法及び最近自動化手法として開発された spiral assay 法 (Houk *et al.*, 1989) の検討結果について報告する。

### 2. microsuspension 法の変異原性検出能

microsuspension 法は、喫煙者の尿の変異原性を Ames 法よりも高感度に測定するため、米国カリフォルニア州の Kado らによって、preincubation 法 (Yahagi *et al.*, 1977) の改良法として作

〒108 東京都港区白金台 4-6-1

Application of the new YG strains derived from *S. typhimurium* TA strains—microsuspension assay and spiral assay—

Sumio Goto

Department of Community Environmental Sciences, National Institute of Public Health, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan



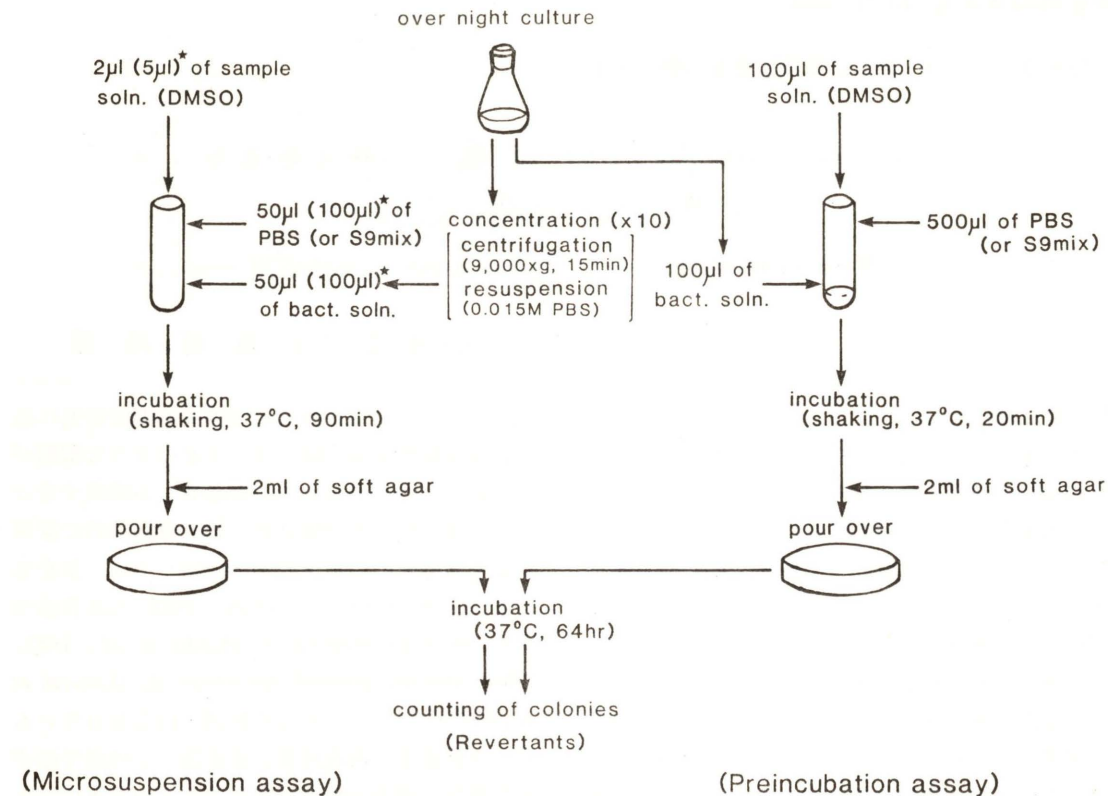


Fig. 1. microsuspension 法と preincubation 法の概要

\*: Kado らの原法での容量

成されたものである。Fig. 1 には、microsuspension 法 (Kado らの原法を若干変更した手法) と preincubation 法の概略手法を示してある。なお、Fig. 1 の ( ) \* は Kado 原法に示されている溶液量である。Fig. 1 に示してあるように両手法を比較すると、microsuspension 法ではプレインキュベーション時の溶液の容量を少なくし (700  $\mu$ l  $\rightarrow$  200  $\mu$ l 又は 100  $\mu$ l)、また、使用菌濃度を高くし (約  $2 \times 10^8$  cell/700  $\mu$ l  $\rightarrow$   $10^8$  cell/100  $\mu$ l) 更にプレインキュベーション時間を長く (20 分  $\rightarrow$  90 分) して菌と被験物質の接触確率を上げるための改良がなされている。

プレインキュベーション時の菌濃度に関して、Kado らは喫煙者の尿の XAD-2 樹脂吸着物を用いて詳しく検討し、その変異原性検出能の使用菌濃度依存性の検討結果から、約  $1 \times 10^{10}$  cell/ml 程度の菌濃度が最適であることを報告している (Kado *et al.*, 1983)。また Kado らは、この濃度

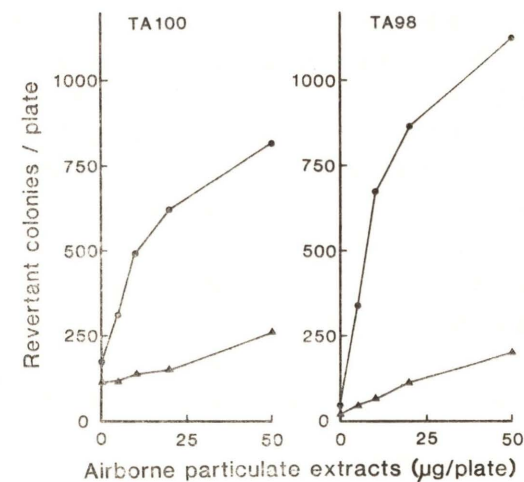


Fig. 2. microsuspension 法及び preincubation 法による大気浮遊粉じん試料の変異原性。

●: microsuspension 法  
▲: preincubation 法

の菌液 (TA98) と上記の尿試料を用いて、microsuspension 法の変異原性検出能を調べ、Ames 法に対して約 20 倍、preincubation 法に対して約 13 倍の変異原比活性が得られたことも報告している。

そこで筆者らは、TA100 株、TA98 株及び大気浮遊粉じん溶媒抽出物を用いて、microsuspension 法の変異原性検出能と preincubation 法のそれとを比較検討した。その結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 から、microsuspension 法の与える大気浮遊粉じん試料の変異原比活性は、TA100 株で 32.3 rev/ $\mu$ g、TA98 株で 63.2 rev/ $\mu$ g であり、preincubation 法の与えるそれは、TA100 株で 3.1 rev/ $\mu$ g、TA98 株で 4.5 rev/ $\mu$ g であることから、microsuspension 法は preincubation 法に対し約 10~14 倍の変異原性検出能を有していることが、この試験結果からも認められた。

Fig. 1 に示してあるように、microsuspension 法の方法自体は我が国で広く用いられている preincubation 法と大差はないが、変異原検出感度が高いこと (被検試料量が少なくすむ)、S9 や co-factor を節約し得ることなどから microsuspension 法は利点が多いことが判る。本法は、上記の尿試料のほか大気浮遊粉じん中の微粒子 (<2.5  $\mu$ m) 試料 (Kado *et al.*, 1986)、室内空気試料

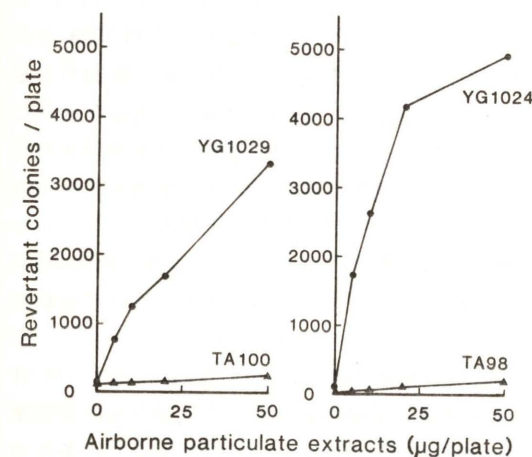


Fig. 3. YG 系菌株/microsuspension 法及び TA 系菌株/preincubation 法による大気浮遊粉じん試料の変異原性。

●: microsuspension 法  
▲: preincubation 法

(Lewtas *et al.*, 1987b) にも適用され、我が国でも玉川らにより室内空気試料 (Tamagawa *et al.*, 1989a,b) の変異原性測定にも利用されている。

### 3. microsuspension 法への YG 系菌株の適用

YG 菌株開発の報告にも述べられているように YG 系菌株は、ニトロ還元酵素高生産性プラスミド (pYG216) やアセチル転移酵素高生産性プラスミド (pYG219) を TA 系菌株に導入した菌株であり、芳香族アミンやニトロアレーンに対し高い変異原感受性を示すことが知られている (Watanabe *et al.*, 1989a,b)。したがって、Ames 法 (preincubation 法) よりも高い変異原性検出能を示した microsuspension 法に YG 系菌株を適用すれば更に高い変異原性検出能が得られることが期待される。そこで、YG 系菌株として TA100 株に pYG219 を導入した YG1029 株、及び TA98 株に pYG219 を導入した YG1024 株を microsuspension 法に用いた場合の大気浮遊粉じん試料に対する変異原性検出能を調べた。その結果を Fig. 3 に示す。ここで Fig. 3 には、比較の対照として各 YG 系株の親株 (TA100 及び TA98 株) を preincubation 法に適用した場合の結果も併せて示してある。Fig. 3 から、YG 系菌株を用いた microsuspension 法のほうが明らかに変異原性検出能が高いことが判る。これらの結果から、求め

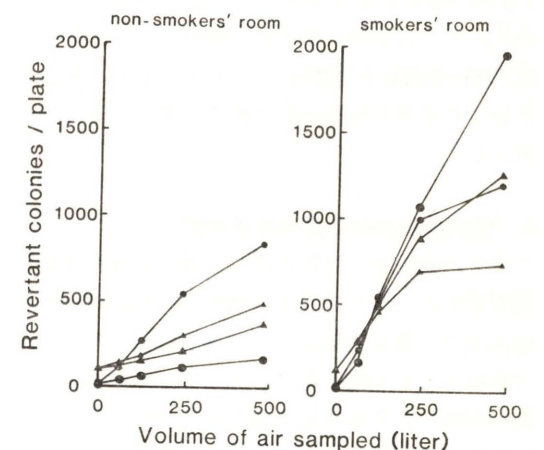


Fig. 4. YG 系菌株/microsuspension 法による室内空気浮遊粉じん試料の変異原性測定例。

●: YG1024, -S9, ●: YG1024, +S9,  
▲: YG1029, -S9, ▲: YG1029, +S9.



Table 1. 室内空気浮遊粒子の変異原性に及ぼす換気扇作動及びエアコン作動の影響 (microsuspension 法, YG1024)

Sampling location	Mutagenic activity (revertants/ m <sup>3</sup> , air)							
	OFF (VF** & AC***)				VF** ON			
	date(cig*) +S9		-S9		date(cig*) +S9		-S9	
Smoker's room (68 m <sup>3</sup> )	5/26(10)	3680	3640		5/29(16)	1170	2440	
	5/30(10)	5250	3930		6/12( 6)	951	2570	
	6/5 (10)	2250	1940		6/17(10)	394	4350	
					6/19( 9)	2290	2440	
	avg.	3727	3170			1201	2950	
	s.d.	1500	1075			796	935	
No-smoking office (155 m <sup>3</sup> )	5/26	270	1480		5/29	696	2390	
	5/30	146	959		6/5	307	888	
	6/12	1010	3120		6/8	341	1820	
	6/19	806	655		6/14	176	874	
					6/17	227	1476	
	avg.	558	1554			349	1490	
	s.d.	416	1098			204	644	

cig\*: no. of cigarettes smoked during working/sampling time (8 hrs), VF\*\*: ventilating fan, AC\*\*\*: air-conditioner.

られた microsuspension/YG 1029 の与える大気浮遊粉じん試料の変異原比活性は 110 rev/ $\mu$ g であり、及び microsuspension/YG 1024 では 252 rev/ $\mu$ g, preincubation/TA 100 では 3.1 rev/ $\mu$ g, 及び preincubation/TA 98 では 4.5 rev/ $\mu$ g であることから、microsuspension/YG 1029 の大気浮遊粉じん試料に対する変異原性検出能は、preincubation/TA 100 の約 35 倍を示すこと、及び microsuspension/YG 1024 では preincubation/TA 98 の約 56 倍を示すことが認められ、通常用いられている方法に較べて、microsuspension 法に YG 系菌株を適用すると大気浮遊粉じん試料に対する変異原性検出能が極めて高くなることが判った。

#### 4. 室内空気試料の変異原性測定

大気浮遊粉じん試料に対して高い変異原性検出能を示した YG 系菌株を用いる microsuspension 法は、微量空気試料の変異原性測定にも有効であることが期待できる。そこで、試料の大量採取が困難なため変異原性調査があまり行なわれていない室内空気中の浮遊粒子の変異原性測定に本法を適用した。

室内空気中の浮遊粒子は、47 mm $\phi$  の石英繊維フィルターをステンレス製フィルターホルダーに

セットし、これに室内の空気を約 20 l/min の流速で約 8 時間通過させて採取した。この室内空気の吸引には低騒音ポンプ (<50 dB) を用いた。得られた浮遊粒子の有機成分をジクロロメタンを用いて超音波抽出し、このジクロロメタンを窒素気流下で留去して得られた残渣 (タール状物質) を変異原性試験 (microsuspension/YG 系菌株) に供した。

Fig. 4 には変異原性試験結果の例を示してある。Fig. 4 から、室内空気試料は YG 1024 及び YG 1029 の両菌株に対して、S9 mix 添加の有無にかかわらず良好な dose-response 関係を示すこと、及び喫煙者の部屋の空気試料は非喫煙者のそれよりも高い変異原性を示すことが判る。この結果から、一般に変異原性検出が困難とされている非喫煙者の部屋の空気試料でも本法 (microsuspension/YG 系菌株) を用いれば、その変異原性を測定し得ることが示唆された。

そこで、1989 年の春期から夏期にかけて 10 日間、喫煙者の部屋 (68 m<sup>3</sup>) の空気試料及び非喫煙者の部屋 (155 m<sup>3</sup>) の空気試料を上記と同条件で採取し、その変異原性を microsuspension/YG 1024 株で測定した。その結果を Table 1 に示す。なお、室内空気の汚染状況に影響を及ぼすと考えられる換気及びエアコン作動の条件についての検

討も行なった。Table 1 から、換気扇及びエアコンを共に作動させていない喫煙者の部屋の空気試料が最も高い変異原比活性 (+S9: 3727 rev/m<sup>3</sup> 及び -S9: 3170 rev/m<sup>3</sup>) を示すこと、換気扇又はエアコンを作動させている喫煙者の部屋の空気試料が次に高い変異原比活性 (換気扇作動; +S9: 1201 rev/m<sup>3</sup> 及び -S9: 2950 rev/m<sup>3</sup>, エアコン作動; +S9: 1537 rev/m<sup>3</sup> 及び -S9: 2867 rev/m<sup>3</sup>) を示すこと、非喫煙者の部屋の空気試料の変異原比活性の平均値は喫煙者の部屋のそれより低い変異原比活性を示すことなどが認められた。以上の結果から YG 系菌株を microsuspension 法に適用することによって室内空気中の浮遊粒子の変異原性を容易に測定し得ることが確認され、本法がニトロアレーンや芳香族アミノ化合物類を含む微量環境試料の変異原性検出に有用であることが示唆された。

#### 5. spiral assay 法

この方法は米国 EPA の Houk らによって作成された方法 (Houk *et al.*, 1989) である。細菌検査で菌数の測定にしばしば用いられているスパイラルシステム (Gilchrist *et al.*, 1973) を Ames 法に適用したものであり、1 枚の最小寒天平板培地 (プレート) 上に被験試料溶液、菌懸濁液及び S9 mix (必要時) をスパイラル状 (連続ラセン状) に塗布し、インキュベーション後プレート上に出現したコロニーをレーザーコロニーカウンターで計数して、dose-response 曲線を得るという簡易自動化手法である。

被験試料溶液、菌懸濁液及び S9 mix の塗布にはソフトアガーを用いず、スパイラルプレーターを用いて直接プレート上に塗布する方法となっている。このスパイラルプレーターは、主として溶液の吸引・塗布するノズル (テフロンチューブ)、マイクロシリンジ、プレートを乗せそれを回転させるためのターンテーブル及び溶液の塗布量を制御するための 2 種のカムなどで構成されている。variable cam を用いれば通常 50  $\mu$ l の溶液をプレートの中心部から、周辺部に向ってスパイラル状に液量を減少させながら塗布することが出来、uniform cam を用いれば通常 20  $\mu$ l の溶液を均一

に塗布することが出来る。したがって、Ames 法に準拠するためには、variable cam を用いて試料溶液を塗布し、uniform cam を用いて菌懸濁液及び S9 mix を塗布する方法で試験が行なわれている。

一方、レーザーコロニーカウンターは、波長 633 nm の He/Ne レーザー発振管、レーザー光線を角度を変えて回転 (500 回/秒) させるためのガルバノメーター及びコロニーの吸光度を測定するレーザー光検出器などで構成されている。このレーザーコロニーカウンターを用いれば、プレート上にスパイラル上に出現した復帰変異コロニーをプレートの周辺部から中心部に向って計数することが出来、その計数値はリアルタイムでパーソナルコンピューターに送られる。この計数値は、Ames 法による試験結果と同様の評価が行なえるように、各スパイラルに対して、プレート 1 枚当りのコロニー数として換算される。また、同様に各スパイラルに対して、プレート 1 枚当りの試料量が換算され、この値と上記のコロニー数換算値から、dose-response 曲線を得ることが出来る。なお、同時に、設定した範囲内の、dose-response 曲線の傾き (変異原比活性に相当) やその相関係数も算出できる。

#### 6. YG 系菌株を用いた Spiral assay による大気浮遊粉じんの変異原性測定

環境汚染物の変異原比活性を測定しその汚染度を評価するためには、多検体測定の可能な変異原性試験法が必要である。本 spiral assay 法は、1 枚のプレートで dose-response 曲線が得られる簡易自動化手法であることから、Ames 法に較べて 1 日で多くの検体の変異原性を測定し得る可能性がある。そこで本 spiral assay による多検体測定の可能性や YG 系菌株の使用による変異原性検

Table 2. 大気浮遊粉じん抽出物の変異原性に及ぼす試料塗布用溶媒の影響 (spiral assay 法, YG1024)

Ratio of solvent (DMSO:DCM)	Mutagenic activity (revertants/ $\mu$ g)							
	avg. s.d.						c.v.(%)	
100: 0	7.12	5.71	6.15	10.34	8.62	7.59	1.90	25.0
75: 25	7.21	8.28	5.42	9.03	6.59	7.31	1.41	19.3
50: 50	7.64	10.63	7.61	8.54	9.43	8.77	1.28	14.6
25: 75	8.11	10.85	7.85	9.11	12.73	9.73	2.05	21.1
0:100	11.72	9.41	9.75	13.17	11.78	11.17	1.56	14.0



Table 3. 試料溶液塗布から菌懸濁液塗布の間の操作時間に関する検討 (spiral assay 法, YG1024)

Interval time (min)	Mutagenic activity (revertants/ug)							
	avg.				s.d.		c.v. (%)	
30	9.48	11.85	9.21	8.51	8.07	9.42	1.47	15.6
60	9.68	8.15	11.21	8.43	8.02	9.10	1.35	14.8
120	11.39	9.81	9.80	7.62	7.72	9.20	1.60	17.3
180	11.80	11.71	11.93	9.24	7.93	10.52	1.83	17.4

出感度の改善等について検討した。

多検体測定に関しては、作業能率上の問題として試料塗布用溶媒種及び塗布操作時間の間隔などについて検討した。大気浮遊粉じんの溶媒抽出物は一般に水に難溶なため、Ames 法ではその DMSO 溶液が試験に供されている。しかし、試料の DMSO 溶液 (50  $\mu$ l) をスパイラルプレートを用いて塗布すると、1, 2 番目のスパイラルが重なり易いことや DMSO がプレートの表面を流れ易いことなど取扱上の難点が認められた。その難点を改善するため DMSO よりも気化し易く被験抽出物の良溶媒であるジクロロメタン (DCM) を用いる場合の変異原検出能について検討した。その結果を Table 2 に示す。なお、本検討では DMSO と DCM の混合溶媒を用いる場合についても検討した。Table 2 から、DCM を用いる場合に得られる変異原比活性 (rev/ $\mu$ g) は、DMSO を用いる場合よりも若干高くなる傾向があることや 5 回の試験結果から得られた変動係数も若干低くなるか又は同等であることなどが認められる。従って、上記結果と DCM が気化し易く取扱が容易であることなどを考慮すると、DMSO よりも DCM の方が大気試料の塗布用溶媒に適していると考えられる。

一方、本 spiral assay では検体数が多くなった場合、試料溶液塗布→菌懸濁液塗布の操作の繰返しでは、試料塗布用ノズルの洗浄操作回数が増加するばかりでなく、2 種のカムの変更等の操作が煩雑になり作業能率の低下が懸念される。そこで、試料溶液塗布操作をまとめて行ない得るかどうかについての検討を行なった。本検討では、大気試料を塗布してから菌懸濁液を塗布するまでの時間を変えて試験を行ない、大気試料塗布後の放置時間が変異原性検出能に及ぼす影響を調べた。得られた結果を Table 3 に示す。Table 3 から、

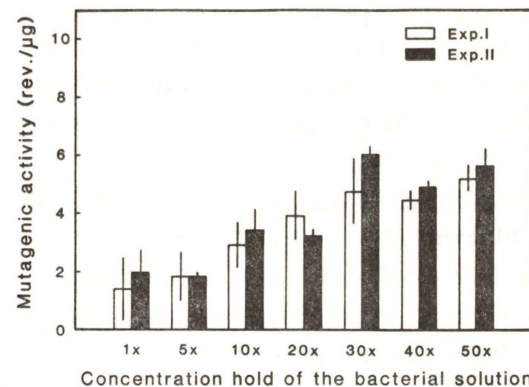


Fig. 5. 大気浮遊粉じん試料の変異原比活性に及ぼす菌懸濁液濃縮倍率の影響 (spiral assay 法, YG1024).

それぞれ 1 時間、2 時間及び 3 時間放置した場合であっても良好な値や再現性を示すことが認められる。従って、大気浮遊粉じん試料の多検体測定には、多数のプレートにあらかじめ試料溶液を塗布した後、菌懸濁液塗布まで少なくとも 3 時間放置することが可能であることが判った。なお、米国 EPA の Houk らは、水に対して溶解度が高く、寒天培地中の拡散速度の大きな物質 (アジ化ナトリウム, MNNG, 4NQO など) を本 spiral assay で試験した場合、良好な dose-response 関係が得られないことを報告 (Houk *et al.*, 1989) しているが、Table 3 で得られた変異原比活性が上記経時変化の影響を殆ど受けていないことから、大気浮遊粉じん試料に含まれる変異原物質の寒天培地中での拡散速度はあまり大きくないことも示唆された。

変異原性検出感度の改善の可能性に関しては、使用される菌懸濁液の菌濃度の影響及び YG 系菌株使用の効果についての検討を行なった。

Houk らの報告では、spiral assay では通常の 14-16 時間培養した菌懸濁液をそのまま用いるよりも 3 倍濃縮した菌懸濁液を用いる場合の方が良好な結果を与えることを報告している。濃縮した菌懸濁液の使用の影響については十分な検討を行っていない (Houk の私言) ことから、今回の検討では、50 倍まで濃縮した菌懸濁液を用いてその濃縮倍率が与える変異原性検出能への影響を調べた。菌培養液の濃縮方法は micro-suspension 法の場合と同様の方法 (遠心沈殿→再懸濁) を用

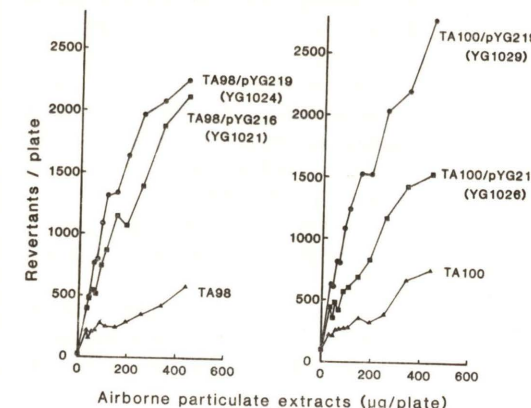


Fig. 6. TA 系及び YG 系菌株の大気浮遊粉じん試料の変異原性検出能 (spiral assay 法).

い、それぞれの菌懸濁液について 3 回 (プレート 3 枚) ずつ試験を行ない、同じ検討を試験日を変えて 2 回行なった。得られた結果を Fig. 5 に示す。Fig. 5 から、濃縮倍率の高い菌懸濁液 (30 倍、40 倍及び 50 倍) を用いた場合ほど大気試料の変異原比活性は高くなること、その値は濃縮倍率の低い菌懸濁液 (1 倍及び 5 倍) を用いた場合の約 2.5 倍を示すことなどが認められる。

この原因としては、micro-suspension assay の場合と同様、被験物質と菌との接触確率が高くなったことがその一因と考えられるが、これらの現象に与える培地成分などの影響に関しては Ames 法による試験結果との整合性に関する検討も含めて今後詳細に検討する必要がある。

次いで、本 spiral assay の大気浮遊粉じん試料の変異原性検出能に関して、YG 菌株を用いた場合、及びその親株である TA 系菌株を用いた場合とを比較検討した。得られた結果を Fig. 6 に示す。Fig. 6 から、いずれの菌株に対しても大気試料は良好な dose-response 関係を示すことが認められた。また、それぞれの菌株の変異原性検出能は、YG1024 > YG1021 > TA98 又は YG1029 > YG1026 > TA100 の順となり、ニトロリダクターゼ高生産性プラズミド pYG216 を導入した株 (YG1021 又は YG1026) よりもアセチル転移酵素高生産性プラズミド pYG219 を導入した株 (YG1024 又は YG1029) のほうが大気試料に対して高い変異原性検出能を示すことが認められる。従っ

て、これらの YG 系菌株を用いる spiral assay は、大気浮遊粉じんの変異原性モニタリング手法として有望であることが示唆された。

以上、YG 系菌株の応用として高感度化手法である micro-suspension 法及び自動化手法である spiral assay 法への適用例やその有用性を報告した。これらの手法に関しては更に、感度を上げるための検討や測定精度を上げるための改良などが必要であるが、これらの方法による変異原性測定値を何等かの評価に用いる場合には、それぞれの使用菌株や手法の特性を十分に考慮して評価に用いる必要がある。

本検討を行なうに当たり、YG 系菌株を快く恵与下さいました国立衛生試験所・変異遺伝部の諸氏、spiral assay 法又は micro-suspension 法で協力いただきました米国 EPA 健康影響研究所、スパイラルシステム社、グンゼ産業社の諸氏に感謝の意を表します。

#### 参考文献

- Gilchrist, J. E., J. E. Campbell, C. B. Donnelly, J. T. Peeler and J. M. Delaney (1973) Spiral plate method for bacterial determination, *Appl. Microbiol.*, **25**, 244-252.
- Houk, V. S., S. Schalkowsky and L. D. Claxton (1989) Development and validation of the spiral *Salmonella* assay: an automated approach to bacterial mutagenicity testing. *Mutation Res.*, **223**, 49-64.
- Kado, N. Y., D. Langley and E. Eisenstadt (1983) A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay: increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutation Res.*, **121**, 25-32.
- Kado, N. Y., G. N. Guirguis, C. P. Flessel, R. C. Chan, K. Chang and J. J. Wesolowski (1986) Mutagenicity of fine (<2.5  $\mu$ m) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micro preincubation (micro-suspension) procedure. *Environ. Mut.*, **8**, 53-66.
- Lewtas, J., K. Williams, G. Lofroth, K. Hammond and B. Leaderer (1987b) Environmental tobacco smoke: mutagenic emission rates and their relationship to other emission factors. *Proc. of Indoor Air '87*, Berlin, 17-21.
- Lewtas, J., S. Goto, K. Williams, J. C. Chuang, B. A. Petersen and N. K. Wilson (1987a) The mutagenicity of indoor air particles in a residential pilot field study: application and evaluation of new



methodologies. *Atomos. Environ.* **21**, 443-449.

Maron, D. M. and B. N. Ames (1985) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 173-215.

高木敬彦, 後藤純雄, 村田元秀, 松下秀鶴, J. Lewtas (1988) 室内空気浮遊粒子の変異原性測定への micro forward-mutation 法の適用, 大気汚染学会誌, **23**, 24-31.

玉川勝美, 松本久美子, 高橋陽子, 関 敏彦, J. Lewtas (1989a) 高感度 Ames テスト (accelerated micro-suspension 法) の室内空気汚染計測への適用: エアコンの除塵フィルターに付着した粉塵の変異原性. 大気汚染学会誌, **24**, 37-44.

玉川勝美, 高橋陽子, 関 敏彦, 角田 行, 後藤純雄, 松下秀鶴 (1989b) 高感度変異原性試験 (microsuspen-

sion 法) による室内空気汚染の評価: 仙台市における室内空気汚染調査, 仙台市衛生試験所報, **18**, 273-283.

Watanabe, M., T. Nohmi and M. Ishidate, Jr. (1989a) New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroaromatics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 974-979.

渡辺雅彦, 能美健彦, 石館 基 (1989b) 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. 環境変異原研究, **11**, 67-74.

Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*, *Mutation Res.* **48**, 121-129.

ワークショップ「新しい環境変異原の研究手法」

# In vitro 小核試験

東京慈恵会医科大学 公衆衛生学教室 鈴木 勇 司

## 1. はじめに

環境中に存在する発癌物質の検出や新規に開発製造された物質の発癌性を短期に評価するには, Ames test, Rec assay, 培養細胞を用いた染色体異常試験等の in vitro 試験系と, 小核試験, 慢性致死試験等の in vivo 試験系とがある。In vivo 試験系は生体の諸要因を反映しているため, 変異原性試験の結果をヒトに外挿するという点からは, in vitro 試験系よりも好ましいといえる。Schmid (1973) と Heddle (1973) によって開発された赤芽球-赤血球系細胞を用いた in vivo 小核試験は, 検出感度が比較的高いことから現在広く用いられている試験方法である。しかし, 種々の試験系の変異原物質検出感度は, in vitro 試験系の方が in vivo 試験系よりも優れているという報告が多い。被験物質の変異原性を評価する上からは, in vivo 試験だけでは不十分と考えられる。

In vivo 試験系の検出感度が低い理由として次のことが考えられる; ①被験物質の主宿に対する毒性のため投与用量を高くできない ②被験物質又は, その代謝産物の標的臓器への到達量が十分でない ③被験物質によって臓器感受性を強く示す場合 (Goldberg ら, 1983) ④動物の飼育条件, 飼育温度 (Chrisman ら, 1980), 飼料と水の供給条件 (Gollapudi ら, 1986) による結果への影響 ⑤被験物質の代謝が in vivo 系と in vitro 系で異なる場合等である。

そこで小核試験において, in vitro 試験系を開発することは物質の変異原性評価の上で重要である。そこで本節では, 現在までに報告されている

種々の細胞を用いた in vitro 小核試験と, 我々が行っている培養骨髄細胞を用いた小核試験法と CHL 細胞を用いた小核試験法を紹介し, さらにその応用例についても述べる。

## 2. 小核誘発のメカニズム

細胞の中の正常な核以外の自然又は人工的に生じた小さな核をマーカーとする方法である。すなわち, 化学物質や放射線が細胞に作用して無動原体断片 (染色体の切断や非対称型の染色体交換によって生じる) や無動原体染色体が形成され, 或いは紡錘体機能障害が生じて, 分裂後期に染色体或いはその断片が極に移動することができずに遅滞染色体になり, 分裂後期で小核を形成する (田中ら, 1977)。Fig. 1 に赤芽球系細胞を用いた小核試験における小核形成のメカニズムについて示した。

## 3. 生体由来の細胞を用いた小核試験

Table 1 及び 2 に, 種々の生体細胞を用いた小核試験法を示した。リンパ球を用いた小核試験に

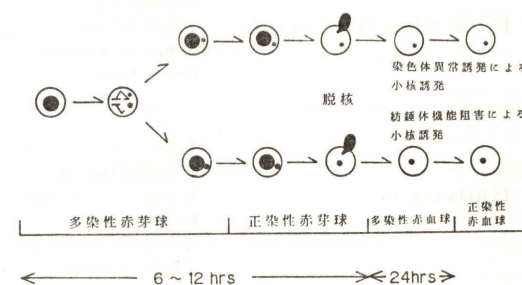


Fig. 1. 小核の誘発過程.

〒105 東京都港区西新橋 3-25-28

The in vitro micronucleus assay

Yuji Suzuki

Department of Public Health, Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan



Table 1. 生体由来細胞を用いた小核試験

Lymphocyte	Mytomicin C	Morishima A	1976
	Cyclophosphamide	Heddle JA	1978
	Bleomycin	Linnainmaa K	1978
	Platinum complex	Natarajan AT	1980
	X-ray contrast media	Iskandar O	1981
	EMS	Heddle JA	1981
	MMS	Huber R	1983, 1989
	Benzene	Hogstedt B	1983a,b, 1984
	Hydroquinone	Tsui YC	1983
	Phenol	Tanaka K	1984
	Disel tar	Aghamohammadi SZ	1984, 1989
	Diaziquinone	Pinca M	1984
	Gosspol	Fenech M	1985a,b,c
	5-bromo-2'-deoxyuridine	Stenstrand K	1985, 1987
	Aflatoxin B <sub>1</sub>	Kwan DK	1985
	X-ray	Shinkawa K	1986, 1988
	γ-ray	Parvez Z	1986, 1987
	UV	Maki-Paakkanen	1987
	Polyester resin	Blasko M	1987
	Vinyl acetate	Cole J	1988
	Alcohol drinking	Kormos C	1988
	Marihuana smoking	Narod SA	1988
	Tabacco smoking	Prosser JS	1988
	Age	Ramalho A	1988
	Ethylene oxide	Erexson GL	1989
	Styrene	Khadzhidekova V	1989
	Styrene oxaide	Migliore L	1989

は、大別して2通りある。一つは、生体よりリンパ球を取りだし培養系に移して、そこに変異原物質を加えて小核誘発頻度を検討する方法であり、抗癌剤 (Obe ら, 1975; Aghamohammadi ら, 1984; Heddle ら, 1978; Sorsa ら, 1988; 新川ら, 1988) や benzene (新川ら, 1987) 等についての報告がある。他の一つは、変異原物質に曝露した生体からリンパ球を取りだして培養系に移し小核誘発頻

Table 2. 生体由来細胞を用いた小核試験

Erythroblast	Mitomycin C	Suzuki Y	1985
	Vincristine		
	Benzo(a)pyrene		
	Benzydine		
Embryo	Asbestos	Oshimura M	1984
	Benzo(a)pyrene		
	X-ray X-ray + Lead		
	Caffeine		
	Mercuric chloride		
	[3H]arginine		
Spermatozoa	Sodium arsenite	Müller WU	1985, 1986, 1987
	X-ray		
	9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene		
	Cyclophosphamide		
	Adriamycin	Cheng SJ	1986
		Risley MS	1988
		Pampfer S	1989
		Tates AD	1989

Table 3. 培養細胞を用いた小核試験

V79	Mitomycin C	Laane C	1984
	Cyclophosphamide		
	Adriamycin		
	Actinomycin D		
	Nitracrine		
	Platinum compound		
	Cytosine arabinoside		
	ENNG MNNG		
	BNU ENU MNU		
	MMS EMS		
	Acridine derivative		
	7-ethylbenz(a)anthracene		
	Diethylsulphate		
	Ketone nucleoside derivative		
	ICR-191		
	9-aminoacridine		
	2-nitro-7-methoxynaphtho[2,1]furan		
	Fusarine C		
	T-2 toxine		
	Tannin		
	Tobacco		

度を検討する方法であり、in vivo と in vitro の中間的な実験法といえる。ライフスタイルに関連するものとして喫煙 (Natarajan ら, 1980; Högstädt ら, 1983a, 1984; Stenstrand ら, 1985; Narod ら, 1988) や飲酒 (Natarajan ら, 1980; Högstädt ら, 1984) の報告があり、職業性曝露に関するものとして vinyl chloride (Natarajan ら, 1980), styrene (Högstädt ら, 1983b, 1984; Linnainmaa ら, 1978) や ethylene oxide (Högstädt ら, 1983a) がある。その他に、加齢 (Högstädt ら, 1984; Fenech ら, 1985c; Cole ら, 1988) に関したのも有る。ヒト由来のリンパ球を用いた小核試験の報告が大半を占めるのが特徴である。

次に、embryo を用いた小核試験 (Oshimura ら, 1984; Müller ら, 1985, 1986, 1987) であるが、ここではアスベストやカフェイン等、我々の日常生活に関係があるものを取り上げられている。精子を用いた小核試験 (Risley ら, 1988; Pampfer ら, 1989) では、放射線や抗癌剤の影響について検討されている。我々も、マウス由来の赤芽球—赤血球系細胞を用いた in vitro 小核試験を開発した (Table 2)。詳細は、別項で説明する。

#### 4. 継代可能な培養細胞を用いた小核試験

Table 3 に Chinese hamster lung fibroblast

Table 4. 培養細胞を用いた小核試験

CHO	X-ray	Bonatti S	1983
	Benzo(a)pyrene		
	MNU		
	MMS		
	4-NQO		
	MNNG		
	Acridine		
	Cadmium chloride		
	Acridine yellow		
	Propidium iodide		

cell (V79) を用いた小核試験を示す。ここ数年多数の報告が見受けられ、発癌物質や抗癌剤に関して検討されている。Table 4 に Chinese hamster ovary cell (CHO) を用いた小核試験を示す。発癌物質に関する報告が多く、これも最近の報告が多い。V79 と比較すると CHO の報告はまだ少ない。Table 5 には、継代可能なその他の細胞や癌細胞を用いた小核試験等について示した。我々の教室では、Chinese hamster lung cell (CHL) 細胞による小核試験を開発したので、詳細は別項で説明する。

#### 5. 赤芽球—赤血球系細胞を用いた小核試験 (鈴木, 1985)

骨髓細胞を培養するための mixed medium の組成 (Fig. 2) としては、NCTC 109, NU-serum, 牛胎児抽出液および牛血清アルブミンフラクシヨ



Table 5. 培養細胞を用いた小核試験

Rat kangaroo ovary tumor cells	Colchicine	Sekiguchi T	1978
Mouse 3T3 cells	Colchicine	Sekiguchi T	1978
Walker carcinoma 256	Nitrogen mustard	Koller PC	1969
Ehrlich ascites tumor cells	DL-buthionine-SR-sulfoximine	Bertsche U	1986
Syrian hamster (BHK21 C13) (LSH/ss LAK)	Radiation Glass fiber	Roberts CJ Hesterberg TW	1986 1986
McCoy cells	Colchicine	Deig EF	1962
mouse lymphoma cells (L5178Y)	Actinomycin Adriamycin DMBA DMSO ICR 107, 109 3-MCA	Doerr CL	1989
CHL	Mitomycin C Colcemid Caffeine Fluoride	Wakata A Li J	1987 1990

- (1) NCTC 109 ----- 14 ml  
 (2) NU-serum ----- 10 ml  
 (3) Bovine fetal extract sol. ----- 1 ml  
 (4) Bovine serum albumin  
 fraction V in  $\alpha$ -medium ----- 5 ml

Fig. 2. Preparation of mixed medium (30 ml) containing (1)-(4).

ン V が含まれる。この mixed medium は、骨髓細胞の中でも特に赤芽球系細胞の増殖に適したものである。Fig. 3 に実験に使う S9 および S9 mix の調製法を示した。S9 作製用動物は、BALB/c マウスで、誘導剤には PCB を用いた。S9 mix の調製に、Ames test ではリン酸緩衝液を用いるところを、この試験では 10% NU-serum 加 NCTC 109 により行った。Fig. 4 は、マウスの大腿骨から骨髓細胞を採取する方法を示した。Fig. 5 には、試験手順を示した。まず、骨髓細胞に S9 mix または 10% NU-serum 加 NCTC109 と被験物質を加えて、37°C で 30 分間振盪培養する。その後、遠心洗浄により被験物質を取り除き、mixed medium に再浮遊した後、37°C で 30 時間炭酸ガス培

養器中で培養してから、スミア標本を作製する。May-Grünwald Giemsa 染色を施して、小核を有する多染性赤血球の頻度を求める。Table 6 に、次の被験物質の結果を示す。あわせて、BALB/c マウスによる in vivo 小核試験と Ames test および動物での発癌性の結果を示した。

- a) アルキル化剤  
 1) carboquone (CQ)  
 2) cyclophosphamide (CY)  
 b) 代謝拮抗剤  
 1) 6-mercaptopurine (6MPR)  
 2) amethopterin (MTX)  
 3) 5-fluorouracil (5FU)  
 4) tegafur (FT-207)

BALB/c mice (♂)  
 ↓  
 Injection of PCB (500mg/kg)  
 ↓  
 Hepatectomy 5 days after pretreated with PCB  
 ↓  
 Homogenize the liver  
 ↓  
 Centrifuge the homogenate at 9000g  
 ↓  
 Post-mitochondrial supernatant (S9)  
 ↓  
 1 ml of S9mix (pH7.2) contains (1)-(7)  
 (1) 0.2ml S9  
 (2) 0.8ml NCTC109 containing 10% NU-serum  
 (3) 16  $\mu$  mole  $MgCl_2$   
 (4) 66  $\mu$  mole  $KCl$   
 (5) 10  $\mu$  mole G6P  
 (6) 8  $\mu$  mole NADPH  
 (7) 8  $\mu$  mole NADH

Fig. 3. Preparation of S9 and S9 mix.

Sacrifice BALB/c mice (♂)  
 ↓  
 Shorten the femur with scissors untill a small opening to the marrow canal become visible  
 ↓  
 Take out bone marrow cells with mixed medium  
 ↓  
 Centrifuge at 1000rpm for 5 min  
 ↓  
 Draw the supernatant off with a pipette  
 ↓  
 Add NCTC109 containing 10% NU-serum and adjust the cell number to  $0.6-6 \times 10^7$  cells/ml

Fig. 4. Preparation of bone marrow cells suspension.

- 5) ancitabine (Cyclo-C)  
 c) 抗癌抗生物質  
 1) mitomycin C (MMC)  
 2) aclarubicin (ACR)  
 3) chromomycin  $A_3$  (CHRM)  
 4) bleomycin (BLM)  
 5) neocarzinostatin (NCS)  
 6) actinomycin D (ADM)  
 d) 紡錘体機能阻害剤  
 1) vincristine (VCR)

(1) Each sample dissolved in water or DMSO --- 0.05ml  
 (2) Bone marrow cells ----- 0.5 ml  
 (3) S9mix ----- 1.5 ml  
 (4) NCTC109 containing 10% NU-serum ----- 0.95ml  
 Mix (1)-(4) and incubate at 37°C for 30min  
 ↓  
 Add the mixed medium  
 ↓  
 Spread bone marrow cells in petri dish  
 ↓  
 Incubate at 37°C for 30hrs  
 ↓  
 Smear bone marrow cells  
 ↓  
 Stain with May-Grünwald and Giemsa  
 ↓  
 Count under a microscope  
 Calculation --  $\frac{\text{micronucleated polychromatic erythrocytes}}{\text{polychromatic erythrocytes (1000 cells)}} \times 100 (\%)$

Fig. 5. Test procedure.

- e) 化学工業物質、大気汚染物質等  
 1) 5-nitroacenaphthene (5NA)  
 2) benzo(a)pyrene (BaP)  
 3) benz(a)anthracene (BaA)  
 4) 3-nitrofluorancene (3NFR)  
 5) 6-nitrochrycene (6NCHR)  
 6) phenylhydrazine (PH)  
 7) 2-aminoanthracene (2AA)  
 8) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)  
 9) benzidine (BZ)  
 10) benzo(e)pyrene (BeP)  
 11) 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2)  
 12) 2-acetylaminofluorene (2AAF)  
 13) 2-naphthylamine (2NA)  
 14) dimethylnitrosamine (DMN)  
 15) benzotrichloride (BTC)  
 16) 1-nitropyrene (1NP)  
 17) 1,1-dimethylhydrazine (DMH)  
 18) 2-nitrofluorene (2NF)  
 19) chrycene (CHR)  
 20) diethylnitrosamine (DEN)  
 21) 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)



Table 6. In vitro 小核試験と in vivo 小核試験, Ames test および発癌試験との比較

Chemicals	In vitro micronucleus test -S9 +S9	In vivo micronucleus test	Ames test	Carcinogenicity
MMC	+	+	+	+
CQ	+	+	+	?
VCR	+	+	-	-
CHRM	+	+	-	?
NCS	+	+	-	?
Cyclo-C	+	+	-	-
BTC	+	-	+	+
5NA	+	-	+	+
INP	+	-	+	-
BLM	+	-	+	+
AMD	+	-	-	+
ACR	+	-	-	?
CY	-	+	+	+
BaP	-	+	+	+
BaA	-	+	+	+
3NFR	-	+	+	+
6NCHR	-	+	+	+
PH	-	+	+	+
6MPR	-	+	+	-
MTX	-	+	-	+
5FU	-	+	-	?
2AA	-	+	+	+
MNNG	-	+	+	+
BZ	-	+	+	+
BeP	-	+	+	+
Trp-P-2	-	+	+	+
2AAF	-	+	+	+
2NA	-	+	+	+
DMN	-	+	+	+
FT-207	-	+	-	?
DMH	-	-	+	+
2NF	-	-	+	+
CHR	-	-	+	+
DEN	-	-	+	+
Trp-P-1	-	-	+	+

Fig. 6 に試験をした 35 物質のうち陽性を示した物質の割合, すなわち陽性率を示した。In vitro 小核試験では 86%, in vivo 小核試験では 43%, Ames test では 74% が陽性となり, in vitro 小核試験と Ames test が優れた結果を示した。試験をした 35 物質のうち 25 物質についてその発癌

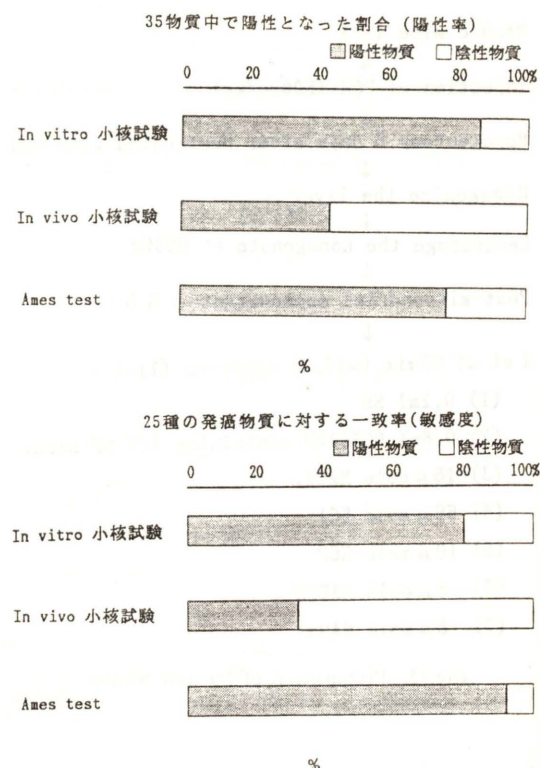


Fig. 6. 培養骨髓細胞を用いた小核試験の結果のまとめ.

性が明らかにされている。そこで, 25 種の発癌物質に対して試験結果が陽性を示した割合, 即ち敏感度を求めた (Fig. 6)。In vitro 小核試験が 80%, in vivo 小核試験が 32%, Ames test が 92% であり, これも in vitro 小核試験と Ames test が優れた結果を示した。また, Ames test で検出感度が低かった抗癌剤に対しても, in vitro 小核試験は優れた結果を示した。これらのことから, in vitro 小核試験と Ames test の両方法を併用することにより, かなり高い確率で発癌性をスクリーニングできると考えられる。

## 6. CHL 細胞を用いた小核試験法

今回用いた CHL 細胞は, 我が国において染色体異常試験に最も多く用いられている (石館ら, 1983)。この CHL 細胞を用いて我々は小核試験を実施した。方法の概略は, Fig. 7 に示した。CHL 細胞に S9 mix または緩衝液と被験物質を加えてから, +S9 mix の時は 6 時間, -S9 mix の時は

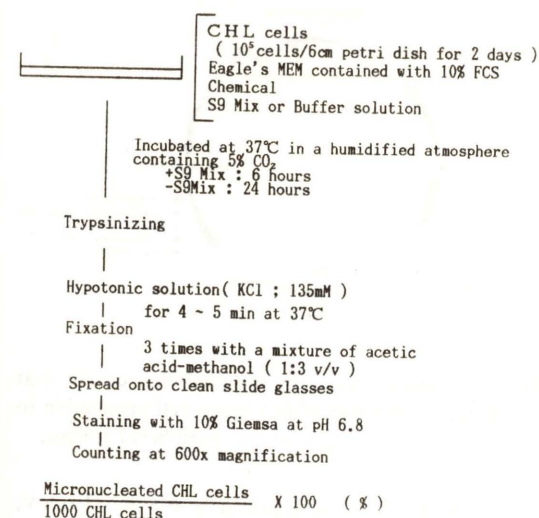


Fig. 7. CHL 細胞を用いた In vitro 小核試験法.

Table 7. CHL 細胞を用いた小核試験の結果

Chemicals	CHL micronucleus test	CHL chromosome aberration	Bone marrow in vitro MN test	Bone marrow in vivo MN test	Ames test	Carcinogenicity
5FU	+	+	+	+	-	?
MMC	+	+	+	+	+	+
CQ	+	NT	+	+	+	?
VCR	+	NT	+	+	-	-
BLM	+	+	+	-	+	+
NCS	+	NT	+	+	-	?
AMD	+	+	+	-	-	+
ACR	+	NT	+	-	-	+
CY	+	+	+	+	+	+
FT-207	-	+	+	-	-	?
MNNG	+	+	+	-	+	+
BZ	+	+	+	-	+	+
2AAF	+	+	+	-	+	+
2AA	+	NT	+	-	+	+
2NF	+	±	-	-	+	+
CHR	+	NT	-	-	+	+
DEN	+	+	-	-	+	+
DMBA	+	+	NT	NT	+	+
Urethane	+	+	NT	NT	+	+
3MC	+	+	NT	NT	+	+
BNU	+	+	NT	NT	+	+
ENU	+	+	NT	NT	+	+
5NA	+	NT	+	-	+	+
INP	+	+	+	-	-	-
BaP	+	+	+	+	+	+
Fluoride	+	NT	NT	NT	-	?

NT : Not tested, + : Positive, - : Negative

24 時間培養する。その後にトリプシン処理をし, 続いて低張処理をする。常法により固定, Giemsa 染色をした後に, 1000 個の細胞を数えてそこに出現した小核を有する細胞の割合を求める。Table 7 に試験結果を示した。あわせて, CHL 細胞による染色体構造異常試験, 我々の行った骨盤細胞を用いた in vitro 小核試験, BALB/c マウスによる in vivo 小核試験, Ames test, 動物実験による発癌性の結果も示した。この Table から CHL 細胞を用いた小核試験および染色体構造異常試験結果の一致率が高く, 検出感度も高いといえる。さらに発癌物質を検出する感度も良好である。従って, CHL 細胞を用いた小核試験は, 染色体構造異常試験法の代用ができる可能性がある。さらに, 手技が簡単で判定も容易であることも一つの利点といえる。



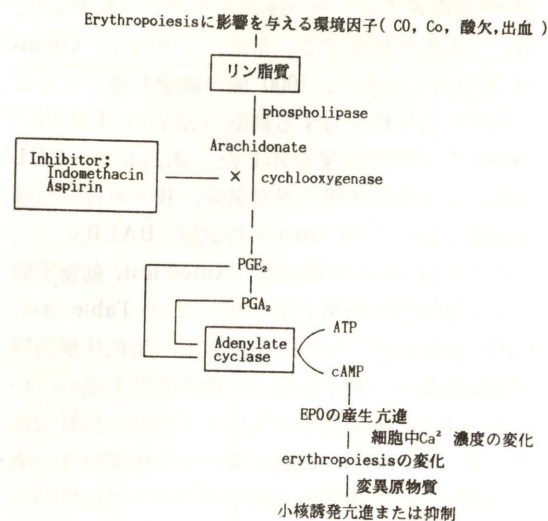


Fig. 8. 小核誘発に関する一考察.

## 7. In vitro 小核試験の応用例

### (1) 赤芽球—赤血球系細胞による in vitro 小核試験の応用例 (その 1)

我々は、日常生活環境中で様々な形で化学物質の曝露を受けている。例えば農薬、医薬品、食品添加物、化粧品、工業化学物質、喫煙、加熱調理食品、大気汚染、水質汚濁などである。これらの中にはヒトに発癌させる物質も存在することが知られている。一般に職業性曝露や医薬品の摂取などを除けば、ヒトへの曝露は個々の物質についてみると微量であることが多い。それにもかかわらず、大気汚染や喫煙と肺癌の発生との因果関係が疫学的に証明されていることは、発癌物質への曝露とそれ以外の種々の要因が絡み合って初めて発癌に至るものと考えられる。そこで、発癌助長因子や変異原性助長因子の研究、作業環境下における複合物質曝露時の相乗・相加作用の研究等、ヒトの発癌性を評価するために総合的に取り組む必要がある。

そこで我々は、in vivo および in vitro 小核試験を用いて染色体異常誘発助長因子のモニタリングとともに、その作用機序の解明を行っている。その概要を Fig. 8 に示した。

生体に一酸化炭素を曝露 (Suzuki ら, 1988) したり、酸素欠乏にすると組織での酸素欠乏状態が起こる。すると生体はホメオスタシス維持のた

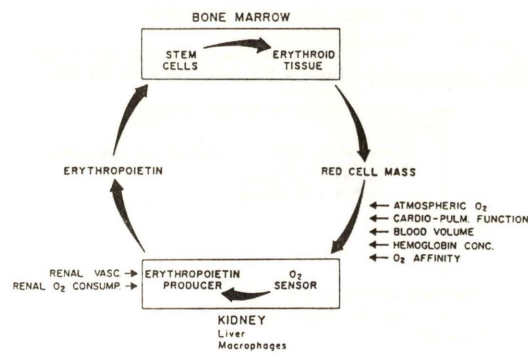


Fig. 9. Current model of the feedback circuit that regulates the rate of red blood cell production to the need for oxygen in the peripheral tissues.

め、Fig. 9 のような赤血球産生モデル (Erslev, 1977) が働きだすと考えられる。すなわち、生体中の  $O_2$  センサーが組織での酸素欠乏を認知し、腎臓、肝臓、網内系等で erythropoietin を産生し、骨髄中での erythropoiesis が亢進すると考えられる。一方ビタミン  $B_{12}$  欠乏により、悪性貧血が起こることが知られており、その治療にビタミン  $B_{12}$  製剤を用いる。ビタミン  $B_{12}$  の化学構造中のコバルトは、erythropoietin を誘導することが知られている。このように種々の要因によって erythropoietin 産生が促進されると生体内、特に骨髄中での erythropoiesis が亢進し、その結果小核誘発のチャンスが増加、すなわち変異原物質による小核誘発頻度が増加すると考えられる。つまり、赤芽球の増殖が盛んになると、変異原物質の DNA への assessability が増加したり、DNA 合成時の DNA 修復機能が完全でないものの割合が増加するためと考えられる (Suzuki ら, 1989a, b)。

つぎに、erythropoietin 産生機構と小核試験の関係を検討した。Erythropoietin 産生に関与していると考えられている prostaglandin  $E_2$  を前処置すると変異原物質による小核誘発頻度が亢進し、prostaglandin 合成阻害剤の indomethacin を前処置すると変異原物質による小核誘発頻度は抑制された。さらに、erythropoietin が赤芽球の分化・増殖に与える影響とカルシウムイオンとの関係を in vitro 小核試験により明らかにした。すなわち赤芽球培養液中のカルシウムイオン濃度を

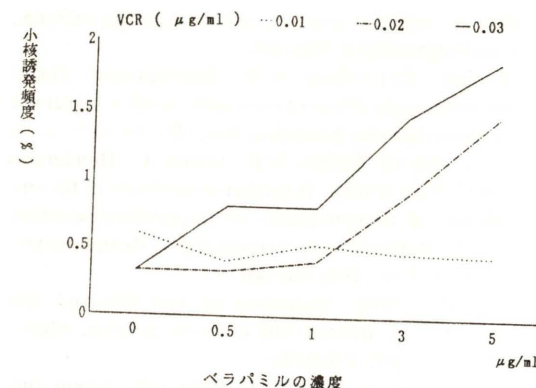


Fig. 10. ベラパミルの小核誘発頻度に与える影響。培養骨髄細胞を用いた小核試験。

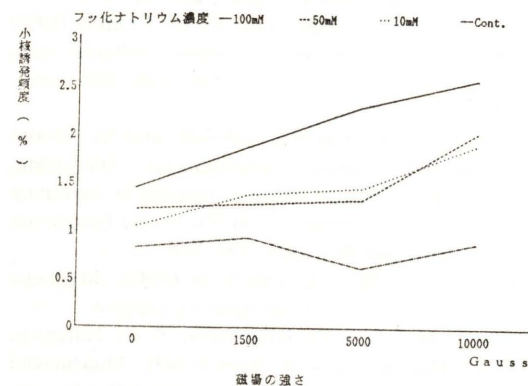


Fig. 11. フッ化ナトリウムの小核誘発に及ぼす磁場の影響。

低下させると、erythropoietin による erythropoiesis が抑制され、その結果変異原物質による小核誘発頻度も低下した。

### (2) 赤芽球—赤血球系細胞による in vitro 小核試験の応用例 (その 2)

心疾患治療薬として用いられているカルシウム拮抗剤であるベラパミルの小核試験への影響を検討した (鈴木ら, 1987)。赤芽球培養液中にベラパミルを前処置すると、VCR による小核誘発頻度が亢進した (図 10)。医薬品は、ヒトの体内に大量に摂取される場合が多いので、二次的効果、すなわち変異原性増強作用について十分検討する必要があると思われる。

### (3) CHL 細胞による in vitro 小核試験の応用例

疫学調査によると、磁場曝露と白血病誘発の関

係が報告されている (WHO, 1987)。一方、フッ化ナトリウムに変異原性が認められることが培養細胞系で報告されている (WHO, 1987)。アルミニウムプラントでは、フッ化ナトリウムが使用されていると共に、ヒトが磁場に曝露する環境にある。従って、磁場のフッ化ナトリウムの変異原性に及ぼす影響を検討することは重要であると考えられる。我々の実験によると、フッ化ナトリウムの小核誘発頻度は、磁場曝露により亢進することが明らかとなった。フッ化ナトリウムによる小核誘発頻度と磁場の強さの間に量—反応関係が認められた (Fig. 11)。アルミニウム工場従事者、リニアモーターカー、医学診断用核磁気共鳴装置等、今後ヒトが磁場に曝露する機会が増えてくることから、磁場曝露のヒトへの影響を明らかにしていくことは重要である。磁場曝露の変異原性への影響を検討する上で、CHL 細胞を用いた小核試験は有用と考えられる。

## 8. In vitro 小核試験のまとめ

### (1) In vitro 小核試験の長所

- 1) 方法が簡便である
- 2) 短期間で結果を出せる
- 3) 細胞と被験物質を直接接触させることができるので、変異原物質検出感度が高い
- 4) In vivo 試験と比較して被験物質量が少なくすむ
- 5) 容易に小核を認知できるので判定に熟練を要しない
- 6) 染色体構造異常試験結果と一致率が高いので代用できる可能性がある
- 7) In vivo 小核試験 (lymphocyte, erythroblast 等) を併用することによりメカニズムの解明ができる
- 8) リンパ球等の試験系では、作業環境等のバイオモニタリングができる
- 9) 最近、動物愛護の問題がクローズアップしてきている折から、継代細胞を用いる小核試験は、in vivo 試験系の代用となりうる可能性がある

### (2) In vitro 小核試験の短所

- 1) 赤芽球系細胞以外の試験では、主核と小



核が重なることがあり、判定が難しいことがある

## 2) In vivo 小核試験と一致しないことがある

いずれにせよ、in vitro 小核試験には、短期試験法としての有利な点が多いことから今後の発展が期待できる。

## 参考文献

- Aghamohammadi, S. Z., L. Henderson and R. J. Cole (1984) The human lymphocyte micronucleus assay. Response of blood lymphocyte to  $\gamma$ -irradiation and bleomycin, *Mutation Res.*, **130**, 395-401.
- Aghamohammadi, S. Z., D. H. Goodhead and J. R. K. Savage (1989) Production of chromosome aberrations, micronuclei, and sister-chromatid exchanges by 24-KeV epithermal neutrons in human Go lymphocytes, *Mutation Res.*, **211**, 225-230.
- Alaoui-Jamali, M. A., C. Lasne, K. Antonakis and I. Chouroulinkov (1986) Absence of genotoxic effects in cells exposed to four ketonucleoside derivatives, *Mutagenesis*, **1**, 411-417.
- Alaoui-Jamali, M., A. Castongusy and H. M. Schuller (1988) *In vitro* genotoxicity of 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone activated by hamster maternal and fetal tissues, *Carcinogenesis*, **9**, 2319-2324.
- Bertsche, U. and H. Schorn (1986) Glutathione depletion by DL-buthionine-SR-sulfoximine (BSO) potentiates X-ray-induced chromosome lesions after liquid holding recovery, *Radiat. Res.*, **105**, 351-369.
- Blasko, M., I. Kvietikova, I. Pleskova, I. Chalupa, P. Kuliffay and J. Siracky (1987) Cytogenetic changes of human peripheral blood lymphocytes *in vitro* after exposure to cis-DDP (cis-diamminedichloroplatinum II) and oxo-Pt (cis-diamminedichlorotrans-dihydroxyplatinum IV), *Neoplasma*, **34**, 235-238.
- Bonatti, S., P. H. M. Lohman and F. Berends (1983) Induction of micronuclei in chinese-hamster ovary cells treated with Pt cocradiation compounds, *Mutation Res.*, **116**, 149-154.
- Bonatti, S., L. Simi and A. Abbondandolo (1985) The effect of thymidine on the induction of micronuclei by alkylating agents in V79 chinese hamster cells, *Mutation Res.*, **150**, 347-353.
- Brock, W. A. and M. Williams (1985) Kinetics of micronucleus expression in synchronized irradiated chinese hamster ovary cells, *Cell Tissue Kinet.*, **18**, 247-254.
- Cheng, S. J., Y. Z. Jiang and H. Z. Lo (1985) A mutagenic metabolite produced by fusarium moniliforme isolated from Linxian country, China, *Carcinogenesis*, **6**, 903-905.
- Chrisman, C. L. and A. P. Baumgartner (1980) Micronuclei in bone-marrow cells of mice subjected to hyperthermia, *Mutation Res.*, **77**, 95-97.
- Cole, J., M. H. Green, S. E. James, L. Henderson and H. Cole (1988) A further assessment of factors influencing measurements of thioguanine-resistant mutant frequency in circulating T-lymphocytes, *Mutation Res.*, **204**, 495-507.
- Das, S. K. (1988) Activation of well behaved cell cycle in araC-treated V97 cells by caffeine, *Mutation Res.*, **207**, 171-177.
- De-Ferrari, M., S. Bonatti, V. Pisano, S. Viaggi and A. Abbondandolo (1988) The induction of numerical chromosome aberration in human lymphocyte cultured and V79 chinese hamster cells by diethyl sulfate, *Mutation Res.*, **205**, 409-414.
- Deig, E. F., T. J. Starr and K. K. Church (1962) Micronuclei formation in tissue cultured cells treated with colchicine, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 248-250.
- Doerr, C. L., K. Harrington-Brock and M. Moore (1989) Micronucleus, chromosome aberration, and small-colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse lymphoma cells, *Mutation Res.*, **222**, 191-203.
- Environmental Health Criteria 69 (1987) Magnetic fields, World Health Organization, Geneva.
- Erexson, G. L., A. D. Kligerman, E. C. Halperin, G. M. Honore and J. W. Allen (1989) Micronuclei in binucleated lymphocytes of mice following exposure to gamma radiation, *Environ. Mol. Mutagen.*, **13**, 128-132.
- Erslev, A. J. (1977) Production of erythrocytes, In: Williams, W. J., E. Beutler, A. J. Erslev and M. A. Lichtman (Eds.), *Hematology*, McGraw-Hill, New York, pp. 365-376.
- Fenech, M. and A. Morley (1985a) Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios*, **43**, 233-246.
- Fenech, M. and A. A. Morley (1985b) Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, **147**, 147.
- Fenech, M. and A. A. Morley (1985c) The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei, *Mutation Res.*, **148**, 99-105.
- Ferguson, L. R., P. van Zijl, W. D. Holloway and W. T. Jones (1985) Condensed tannins induce micronuclei in cultured V79 chinese hamster cells, *Mutation Res.*, **158**, 89-95.
- Ferguson, L. R. and P. van Zijl (1988) Mutagenic and clastogenic activity of nitracrine analogues in cultured V79 chinese hamster cells, *Mutation Res.*, **204**, 655-663.
- Ferguson, L. R., P. van Zijl and B. C. Baguley (1989) Mutagenicity profiles of newer amsacrine analogues with activity against solid tumors: comparison of microbial and mammalian systems, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **25**, 255-261.
- Glatt, H., R. G. Harvey, D. H. Phillips, A. Hewer and P. L. Grover (1989) Influence of the alkyl substituent on mutagenicity and covalent DNA binding of bay region diol epoxides of 7-methyl- and 7-ethylbenz(a)-anthracene in salmonella and V79 chinese hamster cells, *Cancer Res.*, **49**, 1778-1782.
- Goldberg, M. T., D. H. Blakey and W. R. Bruce (1983) Comparison of the effects of 1,2-dimethylhydrazine and cyclophosphamide on micronucleus incidence in bone marrow and colon, *Mutation Res.*, **109**, 91-98.
- Gollapudi, B. B., R. J. Bruce, W. A. Linscombe, P. G. Watanabe and A. K. Sinha (1986) Effect of food and water deprivation on the parameters of the mouse bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, **173**, 121-125.
- Heddle, J. A. (1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutation Res.*, **18**, 187-190.
- Heddle, J. A., R. D. Benz and P. I. Countryman (1978) Measurement of chromosomal breakage in cultured cell by the micronucleus test, In: Evans, H. J. and D. C. Lloyd (Eds.), *Mutagen-induced chromosome damage in man*, Yale Univ. Press New York, pp. 191-200.
- Heddle, J. A., A. S. Raj and B. Alena (1981) The micronucleus assay, II, *In vitro*, In: Stich, H. F. and R. H. C. San (Eds.), *Short-term tests for chemical mutagens*, Topics in environmental physiology and medicine, Springer-Verlag, Berlin, New York, pp. 250-254.
- Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salamone (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **123**, 61-118.
- Hellgren, D., H. Luthman and B. Lambert (1989) Induced recombination between duplicated neo genes stably integrated in the genome of CHO cells, *Mutation Res.*, **210**, 197-206.
- Hesterberg, T. W., C. J. Butterick, M. Oshimura, A. R. Brody and J. C. Barrett (1986) Role of phagocytosis in syrian hamster cell transformation and cytogenetic effects induced by asbestos and short and long glass fibers, *Cancer Res.*, **46**, 5795-5802.
- Högstedt, B., B. Akesson, K. Axell, B. Gullberg, F. Mitelman, R. W. Pero, S. Skerfving and H. Welinder (1983a) Increased frequency of lymphocyte micronuclei in workers producing reinforced polyester resin with low exposure to styrene, *Scand. J. Work Environ. Health*, **9**, 241-246.
- Högstedt, B., B. Gullberg, K. Hedner, A. Kolnig, F. Mitelman, S. Skerfving and B. Widegren (1983b) Chromosome aberrations and micronuclei in bone marrow and peripheral blood lymphocytes in humans exposed to ethylene oxide, *Hereditas*, **98**, 105-113.
- Högstedt, B. (1984) Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A Method for assessment of cytogenetic damage in man, *Mutation Res.*, **130**, 63-72.
- Huber, R., S. Streng and M. Bauchinger (1983) The suitability of the human lymphocyte micronucleus assay system for biological dosimetry, *Mutation Res.*, **111**, 185-193.
- Huber, R., H. Braselmann and M. Bauchinger (1989) Screening for interindividual differences in radiosensitivity by means of the micronucleus assay in human lymphocytes, *Radiat. Environ. Biophys.*, **28**, 113-120.
- 石館 基監修 (1983) 染色体異常試験データ集, Realize Inc., 東京.
- Iskandar, O. and Vijayalaxmi (1981) The enhancement of the effect of aflatoxin B<sub>1</sub> by metabolic activation with rat-liver microsomes on human lymphocytes assayed with the micronucleus test, *Mutation Res.*, **91**, 63-66.
- Khadzhidekova, V. (1989) Frequency of micronuclei in lymphocytes from *in vitro* gamma-irradiated human peripheral blood, *Radiobiol. Radiother. Berl.*, **30**, 157-161.
- Koller, P. C. (1969) Mutagenic alkylating agents as growth inhibitors and carcinogens, *Mutation Res.*, **8**, 199-206.
- Kormos, C. and G. I. Köteles (1988) Micronuclei in X-irradiated human lymphocytes, *Mutation Res.*, **199**, 31-35.
- Kozachenko, V. I., IuB. Pashin, L. S. Soboleva and L. E. Sal'nikova (1987) Mutagenic action of cadmium chloride in mammals, *Biol. Nauki.*, **11**, 102-105.
- Krishna, G., M. L. Kropko and J. C. Theiss (1989) Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 chinese hamster lung cells: results with mitomycin C and cyclophosphamide, *Mutation Res.*, **222**, 63-69.
- Kwan, D. K., A. R. Kagan and A. Norman (1985) Relative biological effectiveness of 125I in the induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes, *Radiother. Oncol.*, **4**, 163-166.
- Lasne, C., Z. W. Gu, W. Venegas and I. Chouroulinkov (1984) The *in vitro* micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens: comparison with the sister-chromatid exchange assay, *Mutation Res.*, **130**, 273-278.
- Li, M. X. (1988) Mutagenicity and carcinogenicity



- of T-2 toxin, a trichothecene produced by *Fusarium fungi*. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih*, **10**, 326-329.
- Li, J. (1990) Conflicting evidence: clastogenic and non-mutagenic effects of sodium fluoride, *Jikei Med. J.*, **37**, 93-102.
- Linnainmaa, K., T. Meretoja, M. Sorsa and H. Vainio (1978) Cytogenetic effects of styrene and styrene oxide, *Mutation Res.*, **58**, 277-286.
- Mäki-Paakkanen, J. and H. Norppa (1987) Induction of micronuclei by vinyl acetate in mouse bone marrow cells and cultured human lymphocytes, *Mutation Res.*, **190**, 41-45.
- Miele, M., S. Bonatti, P. Menichini, L. Ottagio and A. Abbondandolo (1989) The presence of amplified regions affects the stability of chromosomes in drug-resistant Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, **219**, 171-178.
- Migliore, L., M. Nieri, S. Amodio and N. Loprieno (1989) The human lymphocyte micronucleus assay: a comparison between whole blood and separated-lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, **227**, 167-172.
- Morishima, A., M. Milstein, R. T. Henrich and G. G. Nahas (1976) Effects of marihuana smoking, cannabinoids and olivetol on replication of micronuclei, In: Braude, M.C. and S.S. Szara (Eds.), *The Pharmacology of Marihuana*, vol. 2. pp. 711-722.
- Müller, W. U., C. Streffer and R. Wurm (1985) Supraadditive formation of micronuclei in preimplantation mouse embryos *in vitro* after combined treatment with X-ray and caffeine, *Teratogenesis Carcinog. Mutagen*, **5**, 123-131.
- Müller, W. U., C. Streffer and C. Fischer-Lahdo (1986) Toxicity of sodium arsenic in mouse embryos *in vitro* and its influence on radiation risk, *Arch. Toxicol.*, **59**, 172-175.
- Müller, W. U., C. Streffer, M. Molls and L. Gröck (1987) Radiotoxicities of [<sup>3</sup>H] thymidine and of [<sup>3</sup>H] arginine compared in mouse embryos *in vitro*, *Rad. Res.*, **110**, 192-198.
- Narod, S. A., L. Neri, H. A. Risch and S. Raman (1988) Lymphocyte micronuclei and sister chromatid exchanges among Canadian federal laboratory employees, *Am. J. Ind. Med.*, **14**, 449-456.
- Natarajan, A. and G. Obe (1980) Screening of human population for mutations induced by environmental pollutants: Use of human lymphocyte system, *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, **4**, 468-481.
- Nito, S., Y. Kondo, T. Ono and F. Ariyuki (1986) *In vitro* micronucleus method with erythropoietin-differentiated erythrocytes, *Mutation Res.*, **175**, 243-247.
- Nusse, M., S. Viaggi and S. Bonatti (1989) Induction of kinetochore positive and negative micronuclei in V79 cells by the alkylating agent diethylsulphate, *Mutagenesis*, **4**, 174-178.
- Oshimura, M., T. W. Hesterberg, T. Tsutsui and J. C. Barrett (1984) Correlation of asbestos-induced cytogenetic effects with cell transformation of syrian hamster embryo cells in culture, *Cancer Res.*, **44**, 5017-5022.
- Pampfer, S., C. Streffer and W. U. Müller (1989) Micronucleus formation in 2-cell embryos after *in vitro* X-irradiation of mouse spermatozoa, *Mutation Res.*, **210**, 191-196.
- Parvez, Z., M. Kormano, R. Moncada and R. Eklund (1986) Contrast media-induced chromosomal damage in human lymphocyte cultures, *Invest. Radiol.*, **21**, 864-869.
- Parvez, Z., M. Kormano, K. Satokari, R. Moncada and R. Eklund (1987) Induction of mitotic micronuclei by X-ray contrast media in human peripheral lymphocytes, *Mutation Res.*, **188**, 233-239.
- Pincu, M., D. Bass and A. Norman (1984) An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, **139**, 61-65.
- Pleskova, I., M. Blasko and J. Siracky (1984) Chromosomal aberrations, sister chromatid exchange (SCEs) and micronuclei induction with three platinum compounds (cis-DDP, CHIP, CBDCA) in V79 cells *in vitro*, *Neo-plasma*, **31**, 655-659.
- Prosser, J. S., J. E. Moquet, D. C. Lloyd and A. A. Edwards (1988) Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes, *Mutation Res.*, **199**, 37-45.
- Ramalho, A., I. Sunjevaric and A. T. Natarajan (1988) Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: Comparison of two methods, *Mutation Res.*, **207**, 141-146.
- Risley, M. S., A. Miller and D. Bumcrot (1988) *In vitro* analysis of germ cell genotoxicity in testis explant cultures: Spermatid micronucleus assays, *Mutation Res.*, **203**, 125-133.
- Roberts, C. J., G. R. Morgan and P. D. Holt (1986) A critical comparison of the micronucleus yield from high and low LET irradiation of plateau-phase cell populations, *Mutation Res.*, **160**, 237-242.
- Sal'nikova, L. E., L. M. Bakhitova and IuV. Pashin (1988) Effect of alkylation and carbamoylation on the characteristic of genetic damage to mammalian somatic cells cultured *in vitro*, *Biull. Eksp. Biol. Med.*, **105**, 66-67.
- Sekiguchi, T., K. Shelton and N. R. Ringertz (1978) DNA content of microcells prepared from rat kangaroo and mouse cells, *Exp. cell Res.*, **113**, 247-258.
- Serebrianyi, A. M., L. E. Sal'nikova, L. M. Bakhitova and IuB. Pashin (1989) Potassium cyanate modification of the toxic and mutagenic effects of gamma radiation and Benzo(a)pyrene, *Radiobiologia*, **29**, 235-240.
- 新川加奈子, 森本兼義 (1986) ヒトリンパ球小核試験, 遺伝疫学指標への応用について, トキシコロジーフォーラム, **9**, 77-85.
- 新川加奈子, 森本兼義 (1988) ヒトリンパ球におけるマイトマイシン C 誘発小核の出現機構について, 日衛誌, **43**, 628-633.
- Stenstrand, K. (1985) Effects of ionizing radiation on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei in lymphocytes of smokers and nonsmokers, *Hereditas*, **102**, 71-76.
- Stenstrand, K., J. K. Larsen, H. C. Wulf and G. Lange-Wantzin (1987) Effects of 254 nm UV irradiation of human lymphocytes *in vitro* studied on chromosomes, cell cycle phase distribution and cell surface antigens, *Potodermatol.*, **4**, 36-42.
- Stich, H. F. and B. P. Dunn (1986) Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents, *Int. J. Cancer*, **15**, 713-717.
- 鈴木勇司 (1985) 高感度小核試験の開発に関する研究 (第2報) 培養骨髓細胞を用いた *in vitro* の方法, 慈恵医大誌, **100**, 707-719.
- 鈴木勇司, 益頭尚典, 長嶋敏晴, 清水英佑 (1987) 小核試験感度増強に与える Ca<sup>2+</sup> 拮抗剤の影響について, 日衛誌, **42**, 658-665.
- Suzuki, Y., T. Nagashima and H. Shimizu (1988) Effects of carbon monoxide on the micronucleus test, in "Occupational health in the chemical industry", World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, pp. 156-166.
- Suzuki, Y., Y. Nagae, T. Ishikawa, Y. Watanabe, T. Nagashima, K. Matsukubo and H. Shimizu (1989a) Effect of erythropoietin on the micronucleus test, *Envir. Mol. Mutagenesis*, **13**, 314-318.
- Suzuki, Y., Y. Nagae, J. Li, H. Sakaba, K. Mozawa, A. Takahashi and H. Shimizu (1989b) The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio), *Mutagenesis*, **4**, 420-424.
- Tanaka, K., T. Izumi, T. Ohkita and N. Komada (1984) Micronuclei and chromosome aberration found in bone marrow cells and lymphocytes from thorotrast patients and atomic bomb survivors, *Hiroshima J. Med. Sci.*, **33**, 101-111.
- 田中信徳ら (1977) 遺伝学辞典 (田中信徳監修), 共立出版, 東京.
- Tates, A. D., N. Vogel, A. H. M. Rotteveel, F. Leupe and J. A. G. Davids (1989) The response of spermatogonia and spermatocytes of the northan vole *Microtus oeconomus* to the induction of sex-chromosome nondisjunction, diploidy and chromosome breakage by X-rays and fast fission neutrons, *Mutation Res.*, **210**, 173-189.
- Tsui, Y. C., M. R. Creasy and M. A. Hulten (1983) The effect of the male contraceptive agent gossypol on human lymphocytes *in vitro*: traditional chromosome breakage, micronuclei, sister chromatid exchange, and cell kinetics, *J. Med. Genet.*, **20**, 81-85.
- Wakata, A. and M. S. Sasaki (1987) Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations, *Mutation Res.*, **190**, 51-57.
- Walton, D. G., A. B. Acton and H. F. Stich (1984) Comparison of DNA-repair synthesis, Chromosome aberrations and induction of micronuclei in cultured human fibroblast, chinese hamster ovary and central mudminnow (*Umbra limi*) cells exposed to chemical mutagens, *Mutation Res.*, **129**, 129-136.
- White, G. R., C. H. Ockey, J. Brennand and G. P. Margison (1986) Chinese hamster cells harbouring the *Escherichia coli* 06-alkyl-guanine alkyltransferase gene are less susceptible to sister chromatid exchange induction and chromosome damage by methylating agents, *Carcinogenesis*, **7**, 2077-2080.
- Wilson, W. R., N. M. Harris and L. R. Ferguson (1984) Comparison of the mutagenic and clastogenic activity of amsacrine and other DNA-intercalating drugs in cultured V79 chinese hamster cells, *Cancer Res.*, **44**, 4420-4431.
- Xing, S. G., X. C. Shi, Z. L. Wu, W. X. Whong and T. Ong (1989) Effect of tetrandrine on micronucleus formation and sister-chromatid exchange in both *in vitro* and *in vivo* assays, *Mutation Res.*, **224**, 5-10.



## ガス・蒸気曝露による変異原性試験法

東京大学医科学研究所 癌生物学研究部 松 島 泰次郎

微生物変異原性試験で、低沸点で揮発性の液体が通常のプレート法では、寒天培地から蒸発して有効な濃度が得られないので変異原性を示さないのが、デシケーターや嫌気性培養容器を用いて液体を蒸発させてガス状で曝露すると変異原性を示すことが報告されている。ガス状曝露で試験を実施する目安になる沸点をどこにおけば良いのだろうか。

イギリスの John Ashby が最近この点について問題を提起している (Mutagenesis: 4, 160-162, 1989)。沸点が 100°C 以上の液体はプレインキュベーション法で変異原性を示しているが、例外として沸点 120°C の chlorodibromomethane がプレインキュベーション法では変異原性を示さないのに、ガス状曝露をすると変異原性を示す。沸点だけでなく水に対する溶解度を考慮する必要がある。いくつかの物質の変異原性試験の結果を比較して、沸点と分配係数を考慮して、沸点が 180°C 以下で油溶性 (分配係数  $\log P$  が 1 ~ 2 以上) の物質は、通常の方法で変異原性を示さなかった場合にガス状曝露で試験する必要性をあげている。

微生物変異原性試験でプレート法、プレインキュベーション法、ガス状曝露法で試験が実施された化学物質の試験結果と沸点および水に対する溶解度を Table 1 にまとめた。プレート法では変異原性を示さなかった物質がプレインキュベーション法および試験管を密栓して行った改良プレインキュベーション法で変異原性を示している。水に対する溶解度の高い ethylene oxide や propylene

oxide は沸点が低くてもプレインキュベーション法で変異原性を示している。水に対する溶解度の低い物質は変異原性を示さない。trichloroethylene や 1-bromobutane の様に通常のプレインキュベーション法では変異原性を示さない物質が、密栓をした改良プレインキュベーション法では変異原性を示すようになる。プレインキュベーション法に比べてガス状曝露法は検出感度が高い。プレインキュベーション法で変異原性を示さなかった物質は、沸点と溶解度を考慮してガス状曝露で再試験を実施する必要がある。どの様な場合にガス状曝露をする必要があるだろうか。

Table 1 のデータを図に表してみる。Fig. 1 にはプレート法とガス状曝露法の比較を、Fig. 2 にプレインキュベーション法との比較を示す。実線の左側に入る物質はガス状曝露で調べる必要がある。プレインキュベーション法がプレート法より検出感度が高いので、沸点 200°C 以下の物質はプレインキュベーション法で試験をする必要がある。水に対する溶解度の低い物質は改良プレインキュベーション法で試験をする必要がある。沸点が 140°C 以下で溶解度の低い物質が改良プレインキュベーション法で変異原性を示さなかった時には、ガス状曝露法で調べる必要がある。

ガス状曝露の容器としてはデシケーターなどの密閉容器を用いても良いが、液体を気化させる為の加熱装置が必要であり、また気化出来る濃度に限界が生じる。その点環境測定に用いるガス捕集袋で polyvinyl fluoride polymer で作られた Tedlar バッグを用いると便利である。試験菌株

〒108 東京都港区白金台 4-6-1

Mutation assay by gas—or vapour-exposure procedure

Taijiro Matsushima

Department of Molecular Oncology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokane-Dai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan



Table 1. 液状物質のガス曝露法, プレインキュベーション法およびプレート法による微生物変異原性試験

物質名	略字	沸点 (°C)	水に対する 溶解度 (%)	変 異 原 性		
				ガス曝露法	プレインキュベーション法	
					改良(密閉)	通常(開放)
Ethylene oxide	EO	11	100	++		+
Propylene oxide	PO	35	41	++		+
Bromoethane	BE	39	0.91	++	+	—
Methylene chloride	MC	40	1.3	+		—
Allyl chloride	AC	45	0.36	++	+	—
2-Bromopropane	2BP	59	0.29	++	+	
Butylene oxide	BO	63	10	++		+
3-Chloro-2-methylpropane	CMP	69	0.09	+		—
1-Bromopropane	1BP	71	0.23	+		—
Iodo ethane	IE	72	3.9	+	+	—
Acrylonitrile	AN	73	7.4	++		+
1-Chlorobutane		78	0.11	—		—
1,2-Dichloroethane	DCE	84	0.87	+		+
Trichloroethylene	TCE	87	0.11	+	+	—
1-Bromobutane	1BB	101	0.06	++	+	—
1-Bromo-2-chloroethane	BCE	107	0.70	++	+	±
1,1,2-Trichloroethane		113	0.45	—		—
Epichlorohydrin	EH	118	6.6	++	++	+
Chlorodibromomethane	CDBM	120	0.02	+		—
2-Nitropropane	NP	120	1.7	+	+	
1,2-Dibromoethane	DBE	132	0.54	++		±
Benzylchloride		179	不 溶	++		±
Benzotrifluoride		221	不 溶	++		+

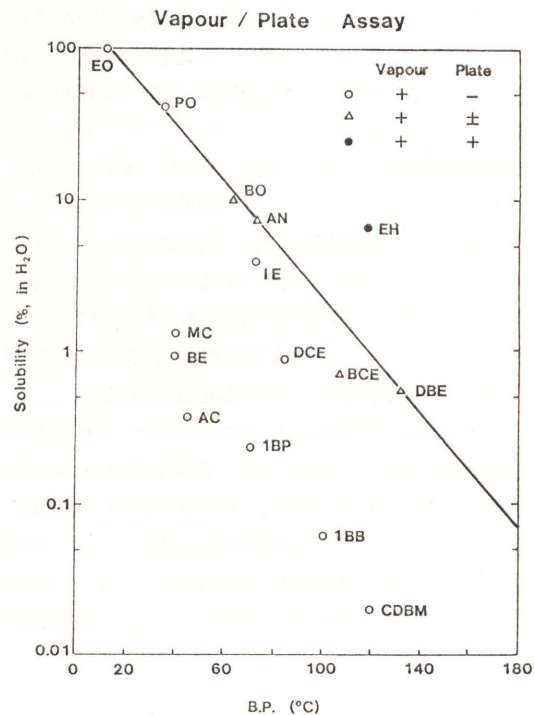


Fig. 1. プレート法とガス曝露法の比較.

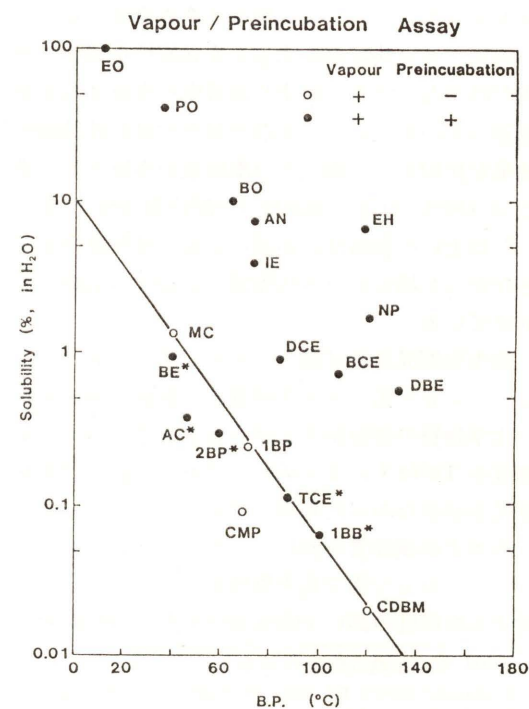


Fig. 2. プレインキュベーション法とガス曝露法の比較.

とヒスチジン・ビオチン液および代謝活性化法  
 のときには S9 mix をスプレッドした最少グルコース  
 寒天平板培地のふたをはずして支持棒にたてた  
 ものを, Tedlar バッグに入れてガス捕集用の栓  
 から排気する。加熱気化装置を用いて液体をガス  
 状にして一定量の空気で希釈して別の Tedlar バ  
 ッグに入れて種々の濃度のガスを作る。このガス  
 を排気したバッグに導入してガス曝露を実施す  
 る。外部からガスを導入するときデシケーターの  
 様な密閉容器の場合に比べて Tedlar バッグを用  
 いるとガス交換が容易である。

ガス状曝露は上に述べた様に揮発性あるいは水  
 に溶解度の悪い液体の試験の場合に有効である  
 が、それ以外に毒性の強い物質の場合にも毒性の  
 発現が低くて有効な場合があり、また水に不安定  
 な物質の場合にガス状にして直接試験菌株にとり  
 込ませることが出来るので変異原性を検出できる  
 利点もある。液状の化学物質の安全性を調べると  
 きにその物質の物性を考慮して試験方法を選択す  
 ることが大切である。

# 参考文献

- 荒木明宏, 野口 忠, 松島泰次郎 (1988) ガス状物質の  
 微生物を用いる変異原性試験——テドラー®バッグを  
 用いる曝露試験——, トキシコロジーフォーラム,  
 11, 184-193.  
 Barber, E. D., W. H. Donish and K. R. Mueller  
 (1981) A procedure for the quantitative measure-  
 ment of the mutagenicity of volatile liquids in the  
 Ames Salmonella/microsome assay, Muta-

- tion Res., 90, 31-48.  
 Bridges, B. A. (1978) On the detection of volatile  
 liquid mutagens with bacteria: Experiments  
 with dichlorvos and epichlorohydrin, Mutation  
 Res., 54, 367-371.  
 Hughes, T. J., D. M. Simmons, L. G. Monteith and  
 L. D. Claxton (1987) Vaporization technique to  
 measure mutagenic activity of volatile organic  
 chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environ.  
 Mutagenesis, 9, 421-441.  
 Hughes, T. J., D. S. Simmons, L. G. Monteith, L. E.  
 Myers and L. D. Claxton (1987) Mutagenicity of  
 31 organic compounds in a modified preincuba-  
 tion Ames assay with *Salmonella typhimurium*  
 strains TA100 and TA102, Environ. Mutagenesis,  
 9, Suppl. 8, 49.  
 McCoy, E. C., L. Burrows and H. S. Rosenkranz  
 (1978) Genetic activity of allyl chloride, Muta-  
 tion Res., 57, 11-15.  
 Milvy, P. and M. Wolff (1977) Mutagenic studies  
 with acrylonitrile, Mutation Res., 48, 271-278.  
 Simmon, V. F., K. Kauhanen and R. G. Tardiff  
 (1977) Mutagenic activity of chemicals identified  
 in drinking water, In: D. Scott, B. A. Bridges  
 and F. H. Sobels (Eds.), Progress in Genetic  
 Toxicology, Elsevier/North-Holland Biomedical  
 Press, Amsterdam, pp. 249-258.  
 Warner, J. R., T. J. Hughes and L. D. Claxton  
 (1988) Mutagenicity of 16 volatile organic chem-  
 icals in a vaporization technique with *Salmo-*  
*nella typhimurium* TA100, Environ. Mol. Mu-  
 tagenesis, 11, Suppl. 11, 111-112.  
 Victorin, K. and M. Ståhlberg (1988) A method  
 for studying the mutagenicity of some gaseous  
 compounds in *Salmonella typhimurium*, Environ.  
 Mol. Mutagenesis, 11, 65-77.



# 「地球圏—生物圏国際協同研究計画(IGBP)の実施について(勧告)」を採択

平成2年5月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る4月18日から20日まで第109回総会を開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、その総会で採択された勧告を中心に、同総会の議事内容等についてお知らせします。

## 日本学術会議第109回総会報告

日本学術会議第109回総会(第14期・第5回)は、4月18～20日の3日間開催された。

総会第1日目の午前中には、会長からの経過報告、各部・委員会報告に続き、勧告、対外報告の2案件の提案がなされた。これらの案件については、同日午後の各部会での審議を経た上で、第2日目の午前中に採択された。なお、総会前日の17日の午前中には、連合部会が開催され、これらの案件の予備的な説明、質疑が行われた。また、第2日目の午後には、自由討議が、第3日目の午前中には各常置委員会が、午後には各特別委員会がそれぞれ開催された。なお、第2日目の総会に先立ち、同日表敬訪問のために訪れた1990年(第6回)日本国際賞受賞者4名の紹介がなされ、うち2名の方々から挨拶が行われた。

今回総会では、次の勧告、対外報告が採択された。

①地球圏—生物圏国際協同研究計画(IGBP)の実施について(勧告)(この勧告の詳細は、別掲参照)

このIGBPについては、以前から会長召集の検討会議や関係する部会、研究連絡委員会等で検討が続けられてきたが、この度、これらの検討結果を踏まえて、人間活動と地球環境に関する特別委員会のIGBP分科会が中心となって今回の勧告案を取りまとめたものである。

この勧告は、同日午後直ちに内閣総理大臣に提出され、関係省庁に送付された。

②人間活動と地球環境に関する特別委員会報告—人間活動と地球環境について(この対外報告の詳細は、別掲参照)

これは、人間活動と地球環境に関する特別委員会が、昭和63年10月の発足以来行ってきた審議の結果を中間報告として取りまとめたものについて、外部に発表することを承認したものである。この件に関する審議の際には、人間活動という言葉の定義、国際関係や各国の科学技術政策との関連、環境教育の位置付け等々について、活発な質疑応答があり、また、文案の修正を求める多くの意見が出される等、熱心な討議が行われた。

また、総会第2日目の午前には、南アフリカ共和国科学者の学術に係る我が国への入国手続きをめぐる従来からの問題について討議が行われ、「科学者の自由交流」の考え方に賛同し、本問題の早急かつ実質的な解決を望む多数の意見が述べられた。

なお、第2日目午後には、「学術の国際化への対応」というテーマで、活発な自由討議が行われた(この自由討議の詳細は、別掲参照)。

## 地球圏—生物圏国際協同研究計画(IGBP)の実施について(勧告)

(勧告本文)

国際学術連合会議(ICSU)は、1983年1月の執行委員会から、国際測地学・地球物理学連合(IUGG)より提案のあった地球圏—生物圏国際協同研究計画(International Geosphere-Biosphere Programme, 略称IGBP)について検討を始め、1986年ベルンで開かれた総会で、この計画を1990年から10年間国際協力により実施することを決定した。我が国の研究者は国際的立案の段階からこの研究計画の審議に参加してきており、この国際協力事業に我が国の研究者が参加することは、この国際協同研究計画が持つ重要性にかんがみ意義が極めて大きいと考えられる。したがって、政府はこの国際的かつ学際的事業を成功させるために、我が国におけるIGBP研究の実施に当たり、研究の推進、国際対応、研究者の養成などの体制整備並びに予算等万全の措置を講じられたい。

(説明)[要旨]

国際学術連合会議(ICSU)は、国際協同研究として、地球変化を支配する物理的・化学的・生物学的な諸過程とその相互作用を解明するため専門的知識を結集し、「地球圏—生物圏国際協同研究計画(IGBP)を実施するため、検討を行ってきた。我が国の研究者は関係する国際委員会に参画し積極的にその役割を果たしてきた。

IGBPの目的は全地球を支配する物理的・化学的・生物学的諸過程とその相互作用を究明することによって、過去から現在、未来にいたるまでの生命を生み出している地球独特の環境とその変化、さらに人間活動による変化について解明し、記述し、理解することである。

我が国における実施計画は、国際的な計画を参照しつつ、次の7研究領域を設定した。

- 研究領域1：大気微量成分の変動及び生物圏との交換。
- 研究領域2：海洋における物質循環と生物生産。
- 研究領域3：陸上生物群集への気候変化の影響。
- 研究領域4：大気圏・水圏・陸圏と生物圏の相互作用を考慮した気候解析とモデリング。
- 研究領域5：環境変化のモニタリング
- 研究領域6：古環境の変遷。
- 研究領域7：地球環境と人間活動の相互作用。

本研究計画は1990年から10年間行われ、日本は広義のモンスーンアジア地域、西太平洋地域、極域に特に重点をおいて研究を実施する。また、効果的に推進するため、地球システムにかかわる他の国際協同研究とも協力する。



## 人間活動と地球環境に関する特別委員会報告 —人間活動と地球環境について（要旨）

人間活動とそれを取りまく環境については、ギリシャ・ローマ時代以来考察されてきた。最近に至り、工業化や都市化が早い速度で展開し、その影響は局地的にとどまらず、地球規模で進行し、地球環境の急速な変化が現れてきた。特に、二酸化炭素や微量気体の温室効果に起因する地球温暖化、酸性雨、砂漠化などさまざまな環境変化が現れている。そしてその進行速度が大で、人間として対応、適応または順化しうる変化の速度の限界を越しているところにある問題がある。

地球規模の環境変化研究の国際的プロジェクトとして「地球圏—生物圏国際協同研究計画（IGBP）」があり、少し遅れて実施される予定の「地球変化の人類次元研究計画（仮称）（HDGCP）」がある。

問題を解決するためには、人間活動と地球環境を一つの系としてとらえ、そこにおける物質循環やエネルギー変化の定量的記述に基づき、あるべき姿を検討し、新しい技術体系や政策体系を構築する。そこでは、総合的な研究体制を構築するプログラムを用意する必要がある。このような新しいしかも長期的な研究を推進するためには、研究者の養成、教育体系の検討、全学術研究体系の整備が必要である。

### 総会中の自由討議—学術の国際化への対応

本会議総会中の行事の一環である自由討議が、総会2日目の4月19日の午後1時から3時間にわたり開催された。今回の課題は、「学術の国際化への対応」であった。

自由討議は、大石泰彦副会長の司会のもと、はじめに話題提供として、①川田侃第2部会員から「学術の国際化への対応—政治学の場合」について、②高柳和夫第4部会員から「学術における国際対応—理学の場合」について、③松本順一郎第5部会員から「日本学術会議と国際学術協力」について、それぞれ意見の発表がなされた。

続いて、会員間で多岐多様にわたり活発な討議が行われたが、その際述べられた意見の主なものを項目として列挙すると、「日本全体の国際学術交流・協力事業に占める日本学術会議の位置付け、役割」、「特に発展途上国からの研究者、留学生の受入れ問題」、「ユネスコ関係の諸活動・事業への対応の在り方」、「日本学術会議が加入している各国国際学術団体への対応の個別的な現状と問題点」、「新しい国際協力事業への日本学術会議の対応の在り方」、「日本学術会議の国際対応組織の整備・強化」等であった。

### 経営工学研究連絡委員会報告—経営工学の体系化に向けて（要旨）

固有技術とよく調和した管理技術の体系を明確にし、この体系の研究を進めて行くことは高度技術社会における社会組織と企業経営のあり方を検討するのに重要な意義を有する。

今までも、経営工学は日本の経済、社会及び技術の発展段階において、その役割を果たし、日本経済の発展に貢献してきた。とくに日本製品の品質と生産性と向上に果たした経営工学の役割は広く内外において高く評価されているところである。

経営工学の理論と応用の研究は、その実学的な性格もあり、企業における工学・技術を基盤とする経営管理活動に

重点がおかれていたが、経営工学の理論は広い普遍性を有しているので、今後は広く社会や国際に関する問題にも応用されなければならない。

本報告は、このような意図の下に、経営工学研究連絡委員会に参加している4学会の代表者よりなるワーキンググループの協力の下に、経営工学の役割と学問的体系を整理し、その研究と教育のあり方と今後の展開を考察したものである。

### 生物物理学研究連絡委員会報告—生物物理学の新しい研究体制について（要旨）

生物科学の急速な進展の中で生物物理学は生物機能のメカニズムを物理学的に解明し、生物科学全体の基礎を形づくる学問として、多くの貢献をしてきた。今後生命現象の基本的理解をめざすのみならず、バイオテクノロジーの基盤となるべく、生物物理学の役割はますます大きい。

このような状況の下で、生物物理学の一層の発展をはかるには、以下のような新しい研究体制をつくることが望ましい。

現段階で特に集中的総合的に研究を推進すべき分野として、(A)分子機能解析 (B)生物情報解析 (C)高次情報解析の三つを取り上げる。それぞれの分野に適合した場所に研究室群（研究センター）をおき、それらが相互に連携し、一つの研究組織を作る。さらにこの組織が物理的方法を軸として新しい大型の研究設備のシステムを備える。そして将来この体制が基礎生物科学の研究体制の重要な一環となることをめざす。

### 日本学術会議第15期会員選出のための学術研究団体の登録について

現在、日本学術会議会員推薦管理会では、各学術研究団体から、第15期会員選出のための日本学術会議への「登録」申請の受付を行なっています。この「登録」は、期が変わる度に行う必要があり、従って、第14期における登録学術研究団体も第15期会員選出のための登録学術研究団体となるためには、改めて第15期の「登録」が必要です。

この「登録」申請を行うためには、所定の様式による「学術研究団体登録申請書」を、平成2年6月30日（土）までに日本学術会議会員推薦管理会に到達するように提出する必要があります。

「学術研究団体登録申請書」は、所定の様式と用紙がありますので、日本学術会議会員推薦管理会に請求してください。無料で送付します。

### 日学双書の刊行案内

日本学術会議主催公開講演会の記録を中心に編集された次の日学双書が刊行されました。

- 日学双書 No.6 「高齢社会をどう生きるか」
- 日学双書 No.9 「『人権の歩み』から何を学ぶか」

〔定価〕両書とも、1,000円（消費税込み）

※問い合わせ先：（財）日本学術協力財団（〒106 東京都港区西麻布3-24-20、交通安全教育センタービル内、電話03-403-9788）

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 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(403)6291

## 日本環境変異原学会会則

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

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

第3条 本会の会員は、正会員、学生会員および賛助会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者とする。学生会員は、大学、または大学院に在籍し、毎年所定の手続を経て、定められた会費を納入した者とする。賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。

第4条 本会に入会を希望するものは、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込むものとする。

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

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
2. 奨励賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行い、将来の成果が期待される研究者（原則として会員）に授与する。
3. Mutation Research誌の特別巻を特価で購入配付する。
4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
5. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

会長 1名 庶務幹事 1名  
会計幹事 1名 国際交流幹事 1名  
編集幹事 1名 会計監査 2名  
および評議員若干名。

評議員は正会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。

庶務幹事、会計幹事、国際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

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

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

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。

会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

### 附 記

1. 本会則は平成2年1月1日より施行する。
2. 本会は事務所を静岡県三島市谷田1,111番地に置く。
3. 正会員、学生会員および賛助会員の会費は、それぞれ年額5,000円、3,000円および10,000円とする。ただし、Mutation Research誌の特別巻の配付を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。



日本環境変異原学会平成2年～3年度役員名簿

会 長  
庶務幹事  
会計幹事  
国際交流幹事  
編集幹事

会計監査

〃

賞等選考委員

編集委員

企画委員

早 津 彦 哉  
祖父尼 俊 雄  
渋谷 徹  
長 尾 美奈子  
佐 藤 茂 秋

高 山 昭 三  
加 藤 隆 一

大 西 克 成  
長 尾 美奈子  
土 川 清  
祖父尼 俊 雄  
菊 池 康 基

島 田 弘 康  
後 藤 純 雄  
菊 川 清 見  
林 真

大 西 克 成  
菊 池 康 基  
若 林 敬 二

日本環境変異原学会平成2年～3年度評議員名簿

(五十音順)

氏 名

所 属

乾 直 道	北里研究所
✓ 大 西 克 成	徳島大学医学部
✓ 菊 川 清 見	東京薬科大学
○ 菊 池 康 基	武田薬品工業(株)研究開発本部
黒 木 登志夫	東京大学医科学研究所
✓ 黒 田 行 昭	麻布大学生物科学総合研究所
近 藤 宗 平	近畿大学原子力研究所
佐々木 正 夫	京都大学放射線生物研究センター
定 家 義 人	国立遺伝学研究所
○ 佐 藤 茂 秋	富山県衛生研究所
渋谷 徹	(財)食品薬品安全センター 秦野研究所
○ 島 田 弘 康	第一製薬(株)中央研究所
清 水 英 佑	東京慈恵会医科大学
✓ 白 須 泰 彦	(財)残留農薬研究所
瀬 野 悍 二	国立遺伝学研究所
✓ 祖父尼 俊 雄	国立衛生試験所
○ 常 盤 寛	福岡県衛生公害センター
✓ 長 尾 美奈子	国立がんセンター研究所
✓ 西 岡 一	同志社大学工学部
△ 林 真	国立衛生試験所
✓ 早 津 彦 哉	岡山大学薬学部
○ 松 下 秀 鶴	国立公衆衛生院
○ 松 島 泰次郎	東京大学医科学研究所
✓ 山 添 康	慶応義塾大学医学部
吉 川 邦 衛	三菱化成工業(株)総合研究所
△ 若 林 敬 二	国立がんセンター研究所



# 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 内線		
	(和)		
	(英)		
自宅 住所	〒 電話		
	(和)		
	(英)		
会誌送付先 ① 所属機関 ② 自宅			

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)

入会申込書の送付先: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1  
 国立衛生試験所 変異遺伝部 祖父尼俊雄



環境変異原研究 第12巻 第1号 1990年

平成2年10月24日 印刷

平成2年10月24日 発行

発行者 日本環境変異原学会

発行責任者 早津彦哉

印刷所 三造写真工業株式会社  
〒105 東京都港区新橋 5-23-7  
TEL 03-433-1869



ISSN 0910-0865