

吳坤

# 環境變異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

中國科學院  
環境化學研究所  
北京

Vol.12 No.3 1990

環境変異原研究

第12巻第3号1990年

目次

日本環境変異原学会主催第2回公開シンポジウム

「変異・病原物質の代謝と毒性発現の分子機構」

第2回公開シンポジウム特集号の発刊によせて	大西 克成……………	227
座長の一人として	早津 彦哉……………	229
座長の一人として	渡部 烈……………	231
変異・癌原物質の反応性中間体の生体内動態と DNA 傷害	加藤 隆一……………	233
変異・癌原物質による DNA の損傷と修復: DNA 付加体の解析		
多田万里子, 小島美咲, 鈴木 任, 白井智之, 森田敏照……………		241
毒性発現におけるフリーラジカルと活性酸素	二木 鋭雄……………	255
変異原物質による DNA 傷害: 修復と突然変異	品川日出夫……………	265
チトクロム P-450 による変異・癌原物質の活性化	鎌滝 哲也……………	275
抱合反応による変異・癌原物質の活性化と不活性化	山添 康……………	283
腸肝循環による変異原物質の活性化・不活性化		
木内武美, 片岡佳子, 宮西幸一, 大西克成……………		291

化学物質のリスクアセスメント確立のための第2回日米学会議報告

— リスクアセスメント手法等の改善と確立等に関する研究 —

石館 基, 祖父尼俊雄…………… 305

日本学会議だより…………… 309

付記

日本環境変異原学会 会 則……………	311
” 役員名簿……………	312
” 評議員名簿……………	313
” 入会申し込み書……………	314

## 第2回公開シンポジウム特集号の発刊によせて

シンポジウム世話人 徳島大学医学部 大西 克成

本学会主催第2回公開シンポジウム「変異・癌原物質の代謝と毒性発現の分子機構」を平成2年6月1日(金)に東京・新橋にあるヤクルトホールにて開催いたしました。参加者数は本学会会員174名を含む389名でした。協賛学会である日本薬物動態学会、日本毒科学会所属の方が48名、主催・協賛の3学会会員以外の方が167名でした。シンポジウム終了後にも、講演内容を知りたいとか、学会に入会したいという希望者からの連絡がありました。ここにその講演内容が発刊されることになり、約800名の学会員に配布されることになりましたことは、大変喜ばしいことと存じます。お忙しいのに原稿を書いていたシンポジスト、座長の方々、並びに編集委員の方々に心から御礼申し上げます次第です。

本学会の活性化のための企画委員の一人として、第2回公開シンポジウムをお世話することになり、平成元年9月から準備を開始しました。本学会の秋の大会の演題をみますと、欧米の環境変異原学会の演題に比較して、検出や試験法に関するものが多く、突然変異の機構とか、生体影響・代謝の機構に関するものが少ない傾向がうかがわれましたので、代謝や毒性発現の機構の分野の活性化を目的として、上記のシンポジウム題目を決定いたしました。まず、テーマ全体を解説していただくために加藤隆一先生に教育講演をお願いして、後の7演題につきましては、座長代表の加藤先生と前学会長の松島泰次郎先生に御相談の上決定いたしました。さらに、講演内容の幅広さや時間を考えて、早津彦哉先生と渡部烈先生に座長に加わっていただきました。また、講演内容はテープに録音し、各演者にお渡しして、原稿を書くときの参考にしていただきました。

地方在住の世話人が東京で学会を開催するわけですので、当日はぶっつけ本番で行いましたが、何とか無事に終了することができました。これは大塚グループの14名の学会員の方々とヤクルト本社の方々の御協力のお陰でありまして、改めて感謝申し上げます次第です。

このシンポジウム特集号を多くの方々に読んでいただき、この分野の基本的なことから、最先端のことまで理解を深めていただいて、今後の研究活動の糧にいただければ、世話人として望外の喜びであります。

平成2年8月20日

岡山大学薬学部 早津 彦哉

環境変異原の検出や活性測定などを一生懸命やっていると、変異原の働く機構を深く考えてみる  
ことがおろそかになりがちである。沢山ある変異原のうちで、分子レベルでの機構まで詳しくわか  
っているのは、メチル化剤そのほかの数少ないものに限られている。機構を解明することによって、  
1) 遺伝子変異についての基本的理解を増す、2) 変異原の活性化とその DNA への反応の様子が明  
らかになる、3) 環境変異原の作用を抑制する可能性を探る、などの進歩が期待できる。  
わが国の変異原研究者は変異原の活性化、DNA への反応と傷の修復など、基礎分野への寄与を  
さらに大きくすることが望まれる。本シンポジウムは第一線の研究者を選びすぐって実のある話し  
をわかりやすく聞かせてくれたと思う。多くの聴衆が詰めかけた上、若い人達が多かったことも印  
象的であった。今後日本の環境変異原研究の基礎的分野が益々発展するに違いないと意を強くした。

岡山大学薬学部 早津 彦哉

環境変異原の検出や活性測定などを一生懸命やっていると、変異原の働く機構を深く考えてみる  
ことがおろそかになりがちである。沢山ある変異原のうちで、分子レベルでの機構まで詳しくわか  
っているのは、メチル化剤そのほかの数少ないものに限られている。機構を解明することによって、  
1) 遺伝子変異についての基本的理解を増す、2) 変異原の活性化とその DNA への反応の様子が明  
らかになる、3) 環境変異原の作用を抑制する可能性を探る、などの進歩が期待できる。

わが国の変異原研究者は変異原の活性化、DNA への反応と傷の修復など、基礎分野への寄与を  
さらに大きくすることが望まれる。本シンポジウムは第一線の研究者を選びすぐって実のある話し  
をわかりやすく聞かせてくれたと思う。多くの聴衆が詰めかけた上、若い人達が多かったことも印  
象的であった。今後日本の環境変異原研究の基礎的分野が益々発展するに違いないと意を強くした。

## 座長の一人として

東京薬科大学 渡部 烈

環境中に存在する変異・癌原性物質のほとんどは、それ自身化学的に安定であり、代謝を受けて、反応性に富む化学的に不安定な活性代謝物へと変換されない限り、DNA を損傷し、細胞の変異を誘導することはきわめて稀である。安定な化学物質から活性代謝物への変換反応は、薬物代謝酵素と呼ばれる一群の酵素によって触媒されている。生体に侵入した化学物質の代謝が行われる最も主要な場として肝は重要であり、例えば Ames 試験におけるラット肝 S9 Mix 使用の必要性はこの事実に基づく。

活性代謝物による DNA 塩基の修飾または損傷は、化学的には、代謝物の非酵素的な安定化の必然的プロセスの一つにしか過ぎない。しかし、このプロセスによる結果は、生物学的にきわめて重大な遺伝学的イベントを伴う。すなわち、DNA の正常な遺伝子コードが塩基の修飾によって異常化し、細胞の死または変異を誘導することになる。上記のプロセスは、化学発癌におけるイニシエーションプロセスとして知られている。したがって、イニシエーションプロセスの配役は変異・癌原性物質と DNA であるが、その役割を演じさせるイベントの演出者は薬物代謝酵素であるといえる。

活性代謝物による DNA の損傷機構は、多くの変異・癌原性物質について、イオン反応機構を中心にしてシナリオが構成されてきたが、最近の活性酸素による DNA の損傷と細胞の変異に関する研究成果は、発癌における酸素ラジカルの重要性を強く示唆している。生体内でスーパーオキシドの生成をひき起こす化学物質ならびにその代謝物の生成機構に関する研究も盛んに行われ始めた。

変異・癌原性物質の代謝的活性化系として汎用されているラット肝 S9 Mix は、酸化酵素であるチトクロム P-450 の活性を発現させる目的で調製されている。この系で生成することが期待される活性代謝物は、せいぜいのところエポキシドやヒドロキシルアミンなどの酸化生成物でしかない。変異・癌原性物質の代謝的活性化に関するこれまでの研究成果は、さらに多岐にわたるタイプの活性代謝物が S9 のなかで生成することを示している。S9 Mix の Mix の部分を NADPH 産生系一点張りから、S9 中のスルホトランスフェラーゼやアセチルトランスフェラーゼなども作動させるように構築し直せば、活性代謝物の優れた生物学的検出手段であるサルモネラにおける試験成績が陰性で発癌試験結果が陽性となるくい違いは、ある種類の化学物質では、可成り狭まってくるであろう。

活性代謝物の生成ならびに生体高分子との反応機構に関するシンポジウムは、欧米では近年ますます頻繁に開催されているが、わが国の諸学会の実情はかならずしもそうではない。活性代謝物による DNA の損傷を細胞ならびに生物個体の変異として検出することを主目的とする環境変異原学会では、この分野の研究が今後ますます盛んになることを念じる次第である。

# 変異・癌原物質の反応中間体の体内動態と DNA 傷害

慶応義塾大学医学部薬理学教室 加藤 隆 一

## 1. はじめに

環境中には数多くの変異・病原物質が存在するが、それらの殆どは化学的に安定で反応性に乏しく、DNA などの生体高分子と共有結合を作り得ない。それゆえ、これらの化学物質が DNA に傷害を与え、変異原性および癌原性を現わすためには生体内で他動的に活性化されねばならない。

それゆえ、化学物質の変異原性・癌原性の強さは代謝的活性化と密接に関係しており、特に代謝の結果生成される反応性中間体 (reactive intermediates) の生成速度、安定性、不活性化および最終活性化などの因子が発癌における重要な鍵を握っている。

性化の第一歩はチトクロム P-450 により行なわれる。すなわち、芳香族多環炭化水素, aflatoxin B<sub>1</sub> のエポキシ化, 芳香族アミンなどの N-水酸化および N-ニトロソアミン類の脱アルキル化である。

これらの活性は肝で高く、また体外異物などにより酵素誘導を受けやすい。しかし、肝以外ではチトクロム P-450 の含量が低いので、Table 1 に示すようにプロスタグランジン合成酵素やベルオキシダーゼにより代謝的に活性化される割合もかなり高いものと考えられよう。また、ニトロ基を還元してヒドロキシアミン体 (N-水酸化体) を作る活性も肝以外でもかなり高い。

## 2. チトクロム P-450 の役割

Fig. 1 から明らかなように化学物質の代謝的活

## 3. 反応性中間体の安定性

一方、生成された反応性中間体の安定性 (化学

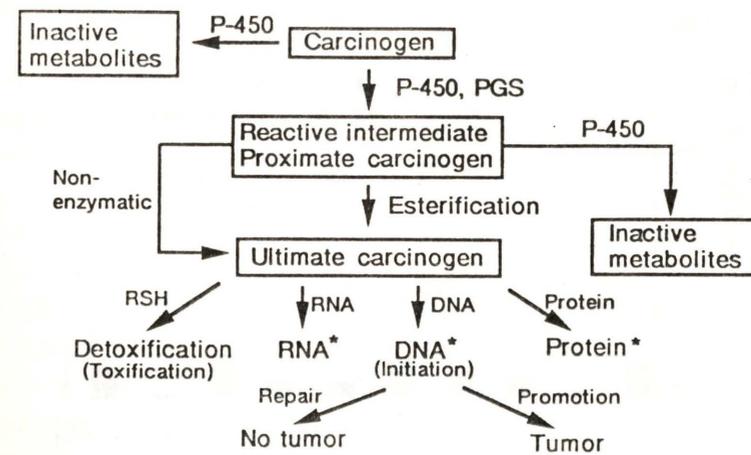


Fig. 1. 化学物質の代謝活性化, 不活性化, DNA 傷害.

〒160 東京都新宿区信濃町 35

Metabolism and disposition of reactive intermediate and DNA damage induced by mutagens and carcinogens

Ryuichi Kato

Department of Pharmacology, School of Medicine, Keio University, Shinjuku, Tokyo, 160

Table 1. 癌原物質の代謝的活性化の臓器

- A) 酸化の活性化
- 1) チトクロム P-450: 肝>腎, 肺, 小腸
  - 2) Peroxidase: Zymbal 腺, Harderian 腺, 乳腺, 甲状腺, 骨髄
  - 3) プロスタグランジン合成酵素: 膀胱, 腎髄質, 骨髄, 大腸
- B) 還元的活性化
- 1) ニトロ還元酵素: 肝>腎, 他の多くの臓器

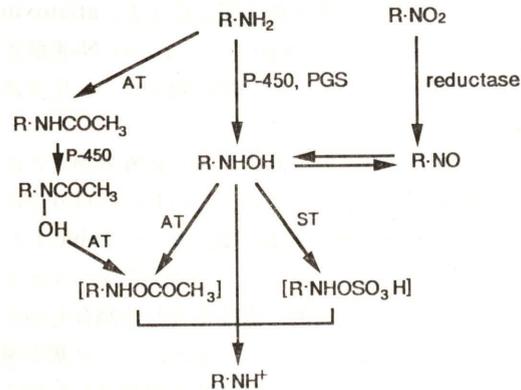


Fig. 2. 芳香族アミンおよびニトロ化合物の代謝的活性化.  
AT: アセチル化酵素  
ST: 硫酸化酵素  
PGS: プロスタグランジン合成酵素

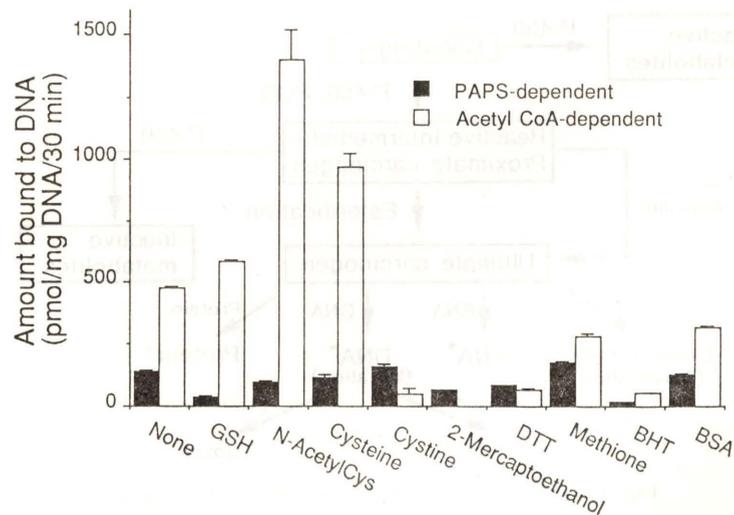


Fig. 3. アセチル CoA-依存性および PAPS-依存性の N-OH-Glu-P-1 の DNA への結合におよぼす SH 化合物および抗酸化剤の影響 (Abu-Zeid *et al.*, 1990).

DTT: Dithiothreitol, BHT: Butylated hydroxytoluene 各薬物を 10 mM (BHT のみ 1 mM) の濃度で添加, BSA (牛血清アルブミンの濃度は 10 mg/ml), PAPS: 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate.

的および代謝的) により, 肝で生成されたものが血行を経て標的臓器まで到達する割合も多いと思われるが, これらの点に関しては研究がほとんど行なわれていない。

一般的にはエポキシ体はかなり半減期が短く, さらにエポキシ水解酵素により水解されるので, 標的臓器まで到達する割合はかなり低いものと考えられる。一方, N-水酸化体の中にはかなり安定であり, DNA などと反応するためには O-エステル化によりさらに代謝的活性化を受けることが必要なものも多い (Fig. 2) (Kato and Yamazoe, 1987)。

#### 4. 反応性中間体の最終変異・癌原物質への代謝的活性化

P-450 により 7, 8 位がエポキシ化された benzo [a] pyrene などはエポキシ体が水解され, 7, 8 ジオキシジオール体となり, さらに 9, 10 位がエポキシ化され, エポキシジオール体という強力な最終癌原物質となる。ここで言う最終変異・癌原物質とは DNA 直接反応するものである。

また, 7, 12-dimethylbenzanthracene はメチル基が水酸化されて, アルコール体となり, さらに

細胞上清中の硫酸転移酵素により硫酸エステル化され初めて強力な最終変異・癌原物質となる。さらに癌原性アミンの N-水酸化体も次に述べるような代謝的活性化を受ける。

#### 5. 芳香族アミン類の N-水酸化体の代謝的活性化

種々の芳香族アミン類 (加熱食品中のヘテロサイクリックアミンを含む) は肝のチトクロム P-450, 特に P-450 d および P-450 c などにより N-水酸化体となる。これら N-水酸化体はかなり不安定で, バッファー中などでは空気中の酸素により酸化されて nitrenium ion ( $-NH^+$ ) になり, DNA と共有結合体を作るが, NADPH などの還元性物質の存在下ではかなり安定なものも多く, さらに代謝的活性化を必要とする (Kato and Yamazoe, 1987)。

N-水酸化体のエステル化に関してはプロリンの存在下でプロリル t-RNA 合成酵素によりプロリル化されるという興味深いエステル化反応が起るが, この反応 N-OH-Trp-P-2 では高いが, N-OH-Glu-P-1 や他の N-水酸化体では殆んど起きない。一方, O-アセチル化および O-硫酸化は多くの N-水酸化体につき良く見られる反応である。しかし, 芳香族アミンについては直接的に N-アセチル化され, ついで P-450 により N-水酸化され, さらに N, O-アセチル転移により活性化されるという複雑な経路もとる (Fig. 2)。O-硫酸エステル化は, dimethylbenzanthracene のアルコール体の O-硫酸エステルがアルコール性硫酸抱合酵素により行なわれるのに反して, フェノール性硫酸抱合酵素により行なわれる。ラット肝での活性は雄は雌よりも数倍高く, この活性はある種の P-450 と同様に下垂体の生長ホルモンの分泌型式により調節されている (Yamazoe *et al.*, 1988)。

興味深いことには O-アセチル化されたものと O-硫酸化されたものは DNA と反応して共有結合体を作るが, 共存する SH 化合物による影響が全く異なる。すなわち, Fig. 3 に示すように N-OH-Glu-P-1 の O-アセチル化体の DNA への結合は N-アセチルシステインや L-システインやグルタチオンによっては増加する。一方, 2-メル

Table 2. 哺乳動物細胞内およびバクテリア内での芳香族アミンの N-水酸化体の代謝的活性化の差異

	哺乳動物	バクテリア
1) O-アミノ酸アシル化		
O-セリン化	-	+
O-プロリル化	+	-
2) O-アセチル化		
アセチル Co-A-依存性	+	+
ヒドロオキサム酸依存性	+	-
3) O-硫酸化		
PAPS 依存性	+	-

カプトエタノールやメチオニンなどによっては DNA との結合を抑制するのみであった (Abu-Zeid *et al.*, 1990)。一方, O-硫酸エステル体の DNA への結合に関しては, すべての SH 化合物により抑制され, 結合が促進することはない。この結果の差異は N-水酸化体の O-アセチル体と O-硫酸化体の反応性の差異によるものと考えられる。

#### 6. 哺乳動物細胞内およびバクテリア内で起る芳香族アミン類の N-水酸化体の代謝的活性化の差異

バクテリアはチトクロム P-450 が欠けているので, 種々の芳香族アミンを N-水酸化することが出来ない。それゆえ, Ames assay に見られるように肝ミクロゾームを添加して, 先ず N-水酸化体を生成させるが, この N-水酸化体はバクテリア細胞内ではどのような動態を示すのであろうか?

Table 2 に示すようにバクテリアでは上清中のセリル-tRNA 合成酵素により, N-OH-Trp-P-2 が O-セリン化される。一方, 哺乳動物細胞ではプロリル-tRNA 合成酵素により, O-プロリル化される。しかし, このアミノ酸のアシル化反応は N-OH-Trp-P-2 にのみ認められ, 他の基質, N-OH-Glu-P-1 や N-OH-AF などでは反応は進まない。

さらにバクテリアではその上清中に acetyl-CoA 依存性の芳香族アミンの N-アセチル化やその N-水酸化体の O-アセチル化の高い活性が認められるが, ヒドロオキサム酸などのアセチル供与体は利用出来ない。一方, 哺乳動物細胞ではアセ

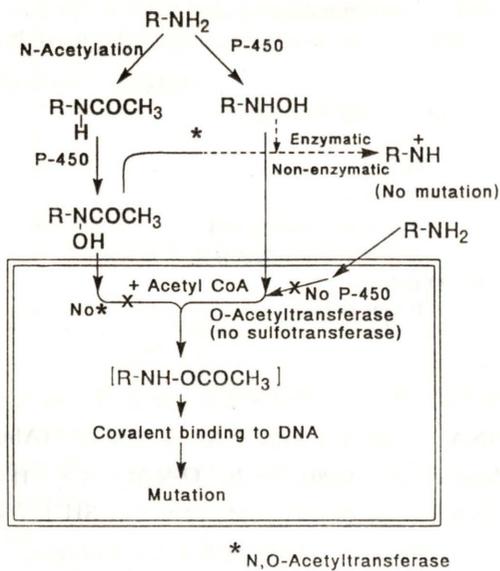


Fig. 4. 芳香族アミンの Ames assay 系における変異原性の発現とそれに影響する諸因子。サルモネラ菌の菌体外および菌体内における代謝的活性化。

チル CoA およびヒドロキサン酸をアセチル供与体として利用し、N-アセチル化、O-アセチル化を行う。すなわち、バクテリアでは N-OH-AAF などの N,O-アセチル転移による活性化が認められない (Kato and Yamazoe, 1987; Yamazoe *et al.*, 1989)。

さらにバクテリアには PAPS-依存性の N-および O-硫酸抱合酵素が欠けており、N-水酸化体やヒドロキサン酸の活性化が起らない。このことが N-OH-AAF では肝上清なしにはサルモ

Table 3. N-ヒドロキシアリルアミンの肝上清分画におけるアセチル CoA 依存性の tRNA への結合の種差 (Shinohara *et al.*, 1986)

動物種	活性代謝物の tRNA への結合 (pmol/min/mg protein)		
	N-OH-Glu-P-1	N-OH-Trp-P-2	N-OH-AF
ハムスター	656.4	85.9	1008.8
ラット	175.5	62.7	94.9
ウサギ			
R	75.3	<0.1	5676.4
r	<0.1	<0.1	69.9
マウス	6.3	<0.1	296.0
モルモット	10.8	0.4	520.8
イヌ	<0.1	<0.1	<0.1

ウサギ R: 遺伝的な rapid acetylator r: 遺伝的な slow acetylator

ネラ菌に変異原性を示さない原因と考えられている。

Ames assay 系における代謝的活性化の機構も、それゆえかなり複雑であり、サルモネラ菌体外で O-エステル化を受けたものが、どの程度菌体内に入るかについては不明であり、N-水酸化体である基質によって異なるものと考えられる。すなわち、O-エステル体がきわめて不安定であると、菌体外で活性化されると変異原性は減少するであろう。一方、N-OH-AAF の場合、菌体外でのみしか O-硫酸化、N,O-アセチル転移反応が起きないので、上清の添加なしでは変異原性はほとんど発現しない (Fig. 4)。

### 7. 哺乳動物の肝における N-水酸化体の活性化の種差

芳香族アミンの N-水酸化に関してはかなり大きな種差が存在することが知られているが、生成された N-水酸化体の活性化についても、それ以上に著しい種差が存在する (Shinohara *et al.*, 1986)。Table 3 に示すように N-OH-Glu-P-1, N-OH-Trp-P-2 や N-OH-AF のアセチル CoA 依存性の代謝活性化にきわめて大きな種差が存在するが、さらに興味深いことには基質により種差のランクオーダーが異なるということである。すなわち、イヌにおける O-アセチル化はどの N-水酸化体を用いても検出されないが、N-OH-AF を基質として用いた場合には rapid acetylator のウサギの活性が一番高く、slow acetylator にもかなりの活性が認められる。また、モルモットやマウ

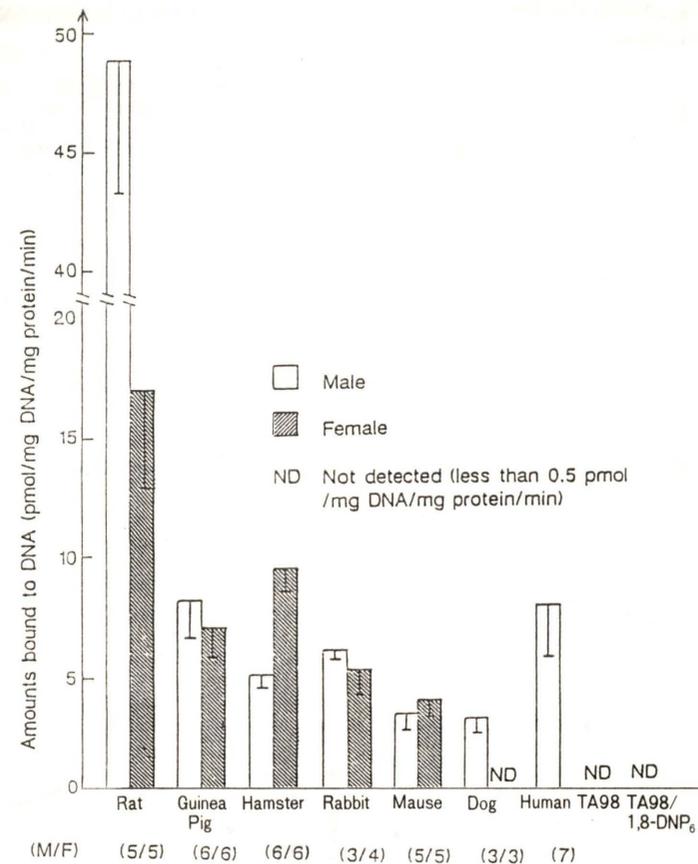


Fig. 5. 肝上清による N-OH-AAF による PAPS-依存性の DNA 傷害の動物種差。\* ヒトの肝は 8 人の剖検サンプル。

などでの活性は N-OH-Glu-P-1 や N-OH-Trp-P-2 と異なりラットよりもかなり高い。N-OH-Trp-P-2 の O-アセチル活性は一般に低いが、rapid acetylator のウサギでも活性は検出されない。

PAPS-依存性の N-OH-AAF の硫酸抱合化経由の DNA 傷害についても Fig. 5 に示すようなかなり明らかな種差が見られる。

すなわち、ラットでの活性が一番高く、しかも明らかな性質が認められ、一方、モルモット、ハムスター、ウサギ、マウスでは明らかな性差が認められず、興味深いことにはイヌでは雌の活性がきわめて低い (Abu-Zeid *et al.*, 未発表)。

ヒトの活性も、モルモット、ハムスター、ウサギ、マウスなどと大差はなく、その活性はかなり高い。

### 8. 反応中間体の代謝的活性化に関する臓器差

既に述べたように、チトクロム P-450 による代謝的活性化能は肝が高く、他の臓器では一般に低い。しかし、N-水酸化体のアセチル CoA 依存性の代謝的活性化は肝以外の臓器でもかなり高い活性を示す。たとえば、Table 4 に示すように N-OH-Glu-P-1 の代謝的活性化は腎では肝の 14%、小腸では 12%、肺では 3.5% であり、ラットでは腎では肝の 33%、小腸では 13%、肺では 20% であった。このような臓器差も基質により異なると共にまた動物種差により異なるなどかなり複雑な結果を示す。特に興味深いのは膀胱であり、N-OH-Glu-P-1 についてはハムスターでは肝の 1.9%、ラットでは 14% であるが、N-OH-Trp-P-2 についてはハムスターでは 0.8%、ラットでは 0.1% であった。

Table 4. N-OH-Glu-P-1 と N-OH-Trp-P-2 のアセチル CoA 依存性結合の臓器差 (Shinohara *et al.*, 1986)

臓器	tRNA への共有結合量 (pmole/min/mg protein)			
	N-OH-Glu-P-1	(%)	N-OH-Trp-P-2	(%)
ハムスター				
肝	678.5	(100)	120.3	(100)
肺	24.0	(3.5)	3.6	(3.0)
腎	94.6	(13.9)	0.3	(0.2)
小腸粘膜	85.7	(12.6)	13.4	(11.1)
膀胱	12.8	(1.9)	1.0	(0.8)
ラット				
肝	177.5	(100)	85.6	(100)
肺	34.7	(19.5)	8.7	(10.2)
腎	57.7	(32.5)	15.7	(18.3)
小腸粘膜	22.3	(12.6)	32.4	(37.9)
膀胱	25.5	(14.4)	0.1	(0.1)

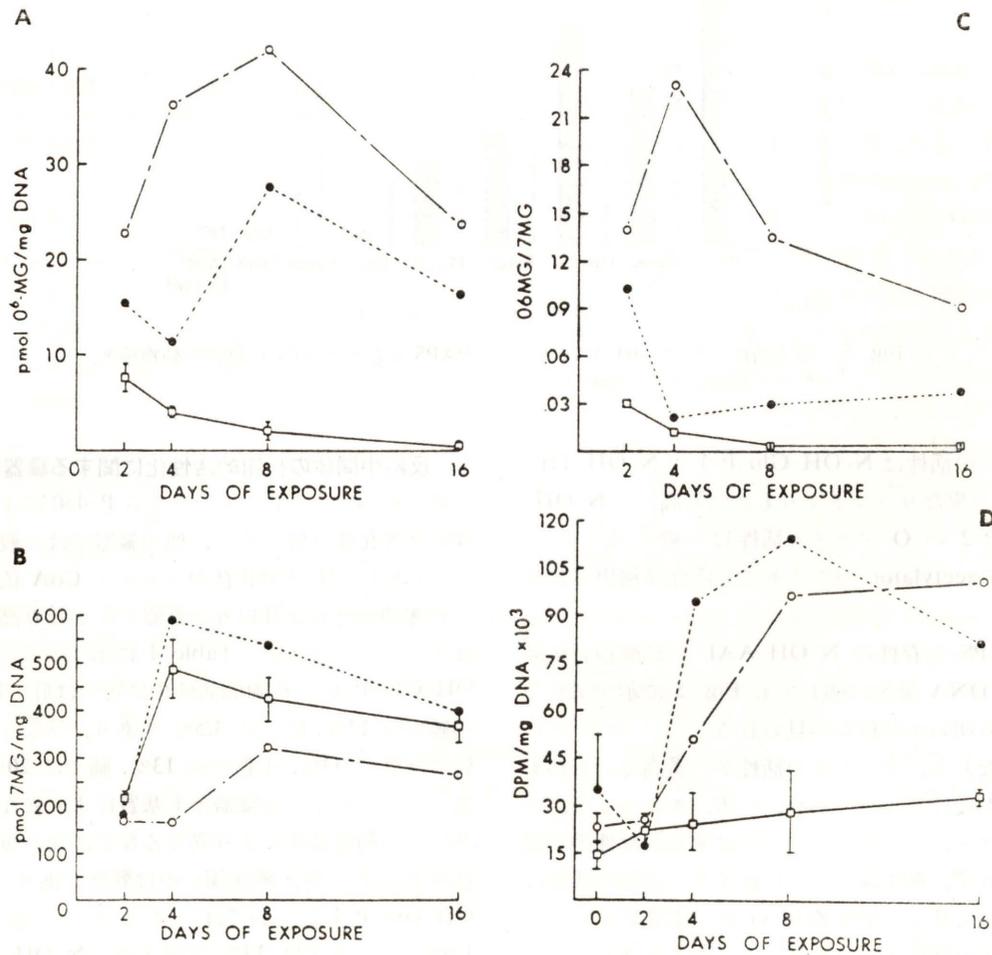


Fig. 6. Dimethylhydrazine 投与後のラット肝における 7-methylguanine と  $O^6$ -methylguanine の蓄積ならびに  $^3H$ -thymidine の取りこみ (Lewis *et al.*, 1983). 30 ppm DMH 含有飲料水を 16 日間投与. —○— 血管内皮細胞 —●— クッパー細胞 —□— 肝細胞

一方、硫酸抱合体になりよる代謝的活性化に関しては肝以外の活性はかなり低く、N-水酸化体の代謝的活性化がアセチル抱合体経由、または硫酸抱合体経由で起こる比率なども発癌の臓器差や種差に関係してくる。

### 9. DNA 傷害とその修復と発癌性

発癌実験においては、その DNA 傷害と種差、性差、臓器差などが問題となるが、DNA 傷害についての定量的な研究は多くなく、特に DNA 傷害についての DNA に関する特性との関連を明らかにしたものは少なく、かつ連続投与時における修復も含めて研究した報告はきわめて少ない。

4-(N-methyl-N-nitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) は肺のクララ細胞から肺腺腫を発生せしめるが、この原因もクララ細胞では P-450 による活性化が高い割に  $O^6$ -methylguanine の修復酵素の  $O^6$ -alkylguanine-DNA-alkyltransferase の活性が低く、NNK 投与期間中に誘導もされず活性が 1/20 に低下するので、 $O^6$ -methyl-G が蓄積されやすいことが原因とされている。

最後に、ラット肝における標的細胞種とその特

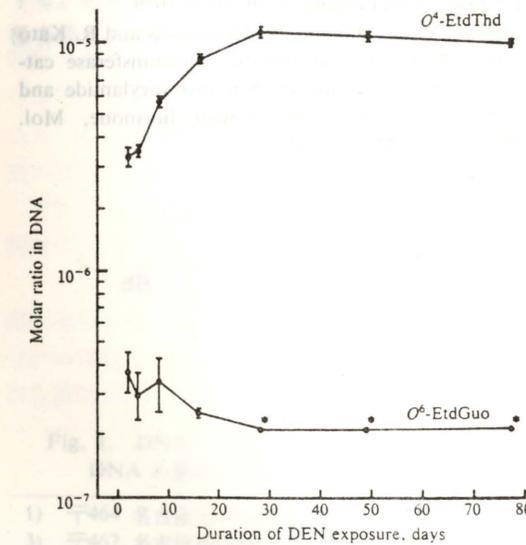


Fig. 7. Diethylnitrosamine 投与後のラット肝細胞の  $O^4$ -ethylthymine および  $O^6$ -ethylguanine の蓄積 (Svenberg *et al.*, 1984). 40 ppm DEN 含量飲料水を 2 日~77 日の間投与.

異的な DNA 傷害との関連が報告されているので紹介する。

Dimethylhydrazine (DMH) はラットに皮下投与すると高率に大腸癌を発生させるが一方、飲料水に入れて投与すると肝の血管内皮腫を発生させる。

DMH 投与後肝では 7-methyl-G が蓄積してくる。しかし、肝を肝実質細胞、血管内皮細胞、クッパー細胞に分けて分析して見ると 7-methyl-G はクッパー細胞で高く、ついで肝実質細胞に高く、標的臓器である血管内皮細胞では低い。しかし、 $^3H$ -thymidine の取り込みで見ると、血管内皮細胞ではクッパーについてかなり高い (Fig. 6)。一方、 $O^6$ -methyl-G は絶対量は少ないが、血管内皮細胞に一番蓄積してくる。この原因は肝実質細胞は P-450 の含量が高いので DMH の代謝的活性化が起り、7-methyl-G が生成されるが、高い  $O^6$ -methyl-G はその高い  $O^6$ -AGT 活性のために修復されやすく、かつ  $O^6$ -AGT 活性の誘導が起りやすい。一方、血管内皮細胞では P-450 含量に乏しいが、 $O^6$ -AGT 活性が低く、かつ DMH 投与により  $O^6$ -AGT 活性が誘導されず、むしろ低下することにより、 $O^6$ -methyl-G が次第に蓄積するものと考えられる。それゆえ、これらの結果から、 $O^6$ -methyl-G の蓄積が DMH 投与による血管内皮腫の発生の原因と考えられよう。

一方、diethylnitrosamine (DEN) がなぜ肝細胞癌を発生せしめるかについては、 $O^6$ -ethyl-G の観点からは説明が不可能であった。なぜなら  $O^6$ -ethyl-G は Fig. 7 に示すように肝実質細胞ではほとんど蓄積せず、むしろ非実質細胞に高い蓄積を示した。一方、 $O^4$ -ethyl-T は非実質細胞に対して実質細胞に高度に蓄積することが明らかになった。このことは  $O^6$ -AGT により修復されやすい  $O^6$ -ethyl-G は実質細胞では蓄積されにくいのに反して、修復されにくい  $O^4$ -ethyl-T が肝実質細胞では次第に蓄積してくるものと考えられる。

### 10. おわりに

以上述べたように、癌原物質の反応性中間体や

Table 5. 反応性中間体, 最終癌原物質の生成と消去の定量的研究の重要性

A)	
1)	反応性中間体, 最終癌原物質の生成速度
2)	反応性中間体, 最終癌原物質の細胞内, 血液内安定性と半減期
3)	反応選択性
	a) 蛋白, RNA, DNA
	b) 塩基配列
	c) 核内 DNA, 裸 DNA
B) 最終目標	
1)	構造活性相関→新規化合物の癌原性予測
2)	臓器特異性, 性差, 系統差, 種差の解明 →ヒトでの癌原性の強さの予測

最終癌原物質の体内動態を定量的に把握しておくことは, 非常に大変な仕事ではあるが, その癌原物質による発癌機序を解明するためにきわめて重要である。

一方, DNA 傷害の修復に関する定量的な研究やプロモーションに関する研究も合せて逐行しないと発癌という複雑な現象の定量的評価は片手落ちになることが多い。

これら, 癌原物質の反応性中間体や最終癌原物質の体内動態の定量的把握の最終目標は癌原物質に関する構造活性相関の究明を通じての新規化合物の癌原性の予測を可能にすることであり, さらに臓器特異性, 性差, 系統差, 種差などの解明を通じて, ヒトでの癌原性の強さの予測性の確立であらう。

参考文献

Abu-Zeid, M., N. Staiano, Y. Yamazoe and R. Kato (1990) Enhancement by cysteinyl thiols of acetyltransferase-mediated, but not of sulfotransferase-mediated, binding of a pyrrolysate-derived N-hydroxyarylamine, 2-hydroxyamino-6-methyldipyrido [1,2- $\alpha$ : 3',2'-d] imidazole, to DNA, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 653-659.

Kato, R. and Y. Yamazoe (1987) Metabolic activation and covalent binding to nucleic acids of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrrolysates, *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 297-311.

Lewis, J. G. and J. A. Swenberg (1983) The kinetics of DNA alkylation, repair and replication in hepatocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells in rat liver during continuous exposure to 1, 2-dimethylhydrazine, *Carcinogenesis*, **4**, 529-536.

Shinohara, A., K. Saito, Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato (1986) Acetyl coenzyme a dependent activation of N-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines: Mechanism of activation, species difference, tissue distribution, and acetyl donor specificity, *Cancer Research*, **46**, 4362-4367.

Swenberg, J. A., M. C. Dyrhoff, M. A. Bedell, J. A. Popp, N. Huh, U. Kirstein and M. F. Rajewsky (1984) O<sup>6</sup>-ethyldeoxythymidine, but not O<sup>6</sup>-ethyldeoxyguanosine, accumulates in hepatocyte DNA of rats exposed continuously to diethylnitrosamine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1692-1695.

Yamazoe, Y., M. Abu-Zeid, D. Gong, N. Staiano and R. Kato (1989) Enzymatic acetylation and sulfation of N-hydroxyarylamines in bacteria and rat livers, *Carcinogenesis*, **10**, 1675-1679.

Yamazoe, Y., S. Manabe, N. Murayama and R. Kato (1987) Regulation of hepatic sulfotransferase catalyzing the activation of N-hydroxyarylamide and N-hydroxyarylamine by growth hormone, *Mol. Pharmacol.*, **32**, 536-541.

変異・癌原性物質による DNA 損傷と修復: DNA 付加体の解析

愛知がんセンター研究所生化学部 多田万里子<sup>1)</sup>, 小島美咲<sup>1)</sup>  
 名古屋市立大学薬学部 鈴木 任<sup>2)</sup>  
 同医学部第一病理 白井 智之<sup>3)</sup>  
 大阪大学教養部 森田 敏照<sup>4)</sup>

1. はじめに

放射線や化学物質などの環境からの諸因子によって細胞 DNA は様々な変化をうけ突然変異や発癌へと導かれることが知られている。DNA の変化としては塩基の修飾, 脱塩基反応, DNA 鎖切断 (1 本鎖, 2 本鎖), クロスリンク, インターカレーション, またこれらを起因とする DNA の局所的構造変化などがある。そのなかでも特に DNA 塩基の修飾 (DNA-adducts) はそれ自体が突然変異誘発の起因として注目されるようになっている。

多くの癌原性物質は生体内で代謝活性化され DNA, RNA, タンパクなどの生体高分子に結合する。癌原性物質や突然変異誘発物質の構造は多種多様であるが, それらの究極反応体は強い求電

子の反応体であり核酸の求核センターに結合し, 塩基付加体を形成する (Fig. 1)。

Fig. 1 に示すようにアデニンの N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>6</sup>, グアニンの N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>, O<sup>6</sup>, N<sup>7</sup>, C-8, チミンの O<sup>2</sup>, O<sup>4</sup>, シトシンの O<sup>2</sup> などが修飾されやすい部位である。これら多種多様の塩基付加体のすべてが DNA 損傷として発癌や突然変異誘発などの生物学的作用に関与しているかという問題についてはアルキル化 DNA において解析が進められている。methyl methanesulphonate (MMS) や 1-methyl-1-nitrosourea (MNU) などによるアルキル化 DNA の場合はもっとも多量に生じるのは N<sup>7</sup> アルキルグアニンであるが O<sup>6</sup>-アルキルグアニンや O<sup>4</sup>-アルキルチミンなどが突然変異誘発において重要な役割を果たすことが注目されている

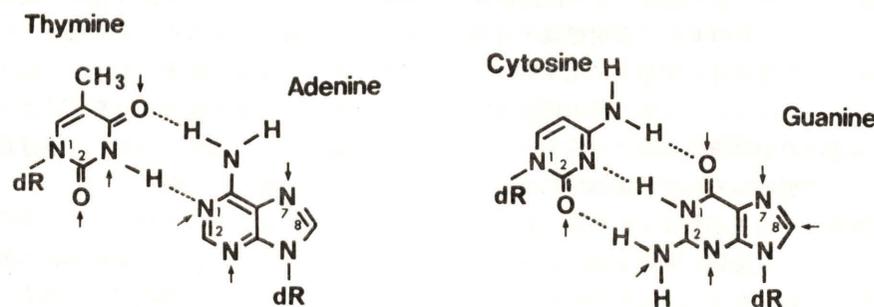


Fig. 1. DNA の求核反応体。

DNA の最も反応性に富んだ箇所を矢印で示した。リン酸にもトリエステルとして結合するが省略した。

- 1) 〒464 名古屋市千種区鹿子殿 1-1, 2) 〒467 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1,  
 3) 〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄, 4) 〒560 豊中市待兼山 1-1

DNA damage caused by mutagenic and carcinogenic compounds and its repair: Analysis of DNA-adducts Mariko Tada<sup>1</sup>, Misaki Kojima<sup>1</sup>, Makoto Suzuki<sup>2</sup>, Tomoyuki Shirai<sup>3</sup> and Toshiteru Morita<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Aichi Cancer Center Research Institute, <sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Nagoya City University, <sup>3</sup>Nagoya City University Medical School and <sup>4</sup>College of General Education, Osaka University

Table 1. 変異原物質 DNA 付加体の検出法

方 法	検出限界量		定量に必要とする DNA 量 ( $\mu\text{g}$ )
	fmol/ $\mu\text{g}$ DNA	付加体/塩基	
高速液体クロマト			
紫外検出	100,000	$1 \times 10^{-5}$	1,000
蛍光検出	50	$1 \times 10^{-7}$	100
免疫化学的方法			
酵素抗体拮抗阻害法	5	$5 \times 10^{-8}$	0.01-1
高速液体クロマト併用	1	$1 \times 10^{-8}$	100-1,000
細胞, 組織			
酵素染色		$1 \times 10^{-6}$	100 細胞または
蛍光染色		$1 \times 10^{-7}$	組織切片
$^{32}\text{P}$ -ポストラベル法		$1 \times 10^{-9}$	0.01

(Saffhill ら, 1985)。また最近  $\text{O}^6$ -メチルグアニンを特異的に除去する  $\text{O}^6$ -メチルグアニン転移酵素の細胞内機能と突然変異や細胞致死との関連が明らかとなり上記の事実が示唆されている。すなわち, 生成する塩基付加体の全てが DNA 損傷として生物学的意味を持たないことが明らかとなってきている。しかしアルキル化剤以外の化学物質については付加体と生物学的活性の関連についての知見がほとんど得られていない。突然変異誘発の機構を分子レベルで解析するためにはまず生体内で生じる付加体の生成量とその種類, また細胞内での持続性などを解析することが必要であると考えられる。そのためには, まず生体内で生じる付加体をそれぞれに検出, 定量する必要がある。

近年, 生化学的分析手法の進歩により高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や放射標識化合物による解析から塩基付加体の定量及び化学構造の解析ができるようになった。しかし放射標識化合物を用いる方法は放射標識化合物の合成や入手に制限があることや感度がその比放射活性に依存すること, 動物個体や培養細胞などに多量に投与出来ないことなどにより実験に制限がある。また, 生物学的活性との相関をしらべるためにはいわゆる生物学的濃度, 突然変異や発癌が生じる最低必要な量で付加体を検出定量し得ることが望まれる。実際, どの程度の付加体の生成が発癌などに必要なのであろうか。Lohman ら (1985) の培養動物細胞による実験から突然変異に要する付加体の量は芳香族アミンで 1 細胞当たり 2000 付加体, すなわち  $10^7$  塩基に 1 付加体といわれている。ち

なみに紫外線では細胞当たり 100,000,  $10^4$  塩基あたり 1 付加体以上が必要であると報告している。したがって細胞, 組織での付加体の検出感度は少なくとも  $10^7$  塩基当りに 1 付加体レベル以上であることが必要である。

Table 1 には現在用いられている付加体の検出法とその感度を示した。絶対感度 (fmol 付加体/ $\mu\text{g}$  DNA) はこれらの方法で定量し得る DNA 付加体の最小量であり, 相対感度は解析可能な最小の修飾比, つまり未修飾塩基に対する修飾塩基のモル比を示している。したがって, 絶対感度が一定ならある分析法の相対感度はその分析法が取り扱える量に応じて上昇する。

Table 1 に示したように抗体による免疫化学的方法と  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法は感度と比較的微量のサンプルで検出できる点で大変優れている。また抗体を用いる免疫組織化学的手法では 1 細胞に注目し付加体の生成と修復を観察することができ, また組織内での付加体の分布と発癌部位との相関を解析できる優れた手段である。

これらの検出法のうち抗体による免疫化学的方法と  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法による付加体の解析について当研究室で行った実験結果とそれらの問題点について述べる。

## 2. 免疫化学的方法

紫外線照射 DNA, 化学発癌物質修飾 DNA や tRNA の minor 塩基に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作成およびそれらの抗体による免疫学的研究は 1975 年頃より行われる

ようになりアルキル化剤や芳香族アミン, 多環炭化水素化合物について数多くのモノクローナルおよびポリクローナル抗体が作成されている (Stickl and Boyle, 1984)。この抗体を用いる方法の最大の利点は DNA や化合物が放射標識されていなくてもよいことである。したがって培養細胞や動物などでの長期間の観察が可能のため, 発癌との相関を解析することもでき, またヒトにおいて分子疫学的にも応用できることである。また免疫組織学的手法では *in situ* での検出により, 細胞および組織レベルでの付加体の生成と修復を観察できる点にある。

ここでは 2 つの化合物 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) と 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) 修飾 DNA の抗体について述べる (Morita ら, 1988; Tada ら, 1989)。

特異性の高い抗体を作成するためには, 適当な抗原を調製することが必要である。また, 抗原となる塩基付加体は免疫の過程で安定であることと, 後述するように抗原-抗体反応は native DNA より denatured DNA の方に親和性が高いので DNA の変性処理で安定であることが必要となる。

一般に DNA 中の修飾スクレオチドに対する抗体を作成する場合は修飾スクレオチドをウシ血清アルブミンなどに covalent に結合させて抗原とする。また DNA に存在する損傷部位を解析す

ることを目的とするなら修飾 DNA を electrostatic にメチル化アルブミンなどにカップルさせたものを抗原として用いる。また修飾 DNA を抗原とする場合は修飾度が 0.5% 前後あることが必要である。

### (I) 抗 4-NQO-修飾 DNA(4NQO-DNA) 抗体

1975 年中原らによってマウス皮膚に発癌することが見いだされて (Nakahara, 1957) 以来 4NQO は種々の動物の臓器を標的とする発癌剤であることが示され, 又試験管内で細胞を形質転換することが明らかにされた (Kakunaga, 1974)。またこの化合物は細菌から動物細胞まで広い範囲にわたり突然変異や細胞致死効果を持つ化合物であり, 塩基付加体と生物学的作用との相関がよく研究されている化合物である (Sugimura, 1981)。

4NQO の代謝活性化機構の研究から 4NQO が還元されて生じる 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4HAQO) がある種のアミノアシル tRNA 合成酵素によって O-アシル化され DNA などの生体高分子に結合することを明らかにした (Tada, 1975)。この酵素の発見によって試験管内で生体内と同じ塩基付加体を生成でき, またアミノアシル-tRNA 合成酵素の代わりに化学合成したアミノアシル-AMP によって試験管内で *in vivo* と同様な付加体をつくることができた。この系はほかの芳香族ヒドロキシルアミン化合物の DNA 修飾にも応用できる。

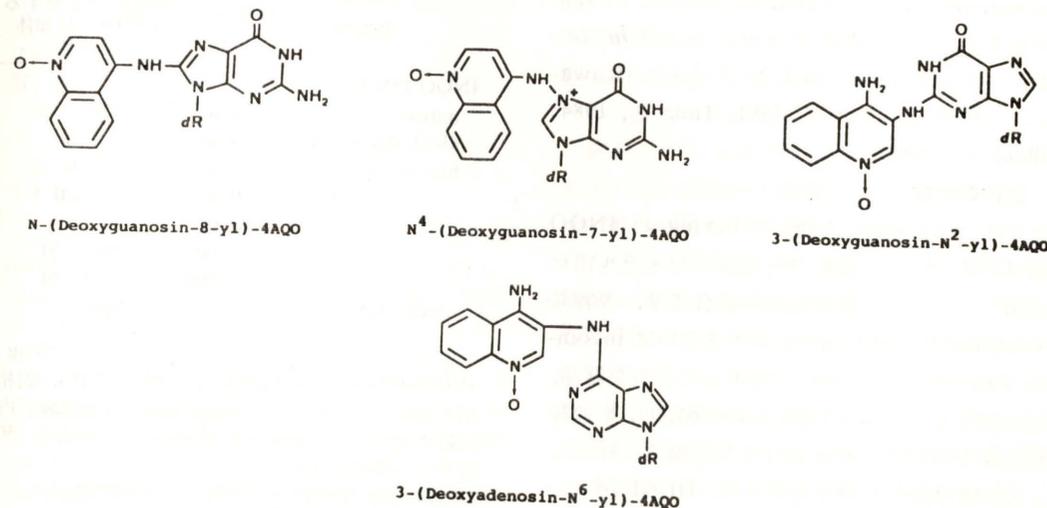


Fig. 2. 4NQO-DNA 付加体の化学構造。

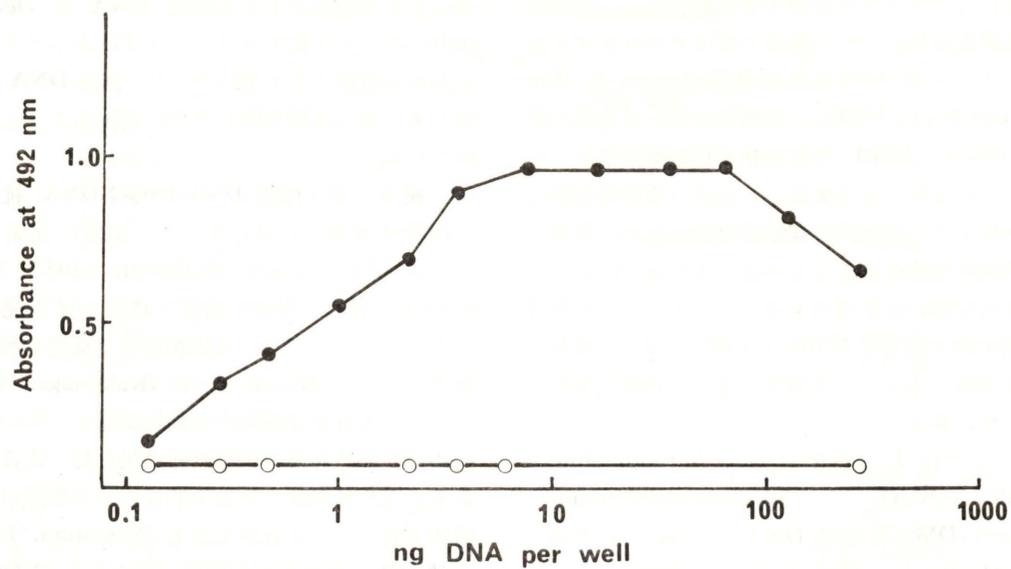


Fig. 3. 抗 4NQO-DNA 抗体の特異性。4NQO-DNA (0.6% 修飾塩基を含む) (●-●) と対照 DNA (○-○) を固相抗原とし 25 ng の IgG と反応させた。

4NQO は DNA と結合し 1 種のアデニン付加体と少なくとも 3 種のグアニン付加体が生成する。それら付加体の構造は 3-(deoxyadenosin-N<sup>6</sup>-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, N<sup>4</sup>-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, 3-(deoxyguanosin-N<sup>2</sup>-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide と構造未決定の不安定なグアニン付加体 (複数) である (Fig. 2)。最近, そのうちの 1 つを N<sup>4</sup>-(deoxyguanosin-7-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide と決定した。その生成比は *in vivo* および *in vitro* においても, 19.7, 6.6, 16.4, 57.2 である (Kawazoe ら, 1975; Bailleul ら, 1981; Tada ら, 1984; Bailleul ら, 1989)。

#### (i) 抗体の作成

ウサギ (白色和種, 2 kg) に 0.5 mg の 4NQO 修飾 DNA (5-6 付加体/10<sup>8</sup> 塩基) をメチル化ウシ血清アルブミンと静電的に結合させ, 等容量の complete Freund's adjuvant あるいは incomplete Freund's adjuvant と混和したものを筋注, 皮内に投与した。10 日間で 4 回免疫し, 8 週間増幅免疫を行いその後 1 週目に耳静脈より採血した。抗体価の高い血清を硫酸沈澱, DEAE セファロースクロマトグラムにより IgG 分画を精製し

た。非特異的に DNA, 特に一本鎖 DNA に反応する分画を一本鎖 DNA セルローズのカラムにより除き特異抗体として用いた。

#### (ii) 抗体の特異性

抗体価の測定は固体酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) によ

Table 2. 抗 4NQO-DNA 抗体の特異性

阻害剤	修飾度 (%)	50%阻害に要する 4NQO-付加体 (fmol)
4NQO DNA		
native	0.6	20
alkali denatured <sup>1)</sup>	0.6	1.65
heat denatured <sup>2)</sup>	0.6	5.0
	0.06	5±0.5
	0.01	15±5
	0.006	105±20
	0.002	140±20
4NQO RNA		
	1.2	3800

マイクロタイタープレートは, ウェル当り 50 ng の 4NQO-DNA (0.6% 修飾塩基を含む) を用い, 固相抗原とした。25 ng の抗体を阻害物質と予め試験管内で反応させたのち残存する抗体価から抗体結合を 50% 阻害する濃度を求めた。

1) 0.02 N NaOH 中 70°C, 15 分間処理した。

2) PBS 中 90°C, 5 分間加熱した。

て行った。固相抗原として 4NQO 修飾-DNA および未修飾 DNA を用いると Fig. 3 に示すように抗 4NQO-DNA 抗体は修飾 DNA とのみ強く反応し, 未修飾 DNA とは全く反応しなかった。抗体の特異性は拮抗阻害 ELISA でしらべた。あらかじめ適量の抗体と希釈した拮抗 DNA を試験管内で反応させたのち残存する抗体価を ELISA 法で測定し 50% 阻害に要する付加体量で感度を示した (Table 2)。同じ修飾度の DNA では 1 本鎖 DNA に存在する付加体の方が 2 本鎖 DNA に存在する付加体より反応性が高いことが認められた。この抗体が認識する塩基付加体は熱およびアルカリ変性に比較的安定であることがわかった。このことから抗体によって認識される付加体はグアニンの N<sup>2</sup>, アデニンの N<sup>6</sup>, またはグアニンの C8 付加体のピリミジン環の開環した 1-(1'-deoxyribose)-1-[6-(2,5-diamino-4-oxo-pyrimidinyl)]-3-(4-quinolinyl 1-oxide) などであることが推定された。この抗体は修飾度の低い DNA より修飾度の高い DNA に対してより高い親和性を示した。このように修飾度の高い DNA に高い親和性を示すことは抗 Benzo (a) pyrene-DNA 抗体についても同様な報告がある (van Schoo-

Table 3. 4NQO 処理ラット臓器に生成する付加体の定量

臓器	4HAQO 付加体量 (fmol/10 <sup>8</sup> 塩基)		
	放射活性法	酵素免疫測定法 (a)	(拮抗阻害) (b)
すい臓	117.6	112.0	82.2
腎臓	69.6	66.0	25.7
胃	66.3	62.0	—
子宮	65.0	62.5	30.0
肺	26.3	24.2	10.8
肝臓	1.2	2.2	—

Donryu ラットに 20 mg/kg の [<sup>3</sup>H] 4HAQO (28 mCi/mmol) を静注し, 2 時間後, 各臓器を摘出した。放射活性法: 0.5-1 mg DNA を 0.01 N HCl, 90°C, 5 分間処理した後, 中和し, シンチレーションカウンターで測定した。

酵素免疫法: DNA (1-5 μg/ml) を PBS 中 90°C, 5 分間処理したのち, その 50 μl (0.02-5 μg DNA) を 25 ng の抗 4NQO-DNA 抗体と試験管内で反応させたのち残存する抗体価を ELISA で測定した。

(a) 3 付加体/10<sup>8</sup> 塩基, (b) 107 付加体/10<sup>8</sup> 塩基の 4NQO-DNA で得た標準曲線より求めた。

ten, 1987)。このことは抗 4NQO-DNA 抗体は 4NQO-塩基付加体ばかりでなく付加体生成による DNA 構造の局所的变化を認識していることを示唆している。

#### (iii) 4NQO 投与ラットの臓器 DNA 付加体の定量

[<sup>3</sup>H] 4HAQO (28mCi/mmol) を Donryu ラット雌に静注投与し (20 mg/kg 体重), 各臓器 DNA を抽出し, DNA の付加体量を ELISA 法と放射活性法により測定した (Table 3)。拮抗 ELISA の標準サンプルは (a) では 1-10 付加体/10<sup>8</sup> 塩基, (b) では 107 付加体/10<sup>8</sup> 塩基の修飾 DNA を用いた。(a) の標準曲線で得られた値は放射活性法の測定値と非常に高い相関性を示したが (b) で求めたものは放射活性法で得られた測定値より低く, 付加体量の少ない肺では 60% も低い値を示した。したがって, 微量の付加体を定量するときには標準とする修飾 DNA は修飾度の低い DNA を用いる必要がある。この静注投与方法ではすい臓に特異的に癌が発生するが, すい臓に最も多くの付加体が生成していた。非標的臓器, 肝には殆ど付加体は検出されず, 付加体の生成と臓器特異性はよく一致した。

#### (iv) 免疫組織化学的検出

拮抗阻害 ELISA から 5 fmol 付加体が 1 本鎖 DNA で検出可能であることが明らかとなった。このことは免疫組織化学的に細胞内での付加体が検出できる可能性のあることと, および組織の化学的処理に伴う DNA 変性は付加体の検出に問題のないことがわかった。そこで細胞および組織での付加体の検出を試みた。

細胞として正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHSE) を用いた。細胞は平板培養したのち, Lab-Tek 2 chamber slides に分注し, 2 日間単層培養した後 4NQO の処理は 2.5×10<sup>-7</sup>-2×10<sup>-8</sup> M 濃度で Hanks 溶液中, 37°C, 60 分間行った。対照の細胞は Hanks 溶液のみを用いた。処理後直ちに洗浄したスライドを 15 分間 4% パラホルムアルデヒドに浸し細胞を固定した。スライドをエタノールなどで洗浄したのち, さらに RNase A 100 μg と RNase T<sub>1</sub> 50 units を含む RNase 溶液 1 ml を加え 37°C, 45 分間反応させ, RNA を除去し

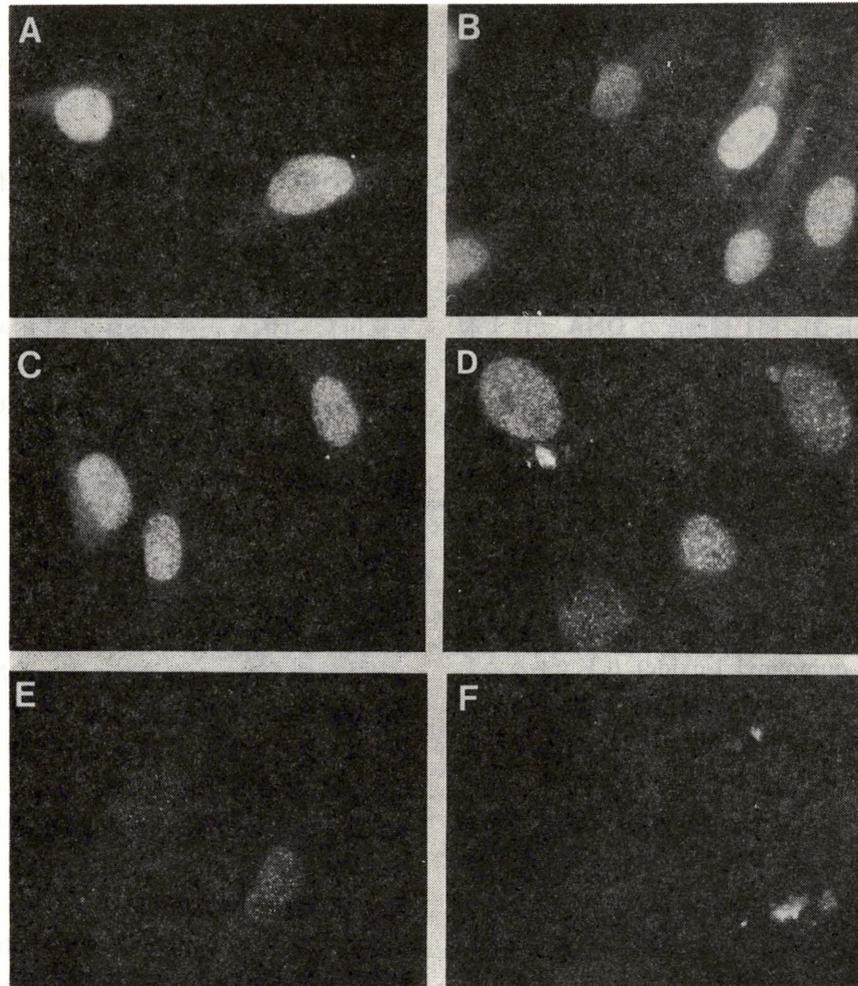


Fig. 4. 蛍光抗体染色による NHSF 細胞に生じた 4NQO-DNA 付加体の検出。4NQO 処理は 37°C, 1 時間行った。4NQO の濃度は A)  $2 \times 10^{-6}$  M, B)  $1 \times 10^{-6}$  M, C)  $5 \times 10^{-7}$  M, D) C) の 16 時間回復培養後, E)  $2.5 \times 10^{-7}$  M, F) 対照

た。クロマチン蛋白の除去と DNA の部分的変性のために細胞を 2.5 N HCl で室温で 45 分間処理した。抗体の非特異的吸着を除くために 5% の正常ヤギ血清で処理したのち、4NQO-DNA 抗体をのせ 37°C, 60 分作用させた。1 次抗体で処理したのち FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と反応させた。よく洗浄し、グリセリンでスライド上に封入し、Nikon Fluophot 落射蛍光顕微鏡で観察した。Fig. 4 に示すように処理した細胞はいずれも核全体に核小体を除いてドット状に蛍光が観察された。また  $2 \times 10^{-6}$  M から  $2.5 \times 10^{-7}$  M まで処理濃度に依存して蛍光の減少が見られた。また酸処理を行わない場合は染色されなかった。 $1 \times$

$10^{-6}$  M 処理したのち (Fig. 4B) 16 時間の回復培養によって蛍光が減少していることが観察された (Fig. 4D)。ここには示していないが、4NQO に高感受性の色素性乾皮症皮膚線維芽細胞 (XP 細胞) でも同様に蛍光染色されたが 16 時間、回復培養しても染色が強く残っていた。これからも XP 細胞には 4NQO の損傷を修復する系が欠損していることがわかった。動物組織での付加体の免疫組織的検出については Nakagawa ら (1988) の論文を参照されたい。

#### (2) 抗 3,2'-DMAB-DNA 抗体

DMAB はラットでは小腸、乳腺、すい臓、前立腺のほかいくつかの臓器を標的とする発癌物質

であるが肝臓には発癌しないことになっている (Shirai ら, 1985, 1988)。特に前立腺では発癌にホルモン依存性のあること発癌の部位が背葉にかぎられ腹葉からは発生しないことなど興味深い化合物である。発癌の臓器特異性との関連において、DMAB-DNA 付加体の生成と除去、持続的存在の定量的解析を免疫組織化学的手法で行っ

た。

#### (i) 抗体の作成

4NQO-DNA 抗体と同様ウサギポリクローナル抗体を作成した。抗原として使用した修飾 DNA は N-OH-DMAB を Seryl-AMP でアシル化し、DNA を修飾、 $10^8$  スクレオチド当り 3-4 付加体を含んだものを使用した。DMAB の

Table 4. 抗 DMAB-DNA 抗体の特異性

阻害剤	修飾度 (%)	50% 阻害に要する DMAB 付加体 (fmol)
DMAB-DNA		
native	0.4	22 ± 2.0
	0.02	44 ± 4.0
	0.008	90 ± 13.3
heat denatured <sup>1)</sup>	0.4	7.0 ± 0.5
	0.02	7.7 ± 0.7
	0.008	8.0 ± 1.0
alkali denatured <sup>2)</sup>	0.02	6.0 ± 1.0

マイクロタイタープレートはウェル当り 20 ng の DMAB-DNA (0.37% 修飾塩基を含む) を用い、固相抗原とした。10 ng の抗体を阻害物質と予め試験管内で反応させたのち残存する抗体価から抗体結合を 50% 阻害する濃度を求めた。

1) PBS 中 90°C, 5 分間加熱した。

2) 0.02 N NaOH 中 70°C, 15 分間処理した。

Table 5. DMAB 処理ラット中に存在する付加体の定量

組織	DMAB 付加体/ $10^6$ 塩基
肝臓	35.2
すい臓	34.7
大腸	27.9
腎臓	26.3
前立腺 (背葉)	24.8
(腹葉側葉)	10.8
小腸	14.3
精巣	15.7

付加体量は拮抗 ELISA で測定した。

F344 ラットに 200 mg/kg 体重の DMAB を投与、24 時間後に各臓器を摘出、DNA を抽出した。DNA (1-50  $\mu$ g/ml) を 0.02 N NaOH, 70°C, 5 分間処理後、中和し、拮抗阻害サンプルとした。その 50  $\mu$ l (0.02-5  $\mu$ g DNA) を 40 ng の抗 DMAB-DNA 抗体と試験管内で反応させたのち残存する抗体価を ELISA で測定した。

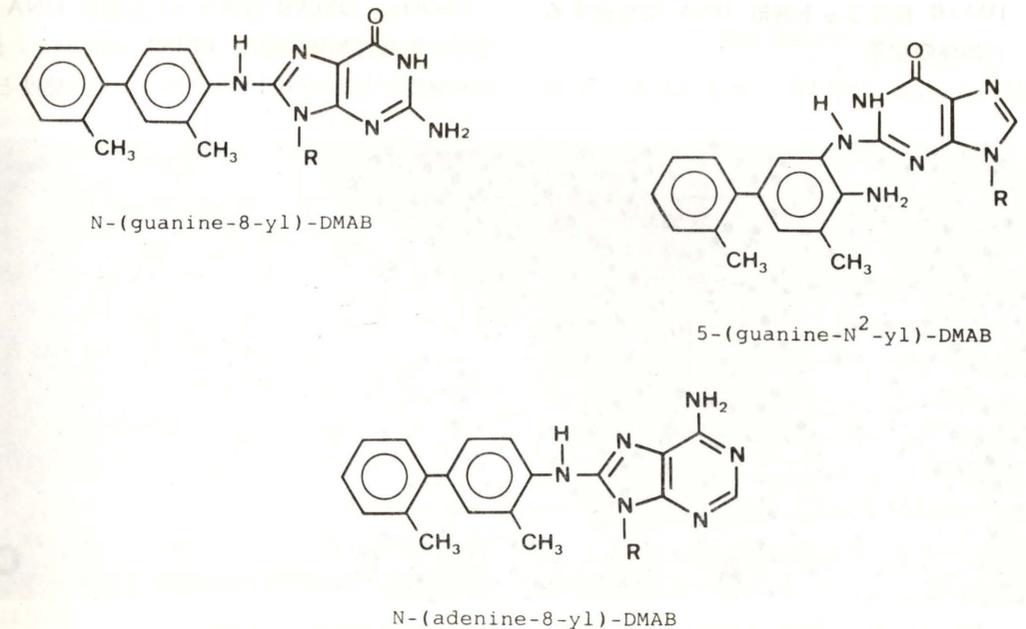


Fig. 5. DMAB-DNA 付加体の化学構造。

塩基付加体の化学構造は Flammang ら (1986) によって N-(deoxyguanosin-8-yl)-DMAB(60-70%), 5-(deoxyguanosin-N2-yl)-DMAB(2-3%) and N-(deoxyadenosin-8-yl)-DMAB(1-3%) であると報告されている (Fig. 5)。

### (ii) 抗体の特異性

Table 4 に示すように抗体の特異性は拮抗阻害 ELISA により求めた。DMAB-DNA の場合も未変性 DNA に比し変性 DNA の方が 4-5 倍親和性が高かった。しかし、抗 DMAB-DNA 抗体は 4NQO-DNA 抗体と異なり 1 本鎖 DNA にすると修飾度に関係なく 50% 阻害に要する量は 7-8 fmol 付加体でほぼ一定であった (Table 4)。1 本鎖 DNA 中 7-8 fmol 付加体を 5  $\mu$ g DNA 中に、すなわち 5 付加体/ $10^7$  塩基まで検出が可能であった。この抗体と反応する塩基付加体は 4NQO の場合と同様、中性、アルカリ性溶液中の加熱処理で安定であった。4NQO や 2-acetylaminofluorene(AAF), 4-aminoazobenzene(4-AAB) 誘導体で修飾した DNA とは反応しなかったが、4-aminobiphenyl(4-AB) で修飾した DNA には DMAB 修飾 DNA と同様高い親和性を示した。この抗体が biphenyl 基で修飾された塩基 (特にグアニン) を認識していることを示唆している。

### (iii) DMAB 投与ラット臓器 DNA に生成する付加体の定量

F344 ラットに DMAB を体重 kg あたり 50

mg, 100 mg, 200 mg 皮下注射し 24 時間後各臓器を摘出、DNA を精製した。DMAB-DNA 付加体量を拮抗 ELISA で測定した結果を Table 5 に示したが、非標的臓器である肝臓にもっとも多く付加体の生成が見られた。前立腺では発癌部位である前立腺背葉に非発癌部位の腹葉より約 3 倍の付加体が存在していた。

### (iv) 免疫組織化学的検出

DMAB を投与した上記ラットの各臓器をアセトンで固定し、そのパラフィン切片を RNase, 蛋白分解酵素, 塩酸処理を行ったのち 1 次抗体を作用させ、ついで avidin biotin peroxidase complex (ABC 法) で染色した。標的臓器である前立腺背葉, 側葉などは強陽性に染まり非発癌部位の前立腺腹葉は弱陽性であった (Shirai, 1990)。非標的臓器の肝臓で最も強く染色され、濃度依存的に染色された (Fig. 6)。これら免疫組織化学的実験結果は ELISA による DNA の付加体の定量とよく相関した。肝臓に生成する付加体は 50 mg/kg 体重投与で 15.7 付加体/ $10^6$  塩基, 200 mg/kg 体重投与では 35.2 付加体/ $10^6$  塩基であった。Fig. 6 に示すように免疫組織化学的にも染色性の強弱が認められる。

### (3) 免疫化学的手法による解析のまとめ

4NQO と DMAB 処理ラット各臓器 DNA に生じた塩基付加体を拮抗 ELISA 法で測定した。絶対感度として 5-10 fmol 付加体, 相対感度とし

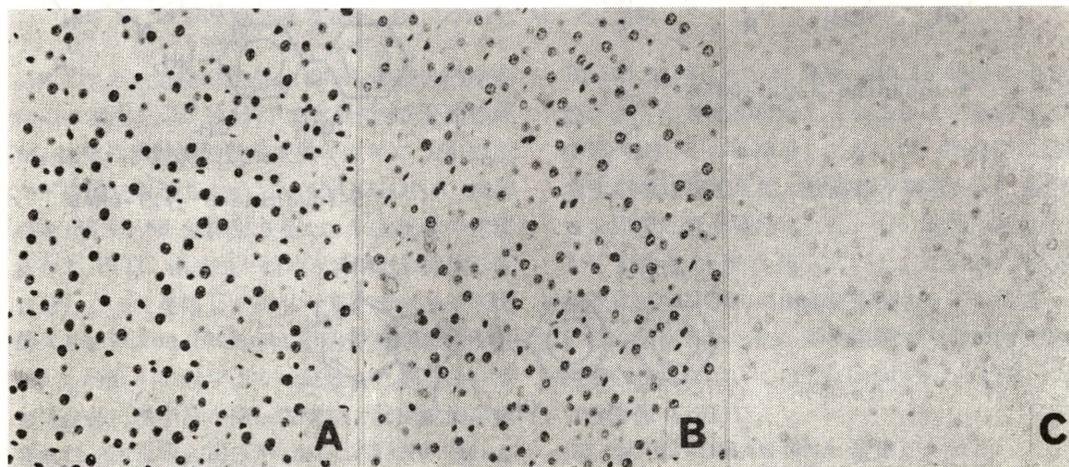


Fig. 6. ラット肝臓に生成する DMAB-DNA 付加体の免疫組織染色による検出。DMAB ラット体重 (kg) 当り A) 50 mg, B) 200 mg 皮下投与 24 時間後, C) 対照ラット

て 0.5-5 付加体/ $10^6$  塩基まで検出できる系を開発した。抗体の特異性の解析から抗 DMAB-DNA 抗体が DMAB 付加体自体を認識しているのに反して抗 4NQO-DNA 抗体は 4NQO 付加体のほか 4NQO 修飾によって DNA に生じた構造変化を認識している可能性があった。このことは 4NQO と DMAB の付加体の構造の差、すなわち DMAB が major groove (主溝) のグアニン C8 位付加体が多く 4NQO が minor groove (副溝) のグアニン N<sup>2</sup> 付加体が多く生成することに由来すると考える (Fig. 2, 5)。したがって、ELISA 法による付加体の定量にはそれぞれの抗体の特性を考慮した上で測定する必要がある。このことは付加体の生成によって DNA に生じる立体構造が抗体によって認識されるからと考えることができる。したがって、アルキル化付加体では O<sup>6</sup>-メチルグアニンや O<sup>4</sup>-チミンを各々に識別し定量することができるが、芳香族アミンのようないわゆる “bulky adducts” では DNA の構造も関与し各々の付加体を分別し定量することはなかなか困難のようである (Muller, 1980)。

免疫組織化学的手法により生じた損傷、塩基付加体を *in situ* で検出することができた。しかし、この方法には i) 細胞、組織の固定法 (アセトン, ホルマリン等), ii) 抗原性を発現させるための処理、ここでは 2.5-4 N の HCl で処理したがその方法が最適であるかどうかは現在検討中である。DNA の塩基付加体は酸処理で抗原性を消失するが細胞レベルでは酸処理によってはじめて抗体と反応できるようになる。酸に不安定な付加体を検出するためにはこれらの処理については注意深く実験を行う必要がある。iii) 蛍光および染色抗体法での付加体の定量的解析の開発などさらに検討する必要がある。今後特異性の高い抗体を作成することにより各々の構造の異なる付加体を DNA または *in situ* で検出できるようになることが期待される。

### 3. <sup>32</sup>P-ポストラベル法による付加体の解析

前述の抗体による免疫学的手法での付加体の検出は感度および特異性の点で優れているが多種類の化合物による付加体の分析には適当でない。そ

れは抗原とする修飾 DNA や スクレオチドを調製することが困難な化合物には適応出来ないからである。近年、Randerath らによって <sup>32</sup>P-ポストラベル法が開発され、放射標識のない癌原性物質、突然変異誘発物質による DNA 損傷の検索としてその改良法とともに広く用いられるようになった (Randerath ら, 1981; Gupta ら, 1982)。

この方法は最終的には薄層クロマトグラフィー (TLC) で正常スクレオチドから修飾スクレオチド (adducted nucleotide) を分離し定量する方法である。これらの方法により芳香族アミン, 芳香族アミド, アゾ色素, 芳香族多環炭化水素化合物などのほかアルキル化剤など 100 以上の化合物の付加体についての解析がなされている。特に、食品中の aflatoxine B<sub>1</sub> やアミノ酸加熱分解物 (Trp-P-2, MeIQ, IQ など), 喫煙によるヒト臓器 DNA の付加体の解析は疫学的見地からも注目されている (Yamashita ら, 1988, Janke ら, 1990)。一般的な実験方法を Fig. 7 に示した。

DNA を micrococcal nuclease で 3'-モノスクレオチドとし T<sub>4</sub> polynucleotide kinase により [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP で 5' 端をラベルし 3',5'-bisphosphate 正常スクレオチド (\*pNp) と修飾スクレオチド (\*pXp) にする。ついで、PEI セルロース

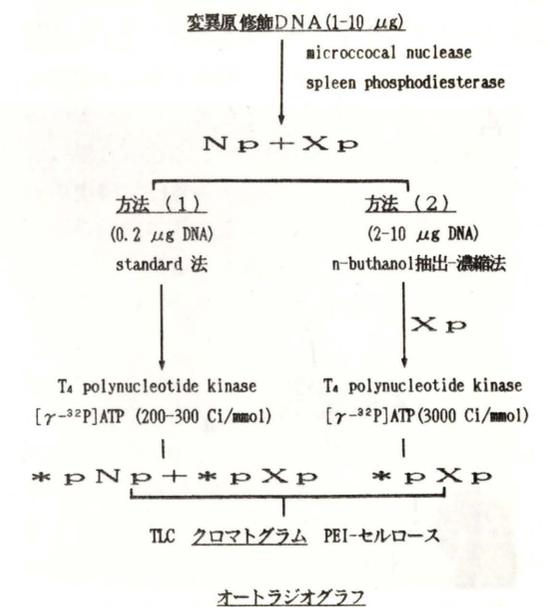


Fig. 7. <sup>32</sup>P-ポストラベル法による付加体の分析法

TLC 二次元クロマトグラムにより正常ヌクレオチドと修飾ヌクレオチドを分離する。autoradiographyにより付加体を検出し、シンチレーション測定により各々の付加体を定量する。修飾レベルは全ヌクレオチドの放射活性に対する修飾ヌクレオチド放射活性比で示す。方法2に示したように nuclease 処理後 n-butanol 抽出により修飾ヌクレオチドを濃縮すると感度は上昇し  $10^9$ - $10^{10}$  塩基当り1付加体、すなわち、哺乳動物の1ゲノム中の1付加体が検出可能である。またこの方法は化学的性質(構造)が未確認の付加体の検出にも利用でき PEI セルロース TLC のフィンガープリントのパターンから付加体の種類、量などを推定することができ、処理後の経時的測定により各々の付加体の修復、持続性なども調べることができる。

#### (1) アゾ色素の付加体の解析

1級型アミノアゾベンゼン化合物である 4-aminoazobenzene 誘導体のうち 3-methoxy-4-aminoazobenzene(3-MeO-AAB) がラット肝に発癌および Ames テストにおいて突然変異原性を示すのに反してその異性体の 2-methoxy-4-aminoazobenzene(2-MeO-AAB) は癌原性および突然変異原性をほとんど示さない。これらの化合物の N-OH 化合物は前述の 4HAQO と同様にアミノアシル tRNA 合成酵素によって *in vitro*

で DNA のグアニンと結合する (Hashimoto, 1981)。この両化合物の作用の差は *in vivo* で生じる付加体とどのように相関するかを明らかにするために  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法で解析した。

雄 F344 ラット腹腔内にアミノアゾベンゼン誘導体を 50 mg/kg 体重投与し、経時的に臓器を摘出、DNA を調製し上記の n-butanol 抽出後、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法で付加体を解析した。全付加体量は 3-MeO-AAB で 24 時間後、2-MeO-AAB で 48 時間後に最高に達し、それぞれ  $10^7$  塩基当り 3.8 付加体、0.16 付加体であった。発癌性 3-MeO-AAB が非発癌性 2-MeO-AAB より約 20 倍付加体が多く生成した。また Fig. 8 に示すように非発癌性 2-MeO-AAB で生成する付加体は1種のみであったが、3-MeO-AAB では主付加体(スポット 1)のほか4種の付加体の存在が確認された。3-MeO-AAB および 2-MeO-AAB の付加体の化学構造などはまだ解明されていないが、このスポットパターンから生成する付加体に差があることがわかった。

両化合物の発癌および突然変異誘発能の差は生成量と付加体の種類に依存することが示唆された。

#### (2) $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法のまとめ

この方法は化学的性状の未確認の化合物の付加体の検出に適していて、しかも1ゲノム当り1付

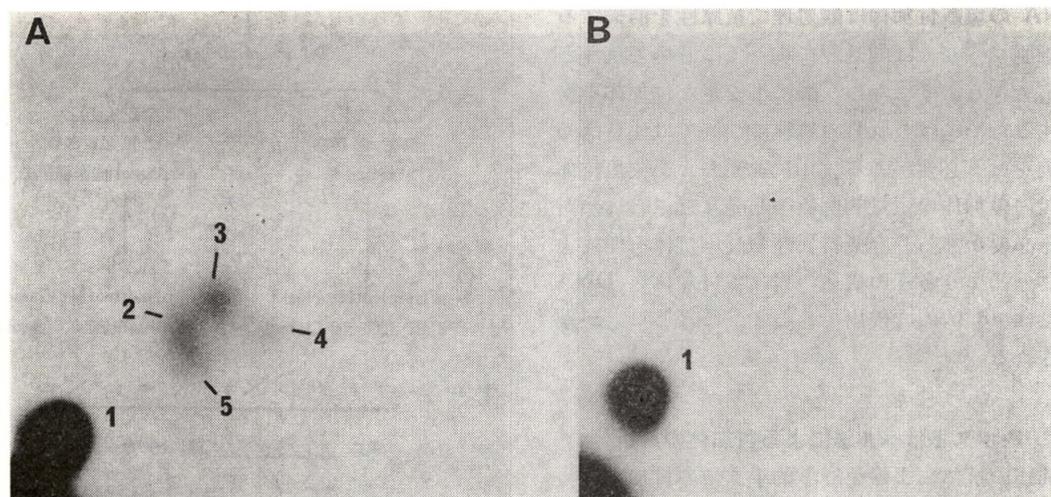


Fig. 8. アゾ色素投与ラット肝臓に生成する付加体の  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法による解析。  
A) 3-MeO-AAB (50 mg/kg) 投与 24 時間後, B) 2-MeO-AAB (50 mg/kg) 投与 48 時間後。

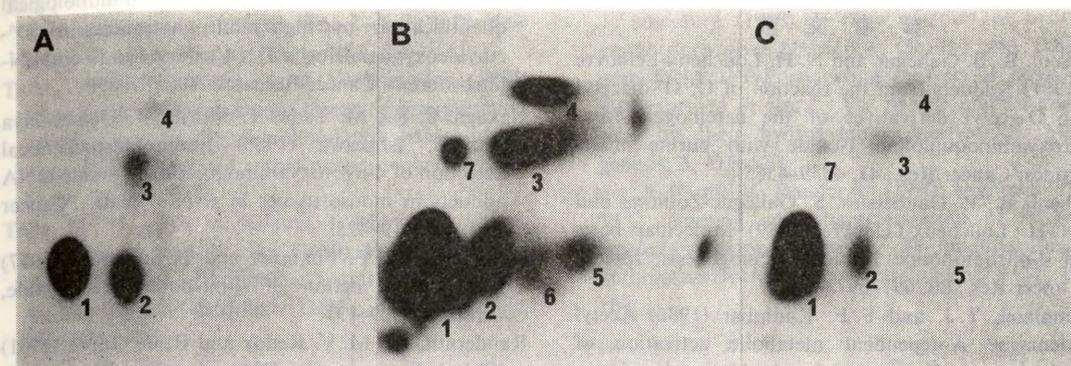


Fig. 9. 4-AB-DNA 付加体の  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法による解析 n-butanol 抽出の効率。  
A) standard 法, B) n-butanol 濃縮法, C) B の露出時間を短くしてある。

加体の検出も可能である。ヒト DNA 中の付加体が解析でき、分子疫学的に応用できる点で優れている。しかし多量に存在する正常のヌクレオチドと修飾ヌクレオチドを分離するには改良すべき点がある (Gupta, 1988; Yang, 1990)。また DNA を細胞や組織から抽出してくる過程での付加体の安定性、nuclease による分解や T4 polynucleotide kinase 等の酵素作用に対する効率の問題、また n-butanol 抽出や、nuclease P<sub>1</sub> 処理による濃縮の効率等にはまだ問題がある。ここに 4-AB-DNA 付加体の  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法での TLC のパターンを示した (Fig. 9)。4-AB-DNA は N-OH-4AB を seryl-AMP 存在下 calf thymus DNA に結合させその修飾度は  $10^4$  塩基当り約 1 付加体である。(A) は standard 法, (B) は n-butanol による濃縮法で (A) よりスポット数が多いことが認められる。(C) は (B) の露光時間を短くしたものである。スポットの強さから付加体によって n-butanol による抽出率に差がありスポット 1 はスポット 2 より抽出されやすいことがわかる。またヒト DNA を解析する場合のように多種類の化合物の付加体が生ずる場合はどの化合物に由来する付加体であるかを定めることがむずかしい。しかし Reddy ら (1984) によれば芳香族アミン、benzo (a) pyrene のような芳香族炭化水素化合物などは化合物によって特色ある TLC パターンが得られ化合物の推定が可能とされている。

#### 4. おわりに

DNA 損傷の生物学的意義を解明するにはまず生体内で生じる付加体の性質および定量的に解析することが必要である。新しい分析技術の進歩によって発癌や突然変異が生じるような低濃度(細胞致死に至らない濃度)での付加体の検出量ができるようになってきている。そのうち当研究室で行った免疫化学的手法と  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法による解析とそれらの利点とまだ改善すべき問題点について述べた。

いずれの方法も動物実験や培養細胞による発癌や突然変異を誘発する付加体量の解析に十分な感度を示した。その結果、4NQO のように付加体量と発癌とがよく相関する場合と DMAB による肝臓のように付加体の生成量が単純に発癌と相関しない場合があることを明らかにした。DNA 付加体の生物学的意義を解析するには、今後は DNA のどの部位にどのような性質をもつ付加体が生ずるのか、さらにそれらの生物学的特性を解析できる実験系を樹立することが望まれる。

#### 5. 謝辞

この研究を進めるにあたり御助言賜りました名古屋大学医学部伊東信行教授、同薬学部川添豊教授に感謝いたします。またアゾ色素化合物を頂きました東北大学薬学部橋本嘉幸教授、出川雅邦博士に感謝します。この研究の1部は文部省科学研究費(がん特1)による。

## 参 考 文 献

- Bailleul, B., S. Galiègue and N. H. Loucheux-Lefebvre (1981) Adducts from the reaction of O, O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides, *Cancer Res.*, **41**, 4559-4565.
- Bailleul, B., P. Daubersies, S. Galiègue-Zouitina and M.-H. Loucheux-Lefebvre (1989) Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 691-697.
- Flammang, T. J. and F. F. Kadlubar (1986) Acetyl coenzyme A-dependent metabolic activation of N-hydroxy-3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and several carcinogenic N-hydroxy arylamines in relation to tissue and species differences, other acyl donors, and arylhydroxamic acid-dependent acyltransferases, *Carcinogenesis*, **7**, 919-926.
- Gupta, R. C., M. V. Reddy and K. Randerath (1982) <sup>32</sup>P-Post-labeling of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts, *Carcinogenesis*, **3**, 1081-1092.
- Gupta, R. C. and K. Earley (1988) <sup>32</sup>P-Adduct assay: Comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures, *Carcinogenesis*, **9**, 1687-1693.
- Hashimoto, Y., M. Degawa, H. K. Watanabe and M. Tada (1981) Amino acid conjugation of N-hydroxy-4-aminoazobenzene dyes: A possible activation process of carcinogenic 4-aminoazobenzene dyes to the ultimate mutagenic or carcinogenic metabolites, *Gann*, **72**, 937-943.
- Jahnke, G. D., C. L. Thompson, M. P. Walker, J. E. Gallagher, G. W. Lucier and R. P. DiAugustine (1990) Multiple DNA adducts in lymphocytes of smokers and nonsmokers determined by <sup>32</sup>P-postlabeling analysis, *Carcinogenesis*, **11**, 205-211.
- Kakunaga, T. (1974) Requirement for cell replication in the fixation and expression of the transformed state in mouse cells treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int. J. Cancer*, **14**, 736-742.
- Kawazoe, Y., M. Araki, G.-F. Huang, T. Okamoto, M. Tada and M. Tada (1975) *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3041-3043.
- Loman, P. H. M., R. A. Bann, A. M. J. Fichtinger-Schepman, M. A. Muysken-Schoen, M. J. Lansbergen and F. Berends (1985) Molecular dosimetry of genotoxic damage: Biochemical and immunochemical methods to detect DNA-damage *in vitro* and *in vivo*. In: TIPS-FEST supplement, Amsterdam Elsevier, pp. 1-7.
- Morita, T., S. Ikeda, Y. Minoura, M. Kojima and M. Tada (1988) Polyclonal antibodies to DNA modified with 4-nitroquinoline 1-oxide: Application for the detection of 4-nitroquinoline 1-oxide-DNA adducts *in vivo*, *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 195-203.
- Muller, R. and M. F. Rajewsky (1980) Immunological quantification by high-affinity antibodies of O<sup>6</sup>-ethyldeoxyguanosine in DNA exposed to N-ethyl-N-nitrosourea<sup>1</sup>, *Cancer Research*, **40**, 887-896.
- Nakagawa, K., M. Tada, T. Morita, J. Utsunomiya and T. Ishikawa (1988) Immunohistochemical detection of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide-DNA adducts in mouse tissues *in vivo*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 419-425.
- Nakahara, W., F. Fukuoka and T. Sugimura (1957) Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide, *Gann*, **48**, 129-137.
- Randerath, K., M. V. Reddy and R. C. Gupta (1981) <sup>32</sup>P-Labeling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6126-6129.
- Reddy, M. V., R. C. Gupta, E. Randerath and K. Randerath (1984) <sup>32</sup>P-Postlabeling test for covalent DNA binding of chemicals *in vivo*: Application to a variety of aromatic carcinogens and methylating agents, *Carcinogenesis*, **5**, 231-243.
- Saffhill, R., G. P. Margison and P. J. O'Connor (1985) Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents, *Biochim. Biophys. Acta*, **823**, 111-145.
- van Schooten, F. J., E. Kriek, M. J. S. T. Steenwinkel, H. P. J. M. Noteborn, M. J. X. Hillebrand and F. E. van Leeuwen (1987), The binding efficiency of polyclonal and monoclonal antibodies to DNA modified with benzo (a) pyrene diol epoxide is dependent on the level of modification. Implication for quantitation of benzo (a) pyrene-DNA adducts *in vivo*, *Carcinogenesis*, **8**, 1263-1269.
- Shirai, T., T. Sakata, S. Fukushima, E. Ikawa and N. Ito (1985) Rat prostate as one of the target organs for 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced carcinogenesis: Effects of dietary ethinyl estradiol and methyltestosterone, *Gann*, **76**, 803-808.
- Shirai, T., Y. Tagawa, O. Taguchi, E. Ikawa, M. Mutai, S. Fukushima and N. Ito (1988) Low tumorigenic response to 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-administration in the prostate of rats castrated at birth, *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 1293-1296.
- Shirai, T., A. Nakamura, S. Fukushima, M. Tada, T. Morita and N. Ito (1990) Immunohistochemical demonstration of carcinogen-DNA adducts in target and non-target tissues of rats given a prostate carcinogen, 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, *Carcinogenesis*, **11**, 653-657.
- Strickland, P. T. and J. M. Boyle (1984) Immunoassay of carcinogen-modified DNA, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **31**, 1-58.
- Sugimura, T. (1981) In "Carcinogenesis a comprehensive survey, Raven Press, New York, **6**, pp. 1-154.
- Tada, M. and M. Tada (1975) Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide, *Nature*, **255**, 510-512.
- Tada, M. and M. Tada (1976) Main binding sites of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in nucleic acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **454**, 558-566.
- Tada, M., K. H. Kohda and Y. Kawazoe (1984) Biomimetic preparation and structure determination of QG<sub>1</sub>, one of the quinoline-DNA base adducts formed in cells treated with 4-nitroquinoline 1-oxide, *Gann*, **75**, 976-985.
- Tada, M., H. Aoki, M. Kojima, T. Morita, T. Shirai, H. Yamada and N. Ito (1989) Preparation and characterization of antibodies against 3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-modified DNA, *Carcinogenesis*, **10**, 1397-1402.
- Yamashita, K., A. Umemoto, S. Grivas, S. Kato and T. Sugimura (1988) *In vitro* reaction of hydroxy amino derivatives of MeIQx, Glu-P-1 and Trp-P-1 with DNA: <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of DNA adducts formed *in vivo* by the parent amines and *in vitro* by their hydroxyamino derivatives, *Mutagenesis*, **3**, 515-520.
- Yang, P.-F. and K. Randerath (1990) High-resolution TLC mapping and characterization of <sup>32</sup>P-post-labeled monophosphate 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-DNA adducts, *Carcinogenesis*, **11**, 159-164.

## 毒性発現におけるフリーラジカルと活性酸素

東京大学先端科学技術研究センター 二木 鋭雄

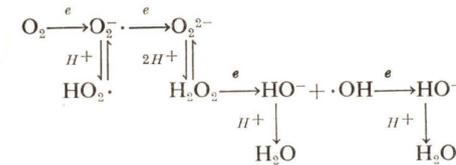
### 1. はじめに

好気性生物はフリーラジカル、活性酸素<sup>1</sup>を合目的的に発生させ、それを利用して生命を維持しているが、反面、これらが過剰に、あるいは本来あるべきでない場で生成すると、これらは一転して毒性を発現するようになる。さらに、体外からラジカル、活性酸素を直接とり込むこともある。これら、フリーラジカルや活性酸素は本来の作用ではない反応を生体分子と行い、それが発がん、突然変異をはじめ、種々の疾病や老化とも関連することを示唆する知見が近年多く認められるよう

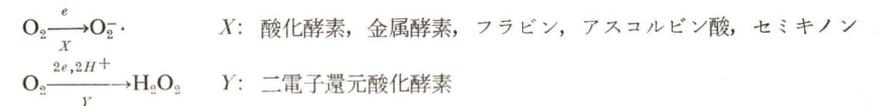
になった (Hayashi, 1989; Halliwell, 1985; Sies, 1985)。癌とラジカルとの関連についても広く注目されている (Pryor, 1986; 児玉, 1987, 1990; Floyd, 1982; 生島, 1987; Ts'o, 1977; Ames, 1983; Cerutti, 1985; Marnett, 1987)。それには、発癌物質の代謝過程におけるラジカルの関与、チトクローム P450 やアミノキシダーゼなど代謝酵素による代謝物からのラジカルによる発癌作用、およびラジカルそのものによる DNA の攻撃による発癌作用などがある。それらの機序の詳細については不明のことが少なくなく、今後に残さ

Table 1 活性酸素, フリーラジカル生成反応

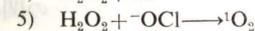
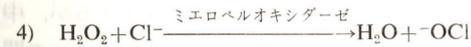
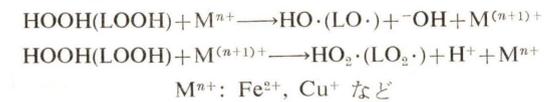
#### 1) 呼吸鎖での酸素分子の4電子還元



#### 2) 酸素分子の一電子, 二電子還元



#### 3) 過酸化物の分解



6) 金属錯体による脂質などへの攻撃

7) 光, 放射線などの照射

8) 大気中の  $\text{HO} \cdot$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ , タバコの煙, タールなどのとり込み

〒153 東京都目黒区駒場 4-6-1

Toxic Effects of Free Radicals and Active Oxygens

Etsuo Niki

Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, 4-6-1

Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153

れた課題も多いが、ここでは、ラジカルと活性酸素による生体分子の反応について、反応化学論的観点から概論する。

1 フリーラジカルとは、言うまでもなく、不対電子を一つあるいはそれ以上もつ原子、分子である。ラジカルのすべてがフリーではないが、ここではフリーラジカルを単にラジカルと言う。ラジカルのすべてが活性ではなく、活性酸素のすべてがラジカルとは限らないことも言うまでもない。

## 2. ラジカル、活性酸素の発生と性質

生物はミトコンドリアでの呼吸や食作用で活性酸素を生成している。このような正常の生理作用で生成するラジカルや活性酸素は、その生成の場、量ともうまくコントロールされて、合目的的に利用されているが、時にはこのコントロールされている場からもれ出たり、過剰に生成したり、あるいは本来あるべきものとは異なる原因、反応でこれらが生ずることもある (Table 1)。

これらラジカルや活性酸素は生体において、脂質、タンパク質、糖、DNA を攻撃する。これら活性種の活性、反応性、および選択性は攻撃種によって当然異なるが、また攻撃される標的分子によっても異なる。Table 2 には、数種のラジカル、活性酸素種の、(1) 二つの二重結合にはさまれた不飽和脂質のメチレン水素の引き抜き反応、(2) 二重結合への付加反応、(3) 炭素-塩素 (C-Cl) 結合との反応における反応速度定数を示した。水素引き抜き反応、二重結合への付加反応いずれに対

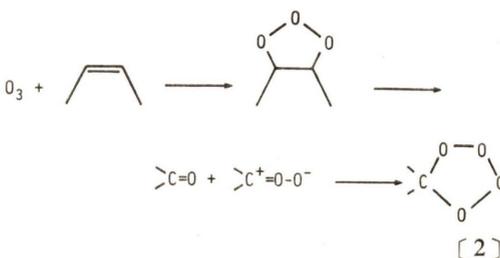
Table 2. フリーラジカル、活性酸素の反応性

ラジカル・活性酸素	H引き抜き	付加	C-Cl
ヒドロキシルラジカル HO·	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	0
チールラジカル RS·	10 <sup>7</sup>	?	?
アルコキシルラジカル LO·	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0
ヒドロペルオキシラジカル HO <sub>2</sub> ·	10 <sup>2</sup>	10	0
ペルオキシラジカル LO <sub>2</sub> ·	10 <sup>2</sup>	10	0
鉄-酸素錯体 Fe...O <sub>2</sub>	?	?	?
スーパーオキシド O <sub>2</sub> ·-	0	0	10 <sup>3</sup>
過酸化水素 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0	遅い	0
ヒドロペルオキシド LOOH	0	遅い	0
一重項酸素 <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	0	10 <sup>5</sup>	0
オゾン O <sub>3</sub>	0	10 <sup>5</sup>	0

速度定数, M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

しても反応性に大きな差があること、そしてその序列がヒドロキシルラジカル>アルコキシルラジカル>ペルオキシラジカル>二酸化窒素ラジカルの順であることが分かる。選択性は当然この逆であり、たとえばヒドロキシルラジカルはほとんどすべての生体分子と拡散律速に近い速度で、ランダムに攻撃すること、一方、ペルオキシラジカルは格段に小さい速度で、弱い結合を選択的に攻撃することが分かる。一方、スーパーオキシドはその名ほど反応性が大きくなく、それが直接水素を引き抜いたり、あるいは二重結合に付加するとは考えにくい。しかし、ハロゲン化物に対しては特異的に活性が大きいところが興味深い。一重項酸素やオゾンはラジカルでなく、水素を引き抜くことはないが<sup>2</sup>、二重結合とは速やかに反応する (1, 2式)。二酸化窒素、一酸化窒素はいずれもラジカルであるが、水素引き抜き反応、二重結合への付加反応いずれも、その速度は小さい。

2 オ존は C-H 結合と反応して COOOH というヒドロトリオキシドを生成するが、この速度は大きくない。



ラジカル、活性酸素は Table 1 に示したように種々の反応、ケースにより生成するが、中でもスーパーオキシドの生成と、金属イオンの関与する反応が重要と考えられている。呼吸でとりこむ三重項の酸素分子は容易に一電子受容体として作用し、白血球をはじめ多くの場でスーパーオキシドを生成する。ただこうして生成するスーパーオキシドがどう生体分子と反応して、毒性を発現するかについては明らかではない。すでに述べたとおり、スーパーオキシド自身の反応性は小さく、そ

れが直接タンパク質なり DNA などを攻撃するとは考えにくい。しかし、たとえば、スーパーオキシドを産生する食細胞やヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼとの共存で線維芽細胞の癌化が起こることが認められている (Weitzman, 1985)。確かに、SOD が極めて有効に傷害を防ぐということも認められており、スーパーオキシドが毒性発現に関与することも間違いなさそうである。実際、バラコートの変異原性が SOD により抑制されることも認められている (栗井, 1989)、また、SOD レベルが低い場合、酸素分子すら変異原となり得ると報告されている (Farr, 1986)。

結局、次の三つの反応のいずれかによりスーパーオキシドが作用している可能性が大きい。一つは、次の (3) 式の pKa は 4.8 であり、生理的条



件下では圧倒的に O<sub>2</sub>· の形で存在しているが、それでもわずかはプロトン化されてヒドロペルオキシラジカルとなり、それが真の活性種として生体分子を攻撃する、ということである。第二の可能性は、スーパーオキシドがキレート化された3価の鉄イオンを還元して活性の大きい小分子の鉄イオンを生成し、それが過酸化水素、脂質などのヒドロペルオキシドを分解し、ヒドロキシルラジカル、アルコキシルラジカルを生成する、というものである。三番目の反応は、スーパーオキシドが炭素-ハロゲン結合を攻撃してラジカルを生成するという反応で、表2に示したように、この反応は速い。しかし、生体内でこの反応がどれだけ重要なのか、よく分からない。

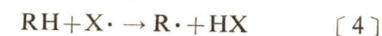
鉄、銅は生体内での重要な遷移金属イオンである。特に鉄イオンが生体内でのラジカル発生に関与するという考えがある。特に低原子価の2価鉄イオンが過酸化物を分解する反応が重要であり、その為、3価の鉄イオンを還元するものは促進効果をもつことになる。勿論、生体内の金属イオンは通常タンパク質によりキレート化されており、このようなラジカル生成反応が容易に起こらないようになっている。しかし、ニトリロ三酢酸鉄が腎臓に対して強い発癌性をもつことが、認められている (岡田, 1989; 岡田, 1990; 栗井, 1989)。さ

らに、岡田ら (Okada, 1989) はサッカレイト鉄にも発癌性があることを認めているが、これはアスベストの毒性と関連して興味深い。また、銅イオンによる DNA 損傷についても報告がある (Stoewe, 1987)。その他、クロム、ニッケル、コバルトなどによる DNA 損傷も認められている (川西, 1989)。

## 3. ラジカルの反応

ラジカルは生体分子と種々の反応をするが、大別すると次のように分けられる。

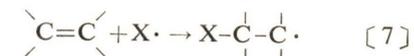
(1) 水素引き抜き反応: ラジカルがタンパク質、DNA、脂質、糖などを攻撃して水素を引き抜き、基質のラジカルを生成する。



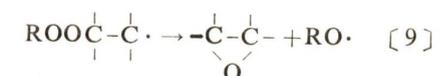
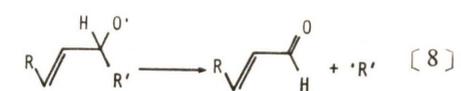
(2) 電子移動反応



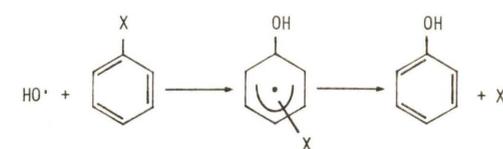
(3) 二重結合への付加反応: ラジカルが炭素-炭素、炭素-窒素などの二重結合に付加して、別のラジカルを発生する。



(4) ラジカルの β 開裂反応: ラジカルの β 位の結合が切断して安定生成物と別のラジカルを生ずる反応であり、主鎖切断などにつながる。



(5) 芳香核置換反応: ラジカルの芳香核への付加反応とそれに続く別の基の脱離反応により進む。芳香核のヒドロキシル化はその例である。



最初のラジカルの核への付加反応は速いが、このステップは可逆反応であり、置換生成物の収率は次のステップの起こりやすさに依存する。

(6) ラジカル間の 2 分子反応による停止反応: ラジカルどうしの 2 分子反応によるカップリング反応で橋かけ (crosslink) が起こる。不均化反応も競争的に進行する。



ペルオキシラジカルどうしの 2 分子反応ではすべてが連鎖停止反応になるとは限らず一部アルコキシラジカルを生成する反応が並列的に進行する。

ラジカルが生体膜、組織を攻撃する場合、多くのものが標的分子となり得るが、脂質はそれらの中でも重要なものの一つである。脂質の中でも二重結合を二つ以上有する、いわゆる高度不飽和脂質の、二重結合には含まれたメチレン水素 (doubly allylic hydrogen) の反応性が大きく、攻撃目標となり、ラジカル連鎖反応で酸化が進行する。そのスキームを Fig. 1 に示す。そのステップを要約すると、(i) ラジカルによる doubly アリル水素

の引き抜き反応によるペンタジエニルラジカルの生成, (ii) そのラジカルへの酸素の付加によるペルオキシラジカルの生成, (iii) それによる別の脂質からの水素引き抜き反応による共役ジエンヒドロペルオキシドの生成と、同時に新しく別の脂質ラジカルの生成、と進みこれで一つのサイクルが終る。実際は、ここで生成する脂質ラジカルが次のサイクルをスタートさせ、連鎖反応がくり返し続くこととなる。この他に、Fig. 1 に示すように、ペルオキシラジカルからの酸素の脱離、酸素の付加、水素引き抜き反応によるヒドロペルオキシドの生成もある。さらに、二重結合を 3 個以上有する脂質については、ペルオキシラジカルの分子内付加反応による環状過酸化物の生成も競争的に進行する。Fig. 1 を詳細に見ることにより、どのようにしてシス体の二重結合をもつ脂質から、シス, トランス-共役ジエンヒドロペルオキシド, トランス, トランス-共役ジエンヒドロペルオキシド, および環状過酸化物が生成するか、よく理解される。各ステップの反応速度定数もほぼ分かっており、それぞれの生成物分布が条件によりどのように変化するかも予測できる。ヒドロペルオキシドは安定な最終産物ではなく、さ

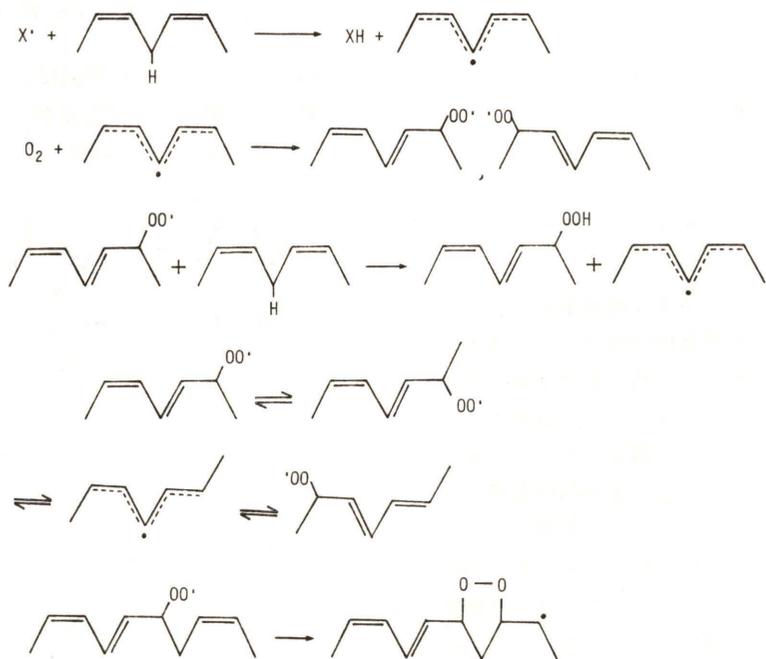


Fig. 1. 高度不飽和脂質のフリーラジカル連鎖的酸化反応。

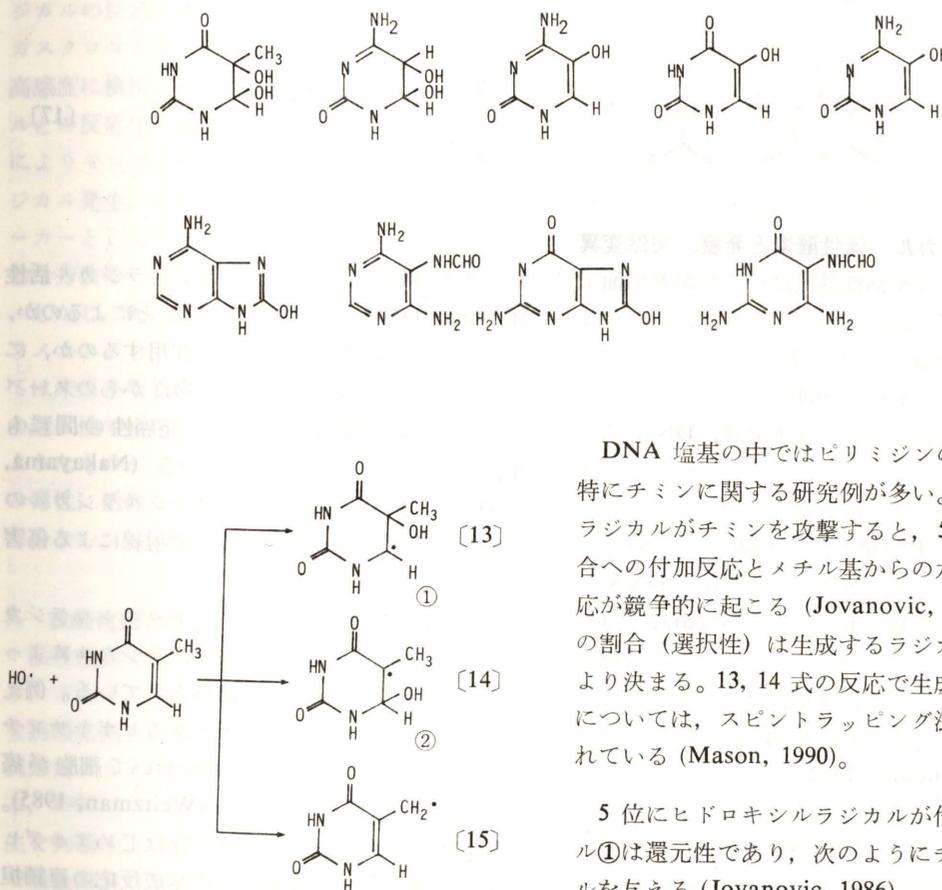
らに二次酸化生成物へと変化していく。

これら脂質過酸化物および二次生成物の細胞毒性などについて多くの研究報告がある。発癌に対しての脂質過酸化反応、脂質過酸化物の関与を示唆する実験報告も少なくない (児玉, 1987)。発癌とビタミン A, C, E など抗酸化物質との間の逆相関を示す疫学的データもある (Stoewe, 1987; Gey, 1989; Hayaishi, 1989)。また、先に述べたニトリロ三酢酸鉄による腎癌の発生に脂質過酸化反応が深く関わっていることも認められている (岡田, 1989)。脂質過酸化反応ではペルオキシラジカルが連鎖担体として作用するが、このラジカルと発癌との関連について、Marnett の総説もある (Marnett, 1987)。脂質過酸化反応のメカニズムが素反応レベルでよく解明されているのに対して、毒性発現の詳細なメカニズムはよく分かっていな

い。

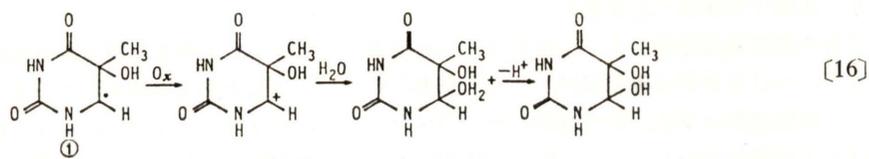
タンパク質も当然重要な標的分子である。チオール水素が引き抜かれてチルラジカルを生じ、そのカップリング反応による橋かけ、あるいは主鎖切断などが知られている。しかし、その傷害の反応メカニズム、機序については、未だ十分理解されておらず、特に定量的なデータ、議論が欠けている。

DNA の塩基とラジカル、活性酸素の反応については、特に放射線化学と関連して数多くの研究例がある (生島, 1987)。DNA のラジカル、活性酸素による損傷として、二重鎖切断、一重鎖切断、塩基の化学変化および脱落、架橋形成などがある。たとえば、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ-鉄系で DNA と反応させたとき、次の 9 種の生成物が認められている (Aruoma, 1989)。



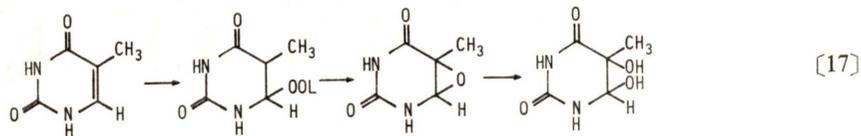
DNA 塩基の中ではピリミジンの感受性が高く特にチミンに関する研究例が多い。ヒドロキシルラジカルがチミンを攻撃すると、5,6 位の二重結合への付加反応とメチル基からの水素引き抜き反応が競争的に起こる (Jovanovic, 1986)。これらの割合 (選択性) は生成するラジカルの安定性により決まる。13, 14 式の反応で生成するラジカルについては、スピントラッピング法により確認されている (Mason, 1990)。

5 位にヒドロキシルラジカルが付加したラジカル①は還元性であり、次のようにチミングリコールを与える (Jovanovic, 1986)。



一方、6位にヒドロキシルラジカルが付加したラジカル②は酸性であり、上と同様にしてチミングリコールを与えることはない。②のラジカルにもう一つのヒドロキシルラジカルが反応するとは考えにくい。15式の反応で生成するラジカルは5-ヒドロキシメチルウラシルの前駆体と考えられる。

①のラジカルからどれだけ定量的にチミングリコールを与えるかは条件にもよるがよく分かっていない。次の17式の反応によるチミングリコール生成の可能性もある。このペルオキシラジカルの二重結合への付加とそれに続くβ開裂によるエポキシド生成はよく知られている反応である。



#### 4. フリーラジカル、活性酸素と発癌、突然変異

フリーラジカルや活性酸素はいくつかの場面で発癌、突然変異と関与する。たとえば、ベンツピレンに発癌性があることは古くから知られていた。特に7,8-ジオール-9,10-エポキシドはベンツピレンの代謝体の中で、変異原性、DNA結合性、発癌のイニシエーションなどについて高い活性を示す。しかし、これに加えて、ベンツピレンはシトクロームP-448により代謝されて6-オキシベンツピレンラジカルとなり、これがDNAと結合することも見出されている(Nagata, 1968; Kodama, 1977)。その他、アントラセン誘導体やアゾ化合物について、発癌性とラジカル活性体への転換しやすさとの間に相関があることが認められている(Kimura, 1982)。

このように、発癌因子とラジカル生成との間に深い関わりがあることは間違いなさそうである。これらがどのようにして発癌作用を発現するの

か、その詳細はしかし分からない。ラジカル活性体が直接DNAを攻撃していくことによるのか、あるいは別の活性種を生成して作用するのか、についても不明である。発がん物質からのスーパーオキシド、過酸化水素発生と発癌性の間にも相関があることが報告されている(Nakayama, 1983)。これらの生成はヒドロキシルラジカルの生成を示唆するが、そうすると放射線による傷害と同じである。

確かに、放射線、すなわちヒドロキシルラジカルのみならず、他の活性酸素種、ラジカルによっても癌が発生することが認められている。例えば、スーパーオキシド発生系であるヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系において細胞が癌化することが認められている(Weitzman, 1985)。過酸化物質、ヒドロペルオキシドをはじめアルデヒドなどの脂質酸化生成物、その生成反応の連鎖担

グアニンからの8-ヒドロキシングアニオンの生成も同様に酸素ラジカルによるDNA修飾反応として着目されている(葛西, 1987)。

DNAの架橋も重要な反応である。SimicとDizdaroglu (Simic, 1985)はDNAとタンパク質間の放射線による架橋反応を検討し、チミンラジカルとチロシンラジカル間の反応による橋かけ反応を報告している。

ラジカルはDNA塩基だけではなく、糖の部分も攻撃して酸化生成物を与える。両者の相対的な割合などについて定量的なデータはあまりない。

体として働くペルオキシラジカルなどの発癌、変異原作用についても注目されている。またそれを抑制する抗酸化剤などの作用についても検討されている。

身近な発癌物質であるタバコについても、タバコの煙に含まれるポリフェノールから活性酸素が生成し、それがDNA鎖を切断すること、また、それがカタラーゼ、SODにより抑制されることも見出されている(Nakayama, 1985)。最近話題のアスベストについても、活性酸素および鉄イオンの関与が指摘されている(岡田, 1989; 岡田, 1990)。

デオキシグアノシンとヒドロキシルラジカルの反応生成物である8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)が、電気化学検出器付きの高速度液体クロマトグラフィー(LC-ECD)で高感度で検出することができる(Floyd, 1986, 1990)。また、他の核酸塩基であるチミンとヒドロキシルラジカルの反応生成物であるチミングリコールも、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)で高感度に検出できる。これらヒドロキシルラジカルとの反応生成物を、たとえば尿を分析することによりモニターして、生体内でのヒドロキシルラジカル発生、あるいはDNAのラジカル傷害のマーカーとしようとする考え方もあり、確かに、有効な方法の一つであろう。

しかし、先にも述べたように、これらがどういうメカニズムにより生成するのかその詳細については未だ不明であり、さらに、これらがどれだけの選択性で生成するのか、他の生成物としてどのようなものがどれだけの選択性で生成し、それらの毒性、活性がどの程度であるのか、よく分かっていない。

#### 5. 抗酸化剤の作用

活性酸素やフリーラジカルの発生を抑制したり、またそれらを捕捉して安定化してしまうものを抗酸化剤という。好気性生物は巧妙ですぐれた抗酸化システムを構築し、自らを守っている(二木, 1990)。すなわち、ラジカルや活性酸素の発生を抑制する一群の酵素や抗酸化物質と、ラジカルや活性酸素を速やかに捕捉して安定化する連鎖切

断型抗酸化物質を合わせてもっている。さらに、傷を修復する機能や再生機能も有している。

ラジカル捕捉剤として作用する抗酸化剤が、抗癌剤として作用することが知られている(Ts'o, 1977; Simic, 1988)。発癌剤を用いた動物実験で、ビタミンEやビタミンCが発癌を抑えることが報告されている(Mirvish, 1986; Trickler, 1987)。先に述べた鉄による発癌においてもビタミンEが抑制効果を示すことが認められている(Okada, 1987)。

しかし、抗酸化剤も両刃の剣である。エストロゲン類に抗酸化作用のあることが知られているが、これらに発癌性があることもまたよく知られている。

#### 6. おわりに

以上述べたように、ラジカルと癌ということについていくつもの興味ある知見が得られてきた。しかし、まだまだ解明されなければならないことが多く残されている。今後、さらに多くの実験がなされなければならないが、その場合、ラジカルとその反応について正しい知識をもち、理解をした上で研究を進めていくことが大事であろう。発癌は多くの因子がからんだ複雑な反応系である。抑制剤、抗酸化剤などの効果について、これまで極めて安易に用い、結果を考察しすぎているようにも見受けられる。普遍的なデータをとることは容易でなく、誤った結論を導くことは容易である。それから何か一般的な普遍的事実を導き出せるような結果を得るためには、十分考えた反応系とアプローチを設定することが重要である。そして、これまであまり試みられていなかったが、素反応を定量的に明らかにするということが発癌を理解するために大切であり、またそれにより癌予防、制癌への道もさらに開けてくるのではないと思われる。

#### 参考文献

- Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens, *Science*, **221**, 1256-1264.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell and M. Dizdaroglu (1989) Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hy-

- poaxanthine/xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 13024-13028.
- 栗井通泰 (1985) 鉄ニトリロ三酢酸の活性酸素産生と発癌誘導, 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 2944-2854.
- Cerutti, P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion, *Science*, **227**, 375-381.
- Farr, S. B., R. D'Ari and D. Touati (1986) Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 8268-8272.
- Floyd, R. A. (1982) *Free Radical and Cancer*, Marcel Dekker, New York.
- Floyd, R. A., J. J. Watson, P. K. Wong, D. H. Alt-miller and R. C. Rickard (1986) Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation, *Free Rad. Res. Comms.*, **1**, 163-172.
- Floyd, R. A. (1990) The development of a sensitive analysis for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *Free Rad. Res. Comms.*, **8**, 139-141.
- Gey, K. F., H. B. Stahelin and G. B. Brubacher (1989) In: O. Hayaishi, E. Niki et al (Eds.), *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*, Elsevier, Amsterdam, pp.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1985) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon, Oxford.
- Hayaishi, O., E. Niki, M. Kondo and T. Yoshikawa (Eds.), (1989) *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*, Elsevier, Amsterdam.
- 生島隆治編 (1987) 放射線障害における酸素の役割, 京都大学原子炉実験 KURRI-TR 295.
- Jovanovic, S. V. and M. G. Simic (1986) Mechanism of OH radical reactions with thymine and uracil derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5968-5972.
- 葛西 宏, 西村 暹 (1987) 酸素ラジカルによる新しい DNA 修飾反応, 代謝, **24**, 臨時増刊, 癌 '87, 9-16.
- 川西正祐, 井上純子 (1988) 重金属と過酸化水素によるヒドロキシルラジカル生成および DNA 損傷, 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 2838-2843.
- Kimura, T., M. Kodama and C. Nagata (1982) A correlation of the rate of N-hydroxylation of aminoazo dyes with their carcinogenic activity in the rat, *Carcinogenesis*, **3**, 1393-1396.
- Kodama, M. and C. Nagata (1977) Binding of 6-oxybenzo (a) pyrene radical with DNA and polynucleotides, *Gann*, **68**, 125-126.
- 児玉昌彦, 中山 勉, 金子元久, 木村晃之, 永田親義 (1987) 発癌因子としてのフリーラジカルの評価, フリーラジカルの臨床, **2**, 51-61.
- 児玉昌彦 (1990) 発癌のメカニズムとフリーラジカル, *KARKINOS*, **3**, 139-145.
- Marnett, L. J. (1987) Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion, *Carcinogenesis*, **8**, 1365-1373.
- Mason, R. P., K. Stolze and W. D. Flitter (1990) Free reactions with DNA and its nucleotides, In: Y. Kuroda, D. M. Shaker et al (Eds.), *Antimutagenesis and Anticardimogenesis II*, Plenum, 119-125.
- Mirvish, S. S. (1986) Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer, *Cancer*, **58**, 1842-1849.
- Nagata, C., M. Inomata, M. Kodama and Y. Tagashira (1968) Electron spin resonance study on the interaction between the chemical carcinogens and tissue components, *Gann*, **59**, 289-298.
- Nakayama, T., T. Kimura, M. Kodama and C. Nagata (1983) Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion from active metabolites of naphthylamine and aminoazo dyes: its possible role in carcinogenesis, *Carcinogenesis*, **4**, 765-769.
- Nakayama, T., M. Kaneko, M. Kodama and C. Nagata (1985) Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells, *Nature*, **314**, 462-464.
- 二木鋭雄 (1990) 生体内における酸素毒性に対する防御システム, 活性酸素種の化学 (日本化学会 編), 学会出版センター, pp. 177-190.
- Okada, S., S. Hamazaki and Y. Ebina (1987) Nephrotoxicity and its prevention by vitamin E in ferric nitrilotriacetate promoted lipid peroxidation, *Biochem. Biophys. Acta*, **922**, 28-33.
- Okada, S., S. Hamazaki and S. Toyokuni (1989) Induction of mesothelioma of the peritoneum and the tunic vaginalis by intraperitoneal injections of ferric saccharate in male Wistar rats, *Birt. J. Cancer*, **60**, 708-711.
- 岡田 茂 (1989) 環境因子による発癌とフリーラジカル—環境金属の酸素活性化と発癌—, *KARKINOS*, **3**, 147-154.
- 岡田 茂 (1990) フリーラジカルと癌, *Pharma Medica*, **8**, 73-79.
- Pryor, W. A. (1986) *Cancer and free radicals*, In: D. M. Shankel, P. E. Hartman et al (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, Plenum, pp 45-59.
- Sies, H. (Ed.), (1985) *Oxidative Stress*, Academic Press, London.
- Simic, M. G. and M. Dizdaroglu (1985) Formation of radiation-induced cross-links between thymine and tyrosine: possible model for cross-linking of DNA and proteins by ionizing radiation, *Biochem.*, **24**, 233-236.
- Simic, M. G. (1988) Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Res.* **202**, 377-380.
- Stoewe, R. and W. A. Prutz (1987) *Free Rad. Biol. Med.*, **3**, 97-105.
- Trickler, D. and G. Shklar (1987) Prevention by vitamin E of experimental oral carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 165-169.
- Ts'o, P. O. P., W. J. Caspary and R. J. Lorentzen (1977) The involvement of free radicals in chemical carcinogenesis, *Free Radicals in Biology*, Vol. III, pp. 251-303.
- Weitzmann, S. A., A. B. Weitberg, E. P. Clark and T. P. Stossel (1985) Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils, *Science*, **227**, 1231-1233.

## 変異原物質による DNA 傷害: 修復と突然変異

大阪大学 微生物病研究所 品川 日出夫

変異原は DNA に種々の傷害を与える。生物は多様な DNA 傷害に対処するために複数の修復機構をもっている。突然変異は DNA 複製のエラーや、DNA が傷害や修飾を受けて、正常な鋳型として機能しなくなった時におこる不正確な複製によって起こると考えられる。遺伝学のおよび分子レベルでの解析が最も進んでいる大腸菌を中心にこれらの研究の現状を紹介する。

### 1. 自然突然変異と DNA 複製を正確に行わせるための機構

特に変異原にさらさなくても、生物は低い頻度で突然変異体を生み出す。しかし、正常な生理状態でも、細胞の代謝によって、DNA に傷害がおきて (例えば活性酸素など)、そのために突然変異が誘導される場合もあると思われる。正常な DNA を鋳型にした DNA 複製のエラーによる突然変異が厳密な意味での自然突然変異であるが、前者と区別できない。生物は DNA 複製の正確さを高める種々の機構をもっていて、そのために自然突然変異の頻度は低く抑えられており、種の連続性が維持されている。これ等の機構は、突然変異の誘発の機構とも密接な関わりをもっている。

#### (1) DNA ポリメラーゼによる塩基対の選択の正確さ

DNA の鋳型に対して、DNA ポリメラーゼは立体的に正しい水素結合ができるような相補的な塩基を対合させ、次にそれを重合させて、DNA 鎖を伸長させる。その結果、親 DNA と同じ塩基配列をもつ二重鎖の DNA の複製がおこる。染色体 DNA の複製を行う DNA ポリメラーゼ III が

鋳型に対して相補的な塩基を挿入する際におこるエラーの頻度は、 $10^{-4}$  から  $10^{-5}$  (1 回の複製における塩基あたり) である。しかし、自然突然変異の頻度は  $10^{-9}$  から  $10^{-10}$  である。この差の大部分は、間違っ形成された塩基対が修正されるためであると考えられる。実際大腸菌は、以下に述べる多数の修正機構をもっている。

#### (2) DNA ポリメラーゼの校正機能 (Proofreading)

DNA ポリメラーゼは鋳型 DNA に相補的な塩基を通常は対合させて DNA 鎖を伸長させていくが、稀に相補的でない塩基を入れてしまう。このような場合に正しい水素結合をしていない新たに導入されたヌクレオチドを認識して切り出す機能をもつのが 3'→5' エキソヌクレアーゼであり、エラーを正す (proofreading) 役割を果たしている。染色体複製に関与する DNA ポリメラーゼ III は少なくとも 7 種類のサブユニットで構成されている大きな複合体で、*polC* (*dnaE*) にコードされている  $\alpha$  タンパクがヌクレオチドを重合させる活性をもち、*dnaQ* にコードされているイプシロン ( $\epsilon$ ) タンパクが校正機能をもつエキソヌクレアーゼ活性をもっている (McHenry *et al.*, 1988)。この校正機能に欠陥のある *mutD* 株 (*dnaQ* 遺伝子に変異がある) では自然突然変異の頻度が  $10^4$  ほど高くなっており、3'→5' エキソヌクレアーゼが自然突然変異の抑制 (正確な DNA 複製) にかかる重要な役割を果たしているか理解できよう。

DNA の修復合成に関与しているポリメラーゼ I は単一のペプチドでポリメラーゼ活性と 3'→5' と 5'→3' の両方のエキソヌクレアーゼ活性をも

〒565 吹田市山田丘 3-1

Mechanisms of DNA Repair and Mutagenesis

Hideo shinagawa

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

っていて、*polA* 遺伝子によってコードされている (Kornberg, 1980)。*polA* 株も突然変異頻度が野性株よりも高いので、*polI* の 3'→5' エキソヌクレアーゼも校正機能に関与している。大腸菌には *polB* 遺伝子にコードされるもう一つの DNA ポリメラーゼ (*pol II*) があることが知られているがその機能は解明されていない (後述)。

### (3) 誤対合塩基の修正 (mismatch repair)

校正機能の監視の眼を逃れて誤対合を含む DNA 二重鎖が合成されると、複製後間もない間は新たに複製された DNA 鎖の方を認識して部分的に切り出して除き、再びその部分を合成して修正する機能を大腸菌はもち、これを誤対合修復 (mismatch repair) と呼ぶ (Radman and Wagner)。DNA 鎖の親娘の識別は GATC 塩基配列上のアデニンのメチル化の有無によって行われる。*dam* 遺伝子にコードされるアデニンメチル化酵素は細胞内に少量しか存在しないため、DNA が合成されてもメチル化はすぐにおこらないため、新しく合成された方の DNA 鎖はしばらくメチル化されていない状態にあるので、娘鎖と識別される。mismatch repair 欠損株は上記の *dam* の他に *mutH*, *mutL*, *mutS*, *mutU* (*uvrD*) が知られており、自然突然変異が野性株の 100 倍ほど高く、*mutator* 株として分離された。*in vitro* で mismatch repair を行わせる系がつけられて、これらの遺伝子の産物の機能が解析された。その結果、MutH タンパクが GATC のメチル化の有無を識別してメチル化されていない方の DNA 鎖にその近辺で切れ目を入れ、MutL と MutS タンパクが誤対合を認識してそこに結合する機能をもつことが明らかにされた。UvrD はヘリケースで除去修復の場合と同様に二重鎖から誤対合を含む単鎖の DNA をほぐして切り出しを促進する働きをもつと考えられている。通常 mismatch repair はこの機構を指し、種々の塩基間の誤対合の修正に機能する。ミスマッチの修正にはこの他に G-A 誤対合に特異的に働く MutY の系があり、MutY タンパクのコードするアデニングリコンダーゼがミスマッチのアデニンを除去する (Au et al., 1989)。MutT タンパクは G-A 誤対合の形成を *syn* 型の dGTP を分解することによって防

ぐという機構が考えられている (Akiyama et al., 1989)。大腸菌の mismatch repair の系と類似の系が動物細胞にもあるらしい (Brooks et al., 1989)。

## 2. DNA の修復機構

DNA に細胞の諸機能の情報が含まれているので、DNA 上の損傷は修復されないと突然変異がおきたり、細胞の死に結びつく。全ての生物は、正常な代謝活動で細胞内に発生する因子 (活性酸素など) の他に、食物や飲料水、太陽光線、宇宙線、空気などに含まれる無数の DNA 傷害を与える因子に曝されている。しかしこれ等の DNA 傷害は正常の細胞では複数の修復機構によって大部分効率よく修復されて、DNA は正確に複製されて突然変異の誘発は極めて低く抑えられている。修復機構に欠陥のある細胞は DNA 傷害に感受性が高く、一般に突然変異が高頻度でおこる。DNA 修復に欠損をもつ遺伝病患者は、高頻度で癌になることはよく知られており、この事は細胞の癌化は、多くの場合突然変異によっておこることの反映である。特に、オゾン層の破壊によって、太陽光中の有害な近紫外線が地表に達する量が過去 10 年間に有意な増加を示しているという憂うべき状況 (宗像, 1990) なので、紫外線による傷害の修復から話を始めたい。

大腸菌は紫外線による傷害を修復する 3 つの機構をもっていることが知られている。1 つは光回復で、可視光のエネルギーを利用する。これに対して、光を必要としない修復は暗回復と呼ばれ、除去修復と組換え修復を含む。除去修復欠損の *uvrA* と組換え修復欠損の *recA* の二重変異株では、ピリミジンダイマー 1 個が致死的に働く (Friedberg, 1984) ので、この 2 つの修復経路が最も重要であると考えられている。

### (1) 光回復

紫外線や、太陽光線中の近紫外線による DNA 損傷のうち最も致死作用が大きく、突然変異を誘発するのがピリミジンダイマーである。ピリミジンダイマーは同じ DNA 鎖上の隣りあうピリミジンの間にシクロブタンリングが形成されてできる。大腸菌では *phr* 遺伝子にコードされる光回復

酵素は、可視光を吸収するクロモフォア (FADH<sub>2</sub>) と複合体を形成し、可視光 (380 nm) のエネルギーを利用して、2 量体を開裂させて単量体にもどす (Sancar and Sancar, 1988)。光回復酵素は出芽酵母、ショウジョウバエ、魚類、鳥類、有袋類などには存在すると考えられているが、枯草菌、分裂酵母、線虫などには光回復がみられないので、存在しないと考えられている。ヒトを含む哺乳類では、活性は確認されていない。光回復酵素は、次節で述べる除去修復を促進することが大腸菌と酵母の系で明らかにされているので、哺乳類などでは光回復の機能は失っているが、ピリミジンダイマーと結合して、除去修復酵素による 2 量体の切り出しを促進する機能はもっているという可能性も考えられている。こうした考えに合うデータとして、チミンダイマーに特異的に結合するタンパクが正常のヒト細胞に見出され、この活性は色素性乾皮症の E グループの患者の細胞には欠けているという報告がある (Chu and Chang, 1988)。

### (2) 除去修復

紫外線による主な DNA の傷害は前述のシクロブタン型のピリミジンダイマーであるが、この他に 6-4 ピリミジン附加体も致死的で突然変異のターゲットとして重要な損傷であると考えられている。除去修復は、これらの傷害の他マイトマイシン C や、4NQO などが結合した塩基などの大きな附加体を含む DNA の修復に働く機構である (Sancar and Sancar, 1988)。UvrA タンパクは DNA 損傷によって正常な二重鎖がゆがめられている部位を認識して結合し、UvrB タンパクは UvrA の助けで損傷部位と結合し、それに UvrC が更に加わって、複合体を形成して、損傷部位の 5' 側の 7 スクレオチド離れたところと、3' 側の 3~4 スクレオチド離れたところに切れ目を入れて、損傷部を含むオリゴヌクレオチドを切り出す。二重鎖からこのオリゴヌクレオチドをはがすのを UvrD タンパク (ヘリケース II) が促進し、その結果できた単鎖 DNA のギャップを DNA ポリメラーゼ I が修復合成を行って埋めて、最後に DNA リガーゼが切れ目をシールさせて修復を完成させると考えられている (Sancar and Sancar,

1988)。UvrA, UvrB, UvrD タンパクは全て ATP 結合のコンセンサス配列をもっていて実際に ATPase 活性ももっている。これらのタンパクの他に前述の光回復酵素がピリミジンダイマーに結合して UvrABC による除去修復を促進することを発見したのが山本和生 (東北大, 理) であり、後で Sancar 等が生化学的に追認している。

ヒトの皮膚癌多発性の遺伝的疾患である色素性乾皮症 (XP) は除去修復に欠損があり、遺伝学的に 9 つの相補性群に分類されている (Friedberg, 1984)。従ってヒトの除去修復の機構もかなり複雑であることが予想される。最近 XP の A 群の遺伝子がクローニングされ、その cDNA の構造が解析された (Tanaka, 1990)。その結果 XP-A の遺伝子は 31K のタンパクをコードしており、このタンパクは Zinc-finger と呼ばれる DNA 結合モチーフをもっていることがわかった。従って UvrA 又は UvrC の様に損傷部位の DNA に結合して切れ目を入れるヌクレアーゼ複合体の構成成分である可能性が考えられる。この他に XP の B 群の細胞の欠損を直す遺伝子が単離され、DNA ヘリカーゼと相同性の高いタンパクをコードすることがわかった (Weeda et al., 1990)。これは除去修復において、UvrD と同様の機能を果たしているのかもしれない。

XP の他にコケイン症候群 (Cockayne's syndrome) の患者細胞は紫外線に感受性だが一見除去修復は正常のように見える。しかしこの細胞は盛んに転写されている DNA の損傷を特異的に修復する機構に欠陥があることがわかった (Venema et al., 1990)。大腸菌も同様の機構をもっていることが最近示された。酵母での除去修復の遺伝学的、生化学的研究からも、除去修復の機構は、生物界でかなり共通であることが示唆されている。

### (3) 組換え修復

DNA 上に傷害が残っていると、DNA 鎖の伸長はそこでブロックされて、1000 塩基程下流から複製が再開されて、単鎖 DNA のギャップがピリミジンダイマーなどの反対側でできる。このギャップは複製後の姉妹染色体の DNA 鎖を組換えによって取り込むか、ギャップのところ

妹 DNA 二重鎖と三重鎖を形成して、正常な DNA 鎖を鋳型として修復合成をしてギャップを埋める (copy choice) と考えられる。単鎖 DNA を相同な二重鎖 DNA とペアさせたり、取り込ませて交換させることを RecA タンパクができる。recA 株は紫外線や X 線、種々の変異原に対して非常に感受性が高く、接合組換えも形質導入による組換えも全く行えない。従って RecA タンパクは DNA 傷害を組換えによって修復する反応に関与することはわかるが、RecA タンパクは後述する SOS 遺伝子の発現にも必須なので、DNA 修復には他の修復遺伝子の発現を介して間接的にも関与している。

マイトマイシン C, シスプラチン, 光架橋したソラーレン, ナイトロジェンマスタードなどの変異原や癌治療薬は二重鎖 DNA の二本の鎖間に架橋する。このような両方の DNA 鎖にまたがる傷害は先ず UvrABC による除去修復によってクロスリンクしている一方の DNA 鎖の両側に切れ目を入れて切り出し、そこのギャップに RecA などの働きで組換えによって正常な単鎖 DNA を組み込んだ後、未だ附加体をふくむもう一方の DNA 鎖を除去修復によって修復する。従って、クロスリンク傷害の修復には除去修復と組換え修復の両方が必要である。

DNA の組換えは RecA タンパクが最も重要であるがそれだけで行われる単純な反応ではない。組換えには RecBCD 経路と RecF 経路の少なくとも二つがあり、どちらも RecA の機能を必要とする (Smith, 1988)。recBC 株は組換え能が欠けているだけでなく、UV やマイトマイシン C などに感受性が高い。recBC 二重変異株でも野性株の 1~2% 程度の組換え能がある。この株からマイトマイシン抵抗性のサブプレッサー変異がとられ、この株 recBC sbcBC はほぼ野性株のレベルの組換え能を回復していた。recBC sbcBC 株より、多くの組換え欠損株が分離された。recF, recJ, recO, recN 株はこの様に分離されて同定された。recQ, ruv は各々チミン飢餓抵抗性変異 (Nakayama et al., 1984), UV 感受性変異 (Otsuji et al., 1974) として分離されて、後に RecF 経路の組換えに関与することが示された。

RecBCD は、複合体としてエキソヌクレアーゼ V を形成し、ATP 依存性の二重鎖エキソヌクレアーゼ活性、DNA 巻きもどし活性 (ヘリカーゼ) とエンドヌクレアーゼ活性ももっている。RecA は相同な DNA 鎖を認識してペアさせ、相同な DNA 鎖同士の交換を行わせる機能がある。交換を行った交叉した DNA 鎖同士は切断と再結合によって分離して組換え反応が完成する。RecBCD は DNA 鎖間の交換反応を RecA と協同して行いか、最後の分離反応を触媒する可能性が考えられている (Taylor and Smith, 1990)。

RecF 経路の遺伝子産物の解析は未だはじまったばかりである。recN, recQ, ruvAB は DNA の損傷によって発現が誘導される SOS 調節を受けるので、同一の組換え経路に関与している可能性が高い。RecQ は ATP を分解して二重鎖 DNA をほぐすヘリカーゼ活性をもつことが最近証明された (Umezumi et al., 1990)。ruv 領域は A と B の 2 つの遺伝子が SOS 調節を受けるオペロンを形成し、どちらも DNA 修復に関与していた (Shinagawa et al., 1988; Iwasaki et al., 1989)。RuvB は ATP 結合タンパクのコンセンサス配列をもち、精製したタンパクは ATP 結合能と弱い ATP 活性をもっていた (Iwasaki et al., 1989)。RuvA は単鎖 DNA と二重鎖 DNA とも結合し、DNA と結合した RuvA は RuvB の ATPase 活性を著しく促進した。閉環状二重鎖 DNA を UV 照射するとこの DNA-RuvAB 複合体の ATPase 活性は更に上昇するが、線状二重鎖 DNA ではこの UV 照射による活性促進はみられない。従ってこの促進効果はピリミジンダイマーなどの附加体そのものでなく、DNA 傷害によってもたらされた特殊な高次構造 (コンフォメーション) によると考えられる。RuvAB 複合体は ATP のエネルギーを消費して、閉環二重鎖 DNA 上に形成された十字架構造 (cruciform) をもとにもどすユニークな活性 (renaturase) をもつことが私達の研究室で明らかにされた (Shiba et al., 論文投稿中)。従って RuvAB は DNA 鎖間の水素結合を一方では切って、他方では新しい水素結合の形成を促進する機能をもつと考えられ、これは相同組換えの交叉点の移動 (branch

migration) のステップにおける反応である。RuvAB は突然変異の誘発にも関係していることがわかり (Sargentini and Smith, 1989; Iwasaki et al., 未発表データ), その重要性が更に認識されてきた。RecJ タンパクは単鎖 DNA 特異的な 5' エキソヌクレアーゼ活性をもつ (Lovett and Koldner, 1989)。組換えに関与する遺伝子は更に多く今迄に 15 個ほど同定されており、多分組換えには 3 つの経路が大腸菌には存在し、各々が特異性と機能的重複をしていると考えられているのが最新の研究状況である (RecA and Related Proteins, Saclay France, Sept., 1990)。

酵母や動物細胞にも RecA タンパクのような組換え酵素が見つけれられており、組換え交叉中間体を分離する酵素の存在も証明されている。

### 3. SOS 応答

大腸菌では DNA に損傷を受けると、多数の遺伝子の発現が誘導され、これ等は除去修復 (uvrA, uvrB, uvrD), DNA 組換え (recA, recN, recQ, ruvA, ruvB) や突然変異の誘起 (recA, umuC, umuD, ruvA, ruvB) に関与しており、DNA の傷害に対する細胞の適応応答と考えられており、SOS 応答と呼ばれている (Walker, 1984)。SOS 遺伝子群は、DNA が傷害を受けると、DNA 合成が阻害されるので、しばらく細胞分裂を停止させて (sfiA 遺伝子の機能) 染色体をもたない細胞の出現を防ぎ、その間に、種々の修復系を誘導して傷害を修復した後、細胞分裂を再開させて生き残るための機構と考えられている。

SOS 遺伝子は通常そのオペレーター部位に LexA レプレッサーが結合して発現を抑制している。UV や変異原によって DNA に傷害を受けると、その損傷部位や複製フォークなどで単鎖 DNA が生成する。RecA タンパクは単鎖 DNA が結合すると活性化されて、LexA レプレッサーに結合して、アロステリック効果によって LexA のコンフォメーションを変化させて、LexA 自身のもつ潜在的プロテアーゼを活性化させて自己切断をおこさせて、レプレッサーとしての機能を不活化させる (Phizicky and Roberts, 1981; Little, 1984)。その結果上記の SOS 遺伝子の発現が誘導

されて、DNA 損傷が効率よく修復されると細胞内の単鎖 DNA が減少して、RecA が不活性型に戻り、LexA レプレッサーが再び蓄積して SOS 遺伝子群が抑制される。この様に SOS 遺伝子は DNA に傷害を受けた緊急時に呼び出される救急システムの様な側面をもつので、この様に命名されたのである。

SOS 遺伝子のオペレーターは 16 塩基対のパリンドローム構造をもつ配列 CTGTATATATATACAG をコンセンサス配列 (SOS ボックス) としてもっており、LexA との結合力はコンセンサスからはずれるほど弱く、コンセンサスからずれが大きい SOS ボックスをもつ遺伝子は、DNA 傷害のない状態でも発現の漏れが大きい。コンセンサスに近い SOS ボックスをもつ遺伝子ほど LexA との結合力が強いので、DNA 傷害が多くなって LexA が大幅に減少した時にはじめて発現がおこって利用される。SOS 遺伝子群はその機能に応じて、適切に発現が調節されている。uvrA, B, ruvAB などは漏れが多く、umuDC などはしっかりと発現がコントロールされている。

### 4. アルキル化剤に対する適応応答 (Lindahl et al., 1988)

大腸菌を低濃度のアルキル化剤で前もって処理しておく、その後高濃度のアルキル化剤に曝しても、アルキル化剤による致死作用および突然変異の誘起作用に対して低抗性になる。アルキル化剤前処理によって、DNA に O<sup>6</sup> メチルグアニンや、メチルホスホトリエステルができると、転写調節タンパクである Ada はそれ自身のもつメチルトランスフェラーゼ活性によって、それ等のメチル基を Ada のシステイン残基に移す。メチル化された Ada タンパクは ada 遺伝子や、3-メチルアデニン DNA グリコシダーゼをコードする alkA 遺伝子などのプロモーターに結合して、それ等の転写を促進して、アルキル化剤による DNA 傷害を修復する複数の酵素の産生を誘導する。Ada はそれ自身、修復に働くが、メチル基は結合したままで離れないので自殺酵素である。

Ada の様に O<sup>6</sup> メチルグアニンを修復するメチルトランスフェラーゼはヒト細胞にも存在し、そ

れをコードする遺伝子が世界の3つの研究室(関口(九大医), Lindahl(英), Mitra(米))でクローニングされ塩基配列が最近決定された。酵素の活性部位を含む領域では、アミノ酸配列が大腸菌の Ada とよく似ている。がん細胞ではこの酵素を欠いている(Mer<sup>-</sup>)株が比較的高頻度で見出されており、細胞の癌化との関連が注目されている。

## 5. 活性酸素に対する適応応答

活性酸素類(過酸化水素 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, スーパーオキシドアニオン O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ヒドロキシルラジカル HO<sup>•</sup>など)は、X線などの電離放射線、近紫外線、化学変異原(パラコートなど)などの外的因子として発生するだけでなく、生体内で酸素分子の水への還元の間接体として正常な代謝過程で常時生成されている(浅田, 1988)。活性酸素は種々の傷害を細胞にもたらし、特に遺伝毒性は、「内在性変異原」として重要性が認識されてきている。大腸菌を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理すると約30種類のタンパクが誘導される(Christman *et al.*, 1985)。大腸菌を前もって低濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理して培養すると後に加えた致死量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する抵抗性が増加する。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって誘導されるタンパクの多くは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による細胞毒性に対する細胞の適応応答に関与していると考えられる。これ等の遺伝子の機能として、活性酸素分子を不活化するもの(カタラーゼ、スーパーオキシドジスミューターゼなど)や DNA 修復遺伝子が考えられる。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で誘導される遺伝子のうち8ヶの発現が *oxyR* という正の調節遺伝子の支配下にあることが証明されている。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で誘導される遺伝子の中には熱ショックで誘導されるものもあり、SOS 調節を受けるものもある。*oxyR* 遺伝子はクローニングされ、*oxyR* タンパクは *oxyR*, *katG* (カタラーゼ遺伝子), *ahpC* (アルキルヒドロパーオキシド還元酵素の遺伝子)のプロモーター部位に結合して、*katG*, *ahpC* の転写を活性化し、*oxyR* の転写を抑制することが証明された(Christman *et al.*, 1989; Tao *et al.*, 1989; Tao *et al.*, in press)。OxyR-レギュロンが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のシグナルに反応する機構として、OxyR タンパク自身が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のセンサー

として働き、酸化によって OxyR が転写のアクチベーターとして活性化されるというモデルとそれを支持するデータが提出された(Storz *et al.*, 1990)。

O<sub>2</sub><sup>-</sup> を発生するパラコート処理によって20~30種類のタンパクが大腸菌で誘導され、それらの多くは *oxyR*-レギュロンとも熱ショックタンパクとも異なる(Kogoma *et al.*, 1988; Walkup and Kogoma, 1989)。パラコートだけで誘導されるものとしてはエンドヌクレアーゼ IV (*nfo* 遺伝子産物)が同定されただけで、他のものについては機能がわかっていない。調節機構も未だ解明されていない。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> や近紫外線に対して感受性になる突然変異株として *katF* と *xthA* (エキソヌクレアーゼ III をコード)知られていたが、*katF* 遺伝子は *xthA* と *katE* (カタラーゼ遺伝子)の発現に必須な調節遺伝子であることがわかった(Sak *et al.*, 1989)。エキソヌクレアーゼ III は、脱塩基部位のエンドヌクレアーゼとしての活性と、3'末端がリン酸でマスクされている場合これを除く活性をもっている。

DNA の酸化による傷害の修復には前述の *xthA*, *nfo* の他に、*recA*, *recBCD*, *polA*, *polC* などが知られているが、未だ多くの修復遺伝子の役割については調べられていない。これらは単鎖や二重鎖 DNA 切断の組換えによる修復や、損傷部位の DNA の修復合成に関与すると考えられる。

## 6. 突然変異の誘発

前述のように細胞は内因性、外因性の様々な因子による DNA 傷害を防ぎ、修復するための多様な機能をもっている。突然変異は修復のエラーによるものであるという考えが以前にはあった。しかし UvrABC などの機能による除去修復も、RecBCD や RecF 経路による組換え修復も本質的に正確で突然変異を伴うものでないことがわかった(Walker, 1984)。突然変異の誘発には、EMS などのアルキル化剤などの変異原による塩基の「小さな修飾」によるものと、UV 照射やマイトマイシン C, 4NQO などの変異原による DNA の立体構造に影響を与えるような「大きな附加体」

によるものの二つの機構が存在すると考えられている。前者においては、本来の塩基が修飾を受けたため、鋳型として正確度が下がり、誤対合をおこす頻度が増加するため、突然変異が誘発される。2AP (2-アミノプリン)などの塩基アナログのような物質による突然変異と同様に考えられている(misinformatinal)。後者の場合、損傷を受けた部位では DNA は鋳型としての機能を果たせなくなる(non-informatinal)と考えられる。この様な場合、DNA 合成は損傷部位のあたりで停止し、DNA 合成が再開されるためには、新たな機能の誘導が必要であり、この non-informatinal な鋳型に対しておこる複製は、したがってエラーを伴うものであり、正確さを犠牲にしたサーバイバルを図る機構(SOS 突然変異)であると考えられている。non-informatinal な鋳型に対してはアデニンを取り込ませる傾向がバクテリアでも哺乳類細胞でも知られている(A-rule)。

### (1) SOS 突然変異

UV や多くの化学変異原による突然変異が組換え欠損株として分離された *recA* 株でおこらないことは古くから知られていた。突然変異の誘発後も、他の SOS 機能と同様に新たなタンパク合成と *recA* の機能を必要とすることが知られていた(Walker, 1984)。Kato and Shinoura (1977) は *recA* 以外に *recA* や *lexA* の調節を受けて突然変異の誘起に直接関与する遺伝子の存在を考えて、UV や 4NQO によって His<sup>+</sup> 復帰突然変異が誘発されないミュータントを多数単離して解析した。*recA* や *lexA* と同じ位置にマップされるものの他に新しい突然変異を見つけ、これを *umuC* と名づけた。*umuC* 遺伝子はその後、我々と Walker のグループがクローニングし、実は *umuD* と *umuC* の2つの遺伝子が SOS 調節をうけるオペロンを形成していることがわかった(Shinagawa *et al.*; Elledge *et al.*, 1983)。

RecA はそれでは *umuDC* オペロンの発現のために LexA レプレッサーの不活化に働くだけであろうか? *lexA* (def) 株では LexA レプレッサーが機能しないので、*umuDC* 遺伝子は構造的に発現しているが、突然変異誘起能は高くなく、RecA タンパクの活性化が、突然変異の誘発には

必要であった。RecA の突然変異誘起における2番目の機能として、*umuD* タンパクの切断による活性化が必要であることがその後証明された(Shinagawa *et al.*; Nohmi *et al.*; Burckhardt *et al.*, 1988)。RecA は3番目の機能として、活性化された *UmuDC* と共に突然変異誘起の直接の反応にも関与するであろうか? つまり、活性化されたタイプの *UmuD* (N 末端の24個のアミノ酸を欠く *UmuD*<sup>\*</sup>) をコードする *umuD'*C を発現させても RecA の機能が欠けていたら突然変異は誘発されなかった。しかし *recA* 株は UV 照射などで死にやすいので、突然変異のターゲットになる傷害があると全て死んでしまうために突然変異が検出できないという可能性を否定することはきわめて難しい。

X線による突然変異は *recA* では全くおこらないが、*umuC* では減少するがマーカーによっては有意におこる。*umuC* *ruvA*, *umuC* *ruvAB* 株では *recA*<sup>+</sup> の状態でも X線による突然変異はおこらなくなる(Sargentini and Smith, 1989; 岩崎, 加藤, 品川, 未発表データ)。従って X線による突然変異には *umuDC* 経路と *ruvAB* 経路の2つがありどちらも *recA* の機能を必要とする。UV による突然変異も *ruvAB* 株では低下しており、化学変異原による突然変異の誘発にも *ruvAB* の機能が関与している場合も見つかり(岩崎, 加藤, 品川, 未発表データ), *ruvAB* も *recA* のように、DNA 組換え, 修復, 突然変異の誘発と多くの機能に関与する重要な遺伝子であることがわかってきた。

### (2) SOS 突然変異と DNA ポリメラーゼ

突然変異は DNA 合成のエラーによっておこるので、大腸菌に存在する3種類の DNA ポリメラーゼのどれが SOS 突然変異に関与しているのであろうか? 前述の様にポリメラーゼ I に欠損があると種々の変異原や X線, UV などに感受性になり、*polA* の完全欠失株でも最少培地では複製できるので、ポリメラーゼ I は通常は修復機能に関与すると考えられる。種々の *polA* 株で SOS 突然変異は十分誘発されるので、ポリメラーゼ I は関与しないと考えられる。

DNA ポリメラーゼ III は染色体の DNA 複製

には通常は必須であり、*polC<sub>ts</sub>* 株 (温度感受性の DNA ポリメラーゼ III の  $\alpha$  サブユニットをつくる株) では低温培養では増殖できるが高温では死んでしまう。Moses らは *polC<sub>ts</sub>* 株が *pcbAI* 変異をもっと高温でもポリメラーゼ I に依存して DNA 複製を行って増殖できることを発見し、この二重変異株を UV 照射後、高温培養すると突然変異がおこらないことを示し (Hagensee *et al.*, 1987), DNA ポリメラーゼ III が突然変異に関与することを示した。

*polB* にコードされる DNA ポリメラーゼは大腸菌の中でどんな機能を果たしているのであろうか? この疑問を解決するために、我々は *polB* をクローン化して、構造と調節機構を解析した (Iwasaki *et al.*, 1990; Iwasaki *et al.*, 1991)。その結果、*polB* 遺伝子が DNA 損傷によって誘導される SOS 遺伝子であることが証明された。更に DNA ポリメラーゼ II はヒトの染色体複製に関与するポリメラーゼ  $\alpha$ 、酵母の複製酵素 *pol I* と *pol III* と極めて高いホモロジーをもつことが明らかになった。多量発現株から高度に精製したポリメラーゼ II は高等生物の染色体 DNA 複製の特異的阻害剤であるアフィディオリンによって活性を阻害された。しかし、遺伝子工学的手法で染色体の *polB* を完全に欠失させた株も、正常に生育でき、UV に対しても感受性が高くならず、突然変異も野生株と同様におきた (岩崎, 堀内, 品川; 未発表) ので、現時点でも DNA ポリメラーゼ II の DNA の複製, 修復, 突然変異誘発における役割は明らかにできていない。しかし、*polB* は SOS 調節を受ける遺伝子であり、その産物はしっかりと発現して、DNA ポリメラーゼの活性をもつので、何らかの大切な機能をもっているはずである。そうでなければ進化の歴史を生き残るはずがないと考えられる。

### (3) SOS 突然変異のモデル

突然変異の機構について現時点での知見をもとにモデルを考えてみる。UV 照射によってピリミジンダイマーや TC (6-4) 附加体などがつくられ、これ等の損傷部位では本来相補的であった DNA の二重鎖間の塩基の間で、水素結合ができなくなり、部分的に単鎖構造をとり、RecA タンパクが

これらの損傷部位に結合して活性化され、LexA レプレッサーの不活化を促進する。その結果 UmuD, UmuC, RecA などの SOS 遺伝子の産物が多量につくられ、UmuD タンパクは RecA によって切断されて活性化される。RecA, UmuD\*, UmuC は DNA ポリメラーゼ III と複合体 (ミュータゾーム) を形成し、損傷を受けた DNA の鋳型のところで停止していた複製を再開させる。鋳型 DNA 上の傷害のため水素結合をつくり得ないような部位に対しては、挿入されたヌクレオチドは直ちに、 $\epsilon$  サブユニットの校正機能で切りとられるのでアイドリングがおこって、DNA 鎖の延長はおこらない (Villani *et al.*, 1978)。RecA は  $\epsilon$  サブユニットの校正機能を阻害するので、non-informational な損傷部位に対して、間違ったヌクレオチドの挿入を促進する (Lu *et al.*, 1986)。しかしこの水素結合をしていないヌクレオチドの 3'OH 末端を更に伸長させるために UmuD\*, UmuC タンパクの機能が必要である (Bridges and Woodgate; 1986)。

上記のモデルは今迄の実験結果とそれに対する解釈を受け入れてたてられたものであって、その根拠はあまりしっかりしたものではない。しかし、RecA, UmuDC, DNA ポリメラーゼ III が複合体を形成して、損傷部位を乗り越えて DNA 合成を可能にするという考えは、大腸菌の突然変異の機構を研究している主な研究者の間のコンセンサスであると思う。

上述のタンパクを精製して *In vivo* を反映するような *In vitro* の突然変異の系をつくらうという試みが世界のいくつかの研究室でなされつつある。UmuD と UmuC はしっかりとした複合体をつくる。UmuC は不溶性で、活性のある状態での精製が極めて難しいので、どこの研究室でも研究の大きな妨げになっている。近い将来の breakthrough を期待し、出来ればそれを私共の研究室で行いたいと思っている。

### 参考文献

Akiyama, M., H. Maki, M. Sekiguchi and T. Horiuchi (1989) A specific role of MutT protein: To prevent dG·dA mispairing in DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 3949-3952.

浅田浩二 (1988) 活性酸素の生成と消去, 環境変異原研究, **10**, 27-38.

Au, K. G., S. Clark, J. H. Miller and P. Modrich (1989) *Escherichia coli mutY* gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 8877-8881.

Bridges, B. A. and R. Woodgate (1985) Mutagenic repair in *Escherichia coli*: Products of the *recA* gene and of the *umuD* and *umuC* genes act at different steps in UV-induced mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 4193-4197.

Brooks, P., C. Dohet, G. Almouzni, M. Méchali and M. Radman (1989) Mismatch repair involving localized DNA synthesis in extracts of *Xenopus* eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 4425-4429.

Burckhardt, S. E., R. Woodgate, R. H. Scheuermann and H. Echols (1988) UmuD mutagenesis protein of *Escherichia coli*: overproduction, purification and cleavage by RecA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 1811-1815.

Chu, G and E. Chang (1988) Xeroderma Pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA, Science, **242**, 564-567.

Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson and B. N. Ames (1985) Positive control of a regulon for defence against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. Cell, **41**, 753-762

Christman, M. F., G. Storz and B. N. Ames (1989) OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 3484-3488.

Elledge, S. J. and G. C. Walker (1983) Proteins required for ultraviolet light and chemical mutagenesis: Identification of the *umuC* locus of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **164**, 175-192.

Friedberg, E. C. (1984) DNA repair, W. H. Freeman & Co., New York.

Hagensee, M. E., T. E. Timme, S. K. Bryan and R. E. Moses (1987) DNA polymerase III of *Escherichia coli* is required for UV and ethyl methanesulfonate mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 4195-4199.

Iwasaki, H., T. Shiba, A. Nakata and H. Shinagawa (1989) Involvement in DNA repair of the *ruvA* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet., **219**, 328-331.

Iwasaki, H., T. Shiba, K. Makino, A. Nakata and H. Shinagawa (1989) Overproduction, purification and ATPase activity of the *Escherichia coli* RuvB protein involved in DNA repair. J. Bacteriol., **171**, 5276-5280.

Iwasaki, H., A. Nakata, G. C. Walker and H. Shinagawa (1990) The *Escherichia coli polB* gene, which encodes

DNA polymerase II, is regulated by SOS system. J. Bacteriol., **172**, 6268-6273.

Iwasaki, H., Y. Ishino, H. Toh, A. Nakata and H. Shinagawa (1991) *Escherichia coli* DNA polymerase II is homologous to  $\alpha$ -like DNA polymerases. Mol. Gen. Genet., in press.

Kogoma, T., S. B. Farr, K. M. Joyce and D. O. Natvig (1988) Isolation of gene fusions (*soi::lacZ*) inducible by oxidative stress in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 4799-4803.

Kato, T., and Y. Shinoura (1977) Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light. Mol. Gen. Genet., **156**, 121-131.

Kornberg, A (1982) DNA Replication. W. H. Freeman & Co., San Francisco.

Lindahl, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. Ann. Rev. Biochem., **57**, 133-157.

Little, J. W. (1984) Autodigestion of *lexA* and phage  $\lambda$  repressors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 1375-1379.

Lovett, S. and R. D. Kolodner (1989) Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 2627-2631.

Lu, C., R. H. Scheuermann and H. Echols (1986) Capacity of RecA protein to bind preferentially to UV lesions and inhibit the editing ( $\epsilon$ ) of DNA polymerase III: A possible mechanism for SOS-induced targeted mutagenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 619-623.

McHenry, C. S., H. Tomasiewicz, M. A. Griep, J. P. Fürste and A. M. Flower (1988) DNA polymerase III holoenzyme. Mechanism and regulation of a true replicative complex, In: R. E. Moses and W. C. Summers (Eds.), DNA Replication and Mutagenesis, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 14-26.

宗像信生 (1990) 枯草菌胞子に対する放射光と太陽光の効果, 日本放射線影響学会第 33 回大会講演要旨集, 331 頁.

Nakayama, H., K. Nakayama, R. Nakayama, N. Irino, Y. Nakayama and P. C. Hanawalt (1984) Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of *Escherichia coli* K12: Identification of a new mutation (*recQ1*) that blocks RecF recombination pathway. Mol. Gen. Genet., **195**, 474-480.

Nohmi, T., J. R. Battista, L. A. Dodson and G. C. Walker (1988) RecA-mediated cleavage activates UmuD for mutagenesis: Mechanistic relationship between transcriptional derepression and post-translational activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 1816-1820.

- Otsuji, N., H. Iyehara and Y. Hideshima (1974) Isolation and characterization of an *Escherichia coli* *ruv* mutant which forms nonseptate filaments after low doses of ultraviolet light irradiation. *J. Bacteriol.*, **117**, 337-344.
- Phizicky, E. M. and J. W. Roberts (1981) Induction of SOS functions: regulation of proteolytic activity of *E. coli* RecA protein by interaction with DNA and nucleoside triphosphate. *Cell*, **25**, 259-267.
- Radman, M and R. Wagner (1988) The high fidelity of DNA replication. *Sci. American*, **259**, August, 24-30.
- Sak, B. D., A. Eisenstark and D. Tauati (1989) Exonuclease III and catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3271-3275.
- Sancar, A. and G. B. Sancar (1988) DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 29-67.
- Sargentini, N. J. and K. C. Smith (1989) Role of *ruvAB* genes in UV- and  $\gamma$ -radiation and chemical mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, **215**, 115-129.
- Shinagawa, H., T. Kato, T. Ise, K. Makino and A. Nakata (1983) Cloning and characterization of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*. *Gene*, **23**, 167-174.
- Shinagawa, H., H. Iwasaki, T. Kato and A. Nakata (1988) RecA protein-dependent cleavage of UmuD protein and SOS mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1806-1810.
- Shinagawa, H., K. Makino, M. Amemura, S. Kimura, H. Iwasaki and A. Nakata (1988) Structure and regulation of the *Escherichia coli* *ruv* operon involved in DNA repair and recombination. *J. Bacteriol.*, **170**, 4322-4329.
- Smith, G. R. (1988) Homologous recombination in prokaryotes. *Microbiol. Rev.*, **52**, 1-28.
- Storz, G., L. A. Tartaglia and B. N. Ames (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation. *Science*, **13**, 189-248.
- Tanaka, K., N. Miura, I. Satokata, I. Miyamoto, M. C. Yoshida, Y. Satoh, S. Kondo, A. Yasui, H. Okayama and Y. Okada (1990) Analysis of human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature*, **348**, 73-76.
- Tao, K., K. Makino, S. Yonei, A. Nakata and H. Shinagawa (1989) Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: Homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 371-376.
- Tao, K., K. Makino, S. Yonei, A. Nakata and H. Shinagawa (1991) Purification and characterization of the *Escherichia coli* OxyR protein, the positive regulator for a hydrogen peroxide inducible regulon. *J. Biochem.*, in press.
- Taylor, A. F. and G. R. Smith (1990) Action of RecBCD enzyme on cruciform DNA. *J. Mol. Biol.*, **211**, 117-134.
- Umezumi, K., K. Nakayama and H. Nakayama (1990) *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5363-5367.
- Venema, J., L. H. F. Mullenders, A. T. Natarajan, A. A. van Zeeland and L. V. Mayne (1990) The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4707-4711.
- Villani, G., S. Boiteux and M. Radman (1978) Mechanism of ultraviolet-induced mutagenesis: Extent and fidelity of *in vitro* DNA synthesis on irradiated template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3037-3041.
- Weeda, G., R. C. A. van Ham, W. Vermeulen, D. Bootsma, A. J. van der Eb and J. H. J. Hoeijmakers (1990) A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell*, **62**, 777-791.
- Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, **48**, 60-93.

環境変異原研究 12: 275-281 (1990)

## チトクローム P-450 による変異・癌原物質の活性化

北海道大学薬学部薬品分析化学講座 鎌滝哲也, 北田光一, 小森雅之,  
太田和秀, 内田泰輔, 菊地 治,  
生方和幸

### 1. 緒言

環境中に存在するほとんどの変異・癌原物質は生体内の酵素系によって代謝的に活性化されて初めて DNA を損傷することができる。そこで、化学物質の構造もさることながら、これらを活性化する酵素が発癌の初発段階のキープポイントとなる。たとえ強い癌原物質でもそれを活性化する酵素が存在しなければ、それは発癌物質たり得ない。発癌実験においてしばしば観察される動物の性差、系統差あるいは種差の多くは活性化酵素系の性質の差で説明できると言われている。このことは発癌における活性化酵素系の重要性を物語っている。事実、活性化酵素系は発癌のメカニズムに関する中心的な研究テーマの一つと考えられ、世界的に盛んに研究されている。

チトクローム P-450 は薬物の解毒や活性化を触媒する酵素として知られているが、癌原物質を活性化することから、その面からも多くの研究が行われている。本酵素によって生成された活性代謝物は直ちに DNA に結合し傷害する(アフラトキシン B<sub>1</sub> のエポキシド生成)場合もあれば、生成された代謝物が更に別の酵素によって二段階目の代謝を受け、それが DNA を傷害する(ヘテロサイクリックアミンの N-水酸化)場合もある。いずれにせよ、チトクローム P-450 は化学発癌のイニジェーションの中でも先ず第一番目に働く重要な酵素であることは疑いない。チトクローム

P-450 の発癌における意義は最早確立された概念であると言えるが、この概念を一層発展させ、ヒトにおける化学物質の発癌リスクを予測できないだろうか。この点こそ現在最も注目されているテーマといえる。

そこで本稿では、チトクローム P-450 についての概略を簡単に紹介したあと、癌原物質を効率よく活性化するチトクローム P-450 の動物種差(あるいは動物種間同性)について特にビーグル犬とサルそれにヒトについて著者らが行った研究を中心に述べ、最後に著者らが最近ヒト肝から精製することに成功した新しいヒト肝のチトクローム P-450 について紹介する。

### 2. チトクローム P-450 の性質と問題点

チトクローム P-450 はヘムを持つ、分子量 45,000~60,000 の蛋白であり、b 型に属するチトクロームである(Sato and Omura, 1978)。肝や副腎、肺、脳などほとんどの臓器組織のミクロゾームやミトコンドリアに存在する。ミトコンドリアに存在する分子種は主としてステロイドなど内因性の物質の代謝に関与する。一方、ミクロゾームに存在する分子種は基質特異性がやや低く、広範な外来異物(薬物や癌原物質など)の代謝を触媒することができる。肝のミトコンドリアにもミクロゾームにも各々多数の分子種が存在するが、これらの酵素の遺伝子も得られつつあり、蛋白の構

〒060 札幌市北区北 12 条西 6 丁目

Metabolic activation of promutagens and carcinogens by Cytochrome P-450

Tetsuya Kamataki, Mitsukazu Kitada, Masayuki Komori, Kazuhide Ohta, Taisuke Uchida, Osamu Kikuchi and Kazuyuki Ubukata

Division of Analytical Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Nishi 6-chome, Kita 12 Jyo, Kita-Ku, Sapporo 060, Japan

Table 1. ヒトと実験動物のチトクローム P-450 の相同性

	Human	Monkey	Dog	Rabbit	Rat	Mouse
P-450IA1	100	95	84	82	82	83
	100	94	81	77	79	80
P-450IA2	100	—	84	83	80	79
	100	—	82	78	75	73
P-450IIC	100	95	74	81	79	—
	100	91	66	77	73	—
P-450IIE1	100	95	—	—	77	—
	100	94	—	—	72	—
P-450IIIA	100	96	—	78	78	—
	100	93	—	74	70	—

Upper and lower values represent percent identities of nucleotide and amino acid sequences, respectively, assuming 100% for human cytochrome P-450.

造の全容が解明されつつある。同一の分子種（あるいは対応する分子種）が各種の動物に存在することも徐々に明らかにされ、その機能も比較されている。著者らはビーグル犬やサルチトクローム P-450 の遺伝子の構造を解析し、ヒトを含む他の動物のそれと比較したので、Table 1 に示した。この研究分野において特に重要と考えられる基本的な概念は、各種の動物において対応するチトクローム P-450 の分子種が必ずしも同じ癌原物質を同じように活性化すると限らないことである。このことが同じ癌原物質でも、ある動物では発癌し、他の動物では発癌しにくい理由の1つと考えられ、動物実験からヒトへ直接外挿することを著しく困難にしている。癌原物質による発癌には代謝的な活性化と不活性化のバランスが重要であるとされている。同一の分子種のチトクローム P-450 が活性化と不活性化の両方に関与するから、ある動物種に存在するチトクローム P-450 の活性化の能力が他の動物種のそれと同等でも、不活性化の能力の違いによってそのバランスが異

なってくる可能性もある。

### 3. 酵母に発現させたビーグル犬とサルのチトクローム P-450 による癌原物質の活性化

ある化学物質の発癌性がラットで証明されても、ヒトにおいても直ちに発癌性があると断定することはできない。発癌性の断定には定性的な研究に加えてある程度定量的な研究も必要である。特に日常我々が摂取する物質の発癌リスクを解析するには定量的な解釈が必要とされよう。ヒトを用いて発癌実験を行うことはできないから、最終的にはヒトに近い動物すなわちサル（あるいは時としてイヌ）を用いて発癌性の判定をすることがある。しかしながら、サルやイヌのチトクローム P-450 の性質はほとんど研究されていないのが現状で、片手落ちともいえる。

肝ミクロゾームに何種類のチトクローム P-450 の分子種が存在するのか、数 10 種程度なのか数 1000 種もあるのか今のところ誰も予測できない。加えて、精製酵素の名前は研究室によって無秩序

Table 2. ラットの P-450IA2 と P-450IA1 による変異原の活性化

Promutagens	Tester Strain	P-450IA2 (rev. $\times 10^{-3}$ /nmol)	P-450IA1 (P-448)
Trp-P-2	TA98	7,810	3,650
Glu-P-1	TA98	5,090	180
IQ	TA98	2,410	202
2-Aminofluorene	TA98	211.4	63.1
2-Acetylaminofluorene	TA98	5.05	1.43
4-Aminobiphenyl	TA98	11.50	1.58
Aflatoxin B1	TA1000	8.17	1.73
Benzo [a] pyrene	TA100	0.84	2.22

に付けられており、余程詳しい研究者でないなどの研究室のどれが他の研究室のどれと同じかなど全く分らない。そこで、このような複雑さを整理するために Nebert ら (1987) によってチトクローム P-450 のグループ分けが成された。このグループ分けは遺伝子の構造の相同性に基づいている。

その最初のグループ P-450 IA ファミリーはさらに P-450 IA1 と P-450 IA2 のサブファミリーに分けることができる。P-450 IA1 は以前からベンツピレン水酸化酵素（又は多環芳香族炭化水素水酸化酵素, AHH）と呼ばれていたものでベンツピレン水酸化酵素活性が高いことを特徴とし、ラットの P-450c, P-448-L (Kamataki *et al.*, 1983) に相当する。P-450 IA2 は P-450d 又は P-448-H に相当し、本酵素の活性の特徴について著者ら (Kamataki *et al.*, 1983; Yamazoe *et al.*, 1983) は IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline) などを含むヘテロサイクリックアミンの N-水酸化があることを見出し報告している (Table 2)。したがって P-450 IA1 と P-450 IA2 は環境中に存在する代表的な変異・癌原物質を活性化する酵素であるといえる。これらの酵素に対応する酵素がラットだけでなくヒトやサルそしてビーグル犬にも存在すると考えられ、果してラット以外の動物でも対応するチトクローム P-450 の分子種がラットのそれと同じような変異原活性化能を持つか否かに注目した。著者らの研究室ではこれらの酵素をビーグル犬、サル、ヒトの肝から精製し、その性質を比較することを目指しているが、未だ全ての動物から P-450 IA1 と P-450 IA2 を精製することには成功していない (Ohta *et al.*, 1989a, 1989b, 1989c, 1990)。

近年、遺伝子工学の技術は目覚しく発展しており、この技術を利用すれば新しいアプローチが可能になる。著者らはビーグル犬の P-450 IA1 と P-450 IA2 の cDNA クローンを得ることに成功した (Uchida *et al.*, 1990)。また、カンクイザルの P-450 IA1 の cDNA クローンを単離することにも成功している。しかし、ビーグル犬とサルの P-450 IA1 の蛋白の精製には成功していないので、これらの cDNA クローンを活用して蛋白を合成し、その酵素活性を調べることにした。

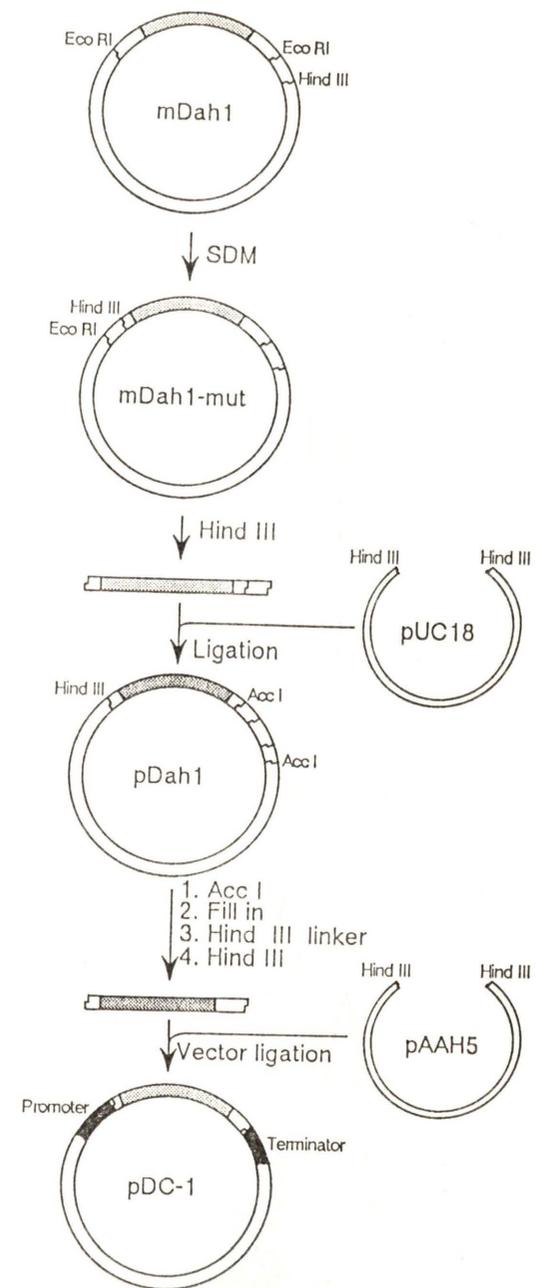


Fig. 1. ビーグル犬の P-450IA1 である P-450 (Dah 1) 発現プラスミドの構築。

得られたビーグル犬の P-450 IA1 の cDNA クローンは Dahl と命名し、サルの P-450 IA1 の cDNA クローンは MKah 1 と命名した。両 cDNA の 5' 上流と 3' 下流の非翻訳領域の DNA をきれいにそぎ取って可及的に蛋白をコードする

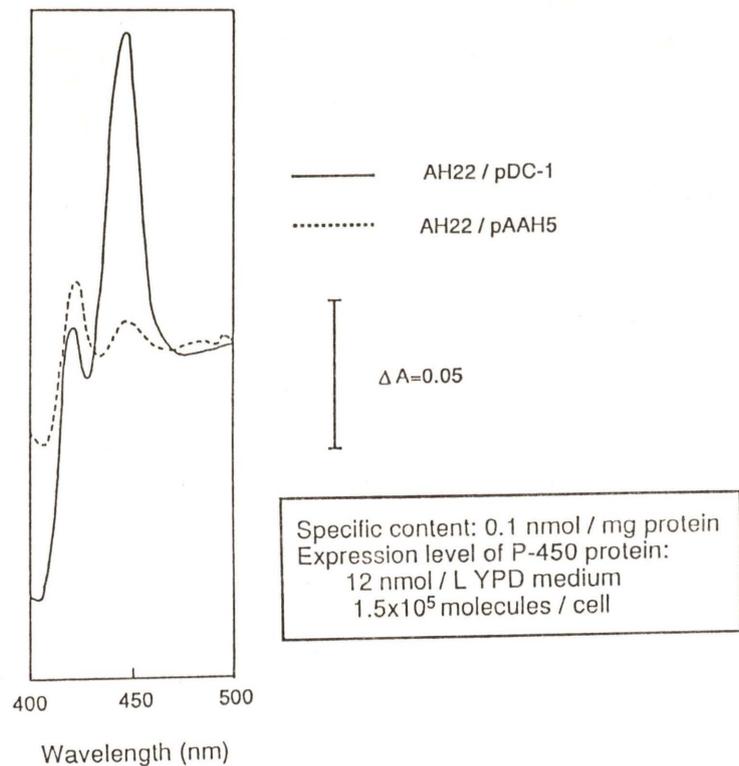


Fig. 2. 酵母に発現したビーグル犬のチトクローム P-450, P-450 (Dah 1) の一酸化炭素差スペクトル.

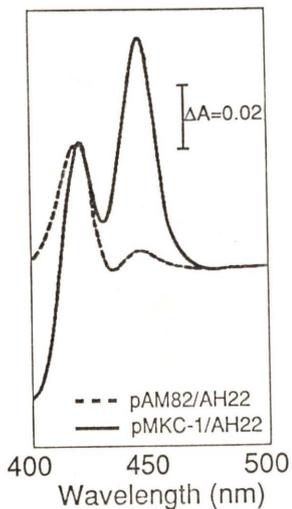


Fig. 3. 酵母に発現したサルのチトクローム P-450, P-450 (MKah 1) の一酸化炭素差スペクトル.

翻訳領域のみの cDNA クローンを調製した。この cDNA 断片の両側に適当なオリゴ (リンカー) を付け、制限酵素部位を作った。このオリシ

ろは発現ベクターを制限酵素で処理したときのできる制限酵素部位とピッタリと合うようになっている。発現ベクター pAAH5 又は pAM82 を制限酵素で処理し、そこにリンカーを付けた Dah 1 又は MKah 1 を挿入した。Dah 1 をくみ込んだ発現プラスミド (pDC-1) を構築した時の例を Fig. 1 に示した。完成したビーグル犬の pDC-1 とサルの pMKC-1 発現プラスミドで酵母 (AH 22) を形質転換し、これらのコードするチトクローム P-450 すなわち P-450 (Dah 1) と P-450 (MKah 1) を酵母のマイクロゾームに発現することができた。Dah 1 と MKah 1 の cDNA を放射能でラベルし、これをプローブとして用いて酵母の中に P-450 (Dah 1) と P-450 (MKah 1) をコードする mRNA が発現していることを確認した。また、ラットの P-450 IA2 に対する抗体 (P-450 IA1 とも反応する) を用いてウエスタンブロット分析したところ、予想された分子量のところに抗体と反応する蛋白が存在し、P-450 (Dah 1) と P-450 (MKah 1) の発現が蛋白レベルでも立証

Table 3. 酵母に発現したビーグル犬の P-450 (Dah) による変異原の活性化

Promutagen <sup>1)</sup>	AH22/pDC-1
IQ	109.8 <sup>2)</sup>
MeIQ	131.2
AFB <sub>1</sub>	3.55
B(a)P	8.20
Glu-P-1	39.7
Trp-P-2	32.2

- 1) Concentration was 0.01 mM.
- 2) *umu* gene expression (units/min/nmol P-450)

Table 4. 酵母に発現したビーグル犬の P-450 (Dah) のベンツピレン水酸化酵素活性

Microsomes	Activity	
	(nmol/min/mg protein)	(nmol/min/nmol P-450)
AH22/pDC-1	1.4	24
AH22/pAAH5	0.024	—

された。酵母のマイクロゾームをとり、マイクロゾームの中にチトクローム P-450 が発現していることを一酸化炭素差スペクトルで確認した (Figs. 2, 3)。次に酵母のマイクロゾームに発現したチトクローム P-450 が変異・癌原物質を活性化することができるかについて検討した。Table 3 に示したように、ビーグル犬の P-450 IA1 である P-450 (Dah 1) は IQ, MeIQ (2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline) を効率よく活性化し、Glu-P-1 (2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a; 3',2'-

d]-imidazole), Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) も活性化された。しかし、アフラトキシン B<sub>1</sub> とベンツピレンはほとんど活性化しなかった。ビーグル犬の P-450 IA1 がベンツピレンを効率よく活性化しなかったのは従来のラットの P-450 IA1 の実験結果と異なったが、Table 4 に示したように本酵素は高いベンツピレン水酸化酵素活性を示した点ではラットの P-450 IA1 と共通していた。ベンツピレン水酸化 (主として 3-位水酸化) と変異原活性化 (多分エポキシ化) は異なった反応であり、本酵素はラットの P-450 IA1 に比べてベンツピレンの 3-位水酸化に比較的特異性を持った酵素であると考えられる。Fig. 4 に酵母に発現したサルの P-450 IA1 すなわち P-450 (MKah 1) の変異原活性化能を示した。サルの P-450 (MKah 1) は IQ を最も効率よく活性化し、Trp-P-2 も活性化した。しかしながら、ビーグル犬の P-450 (Dah 1) において見られたように、ベンツピレンはほとんど活性化することはできなかった。ここには示さないが、P-450 (MKah 1) は P-450 (Dah 1) と同様ベンツピレン水酸化に対しては高い活性を示しており、むしろラットの P-450 IA1 がベンツピレン水酸化酵素活性と変異原活性の両者を示すことの方が特殊な例の様にみえた。以上の結果を総合すると組換え DNA 技術を活用して人工的に合成したチトクローム P-450 は変異原を活性化することができ、入手しにくいチトクローム P-450 標品たとえばヒ

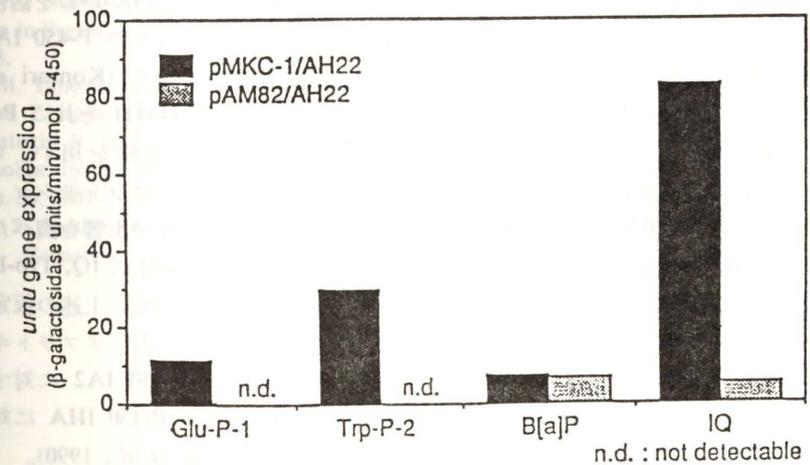


Fig. 4. 酵母に発現したサルの P-450 (MKah1) による変異原の活性化.

Table 5. ヒト肝マイクロゾームによる変異原の活性化

Promutagen	umu gene expression (units/min/mg)	Promutagen	umu gene expression (units/min/mg)
MeIQ	33.2±13.7	Tris-BP	4.1±2.9
IQ	24.0± 7.0	Benzo-(a) pyrene	2.6±0.9
Glu-P-1	23.5± 7.0	5-Nitro-o-anisidine	2.0±0.9
AFB <sub>1</sub>	18.8± 6.5	Michler's ketone	1.7±0.9
Trp-P-2	4.1± 1.4	2-AAF	1.0±0.4

Each value represents the mean±SD (n=8).

ト肝のチトクローム P-450 の代りに用いることができることが示唆された。このような方法を駆使することにより化学物質のヒトにおける発癌リスクを予測できる可能性もある。既に著者らの研究室ではヒトのチトクローム P-450 を酵母と培養がん細胞に発現させることに成功しており、癌原物質の活性化能も判明しつつある。

### 3. ヒト肝マイクロゾームによる変異原の活性化

実験動物でのデータが蓄積しても、それだけではヒトへ外挿しヒトにおける結果を予測することはできない。ヒトに関する基礎的データが蓄積してこそ実験動物からヒトへの予測が可能になると考えられる。ヒトに関するデータを得るにはヒトの肝の入手、それも新鮮な肝の入手という困難さがある、そのため世界的にヒトの肝を用いた変異原活性化に関するデータの蓄積は少ない。著者らは病理解剖時に遺族の同意を得て入手されたヒトの肝を用いて、ヒト肝マイクロゾームによる種々の変異・癌原物質の活性化能を測定した (Table 5) (Kitada *et al.*, 1990)。ヒトの肝を用いた研究では、1) 死亡した患者の死後時間、2) 患者の病歴や薬歴、それに 3) 患者の年齢や性などを一定にすることは不可能である。したがって得られた実験結果のバラツキは大きい、Table 5 に見られるようにヒトの肝では MeIQ, IQ, Glu-P-1 それにアフラトキシン B<sub>1</sub> が効率よく活性化されることがうかがえた。ヒト個体間データのバラツキを利用し、ある変異原を効率よく活性化する個体が他のどの変異原物質を効率よく活性化するかの相関性を調べた。もし、ある2つの変異原物質が同じ分子種のチトクローム P-450 で代謝的に活性化されるとすれば、これらの変異原物質の活性

Table 6. ヒト肝における変異原活性化能の個体差を利用した変異原活性化に関するチトクローム P-450 が同一か否かの推定

	Correlation coefficient			
	MeIQ	Trp-P-2	Glu-P-1	AFB <sub>1</sub>
IQ	0.90	0.78	0.80	0.50
MeIQ		0.82	0.80	0.61
Trp-P-2			0.81	0.52
Glu-P-1				0.48

Each value was determined by linear regression analysis.

化の間に高い相関性が認められるはずである。Table 6 に示したように、IQ, MeIQ, Trp-P-2 それに Glu-P-1 は同じチトクローム P-450 の分子種によって活性化されることが示唆されたが、アフラトキシン B<sub>1</sub> は他の分子種によって活性化されることが示唆された。この知見を Table 2 に示した結果と併せると、P-450 IA2 がヒトの肝でも IQ, MeIQ, Trp-P-2, Glu-P-1 を活性化すると推測された。そこでラットの P-450 IA2, ヒト肝から当研究室で精製された (Komori *et al.*, 1988) P-450 IIIA (P-450 HM1) それに P-450 IIC (P-450 HM2) に対する抗体を用い、ヒト肝による IQ, Trp-P-2 それにアフラトキシン B<sub>1</sub> の活性化に対するこれらの抗体の影響を調べた。ラットの P-450 IA2 に対する抗体は IQ, Trp-P-2 の活性化を各々 85%, 90% 阻害し、上述の仮定が正しいことが裏付けられた。一方、アフラトキシン B<sub>1</sub> の活性化はラットの P-450 IA2 に対する抗体では阻害されず、ヒトの P-450 IIIA に対する抗体で阻害された (Kitada *et al.*, 1990)。

### 4. ヒト肝マイクロゾームの新しい P-450 IA

ヒト肝の P-450 IA については、P-450 IA1 は未だ精製されておらず、P-450 IA2 が部分精製されているに過ぎない。ラットの P-450 IA2 (P-448-H) に対する抗体を用いてヒトの肝マイクロゾームをウエスタンブロット分析すると、3本のバンドが見えた。すなわち、ヒト肝マイクロゾームには P-450 IA ファミリーに属するチトクローム P-450 が3種存在することが示唆された。そこで、その内一番分子量が小さい分子種を精製した。精製された分子種 P-450-HM4 の分子量は 49,000、酸化型絶対スペクトルのピークの位置は 416.5 nm にあり低スピン型であることが判明した。一酸化炭素差スペクトルのピークの位置は 449 nm にあった。精製酵素は IQ その他の変異原物質を活性化した。ヒト肝マイクロゾームにおいて本酵素が IQ の活性化に占める役割りの大きさを本酵素の抗体を用いることによって推定したところ、IQ の活性化の 8~50% が本酵素に対する抗体で阻害され、ヒトにおいては大きな個体差があることが示唆された。P-450 IA は動物のみならずヒト肝においても変異・癌原物質の活性化に重要な役割りを演じており、今後さらに詳しく検討することが必要と思われる。

### 参考文献

- Kamataki, T., K. Maeda, Y. Yamazoe, N. Matsuda, K. Ishii and R. Kato (1983) A high spin form of cytochrome P-450 highly purified from PCB-treated rats: Catalytic characterization and immunological quantitation in liver microsomes. *Mol. Pharmacol.* **24**, 146-155.
- Kitada, M., M. Taneda, K. Ohta, K. Nagashima, K. Itahashi and T. Kamataki (1990) Metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub> and 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f)-quinoline by human adult and fetal livers. *Cancer Res.* **50**, 2641-2645.
- Komori, M., T. Hashizume, H. Ohi, T. Miura, M. Kitada, K. Nagasima and T. Kamataki (1988)

Cytochrome P-450 in human liver microsomes: High performance liquid chromatographic isolation of three forms and their characterization. *J. Biochem.* **104**, 912-916.

- Nebert, D. W., M. Adesnik, M. J. Coon, R. W. Estabrook, F. J., Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson, B. Kemper, W. Levin, I. R. Phillips, R. Sato and M. R. Waterman (1987) The P-450 gene superfamily: Recommended nomenclature. *DNA* **6**, 1-11.
- Ohta, K., M. Kitada, T. Hashizume, M. Komori, H. Ohi and T. Kamataki (1989a) Purification of cytochrome P-450 from Polychlorinated biphenyl-treated crab eating monkeys: High homology to a form of human cytochrome P-450. *Biochim. Biophys. Acta*, **996**, 142-145.
- Ohta, K., M. Motoya, M. Komori, T. Miura, M. Kitada and T. Kamataki (1989b) A novel form of cytochrome P-450 in beagle dogs: P-450-D<sub>3</sub> is a low spin form of cytochrome P-450 but with catalytic and structural properties similar to PCB P-448-H (P-450d). *Biochem. Pharmacol.* **38**, 91-96.
- Ohta, K., M. Kitada, H. Ohi, M. Komori, K. Nagashima, N. Sato, K. Muroya, T. Kodama, M. Nagao and T. Kamataki (1989c) Interspecies homology of cytochrome P-450 cross-reactive with anti-rat P-448-H antibodies in liver microsomes from dogs, monkeys and humans. *Mutation Res.* **226**, 163-167.
- Ohta, K., M. Motoya, M. Komori, T. Miura, M. Kitada and T. Kamataki (1990) Interspecies homology of cytochrome P-450: Purification and toxicological significance of a high spin form of cytochrome P-450 (P-450-D-2) from liver microsomes of polychlorinated biphenyl (PCB)-treated beagle dogs. *J. Biopharm. Sci.* **1**, 59-71.
- Uchida, T., M. Komori, M. Kitada and T. Kamataki (1990) Isolation of cDNAs coding for three different forms of liver microsomal cytochrome P-450 from polychlorinated biphenyl-treated beagle dogs. *Mol. Pharmacol. in press.*
- Sato, R. and T. Omura (ed.) (1978) *Cytochrome P-450* Kodansha/Academic Press. Tokyo/New York.
- Yamazoe, Y., M. Shimada, T. Kamataki and R. Kato (1983) Microsomal activation of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline, a pyrolysate of sardine and beef extract, to a mutagenic intermediate. *Cancer Res.* **43**, 5768-5774.

## 抱合反応による活性化と不活性化

慶應義塾大学医学部 薬理 山添 康

### 1. 抱合反応の機能

既に良く知られているように環境中に含まれる化学物質の多くは生体内に取込まれたのち、酵素的な2段階の変換を受けて体外に排泄される。一般に酸化/還元反応によって水酸基やアミノ基のような官能基が生成した代謝物質は更に硫酸エステル、グルクロン酸エステル及びエーテル、あるいは他の抱合体として尿中あるいは糞中に排泄される。この抱合反応は第2相の反応とも呼ばれており、数多くの酵素系がこの反応に関与している。現象の面から見ると Table 1 に示すように抱合反応は脂溶性代謝物に水溶性の糖や酸を導入して代謝物の極性を増加させるが、それだけでなく分子サイズの増加によって尿/糞(胆汁)への排泄比率を変化させ、また硫酸エステルのような酸性基、あるいはメチル化による3級アミンの4級アミノ化によって塩を形成しやすい形態に変化させている。抱合反応はほとんどの場合解毒的に作用しているが、時には変異・癌原物質の代謝的活性化の重要なステップを担当することがある。またN-ヒドロキシアルルアミンの様な不安定な中間代謝物がグルクロン酸抱合を受けるとむしろ安定

となり、血液や尿を介して遠隔部位に到達できるようになる。つまり抱合反応が不安定薬物の保護と運搬にも寄与することが知られている。

ここでは数多くの抱合反応のうち主要と考えられるグルクロン酸抱合、硫酸抱合、アセチル抱合およびグルタチオン抱合を取り上げ主に代謝的活性化への関与についてその例を紹介する。

### 2. グルクロン酸抱合

脂溶性フェノール、アルコール、チオール、N-ヒドロキシルアミン(アミド)、四級アミンおよびピラゾロン化合物は主に肝でグルクロン酸抱合を受け、O-, S-, N-, および C-β-グルクロニドに変換される。この反応を触媒するグルクロニルトランスフェラーゼは哺乳動物の肝小胞体に存在し、UDPGA (uridine-diphospho-α-glucuronic acid) を補酵素として必要とする。肝で抱合を受けると分子量の小さいグルクロン酸抱合体 (<400 MW) は血中に移行し腎から尿中に排泄される。一方分子量の大きいグルクロン酸抱合体 (>400 MW) は胆管に取り込まれ腸に到達し、糞と共に排泄される。この際グルクロニドの一部は腸内細菌叢により脱抱合され、再生した脂溶性代謝物が再吸収される(腸肝循環)。ヒトに膀胱癌を生ずるとされる2-naphthylamine は肝でN-水酸化され、さらにグルクロニルトランスフェラーゼによりN-ヒドロキシ-N-グルクロニドに変換される(Fig. 1)。生成したグルクロニドは比較的分子量が小さいのでその多くが腎を経由して尿中に排泄される。このN-グルクロニドは中性領域では安定であるが、

Table 1. 抱合反応

機能: 解毒 代謝活性化
現象: 1. 水溶性の変化—再吸収の低下, 尿中溶解度の増加, 塩形成
2. 分子量の変化—尿/胆汁移行率の変化
3. 反応種の安定化・運搬—遠隔組織への移行, 腸肝循環

〒160 東京都新宿区信濃町 35

Activation and inactivation of mutagenic and/or carcinogenic chemicals by conjugation

Yasushi Yamazoe

Department of Pharmacology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinano-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan

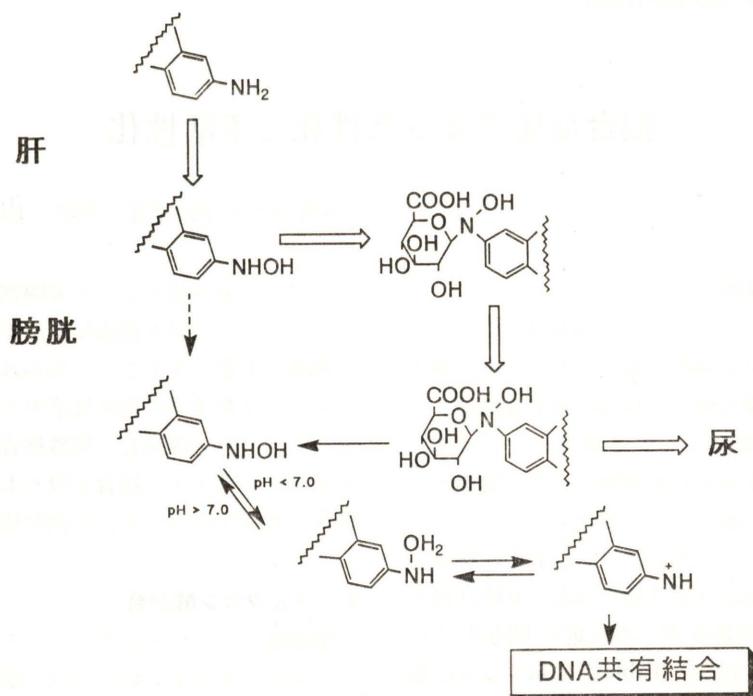


Fig. 1. アリルアミンによる膀胱 DNA の損傷機構.  
Kadlubar et al. 1977 より引用

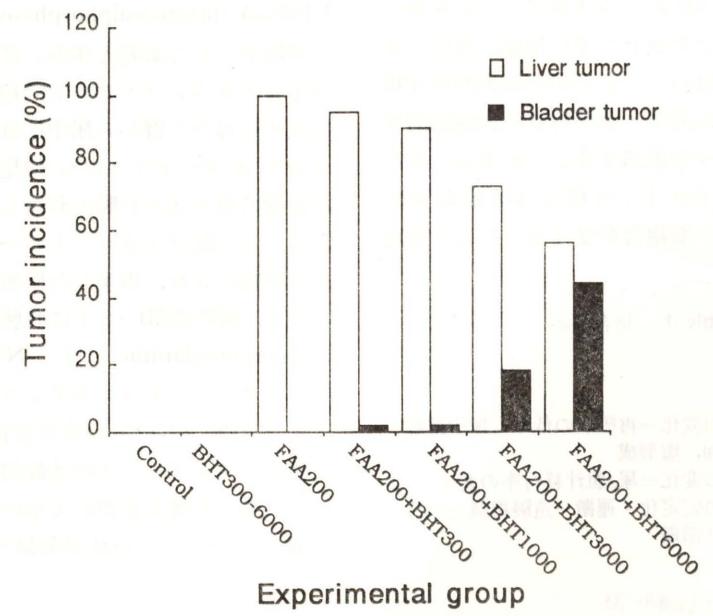


Fig. 2. アセチルアミノフルオレン投与による肝及び膀胱発癌への BHT の影響.  
FAA; 2-acetylaminofluorene, BHT; Butylhydroxytoluene  
単位は ppm  
Maeura et al., 1984 より引用, 改図した.

酸性条件下では不安定で、N-グルクロニドは解離して元の N-ヒドロキシルアミンを再生する。2-naphthylamine はヒトやイスで膀胱癌を生ずるが、これら動物種では尿の pH が酸性側に傾いており、このことがいったん尿中に排泄されたグルクロニド代謝物の再活性化が起こる原因と考えられている (Kadlubar et al., 1977)。実際尿の pH が中性を示すラットやウサギでは 2-naphthylamine による膀胱癌の発生率は低い。このように 2-naphthylamine のグルクロン酸抱合は標的部位への活性中間体の保護 (安定化) と運搬にあづかっている。このような抱合反応による標的臓器の

シフトは 2-acetylaminofluorene (AAF) でも知られており、butylhydroxytoluene (BHT) を AAF と共にラットに投与すると主発癌部位である肝での腫瘍発生率が低下し、膀胱では増加する (Fig. 2)。この現象も BHT 投与によってグルクロニルトランスフェラーゼの酵素誘導が起こり、尿中に移行する N-グルクロニドが増加したためとされている (Maeura et al., 1984)。

3. アセチル抱合

アリル (芳香族) アミンやヒドラジン構造をもつ物質は生体内でアセチル化を受け、アミドとし

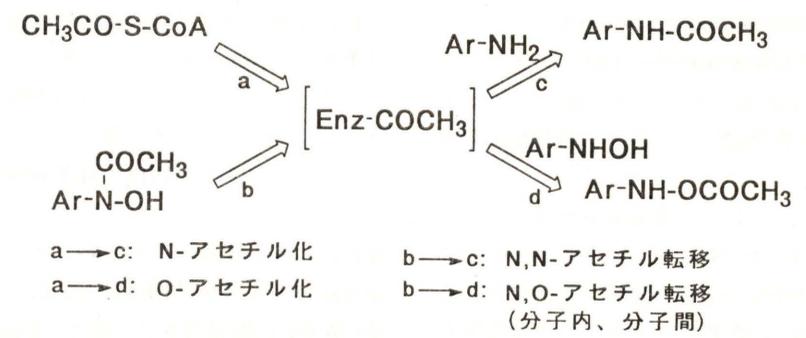


Fig. 3. アセチルトランスフェラーゼによる N-, O- および N, O-アセチル転移反応.

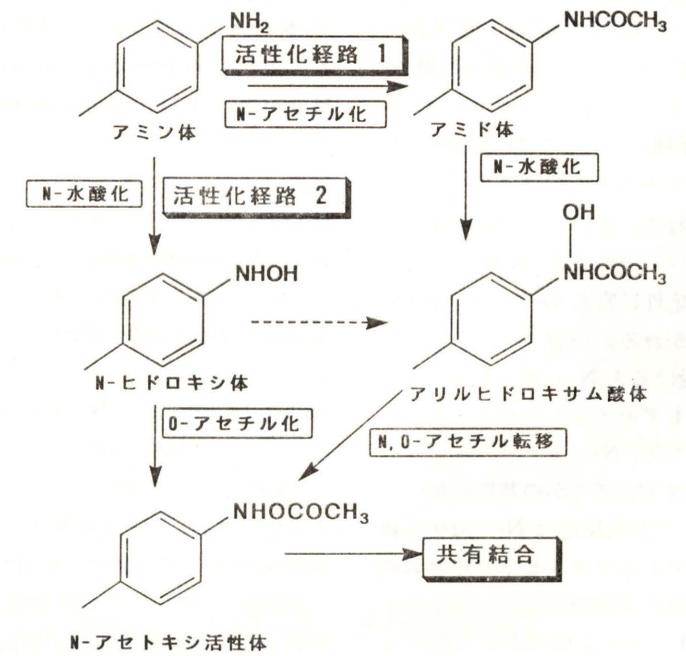


Fig. 4. アリルアミンのアセチル化及び N-水酸化による活性化経路.

て排泄される。哺乳動物の生体内には基質特異性が高く内因性基質をアセチル化する幾つかの酵素(例えばコリンアセチルトランスフェラーゼ)が存在するが、外来薬物のアセチル化はこれらとは異なり主に可溶性画分に含まれるアセチル CoA-要求性のアセチルトランスフェラーゼによって触媒される。この酵素は肝だけでなく皮膚を含む多くの臓器に分布しており、ヒトやハムスターでは免疫学的に類似した2分子種の発現が認められている。これら可溶性画分のアセチルトランスフェラーゼはアミノ化合物のN-アセチル化と共にN-ヒドロキシアリルアミンのO-アセチル化を触媒する(Fig. 3)。またハムスター、ラットおよびウサギ肝のアセチルトランスフェラーゼはアセチル CoA 以外にアリルヒドロキサム酸(N-ヒドロキシ-N-アセタミド)をアセチル供与体として利用し、N,O- および N,N'-アセチル転移反応を触媒する。

現在アリルアミンによる変異原活性化の多くはN-水酸化と生成したN-ヒドロキシアリルアミンのO-アセチル化の2ステップ機構で進行すると考えられている。したがってアセチルトランスフェラーゼ-チトクローム P-450 系によるアリルアミンの活性化には2つの異なる経路が可能である(Fig. 4)。まずアリルアミンが初めにアセチル化され、N-アセチルアミン(アセタミド)になった場合、生成したN-アセチルアミンがチトクローム P-450 (主にIA2型分子種)によってN-水酸化されN-ヒドロキシ-N-アセチルアミン(アリルヒドロキサム酸)に変換される。次いでこの中間体はアセチルトランスフェラーゼによるN,O-アセチル転移反応によって反応性に富むO-アセチル体(N-アセトキン体)に導かれる。一方アリルアミンが最初にN-水酸化を受けるとN-ヒドロキシアミンとなり、この中間体もアセチルトランスフェラーゼの良い基質であるため、N-ヒドロキシアミンのO-アセチル化が進行する。幾つかの基質を用いた実験からこのO-アセチル化反応はN-アセチル化とこの反応により生成したアリルヒドロキサム酸のN,O-アセチル転移の2段階反応によるものではなく、直接的なO-アセチル化によって起こると考えられている(Shinohara *et al.*, 1986)。

しかしながら実際に変異原性・癌原性アミンが生体内で上述のどちらの経路で活性化されるかについてはいまだ明確ではない。*in vitro* のデータから判断するとN-アセチル化を受け易い2-aminofluorene (AF) では1の経路(最初にアセチル化)が主活性化経路であり、AFに比べてアセチル化を受けにくい加熱変異原のヘテロサイクリックアミンではむしろ2の経路(最初にN-水酸化)によって活性化を受けるものと考えられる。

アリルアミンのN-アセチル化活性はヒトを含む多くの動物に認められるが、イヌではこの活性を欠いており、またヒト、ウサギ、ハムスター及び特定系統のマウスでは遺伝的要因にもとづく個体差が知られている。このうちヒトとハムスターでは2分子種のうち一方のみの発現に多型性が認められており、この多型性はメンデルの不完全優勢則にあてはまる(Kato and Yamazoe, 1989)。

ハムスターのアセチルトランスフェラーゼ、AT-I と AT-II は互いに免疫交差性があり、SDS電気泳動で前者は31 KDa、後者は30 KDaを示す。AT-Iは基質特異性が低く、2-aminofluorene や 4-aminobiphenyl, 4-aminoazobenzene, その他の変異・癌原性アミンの多くがこの酵素によってN-アセチル化される。AT-Iはアセチル CoA だけでなくN-hydroxy-2-acetylaminofluoreneやN-hydroxy-4-acetylaminobiphenylのようなアリルヒドロキサム酸のアセチル基を供与体として利用することができる(アリルヒドロキサム酸のN,O-アセチル転移活性)。一方多型性を示すAT-IIは2-aminofluorene や p-aminobenzoic acid のN-アセチル化に高い活性を示し、さらにN-hydroxy-2-aminofluorene のO-アセチル化を触媒する。しかしながらヘテロサイクリックアミンの活性中間体であるN-hydroxy-Glu-P-1のO-アセチル化には活性を示さない。

Amesテストを用いてアリルアミンの変異原性を測定すると、例えば精製チトクローム P-450再構成系のように、必ずしもN-ヒドロキシアミン中間体のO-アセチル化を触媒する可溶性酵素系を含まなくとも変異原性が観察される。これはサルモネラ菌体内にアセチルトランスフェラーゼが

存在し、菌体内に入ってきたN-ヒドロキシアリルアミンをO-アセチル化によって活性化するためであり、N-ヒドロキシアリルアミンに感受性の低い *Salmonella typhimurium* TA98<sub>1,9-DNP<sub>6</sub></sub> の様な変異株はアセチルトランスフェラーゼを欠いている(Saito *et al.*, 1983; Saito *et al.*, 1985; Yamazoe *et al.*, 1989)。

#### 4. 硫酸抱合

硫酸抱合を触媒するスルホトランスフェラーゼは可溶性画分に含まれており、補酵素であるPAPS (phosphoadenosinephosphosulfate) の存在下でアルコール、チオール、フェノール、アミン、N-ヒドロキシアリルアミンなどの硫酸抱合を触媒する。多環炭化水素(PAH), dimethylbenzanthracene のジヒドロキシメチル体(代謝物, DHBA)はAmesテスト系においてそのままでは変異原性を示さないが、ラット肝可溶性画分とPAPSをAmesテスト系に添加すると強い変異原性を示す(Fig. 5)。この変異原性はスルホトランスフェラーゼによって生成したDHBAスルフェートに起因する(Watabe *et al.*, 1982; Watabe *et al.*, 1985)。この結果は化学合成されたDHBAスルフェートが直接変異原であることによって支持されている。ラットにおけるヒドロキシメチルPAHやアルコールの硫酸抱合は一般に雌性で高

く、雄性で低い、N-ヒドロキシアリルアミンの硫酸抱合(O-スルホニル化)は逆に雌性で高く、雄性で低い。ラット肝には基質特異性が異なる幾つかのスルホトランスフェラーゼが存在し、これらのうちヒドロキシメチル-PAHの活性化を触媒するアルコール(ヒドロキシステロイド)スルホトランスフェラーゼは雌性>雄性の、逆にN-ヒドロキシアリルアミンのO-スルホニル化を触媒するフェノールスルホトランスフェラーゼは雌性>雄性の含量の性差を示し、このためこれらスルホトランスフェラーゼによって活性化される化合物の作用には顕著な性差が認められる(Yamazoe *et al.*, 1987; Yamazoe *et al.*, 1989)。実際、アリルアミン投与による肝癌の出現率は雌性で高く、雄性で低い(DeBaun *et al.*, 1970)。このことから硫酸抱合はラットのアリルアミン誘発発癌に重要な役割をはたしていると考えられている。

#### 5. グルタチオン抱合

グルタチオンは生体内で生成したさまざまなタイプの親電子中間体(electrophiles)やラジカルの処理役として重要な役目を担っており、生体高分子ダメージの最終防御ラインとしてサッカーでのスーパーにも似た働きをしている。しかしながらグルタチオン抱合も変異原の活性を促進する例が幾つか知られている。ニトロフラン誘導体のフ

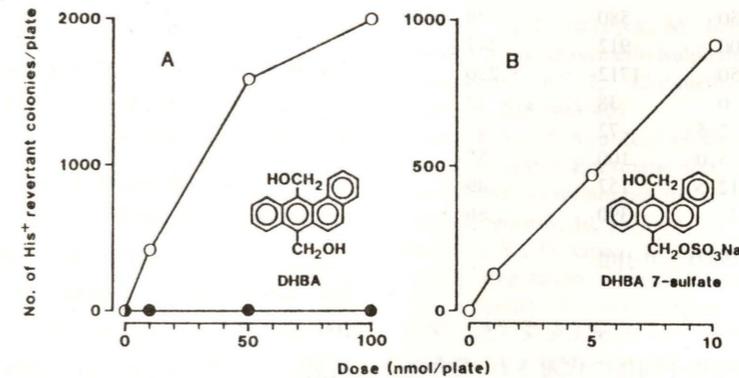
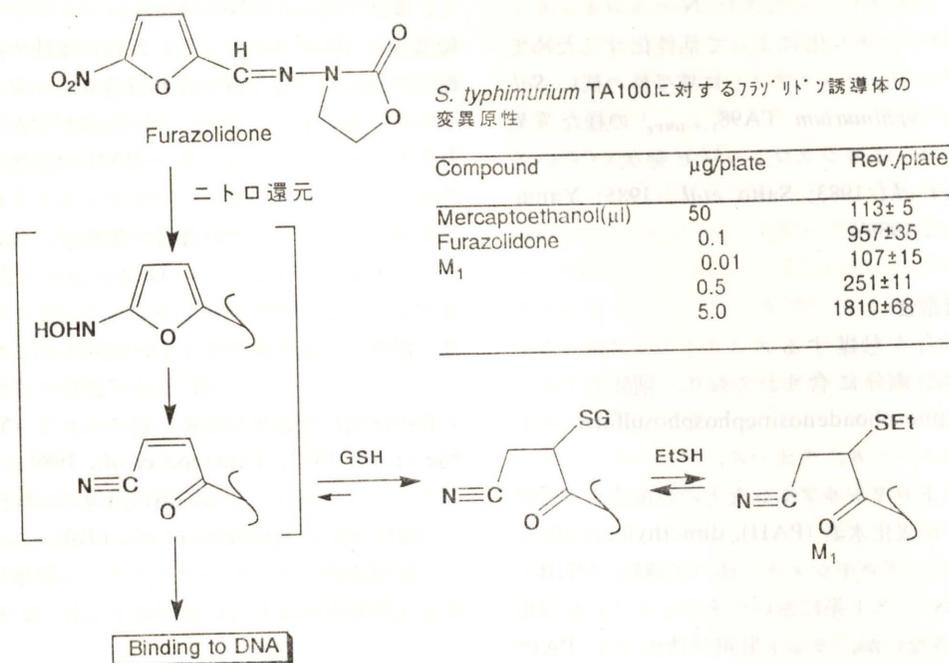


Fig. 5. 7,12-dihydroxymethylbenz[a]anthracene (DHBA) のスルホトランスフェラーゼによる変異原活性化。

A: ○ 肝可溶性画分および PAPS 存在下, ● PAPS 非存在下

B: DHBS sulfate の直接変異原性

Watabe *et al.* 1985 より引用



*S. typhimurium* TA100に対するフラグメント誘導体の変異原性

Compound	μg/plate	Rev./plate
Mercaptoethanol(μl)	50	113±5
Furazolidone	0.1	957±35
M <sub>1</sub>	0.01	107±15
	0.5	251±11
	5.0	1810±68

Fig. 6. Furazolidone の変異原活性化とチオールによる促進効果。

GSH; グルタチオン, EtSH; メルカプトエタノール

Vroomen et al., 1988 より引用

Table 2. Chloro- (CDNB) および fluoro-2, 4-dinitrobenzene (FDNB) の *Salmonella* TA100 and TA100/GSH<sup>-</sup> 株に対する変異原性

被検物質	濃度 (μM)	Rev./plate	
		TA100	TA100/GSH <sup>-</sup>
CDNB	0	54	56
	25	280	118
	50	580	220
	100	912	247
	250	1712	250
FDNB	0	38	42
	2.5	72	47
	5.0	100	57
	12.5	157	49
	25	390	86

Kerklaan et al. (1987) より引用

ラゾリドンは生体内でニトロ還元を受けて、フラン環が開裂した反応性中間体に代謝され *Salmonella* 菌に対して変異原性を示す (Fig. 6)。この反応性中間体はグルタチオンやメルカプトチオールのようなチオールと容易に反応してチオエーテル誘導体を生成するが、このメルカプトチオール

誘導体には変異原性が認められている (Vroomen et al., 1988)。この理由はチオエーテル結合が可逆的であるため、一部の抱合体が元の反応性中間体を再生成するためである。同様のチオールによる促進は加熱変異原 Glu-P-1 の反応性中間体 (N-hydroxy-Glu-P-1) の酵素的活性化でも認められている (Abu-Zeid et al., 1990)。このような例からわかるようにグルタチオン類による可逆的な抱合の一部は反応性中間体を安定化し、生体内での反応性中間体のプールサイズを増加するのに寄与しているものと考えられる。chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) はグルタチオントランスフェラーゼの良い基質であり、活性の測定によく用いられている。この物質は *Salmonella* 菌 TA 100 株に対して変異原性があり、Table 2 の様な結果を示す (Kerklaan et al., 1987)。TA 100 には菌体内 GSH 含量の低い変異株 (TA 100/GSH<sup>-</sup>) があり、両株を用いて CDNB の作用を比較すると GSH 含量の高い TA 100 でより多くの復帰変異コロニーが観察される。同様の現象はフルオ

ロ誘導体 (FDNB) でも認められている。これは CDNB や FDNB のハロゲン原子が GSH によって置換されるとニトロ基の還元が促進され、変異原性を示すヒドロキシアミン体が増加するためと考えられている。

## 5. 終りに

文頭にも述べたように抱合反応は生体に入った物質の代謝・排泄に重要な役割をはたしている。しかしながらその一部は代謝活性化にも寄与しており、肝以外の組織での活性化、殊に膀胱や腎での活性化には抱合反応の関与を考慮することが必要である。一般に変異原性テスト系ではどうしても変異原の検出を目的とするため第1相の酸化・還元系にのみ注意を向け勝ちであるが、実際生体内での反応を考える場合には、抱合や加水分解などの第2相反応を考慮する必要がある。ここでは抱合反応の活性化への関与についてその例を示したが詳しくは成書を参照されたい。

## 参考文献

- Abu-Zeid, M., N. Staiano, Y. Yamazoe and R. Kato (1990) Enhancement by cysteinyl thiols of acetyltransferase-mediated, but not of sulfotransferase-mediated binding of a pyrolysate-derived N-hydroxyarylamine, 2-hydroxyamino-6-methyldipyrrodo [1,2-*a*:3',2'-*d*] imidazole, to DNA. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **81**, 653-659
- DeBaun, J. R., E. C. Miller and J. A. Miller (1970) N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene sulfotransferase: Its probable role in carcinogenesis and in protein-(methionine-S-yl) binding in rat liver. *Cancer Res.*, **30**, 577-595
- Kadlubar, F. F., J. A. Miller and E. C. Miller (1977) Hepatic microsomal N-glucuronidation and nucleic acid binding of N-hydroxyarylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.*, **37**, 805-814
- Kato, R. and Y. Yamazoe (1989) Further metabolic activations of mutagenic and carcinogenic N-hydroxyarylamines by conjugating enzymes, In: (R. Kato, R. W. Estabrook and M. N. Cayen, eds.), *Xenobiotic Metabolism and Disposition*, Taylor & Francis, London, 383-391
- Kerklaan, P. R. M., S. Bouter, J. M. te Koppele, N. P. E. Vermeulen, P. J. van Bladeren and G. R. Mohn (1987) Mutagenicity of halogenated and other substituted dinitrobenzenes in *Salmonella typhimurium* TA100 and derivatives deficient in glutathione (TA100/GSH<sup>-</sup>) and nitroreductase (TA100NR). *Mutation Res.*, **176**, 171-178
- Maeura, Y., J. H. Weisburger and G. M. Williams (1984) Dose-dependent reduction of N-2-fluorenyl acetamide-induced liver cancer and enhancement of bladder cancer in rats by butylated hydroxytoluene. *Cancer Res.*, **44**, 1604-1610
- Saito, K., Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato (1983) Mechanism of activation of proximate mutagens in Ames' tester strains: The acetyl CoA-dependent enzyme in *Salmonella typhimurium* TA98 deficient in TA98/1,8-DNP6 catalyzes DNA binding as the cause of mutagenicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 141-147
- Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki and R. Kato (1985) Metabolic activation of mutagenic N-hydroxyarylamines by O-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA98. *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**, 286-295
- Shinohara, A., K. Saito, Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato (1986) Acetyl coenzyme A-dependent activation of N-hydroxy derivative of carcinogenic arylamines: Mechanism of activation, species difference, tissue distribution and acetyl donor specificity. *Cancer Res.*, **46**, 4362-4367
- Vroomen, L. H. M., M. C. J. Berghmans, J. P. Groten, J. H. Koeman and P. J. van Bladeren (1988) Reversible interaction of a reactive intermediate derived from furazolidone with glutathione and protein. *Tox. Appl. Pharmacol.*, **95**, 53-60
- Watabe, T., A. Hiratsuka, K. Ogura and K. Endoh (1985) A reactive hydroxymethyl sulfate formed regioselectively from the carcinogen, 7, 12-dihydroxymethylbenz[a]anthracene, by rat liver sulfotransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 694-699
- Watabe, T., T. Ishizuka, M. Isobe and N. Ozawa (1982) A7-hydroxymethylsulphate ester as an active metabolite of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene. *Science*, **215**, 403-405
- Yamazoe, Y., M. Abu-Zeid, G. Dawei, N. Staiano and R. Kato (1989) Enzymatic acetylation and sulfation of N-hydroxyarylamines in bacteria and rat livers. *Carcinogenesis*, **10**, 1675-1679
- Yamazoe, Y., D. Gong, N. Murayama and R. Kato (1989) Regulation of hepatic cortisol sulfotransferase by pituitary hormone. *Molec. Pharmacol.*, **35**, 707-712
- Yamazoe, Y., S. Manabe, N. Murayama and R. Kato (1987) Regulation of hepatic sulfotransferase catalyzing the activation of N-hydroxyarylamide and N-hydroxyarylamines by growth hormone. *Mol. Pharmacol.*, **32**, 536-541

## 腸肝循環による変異原物質の活性化・不活性化

徳島大学医学部細菌学教室 木内 武美, 片岡 佳子,  
宮西 幸一, 大西 克成

### 1. はじめに

環境変異原物質が生体外異物としてヒト体内にはいる経路としては、経皮、経気道および経口が考えられるが、この中では経口的に侵入する場合が一番多い。生体内に入った化学物質の代謝反応は、一般に第 I 相反応 (官能基導入反応) と第 II 相反応 (抱合反応) に分けられる。また代謝産物の主要排泄経路は、腎臓から尿中への排泄と胆汁を介しての十二指腸への放出である。なお尿中へ排泄されるか胆汁中に放出されるかは、一般的にその物質の分子量に依存している (加藤, 1983)。すなわち、ラットの場合分子量  $325 \pm 50$ , モルモットが  $400 \pm 50$ , イヌが  $350 \pm 50$ , サルで  $500 \pm 50$  以上の物質が胆汁中に放出され、それ以下のものは尿中へ排泄される。ヒトの場合はサルに近いと考えられている。抗炎症剤である diclofenac sodium (Voltaren, 分子量 318) による消化管潰瘍という毒性発現がイヌやラットで強くヒトで弱いという現象 (加藤ら, 1974) も胆汁中への排泄量の差と腸内菌の種差によると思われる。

肝臓から胆汁中へ放出される代謝産物のほとんどは、グルクロン酸、硫酸、あるいはグルタチオン (システイン、グルタミン酸およびグリシンのトリペプチド) などのペプチド抱合体の形で排泄される。排泄された抱合体は腸管内で腸内菌の持つ  $\beta$ -glucuronidase や sulfatase などの脱抱合酵素で加水分解された後に再び脂溶性の活性物質となり、腸粘膜より吸収されて肝臓へ送られ再度代謝される。この生体内での化学物質の移動を腸肝循環と呼んでいる。この腸肝循環により化学物

質の生体内滞留が長くなり毒性の増加につながる可能性がある。また、主として腸内菌が担う抱合体の分解反応を第 III 相反応と呼びその重要性が注目されている。

### 2. 腸内菌叢とその代謝の特徴

一般にヒトの腸管内は生後 3~4 時間以内までは無菌の状態に近い。生後外界の種々の環境因子の汚染を受け、生体が外界と接触している皮膚や気道、さらに消化管などの粘膜面にいろいろな種類の微生物が定着し、それぞれの部位に特徴的な常在菌叢を形成する。そのうちで腸内に住む菌を腸内菌と呼び、その集団を腸内菌叢と呼ぶ。

細菌は発育に対する酸素の影響により、大きく 3 種類に分けられる。すなわち、酸素の存在下では増殖できずかえって死滅するような偏性嫌気性菌、逆に酸素が存在しないと増殖できない偏性好気性菌、また酸素の有無にかかわらず増殖するが酸素があればこれを利用して発育が良好となる通性嫌気性菌である。一般に偏性好気性菌と通性嫌気性菌を好気性菌、偏性嫌気性菌を嫌気性菌と呼ぶ。

従来、腸内菌の代表として大腸菌や腸球菌が考えられていた。その数は糞便で調べてもせいぜい 1g 当り  $10^8$  (1 億) くらいしか培養されてこなかった。ところが糞便をとって直接顕微鏡でみると腸内菌は 1g 当り  $10^{11}$  (1000 億) 以上も数えられる。そのため糞便中の菌は死菌であると考えられていた。しかし、1960 年代後半からの嫌気培養法の進歩により腸内菌の大部分はこれまで培養で

〒770 徳島市蔵本町 3 丁目 18-15

Metabolic activation and inactivation of environmental mutagens during enterohepatic circulation  
Takemi Kinouchi, Keiko Kataoka, Koichi Miyanishi and Yoshinari Ohnishi

Department of Bacteriology, School of Medicine, The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho,  
Tokushima 770, Japan

Table 1. ヒトおよび実験動物の大腸または糞便中の細菌数 (Rowland *et al.*, 1985)

菌名	1 グラム当りの生菌数 (対数表示)					
	ヒト	ラット	マウス	ハムスター	ウサギ	モルモット
総菌数	10-11.5	10-11	10-11	10	7-10	9-10
<i>Bacteroides</i>	10-11	7-10	9-10	10	7-9	7-9
<i>Eubacterium</i>	10-11	9	9-11	(-)	6	8
<i>Bifidobacterium</i>	10-11	8-10	7	9	7-9	9
<i>Fusobacterium</i>	10	9-10	9-11	9	(-)	(-)
<i>Peptostreptococcus</i>	9-10	9-11	9	10	8	9
<i>Lactobacillus</i>	7-9	8-10	8-10	10	-3	8
<i>Streptococcus</i>	4-9	8-10	6-8	5	2-4	3-7
<i>Enterobacteria</i>	4-8	5-7	4-6	6	-3	-6
<i>Propionibacteria</i>	9-10	ND	9	ND	ND	ND
<i>Clostridium</i>	5-10	2-7	7-9	(-)	-3	-4
<i>Veillonella</i>	-6	4-10	-6	4	(-)	-4
<i>Staphylococcus</i>	-8	-6	-5	5	-3	-7

ND, Not determined; (-), Below limit of detection; Values preceded by a minus varied from below the limit of detection to number indicated.

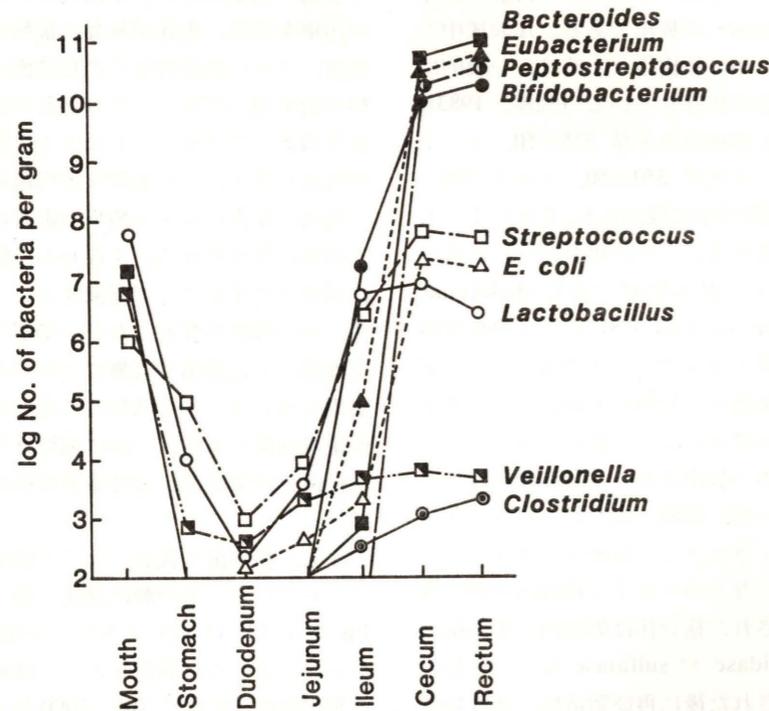


Fig. 1. 健康人の消化管各部位の菌叢 (光岡, 1980).  
大腸の優勢菌である *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* などは嫌気性菌である。

きなかった各種の嫌気性菌であることがわかってきた。ヒト糞便の 50% 以上は腸内菌であり (Stephen *et al.*, 1979), 乾燥重量 1g 当りの菌数は  $10^{11}$  から  $10^{12}$  (1 兆) で菌の種類も 400 種を

越えると推定されている (Finegold *et al.*, 1974; Moore and Holdeman, 1974; Holdeman *et al.*, 1976; Drasar and Barrow, 1985)。その構成菌は *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bi-*

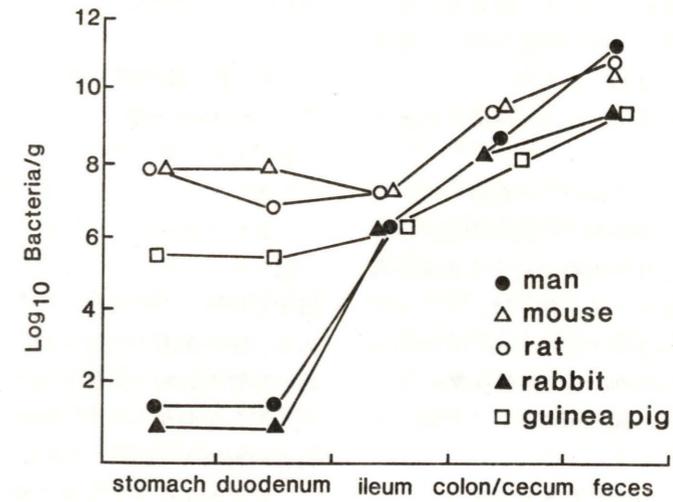


Fig. 2. ヒトおよび動物の消化管各部位の菌数 (Rawland *et al.*, 1985).  
ヒトでは菌数が著しく少ない胃や十二指腸でも、マウスやラットでは内容物 1g 当り約  $10^8$  の菌数であるのが特徴である。

*fidobacterium* などの嫌気性菌が最優勢であり、大腸菌のような好気性菌の 100 倍以上も存在していることが明らかになった (Table 1)。

ヒト消化管の部位による菌叢の違いを Fig. 1 に示した。消化管内の環境条件はそれぞれの部位により異なっているのでそれに最も適した菌種が増殖することになる。ヒトの唾液には 1ml 当り  $10^7$ - $10^8$  の細菌が生存し、その構成は嫌気性菌と

好気性菌がほぼ同数である。胃では空腹時に pH 3.0 以下までに低下し極めて菌数は少なく、*Lactobacillus* や *Streptococcus* などの耐酸性の菌が胃液 1ml 当り  $10^2$ - $10^8$  程度検出される。十二指腸や空腸など小腸上部では細菌はあまり増殖しないうちに小腸下部に送られ小腸下部で細菌数は増加する。これは腸液で腸内容物が中和され、通過時間も遅くなってきたためで空腹時でも常に 1g 当

Table 2. 化学物質に対する腸内菌の代謝活性 (Sheline, 1973)

1. Hydrolysis of glycosides	13. Heterocyclic ring fission
a. Glucuronide	a. O-containing ring system
b. Other glycosides	b. N-containing ring system
2. Hydrolysis of sulfate esters	14. Reduction of double bonds
3. Hydrolysis of amides	15. Reduction of nitro group
4. Hydrolysis of esters	16. Reduction of azo group
5. Hydrolysis of sulfamates	17. Reduction of aldehyde
6. Hydrolysis of nitrates	18. Reduction of ketones
7. Hydrolysis of peptides	19. Reduction of alcohols
8. Decarboxylation	20. Reduction of N-oxide
9. Dealkylation	21. Reduction of arsonic acids
a. O-alkyl compounds	22. Reduction of sulfoxides
b. N-alkyl compounds	23. Reduction of epoxide to olefins
c. Other alkyl derivatives	24. Aromatization
10. Dehalogenation	25. Nitrosamine formation
11. Deamination	26. Nitrosamine degradation
12. Dehydroxylation	27. Acetylation
a. C-hydroxyl compounds	28. Esterification
b. N-hydroxyl compounds	29. Methylation
	30. Ketone formation

り  $10^5-10^7$  の細菌が存在している。回盲弁を境として大腸では腸内菌叢の著しい変化が起こり細菌数は急激に上昇し  $10^{10}/g$  以上となる。ここにみられるのは嫌気性菌が最優勢でほとんど糞便菌叢と構成上では変りがない。

哺乳動物間での消化管各部位での菌数の違いを Fig. 2 に示した。この動物間での消化管部位における菌数の違いは、生体外異物に対する代謝を考える上で考慮する必要がある。例えば、マウスやラットのように胃とか小腸上部でも菌の定着がみられるような場合 (*Lactobacillus* が最優勢)、ヒトに比べて吸収される前に腸内菌によって代謝される可能性が高くなる。

腸内菌叢を構成する細菌は数も種類も多くヒト一人当たりではおよそ 100 兆もの細菌が住み着いているため多種多様な酵素活性を有しており、肝臓に存在する酵素の種類をはるかに上回り、活性も高いとされている。そして経口的に入った物質に対して直接的に作用する場合と、胆汁中に排泄された代謝産物に対して作用する場合とがある (Sheline, 1973; Goldman, 1978; Rowland *et al.*, 1985)。Table 2 に腸内菌の代謝活性の種類を列挙した。生体、特に肝臓での代謝が酸化と合成を主とし、グルクロン酸抱合や硫酸抱合あるいはグルタチオン抱合の様な水溶性の物質を生成するのに対して、腸内菌による代謝は還元と加水分解が主で、ニトロサミンやケトン合成の例を除けば合成はまれであって、非極性の脂溶性物質を生成するのが特徴である。

一方、腸内菌叢の代謝活性は、食事、薬物、ストレス、消化吸収や消化管通過速度などによって影響を受けることも知られている。例えば、Goldin ら (1978) は、ラットに高牛肉食または高穀物食を与えて腸内の nitroreductase, azoreductase,  $\beta$ -glucuronidase および  $\beta$ -glucosidase の酵素活性を測定し、高牛肉食で nitroreductase, azoreductase,  $\beta$ -glucuronidase 活性が高く、逆に高穀物食では  $\beta$ -glucosidase 活性が上昇することを明らかにした。また、ヒト糞便中の nitroreductase および  $\beta$ -glucuronidase 活性は、西洋食の方が菜食よりも高く、西洋食に *Lactobacillus* を添加すると低下することも報告されている (Gol-

din *et al.*, 1980)。

### 3. 腸内菌代謝の研究法

#### (1) *in vitro* 実験

腸内菌叢の取り扱いを成功させるためには、消化管内とできるだけ同じ条件を作り出す必要がある。試料は細菌の死滅を避けるために無酸素状態で取り出し、取り扱わなければならない。また使用する培地や希釈液中の溶存酸素の除去も重要である。腸内菌叢の代謝を調べる方法としては、動物の腸管内容物や糞便と調べようとする化学物質とを混合保温するのが一般的である。この場合、腸管内容物や糞便はできるだけ新鮮なものを用い、嫌気的条件下で十分に均一にした後、その一部をできるだけ早く使用することが望ましい。一度凍結したものは生菌数が減少し、また酵素活性の低下がみられる場合があるので、細菌学的または生化学的分析には用いない方がよい。反応中も azoreductase (Mason *et al.*, 1977) や nitroreductase (Mason and Holtzmann, 1975; Kinouchi and Ohnishi, 1983) などの酵素は酸素存在下で活性低下がみられるので窒素ガスなどを吹き込み、嫌気的条件下で行うことが大切である。また緩衝液を使用する場合、その水素イオン濃度は生体内での試料水素イオン濃度に近い値を用いる。糞便とか盲腸内容物の場合、水素イオン濃度は 6.0-7.6 である (Coates *et al.*, 1988)。また腸内菌を分離し、その純培養菌液または無細胞抽出液を用いて化学物質と反応させる方法もある。この場合には、その菌の活性は生体内では他に存在する菌とか宿主の生理的要因により修飾されている可能性があることを考えておかねばならない。

#### (2) *in vivo* 実験

生体内でのある酵素活性に腸内菌叢が関与しているかどうかを調べる方法として以下の3つが考えられる。

##### ① 化学物質の投与経路による比較

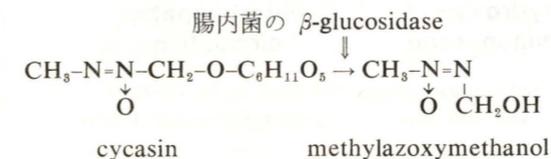
経口投与と他の投与経路、腹腔内投与や静脈内投与による代謝産物や毒性発現を比べる方法である。経口投与以外は腸内菌の関与が少ないと考えての実験であり、tartrazine (Jones *et al.*, 1964) や Brown FK (Grasso and Goldberg, 1968) な

どのアゾ化合物において良い結果を得ている。しかし、この方法では細菌の酵素による代謝なのか生体側の酵素による代謝なのかをはっきりと区別しにくいことが問題である。経口投与以外でも腸管へは胆汁を介してあるいは腸管粘膜 (entero-entero circulation) より排泄され、腸内菌によって代謝を受けるので完全な腸管を経ないバイパスにはなっていないからである。

##### ② ノトバイオート (無菌動物を含む) と通常動物の比較

ノトバイオート (gnotobiot) とはギリシャ語の gnotos (知られたる known の意) と biota (生物, 生命 life の意) を結び付けた言葉である。微生物を完全に持っていない動物を無菌動物、1種類以上の既知の微生物を持っている動物をノトバイオートと呼び分けることもある。

この技術を用いて腸内菌の役割を鮮やかに証明した例として cycasin (methylazoxymethanol- $\beta$ -D-glucoside) の毒性発現実験がある。無菌ラットと通常ラットに cycasin 200 ppm を含む飼料を与えると通常ラットでは 20 日以内に半数以上が死亡したのに対して無菌ラットでは無害であった。さらに長期投与で通常ラットでは癌が多発したが無菌ラットではそのような癌はみられないことも明らかにされた (Laqueur *et al.*, 1967)。また代謝産物の比較から、無菌動物では cycasin からその毒性を発現する aglycon 部分である methylazoxymethanol に変換できないことも示された (Spatz *et al.*, 1966)。ここで無菌ラットに  $\beta$ -glucosidase を持った細菌と持たない細菌を投与して作り出した単一菌株ノトバイオートに cycasin を投与すると、 $\beta$ -glucosidase 活性を持つ菌株を投与した動物にのみ cycasin を加水分解することが明らかにされ (Spatz *et al.*, 1967), cycasin の毒性発現は  $\beta$ -glucosidase 活性を持つ腸内菌によって初めて発現されることが示唆された (下図参照)。



また、我々も環境変異原物質 1-nitropyrene (1-NP) の生体内代謝を調べ、無菌ラットではその代謝産物中に 1-NP の還元代謝産物が検出されないことから肝臓ではほとんどニトロ還元反応は行われず (Kinouchi *et al.*, 1986; Ohnishi *et al.*, 1986; 大西・木内, 1985; 大西ら, 1988), 腸管内細菌、特に最優勢の嫌気性菌によってニトロ還元反応は行われていることを示した (Kinouchi *et al.*, 1982; Ohnishi *et al.*, 1983; 大西ら, 1988)。

##### ③ 抗生物質投与動物と通常動物の比較

抗生物質処理は、方法も簡単で無菌動物を取り扱う場合に必要ないアイソレーターも必要ないのでよく利用されている。抗生物質での前処理後に化学物質の投与実験を行い、抗生物質処理動物で代

Table 3. 実験に使用した抗生物質 (Kinouchi *et al.*, 未発表)

実験群	抗生物質	体重 1 kg 当りの投与量
I	None (Saline)	—
II	Bacitracin	200 mg
	Neomycin	200 mg
	Streptomycin	200 mg
III	Bacitracin	400 mg
	Neomycin	400 mg
	Tetracycline	200 mg
IV	Neomycin	500 mg
V	Kanamycin	250 mg
VI	Kanamycin	200 mg
	Erythromycin	200 mg
VII	Kanamycin	200 mg
	Lincomycin	200 mg
	Tetracycline	200 mg

抗生物質投与は、1日に2回、5日間行い、最終投与より4時間後に化学物質を投与した。

Table 4. 抗生物質処理したマウスの下部腸管内細菌の生菌数の変化 (Kinouchi *et al.*, 未発表)

実験群	生菌数 (対数表示)	
	好気培養	嫌気培養
I	8.83±0.09	10.00±0.08
II	3.47±0.19**	3.13±0.19**
III	2.70±0.10**	2.15±0.15**
IV	5.00±0.14**	9.67±0.19
V	6.80±0.30**	9.55±0.05
VI	5.73±0.17**	7.33±0.31**
VII	3.20±0.36**	2.43±0.19**

\*\* 対照群 I との間で有意差有り (P<0.01)

謝産物が減少すれば主として腸内菌がその酵素反応を司っていたと考える。抗生物質投与を中止すると腸管の菌は速やかに増加してくるし、滅菌水や滅菌食を与える方が菌の再定着が遅れるので (Rowland *et al.*, 1980), 実験期間中は飼育環境の清掃と抗生物質投与を続け、滅菌水及び滅菌食を与えるべきである。ただし、この時に抗生物質によって実験動物が下痢をしていたり、抗生物質がその化学物質と反応したりして、化学物質の吸収が悪いときにも同じ様な結果がでるので注意し

なければならない。アミノグリコシド系抗生物質の単独投与によって腸内菌を消失させたつもりでその抗生物質処理動物を実験に使用している例を論文などで見かけることがあるが、アミノグリコシド系抗生物質は嫌気性菌や嫌気的に増殖中の通性嫌気性菌には効果がない (Sheline, 1973; Boxenbaum *et al.*, 1979; Bryan *et al.*, 1979; Hecht *et al.*, 1989) ので、本当に腸内菌の代謝を抑えているのかどうか疑問である。また腸管からの吸収の少ない抗生物質を使用し、生体への影響を少な

Table 5. 抗生物質処理による下部腸管内容物の酵素活性の変化 (Kinouchi *et al.*, 未発表)

実験群	$\gamma$ -Glutamyltransferase (nmol/min/mg)	Aminopeptidase (nmol/min/mg)	$\beta$ -Glucuronidase ( $\mu$ g/hr/mg)	$\beta$ -lyase (nmol/min/mg)	Nitroreductase ( $\mu$ g/hr/mg)
I	8.2 $\pm$ 0.7	4.6 $\pm$ 1.5	74.8 $\pm$ 16.8	9.5 $\pm$ 3.0	1.1 $\pm$ 0.2
II	8.0 $\pm$ 2.1	4.7 $\pm$ 1.5	6.2 $\pm$ 2.0*	0.3 $\pm$ 0.2*	0.07 $\pm$ 0.02*
III	13.6 $\pm$ 0.9	6.1 $\pm$ 2.3	9.2 $\pm$ 0.8*	0.6 $\pm$ 0.4*	0.02 $\pm$ 0.01*
IV	8.2 $\pm$ 1.7	4.6 $\pm$ 1.2	5.8 $\pm$ 1.2*	1.6 $\pm$ 0.2*	0.4 $\pm$ 0.04
V	10.2 $\pm$ 1.5	3.6 $\pm$ 0.5	18.1 $\pm$ 3.5*	5.8 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.02
VI	12.7 $\pm$ 4.9	7.6 $\pm$ 2.4	7.2 $\pm$ 1.0*	0.3 $\pm$ 0.1*	0.08 $\pm$ 0.1*
VII	7.3 $\pm$ 1.2	2.9 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 1.3*	0.3 $\pm$ 0.1*	0.03 $\pm$ 0.02*

\* 対照群 I との間に有意差有り (P<0.05)

$\gamma$ -glutamyltransferase, aminopeptidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -lyase および nitroreductase 活性は、それぞれ Orłowski *et al.*, (1963), Rankin *et al.*, (1980), Goldin and Gorbach (1976), Tomisawa *et al.*, (1984) および Kinouchi *et al.*, (1986) の方法にしたがって測定した。

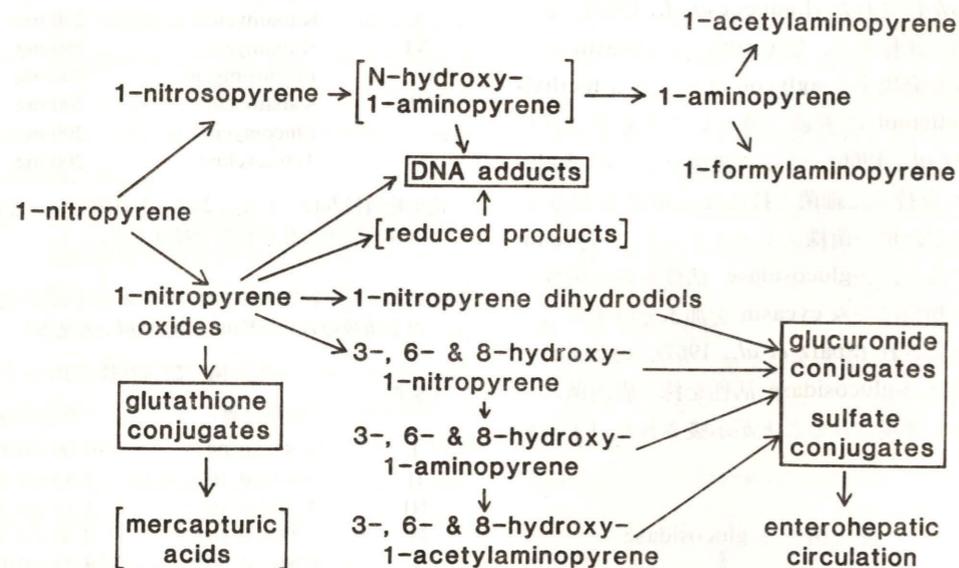


Fig. 3. 1-nitropyrene の生体内での代謝活性化および不活性化の代謝経路 (Ohnishi *et al.*, 1990a). 1-nitropyrene の還元代謝活性化体は N-hydroxy-1-aminopyrene であり、酸化活性化体は 1-nitropyrene oxides だと考えられている。

くすることも大切である。

我々は各種抗生物質 (Table 3) をマウスに 5 日間、1 日 2 回胃内にゾンデで投与し、生菌数および腸管内の酵素活性の変化を測定した。IV 群および V 群のアミノグリコシド系抗生物質の単独投与では対照群 I に比べて好気性菌の減少には有意差がみられたが、嫌気性菌の菌数変化には有意差がみられず、腸管内の優勢菌である嫌気性菌には効果がないことを示している (Table 4)。また下部腸管内容物の各種酵素活性を粗抽出液を用いて比較すると、主に生体側に由来する酵素である  $\gamma$ -glutamyltransferase と aminopeptidase の酵素活性にはどの抗生物質処理群でも影響を与えなかった。また細菌由来の酵素の中では  $\beta$ -glucuronidase 活性はどの抗生物質処理でも減少したが、嫌

気性菌が強い活性を持つ nitroreductase と  $\beta$ -lyase 活性はアミノグリコシド系抗生物質の単独投与では有意に減少しなかった (Table 5)。またどの抗生物質処理群でもトリチウムラベルしたグルコースの腸管からの吸収および肝臓の酵素活性には影響しなかった (data not shown)。以上の結果および腸管からの抗生物質の吸収がないことから、第 II 群の抗生物質処理がよいと考えている。

その他に肝臓の酵素の合成を促進する誘導因子を前処理として動物に投与したり、合成を阻害する物質で処理した後、化学物質を投与する方法もある。代謝産物が増加あるいは減少すれば主たる反応は肝臓で行われており、変化がなければ主たる反応は腸内菌あるいは他の臓器によって行われていることになる。

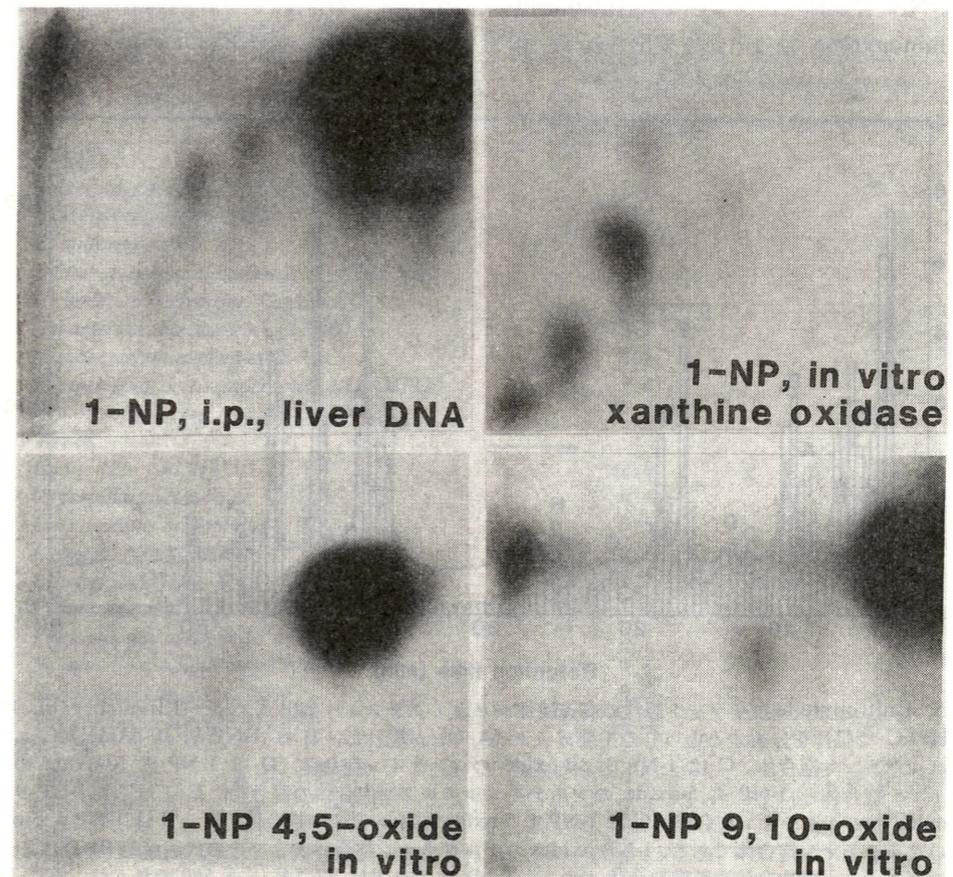


Fig. 4. 1-nitropyrene 投与マウスの肝臓での DNA 付加体 (Kinouchi *et al.*, 未発表). 1-nitropyrene 投与マウスより抽出した DNA への付加体は 1-NP oxides の *in vitro* で合成した DNA 付加体と同じ挙動を示した。還元代謝活性化体由来の DNA 付加体はほとんど検出されなかった。

4. 1-nitropyrene をモデル化合物としての腸肝循環, 特にグルタチオン抱合体の代謝について

(1) 肝臓での活性化と抱合体の形成

1-nitropyrene (1-NP) の代謝活性化経路としては, ニトロ基の還元とピレン環の酸化反応が考えられている (Fig. 3, Rozenkranz and Mermelstein, 1985; Beland *et al.*, 1985; Tokiwa and Ohnishi, 1986)。どちらの代謝経路が実際に生体内で重要な役割を果たしているのかを 1-NP を投与したマウスより DNA を抽出して DNA 付加体を <sup>32</sup>P-ポストラベル法 (Randerath *et al.*, 1985; Gupta, 1985; 山下, 1988) で調べた。その結果, 1-NP 投与動物での DNA 付加体は *in vitro* で合成した 1-NP oxides (1-NP の K-region epoxide) の DNA 付加体と同じ挙動を示した。また 1-NP の還元 DNA 付加体である N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene はほとんど検出されず, 生

体内での主要な DNA 付加体は酸化的活性化体によると考えられた (Fig. 4)。ただし, 毒性発現に, この主要な DNA 付加体が関与しているとは限らないことは注意しておく必要がある。

グルタチオンは, 生体内に広く分布するトリペプチドであり, エポキシドなどの親電子化合物と酵素的または非酵素的に反応してグルタチオン抱合体を生成する (Chasseaud, 1979; Sinsheimer *et al.*, 1987)。エポキシドを活性本体とする物質のグルタチオン抱合の例として aflatoxin B1 (Degan and Neumann, 1978; Lotlikar *et al.*, 1984), benzo[a]pyrene (Cooper *et al.*, 1980; Hernandez *et al.*, 1980) および styrene (Watabe *et al.*, 1983) などがある。当然 1-NP oxides もグルタチオン抱合体として胆汁中に解毒排泄されるはずである。我々は 1-NP 投与ラットの胆汁を分析し, 胆汁中の 21.4% がグルタチオン抱合体およびその代謝産物 (システイニルグリニンおよびシステ

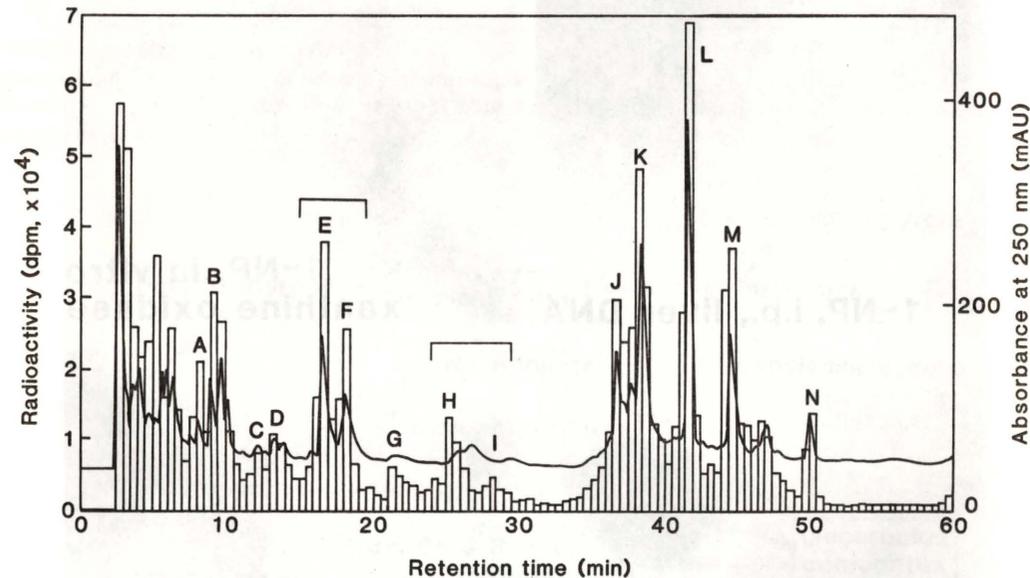


Fig. 5. 1-nitropyrene 投与ラット胆汁の高速度液体クロマトグラフィー溶出パターン (Kinouchi *et al.*, 1990)。HPLC で胆汁を分析すると 14 の主要ピーク (A-N) が現れた。B は 1-NP 9, 10-oxide のシステイニルグリニン抱合体, C は 1-NP 9, 10-oxide のシステイン抱合体, D は 1-NP 9, 10-oxide のシステイン抱合体と 1-NP 4, 5-oxide のシステイニルグリニン抱合体の混合物, E と F は 1-NP 9, 10-oxide のグルタチオン抱合体, G は 1-NP 4, 5-oxide のシステイン抱合体, H と I は 1-NP 4, 5-oxide のグルタチオン抱合体である。1-NP oxides のグルタチオン抱合体およびその代謝産物 (B-I) は 21.4% でグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体 (ピーク J-M) はそれぞれ 27.5% と 5.5% であった。また 1-NP 9, 10-oxide のグルタチオン抱合体の方が 1-NP 4, 5-oxide のグルタチオン抱合体より多いのは, 1-NP 4, 5-oxide が epoxide hydrolase により 1-NP 9, 10-oxide よりもよく分解され, 1-nitropyrene-4, 5-dihydrodiol となりグルクロン酸抱合されるためである。

イン抱合体)であることを明らかにした。その他の 3/6/8-nitropyrenols や 1-nitro-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene などのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体はそれぞれ 27.5% と 5.5% であった (Fig. 5)。

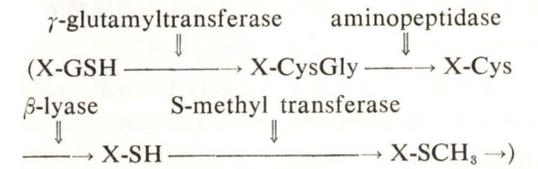
(2) 抱合体の腸管内での代謝

(i) グルタチオン抱合体の分解活性

我々は, 1-NP 投与ラット胆汁中のグルクロン酸や硫酸抱合体は腸内菌の持つ  $\beta$ -glucuronidase や arylsulfatase によって aglycon を遊離し, 胆汁の変異原性を上昇し, さらにその代謝産物は再吸収される可能性について報告した (Kinouchi *et al.*, 1987)。

グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体では脱抱合によって抱合されている物質と同じ生成物が遊離し

てくるのに比べて, グルタチオン抱合体の場合は, その代謝によって生成物が異なってくるので興味ある対照となる。下にグルタチオン抱合体の一般的代謝経路を示した。



グルタチオン抱合体の分解活性を各種腸管内容物で調べると小腸内容物に強い活性があり, 下部腸管には強い活性はなかった。小腸内でのグルタチオン抱合体の代謝を調べると, まずグルタチオン抱合体の減少にともなってシステイニルグリニン抱合体が上昇し, 次いでシステイニルグリニン抱

Table 6. 各種嫌気性菌および好気性菌, 腸管粘膜, 胆汁および唾液による 1-ニトロピレンオキシドのシステイン抱合体の分解活性 (Kinouchi *et al.*, 1990)

粗抽出液または試料	$\beta$ -lyase 活性 (nmol/hr/mg of protein)	
	1-NP 4, 5-oxide-Cys	1-NP 9, 10-oxide-Cys
嫌気性菌		
<i>Bacteroides fragilis</i> GAI0624	1.5	2.2
<i>B. thetaiotaomicron</i> 5482	0.6	1.2
<i>B. uniformis</i> 0061	5.6	3.9
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC15703	1.6	1.7
<i>Clostridium perfringens</i> GAI0668	0.1	1.7
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC8480	175.7	135.4
<i>Fusobacterium nucleatum</i> F-1	6.4	19.3
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC27337	5.4	7.8
<i>Peptostreptococcus magnus</i> GAI0663	58.3	1554.3
好気性菌		
<i>Escherichia coli</i> W3110	32.8	4.3
<i>Krebsiella pneumoniae</i> KUB13	0.4	N. D.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC4356	0.5	0.2
<i>L. brevis</i> ATCC8287	0.1	N. D.
<i>L. casei</i> IAM1043	4.2	3.4
<i>Proteus mirabilis</i> KUB22	1.8	3.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UTC55	0.7	0.5
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	0.4	0.4
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	0.6	0.3
<i>Streptococcus faecalis</i> UTB74	24.2	16.5
腸管粘膜		
小腸 (上部)	0.1	N. D.
小腸 (下部)	0.4	1.5
盲腸	N. D.	0.4
大腸	0.5	0.9
胆汁	0.7	2.5
唾液	N. D.	0.1

N. D., Not detected.

合体がシステイン抱合体へと変換されることがわかった (Kinouchi *et al.*, 1990)。またその分解活性を各種好気性菌及び嫌気性、腸管粘膜、胆汁および腭液について測定すると、腭液が著しく強い活性を示した。また腸管粘膜や小腸内の優勢菌、*Lactobacillus* などには強い活性がなかったことから、小腸内でのグルタチオン抱合体の分解には腭液が重要な役割を果たしているものと考えられた (Kinouchi *et al.*, 1990)。

### (ii) システイン抱合体の分解活性

胆汁中に排泄されたグルタチオン抱合体は小腸内でシステイン抱合体にまで代謝されて下部腸管へ移行するので、システイン抱合体の分解活性を各種腸管内容物で測定した。その結果、システイン抱合体の分解活性は盲腸及び大腸内容物が強く、小腸内容物にはないことがわかった (Kinouchi *et al.*, 1990)。その分解活性は、システイン抱合体  $\beta$ -lyase の阻害剤 aminooxyacetic acid の添加で 90% 以上阻害された。この酵素活性 ( $\beta$ -lyase) を各種好気性菌および嫌気性菌、腸管粘膜、胆汁および腭液について測定すると、腸内菌叢に由来していることがわかった。特に *Eubacterium limosum* と *Peptostreptococcus magnus* が強い活性を持っていた。また一般に嫌気性菌の方が好気性菌よりも高い活性を示した (Kinouchi *et al.*, 1990, Table 6)。

### (iii) グルタチオン抱合体の腸管からの吸収

1-NP oxides がグルタチオン抱合体として腸管より吸収されずに糞便中へ排泄されれば生体にとっては完全な解毒となる。そこでトリチウムラベルした 1-NP oxides のグルタチオン抱合体を上記 II 群の抗生物質処理マウスおよび無処理のマウスに経口投与し、腸管からの吸収はあるのか、腸内菌叢の関与はどうかを検討した。抱合体投与後、経時的に血中の放射能を測定した。抗生物質無処理マウスでは放射能レベルは上昇し、2~3 時間後に最高値を示したのち減少したが、抗生物質処理マウスでは血中放射能濃度の上昇は少なく (data not shown)、腸管からの吸収に腸内菌叢の関与が明らかになった。また、尿中へは 48 時間で無処理マウスは 1-NP 4,5-oxide のグルタチオン抱合体を投与した場合、投与量の 19.6% を、

また、1-NP 9,10-oxide のグルタチオン抱合体を投与した場合、投与量の 21.5% を排泄したが、抗生物質処理マウスではそれぞれ 0.38% と 2.0% であった。

### 5. グルタチオン抱合体の活性化

胆汁中へ排泄された抱合体のうち、グルクロン酸抱合体は腸内菌叢の持つ  $\beta$ -glucuronidase によって加水分解され、その活性 aglycon が遊離し、毒性が上昇するということがすでに報告されている (Morotomi *et al.*, 1985; Kinouchi *et al.*, 1987; Kinoshita and Gelboin, 1978; Weisburger *et al.*, 1970)。グルタチオン抱合体については、反応性に富んだ毒性物質の、より安定な水溶性物質への変換という解毒機構としてこれまで位置づけてきたが、最近本反応により逆に活性化を受ける化合物が報告されている (Anders *et al.*, 1988; Dekant *et al.*, 1987)。1-NP oxides のグルタチオン抱合体は未抱合物質に比べて著しく変異原性が減少し、1/150 以下になった。しかしシステイン抱合体にまで代謝されるとその変異原性はグルタチオン抱合体の 10 倍以上の値を示した。さらに、 $\beta$ -lyase の添加により変異原性の上昇がみられ、 $\beta$ -lyase の阻害剤である aminooxyacetic acid の添加で変異原性は抑制された (Ohnishi *et al.*, 1990b)。

このことは、一度解毒されたグルタチオン抱合体は腸内での代謝過程で腸内菌によって再活性化されることを示している。

### 6. おわりに

変異・癌原物質の毒性発現や発癌メカニズムの解明に関する大部分の研究は、主として哺乳動物を使った *in vivo* の実験か、哺乳動物の各種臓器や細胞、さらに分子レベルの実験によって行われている。特に変異・癌原物質の生体内代謝を考える場合、重要な代謝系である腸管での腸内菌叢の酵素活性がしばしば無視されがちである。

腸内菌叢は生体内において単に寄生体として末端に位置するのではなく、機能者として位置していることが生体における化学物質代謝への関与という点からも理解できると思う。腸内菌叢は構成

菌の種類および菌数などから肝臓よりも酵素の種類も多く、活性も強いとされていることから、また重量的にも肝臓に次ぐ重さであることから大切な“臓器”の一つと考えられる。また、Ames 試験の反応系に糞便の抽出液 (fecalase) を添加する方法が提案され、この方法の導入により、rutin, quercitrin などのグルコシドおよびこれらを含む赤ワインや紅茶の変異原性が証明されている (Tamura *et al.*, 1980)。

以上 1-NP を中心として述べてきたが、同様の代謝経路を經るとされる多くの多環芳香族炭化水素類やニトロ化合物の研究に少しでも参考になれば幸いである。

### 7. 謝 辞

この研究の一部は文部省科学研究費補助金および厚生省がん研究助成金の援助を受けた。動物実験については徳島大学中坊幸弘博士からの助言を受けた。また、*p*-bromophenyl-cysteine はアップジョン筑波研究所の立石満博士より、ラット腎臓より精製した  $\gamma$ -glutamyltransferase および aminopeptidase N は、徳島大学松田佳子教授より分与を受けた。ここに記して深甚なる謝意を表する次第である。

### 参 考 文 献

- Anders, M. W., L. Lash, W. Dekant, A. A. Elfarra and D. R. Dohn (1988) Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **18**, 311-341.
- Beland, F. A., R. H. Heflich, P. C. Howard and P. P. Fu (1985) The *in vitro* metabolic activation of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons. In: R. G. Harvey (Ed.), *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 371-196.
- Boxenbaum, H. G., I. Bekersky, M. L. Jack and S. A. Kaplan (1979) Influence of gut microflora on bioavailability. *Drug Metab. Rev.*, **9**, 259-279.
- Bryan, L. E., S. K. Kowand and H. M. van den Elzen (1979) Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **15**, 7-13.
- Chasseaud, L. F. (1979) The role of glutathione and glutathione S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents.

*Adv. Cancer Res.*, **29**, 207-274.

- Coates, M. E., B. S. Drasar, A. K. Mallett and I. R. Rowland (1988) Methodological consideration for the study of bacterial metabolism. In: I. R. Rowland (Ed.), *Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer*, Academic Press, London, pp. 1-21.
- Cooper, C. S., A. Hewer, O. Ribeiro, P. L. Gover and P. Sims (1980) The enzyme-catalysed conversion of anti-benzo [a] pyrene-7, 8-diol 9, 10-oxide into a glutathione conjugate. *Carcinogenesis*, **1**, 1075-1080.
- Degan, G. H. and H.-G. Neumann (1978) The major metabolites of aflatoxin B1 in the rats is a glutathione conjugate. *Chem.-Biol. Interact.*, **22**, 239-255.
- Dekant, W., L. H. Lash and M. W. Anders (1987) Bioactivation mechanism of cytotoxic and nephrotoxic S-conjugate S-(2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl)-L-cysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7445-7447.
- Drasar, B. S. and P. A. Barrow (1985) The bacterial flora of the normal intestine. In: B. S. Drasar and B. S. Barrow (Eds.), *Intestinal Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 19-41.
- Finegold, S. M., H. R. Attebery, V. L. Sutter (1974) Effect of diet on human fecal flora: Comparison of Japanese and American diet. *J. Clin. Nutr.*, **27**, 1456-1469.
- Goldin, B. R., J. Dwyer, S. L. Gorbach, W. Gordon and L. Swenson (1978) Influence of diet and age on fecal bacterial enzymes. *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 136-140.
- Goldin, B. R. and S. L. Gorbach (1976) The relationship between diet and rat fecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**, 371-375.
- Goldin, B. R., L. Swenson, J. Dwyer, M. S. Sexton and S. L. Gorbach (1980) Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements of human fecal bacterial enzymes. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 255-261.
- Goldman, P. (1978) Biochemical pharmacology of the intestinal flora. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **18**, 523-539.
- Grasso, P. and L. Goldberg (1968) Problems confronted and lessons learnt in the safety evaluation of Brown FK. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **6**, 737-747.
- Gupta, R. C. (1985) Enhanced sensitivity of <sup>32</sup>P-post-labeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts. *Cancer Res.*, **45**, 5656-5662.
- Hecht, D. W., M. H. Malamy and F. P. Tally (1989) Mechanism of resistance and resistance transfer in anaerobic bacteria. In: S. M. Finegold and W. L. George (Eds.), *Anaerobic Infection in Humans*, Academic Press Inc., San Diego, pp. 755-769.
- Hernandez, O., M. Walker, R. H. Cox, G. L. Fourman, B. R. Smith and J. R. Bend (1980) Regio-

- specificity and stereospecificity in the enzymatic conjugation of glutathione with ( $\pm$ )-benzo[a]pyrene 4, 5-oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 1494-1502.
- Holdemann, L. V., I. J. Good and W. E. C. Moore (1976) Human fecal flora: Variation in bacterial composition within individuals and possible effect of emotional stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 359-375.
- Jones, R., A. J. Ryan and S. E. Wright (1964) The metabolism and excretion of tartrazine in the rat, rabbit and man. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **2**, 447-452.
- 加藤隆一 (1983) 薬物代謝酵素と薬物の薬効・毒性、薬物代謝の比較生化学 (加藤隆一, 鎌滝哲也 編), 清至書院, pp. 3-20.
- Kinoshita, N. and H. V. Gelboin (1978)  $\beta$ -glucuronidase catalyzed hydrolysis of benzo [a] pyrene-3-glucuronide and binding to DNA. *Science*, **199**, 307-311.
- Kinouchi, T., Y. Manabe, K. Wakisaka and Y. Ohnishi (1982) Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria. *Microbiol. Immunol.*, **26**, 993-1005.
- Kinouchi, T., M. Morotomi, M. Mutai, E. K. Fifer, F. A. Beland and Y. Ohnishi (1986) Metabolism of 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **77**, 356-369.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1987) *In vitro* intestinal microflora-mediated metabolism of biliary metabolites from 1-nitropyrene-treated rats. *Microbiol. Immunol.*, **31**, 1145-1159.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Biliary excretion of glutathione conjugates of 4, 5-epoxy-4, 5-dihydro-1-nitropyrene and 9, 10-epoxy-9, 10-dihydro-1-nitropyrene in rats administered 1-nitropyrene orally and their further metabolism in the intestinal tract. *Carcinogenesis*, **11**, 1381-1387.
- Kinouchi, T. and Y. Ohnishi (1983) Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. *Appl Environ. Microbiol.*, **46**, 596-604.
- Kinouchi, T., and Y. Ohnishi (1986) Metabolic activation of 1-nitropyrene and 1, 6-dinitropyrene by nitroreductases from *Bacteroides fragilis* and distribution of nitroreductase activity in rats. *Microbiol. Immunol.*, **30**, 979-992.
- Laqueur, G. L., E. G. McDaniel and H. Matsumoto (1967) Tumor reduction in germfree rats with methylazoxymethanol (MAM) and synthetic MAM acetate. *J. Natl. Cancer Inst.*, **39**, 355-371.
- Lotlikar, P. D., E. C. Jhee, S. M. Insetta and M. S. Clearfield (1984) Modulation of microsome-mediated aflatoxin B1 binding to exogenous and endogenous DNA by cytosolic glutathione S-transferases in rat and hamster livers. *Carcinogenesis*, **5**, 269-276.
- Mason, R. P., F. J. Peterson and J. L. Holtzman (1977) The formation of an azo anion free radical metabolite during the microsomal reduction of sulfonazo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 532-536.
- Mason, R. P. and J. L. Holtzman (1975) The role of catalytic superoxide formation in the O<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1267-1275.
- 光岡知足 (1980) 腸内菌の生態, 腸内菌の世界——嫌気性菌の分離と同定——, (光岡知足 編) 叢文社, 東京, pp. 13-41.
- Moore, W. E. C. and V. L. Holdman (1974) Human fecal flora: The normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.*, **27**, 961-979.
- Morotomi, M., N. Nanno, T. Watanabe, T. Sakurai and M. Mutai (1985) Mutagenic activation of biliary metabolites of 1-nitropyrene by intestinal microflora. *Mutation Res.*, **149**, 171-178.
- 大西克成, 木内武美 (1985) 環境中におけるニトロピレンの存在およびその代謝. *代謝*, **22**, 725-734.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, Y. Manabe and K. Wakisaka (1983) Environmental aromatic nitrocompounds and their bacterial detoxification. In: M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, N. Chernoff and S. Nesnow (Eds.), *Short-Term-Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*, Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 527-539.
- 大西克成, 木内武美, 西藤佳子 (1988) 腸内菌によるニトロ化合物の代謝, 光岡知足 編, 腸内フローラの代謝. 学会出版センター, 東京, pp. 189-216.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, E. K. Fifer and F. A. Beland (1986) Metabolism of mutagenic 1-nitropyrene in rats. In: N. Ishinishi, A. Koizumi, R. O. McClellan and W. Stöber (Eds.), *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, pp. 171-183.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, E. K. Fifer, F. A. Beland, T. Kanoh, M. Fukuda and I. Mizoguchi (1990a) Metabolic formation and inactivation of 1-nitropyrene oxides and the effect of pyrene administration during nitrogen dioxide exposure on the formation of 1-nitropyrene metabolites. In: M. Cooke, K. Loening and J. Merritt (Eds.), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Measurements, Means and Metabolism*, Battelle Press, Columbus, Ohio, in press.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, K. Miyanishi, T. Kanoh and M. Hukuda (1990b) Metabolism of 1-nitropyrene oxides and effect of nitrogen dioxide on arene activation. In: S. S. Hecht, F. A. Beland and P. C. Howard (Eds.), *Occurrence, Metabolism and Biological Impact of Nitroarenes*, Plenum Publishing Corp., New York, in press.
- Orlowski, M. and A. Meister (1963)  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of L- and D- $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase activities. *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 679-681.
- Randerath, K., E. Randerath, H. P. Agrawal, R. C. Gupta, K. M. Schurdak and M. V. Reddy (1985) Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environ. Health Perspect.*, **62**, 57-65.
- Rankin, B. B., T. M. McIntyre and N. P. Curthoys (1980) Brush border membrane hydrolysis of S-benzylcysteine-p-nitroanilide, an activity of aminopeptidase M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 991-996.
- Rowland, I. R., M. J. Davies and J. G. Evans (1980) Tissue content of mercury in rats given methylmercuric chloride orally: influence of intestinal flora. *Arch. Environ. Health*, **35**, 135-160.
- Rowland, I. R., A. K. Mallett and A. Wise (1985) The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **16**, 31-103.
- Rosenkranz, H. S. and R. Mermelstein (1985) The genotoxicity, metabolism and carcinogenicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Sci. Health*, **C3**, 221-272.
- Sheline, R. R. (1973) Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacol. Rev.*, **25**, 451-523.
- Sinsheimer, J. E., van den Eeckhout, B. H. Hooberman and V. G. Beylin (1987) Detoxication of aliphatic epoxides by diol formation and glutathione conjugation. *Chem.-Biol. Interact.*, **63**, 75-90.
- Spatz, M., E. G. McDaniel and G. L. Laqueur (1966) Cycasin excretion in conventional and germfree rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**, 417-422.
- Spatz, M., D. W. E. Smith, E. G. McDaniel and G. L. Laqueur (1967) The role of intestinal microorganisms in determining cycasin toxicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124**, 691-697.
- Stephen, A. M. and J. H. Cummings (1979) The microbial contribution to human faecal mass. *J. Med. Microbiol.*, **13**, 45-56.
- Tamura, G., C. Gold, A. Ferro-Luzzi and B. N. Ames (1980) A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4961-4965.
- Tomisawa, H., S. Suzuki, S. Ichihara, H. Fukazawa and M. Tateishi (1984) Purification and characterization of C-S lyase from *Fusobacterium varium*: a C-S cleavage enzyme of cysteine conjugates and S-containing amino acids. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2588-2593.
- Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60.
- Watabe, T., N. Ozawa and A. Hiratsuka (1983) Studies on metabolism and toxicity of styrene. VI Regioselectivity in glutathione S-conjugation and hydrolysis of racemic R- and S-phenylloxiranes in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 777-785.
- Weisburger, J. H., P. H. Grantham, R. E. Horton and E. K. Weisburger (1970) Metabolism of the carcinogen N-hydroxy-N'-2-fluorenylacetamide in germfree rats. *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 151-162.
- 山下克美 (1988) <sup>32</sup>P-ポストラベル法, トキシコロジーフォーラム, **11**, 71-80.

## 化学物質のリスクアセスメント確立のための 第2回日米学会議

—リスクアセスメント手法等の改善と確立に関する研究—

国立衛生試験所 変異遺伝部 石 館 基, 祖父尼俊雄

環境化学物質に対する毒性試験の諸問題に関する第1回目の日米合同会議が昨年度開催され、信頼性の確保された毒性試験の実施と評価、それらに関する情報の相互利用の促進、化学物質のリスク評価に関する国際的ネットワークの確立などを

目的として論議がなされた。本年度は、引続き第2回目の日米合同会議が米国 North Carolina, Research Triangle Park にある National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS, 環境保健衛生研究所) において、平成2年4月2

表1 第2回日米学会議参加者リスト

### 米国側

Dr. David P. Rall  
Director, National Institute of Environmental Health Sciences

Dr. Richard A. Griesemer  
Director, Division of Toxicology and Research Testing, National Institute of Environmental Health Sciences

Dr. Terri Damstra  
Assistant to the Director, National Institute of Environmental Health Sciences

Dr. Raymond W. Tennant  
Chief, Cellular and Genetic Toxicology Branch, National Institute of Environmental Health Sciences

Dr. Michael D. Shelby  
Head, Mammalian Mutagenesis Group, Cellular and Genetic Toxicology Branch, National Institute of Environmental Health Sciences

Dr. Errol Zeiger  
Head, Environmental Mutagenesis Group, Cellular and Genetic Toxicology Branch, National Institute of Environmental Health Sciences

Ms Beth Anderson  
Cellular and Genetic Toxicology Branch, National Institute of Environmental Health Sciences

Dr. David Jacobson-Kram  
Genetic Toxicology Division, Microbiological Associates Inc.

Dr. Sheila M. Galloway  
Merck Sharp and Dohme Research Laboratories

Dr. A. K. Thilagar  
SITEK Reserch Laboratories

Dr. Donald L. Putman

Genetic Toxicology Division, Microbiological Associates Inc.

Dr. N. Sabharwal  
Environmental Health Research and Testing

Dr. J. P. Wojciechowski  
Environmental Health Research and Testing

Dr. James Ivett  
Hazleton Laboratories America Inc.

Dr. Richard Marshall  
Microtest Research Ltd.

### 日本側

Dr. Motoi Ishidate, Jr.  
Head, Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences

Dr. Yuji Kurokawa  
Head, Division of Toxicology, National Institutes of Hygienic Sciences

Dr. Toshio Sofuni  
Section Chief, Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Science

Dr. Takehiko Nohmi  
Section Chief, Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences

Dr. Junko Momma  
Senior Researcher, Division of Toxicology, National Institute of Hygienic Sciences  
(at present: Visiting Research Fellow, Chemical Pathology Branch, National Institute of Environmental Health Sciences)

Dr. O. Hirai  
Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd.  
(at present: Integrated Laboratory Systems)

日より4月6日にわたって行われた。

米国側の出席者は合計15名(英国1名を含む)、日本側からの出席者は6名の合計21名である(Table 1)。今回の会議では、両国での遺伝毒性短期試験法のガイドラインにもり込まれている内容について比較検討すると共に、特に培養細胞を用いる染色体異常試験のプロトコールおよび使用細胞などの試験条件について検討を行った。

### 1. 毒性試験法のための法的規制

今回の会議では最初に毒性試験法の法的規制について日米間で比較し、特にヒトへ有害性を示す可能性のある化合物を検出するための *in vitro* および *in vivo* 短期遺伝毒性試験法の意義と役割について評価を行った。

初めに Dr. Jacobson-Kram (Microbiological Associates) が米国の短期遺伝毒性試験の法的規制とガイドラインについて報告し、米国政府の各省庁においてそれぞれ特徴のあること、およびそれらがかなり複雑であるため総合的に再編成することの重要性を指摘した。本邦における法的規制とガイドラインに関しては、短期遺伝毒性試験については Dr. M. Ishidate, Jr. (国立衛生試験所・変異遺伝部)、一般毒性試験については Dr. Y. Kurokawa (国立衛生試験所・毒性部) がそれぞれ概要の説明を行った。

### 2. 化学物質の遺伝毒性評価

米国の National Toxicology Program (NTP) における短期試験について、Dr. E. Zeiger (NIEHS) が報告を行った。NTP では最近 *in vitro* 試験の種類を少なくし、有用な *in vivo* 試験法、例えば小核試験を組み入れること、並びに最初に規定した方法で多数の化合物についてスクリーニングするよりもむしろ、特定の化学物質の遺伝毒性を適切に評価するための試験体系を確立することの重要性を指摘した。Dr. Ishidate は変異原性試験結果の定性的な評価よりも定量的に評価することの必要性を指摘し、本邦での専門委員会を検討されている変異原活性の強さを基にしたリスク評価法の有用性について言及した。

新しい試験法の導入として、ニトロ還元酵素あ

るいはアセチル転移酵素活性が著しく高められたサルモネラ菌株の開発、およびその利用によってニトロ芳香族アミンなどの検出感度が著しく高まったことが、Dr. T. Nohmi (国立衛生試験所・変異遺伝部) によって報告された。Dr. M. Shelby (NIEHS) は NTP で行われた *in vitro* および *in vivo* 短期試験法の結果を比較検討し、*in vitro* と *in vivo* 試験とでは発がん試験結果との一致性は同等であり、通常の試験では遺伝毒性を検出しがたい化合物のために、新しい試験法の導入が重要であることを指摘した。

このセッションの最後には non-genotoxic carcinogen の問題をとり上げ、Dr. Kurokawa より peroxisome の増殖など DNA の酸化型傷害をもたらす化合物による 8-hydroxydeoxyguanosine の生成に関する一連の実験結果が報告された。Dr. Tennant (NIEHS) は NTP における non-genotoxic carcinogen 検出における現状を紹介し、この範疇に入る化合物の構造と発がん機構との関連性について言及した。

### 3. CHL および CHO 細胞を用いる染色体異常試験

最初に本邦で行われている CHL 細胞を用いる染色体異常試験の実験プロトコールについて、Dr. T. Sofuni (国立衛生試験所・変異遺伝部) が詳細に報告し、これに対し NTP での CHO 細胞を用いる染色体異常試験の実際について Ms. B. Anderson (NIEHS) が紹介を行った。NIEHS と国立衛生試験所との間ではすでに共同研究が行われ、CHL と CHO 細胞による染色体異常試験の比較検討が進められてきた。同一ロットの 25 種の化合物に対するこれら共同研究の結果について Dr. Sofuni により報告が行われた。その結果については既に論文としてまとめられ、Mutation Research に発表された。この研究結果については、米国および英国の他の研究者から大きな関心がよせられ、両試験システムで得られた試験結果の相違の要因を解明するために、共同研究に参加したい旨の要望がだされた。そのため、さらに拡大した国際共同研究を開始することとし、これによって国際的に共通した基盤による試験プロトコ

Table 2. CHL および CHO 細胞による染色体異常試験の共同研究試験計画

No.	被験物質	担当研究機関
1	2, 3, 4-Trichlorophenol	National Institute of Hygienic Sciences SITEK Research Laboratories Environmental Health Research and Testing Merck Sharpe and Dohme Research Laboratories Hazleton Laboratories America Inc.
10	N, N-Dimethyl-p-phenylenediamine	Environmental Health Research and Testing Merck Sharpe and Dohme Research Laboratories
14	N, N'-Diphenyl-p-phenylenediamine	National Institute of Hygienic Sciences SITEK Research Laboratories Hazleton Laboratories America Inc.
15	N, N'-Di-2-naphthyl-p-phenylenediamine	National Institute of Hygienic Sciences
21	N-Nitrosodiphenylamine	SITEK Research Laboratories Hazleton Laboratories America Inc.

ールの確立を目指すこととした。

このセッションの最後の2日間では、Dr. Ishidate と Dr. S. Galloway (Merck Sharpe and Dohme) が座長となり、染色体異常試験実施におけるいくつかの問題点、例えば細胞毒性の判定法、試験濃度の設定、処理時間と標本作製時間、代謝活性化法、陰性および陽性対照物質、染色体異常の分類と判別などについて自由討論が行われた。この中からいくつかの重要な項目について以下に述べる。

#### (1). 試験方法

代謝活性化法における実験条件について Dr. Galloway から報告があり、培養液に添加する血清、検体処理時の S9 mix の濃度、S9 mix に添加する補酵素、検体処理時間および標本作製時間など、いくつかの要因の影響について詳細な結果が述べられた。

Dr. Ishidate は、CHL と CHO 細胞による試験プロトコールの重要な相違点は処理時間と S9 の濃度にあることを指摘すると共に、CHL 試験システムでの 24 および 48 時間処理は全ての細胞周期にわたって細胞を処理することが可能であり、代謝活性化法では懸濁法による3時間処理よりもプレート法による6時間処理の方が有効であることを強調した。

前述の 25 種の化合物の中から3種の化合物を選び、CHL, CHO-WBL, CHO-UK およびヒトリンパ球を用いて染色体異常誘発性を比較した結果が Dr. Marshall (Microtest, U.K.) より報告さ

れた。20 時間処理後直ちに染色体標本作製すると、2 種の化合物ではいずれの細胞においても陽性結果が得られたが、細胞毒性および染色体異常を誘発する濃度には細胞間で大きな違いがみられた。この結果は NTP で用いている 12 時間処理よりもっと遅い時期に染色体標本作製することが重要であることを指摘している。

#### (2). 染色体異常の判別

染色体異常試験結果を左右する要因として、顕微鏡観察での染色体異常の識別の違いが考えられる。そのため、この会議では実際に顕微鏡と染色体標本を会場に持ち込み、参加者がそれぞれ顕微鏡下で観察を行い、染色体異常の判別の相違点について議論した。その結果、主な染色体異常の判別に関しては明らかな違いがみられないことが判明したが、ギャップおよび切断については日米間で相違が認められた。本邦での判断では、染色分体幅よりも狭いような小さな非染色性部位は異常の対象として扱わないが、米国ではギャップとして記録する。但し、これらのギャップは染色体異常誘発性の評価には用いていない。一方、米国では切断としている染色分体幅以上の非染色性部位で軸より逸脱していないものは本邦ではギャップとし、染色体異常誘発性の評価にはこれらも含めて検討している。このように染色体異常判別における日米間の相違が相互に理解できたことは本会議の成果の一つであり、染色体異常誘発性の評価にあたっては、最終的には両試験システムではほぼ近似していることが判明した。

### (3) 今後の共同研究計画

これまでの共同研究では用いる細胞および試験プロトコールがそれぞれ異なっているため、使用細胞あるいは試験プロトコールの違いがどのように試験結果に影響しているかを明確に把握することは困難であった。そのため、いずれの研究機関においても、CHL と CHO 細胞の両方を用いることとし、それぞれ相互に細胞株の受渡しを行った。両細胞系を用いて同一のロットの化合物について試験を行うが、その際には CHL および CHO それぞれの試験プロトコールを用いて比較することとした。これによって使用細胞並びに試験プロトコールの相違の有無を検討することが可能となる。対象とする化合物はこれまでの共同研究に用いた 25 種より数種選別し、NTP が同一のロットの被験物質を各研究機関に供与する。各研究機関が対象とする化合物については Table 2 を

参照されたい。これらの共同研究は 1990 年 9 月までに終了し、試験結果は全て NIEHS, Ms. Anderson に送付することとした。これら共同研究の結果については、1990 年 10 月より 1991 年 3 月までの間に会議を開催し、討論を行うこととする。このような国際的な共同研究の成果を踏まえて、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の国際的に共通した試験プロトコールが確立されることを期待している。

### 参考文献

Sofuni, T., A. Matsuoka, M. Sawada, M. Ishidate, Jr., E. Zeiger and M. D. Shelby (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHL and CHO) systems in culture, *Mutation Res.*, **241**, 175-213 (1990).

## 日本学術会議だより №18

### 第15期日本学術会議会員の選出手続きが始まる

平成 2 年 8 月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議では、現在、第15期会員を選出するための手続きが進められています。今回の日本学術会議だよりでは、その手続きの概要に加えて、来年度に開催される共同主催国際会議等について、お知らせいたします。

#### 第15期日本学術会議会員の選出について

日本学術会議では、現在、第15期会員（任期：平成 3 年 7 月 22 日から 3 年間）を選出するための手続きが進められている。

先般、最初の手続きとして、6 月末日を締切期限に、各学術研究団体からの登録申請の受付が行われた。今回申請のあった団体数は、942 団体であった。

今後引き続き行われる手続きとその日程の概略は次のとおりである。

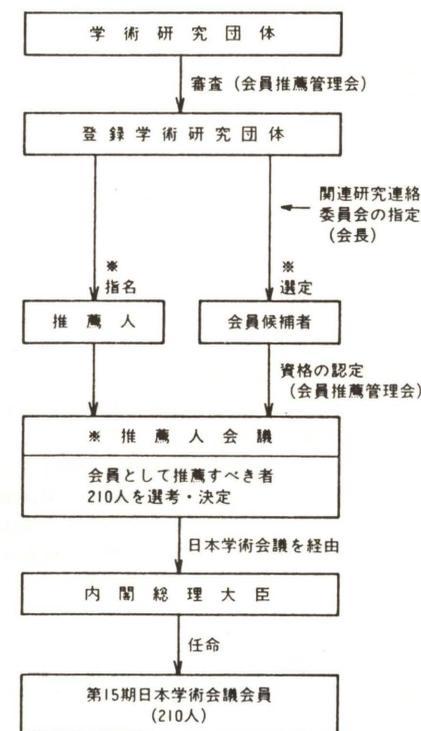
#### 〈平成 2 年〉

- ・ 9 月上旬……登録審査結果の通知
- ・ " ……関連研究連絡委員会（注）についての意見聴取
- ・ 11 月 30 日まで……関連研究連絡委員会の指定
- ・ 12 月上旬……会員の候補者の選定及び推薦人の指名の依頼

#### 〈平成 3 年〉

- ・ 1 月 31 日まで……会員の候補者の届出の締切り
- ・ 2 月 20 日まで……推薦人（予備者を含む）の届出の締切り
- ・ 3 月 20 日まで……会員の候補者の資格の認定等の通知
- ・ 3 月下旬……推薦人に会議開催等の通知発送
- ・ 4 月 20 日まで……候補者関係異議の申出に対する決定
- ・ 5 月中旬から  
6 月上旬まで……推薦人会議（会員及び補欠の会員として推薦すべき者を決定）
- ・ 6 月中旬……日本学術会議を経由して内閣総理大臣へ推薦
- ・ 7 月 22 日……第15期日本学術会議会員の任命

#### 〈会員選出手続きに関するフローチャート〉



\* 指定された関連研究連絡委員会により区分された学術研究領域ごとに行われる（下記の注）を参照

(注) 関連研究連絡委員会：学術研究団体はその目的とする学術研究の領域と関連する研究連絡委員会として、届け出た研究連絡委員会。届け出た関連研究連絡委員会が複数あるときは、日本学術会議会長は、登録学術研究団体の意見を聴いて関連研究連絡委員会を指定

(限定)する。  
登録学術研究団体は、この指定された関連研究連絡委員会により区分された学術研究の領域ごとに、会員の候補者及び推薦人を届け出ることになる。

## 平成3年(1991年)度共同主催国際会議

本会議は、昭和28年以降、学術関係国際会議を関係学術研究団体と共同主催してきたが、平成3年(1991年)度には、次の6国際会議を開催することが、6月19日の閣議で了解された。(カッコ内は、各国際会議の開催期間と開催地)

- ◆第21回国際農業経済学会議  
(平成3年8月22日～29日、東京都)  
共催団体：日本農業経済学会外4学会
- ◆国際医用物理・生体工学会議(第16回)国際医用生体工学会議・第9回国際医学物理会議  
(平成3年7月7日～12日、京都市)  
共催団体：(社)日本エム・イー学会外1学会
- ◆国際純正・応用化学連合1991国際分析科学会議  
(平成3年8月25日～31日、千葉市)  
共催団体：(社)日本分析化学会
- ◆第22回国際シミュレーション&ゲーミング学会総会  
(平成3年7月15日～19日、京都市)  
共催団体：日本シミュレーション&ゲーミング学会
- ◆一般相対論に関する第6回マールセルグロスマン会議  
(平成3年6月23日～29日、京都市)  
共催団体：(社)日本物理学会
- ◆第22回国際動物行動学会議  
(平成3年8月22日～29日、京都市)  
共催団体：日本動物行動学会

## 第4部報告—科学技術庁大型放射光施設建設計画について(要旨)

(平成2年5月25日、第755回運営審議会承認)  
予算規模約一千億といわれる科学技術庁大型放射光施設が実施段階に入った。このような大型施設の順調な建設、稼働後の有効利用のためには、研究者、技術者の努力はもとより、関連政府諸機関相互の理解と協力が不可欠である。我が国の放射光研究開発はこれまで大学等基礎的研究機関を中心として発展してきたのであるが、その経験と成果は今回の大型計画においても活用され、さらに発展せられるべきである。日本学術会議は、先に「大学等における学術研究の推進について—研究設備等の高度化に関する緊急提言—(平成元年第107回総会勧告)」において、大学等と各省庁研究機関の間の研究設備の相互利用、研究者の相互交流の必要性を指摘した。第4部は、今回の科学技術庁の大型放射光施設の建設及び共同利用がその重要な具体例であると判断し、物理学、結晶学、生物物理学三研究連絡委員会委員長より日本学術会議会長あての中入れにもついで本報告をとりまとめたものである。

## 化学研究連絡委員会報告—大学における研究環境、特に研究実験室のスペースについて(要旨)

(平成2年5月25日、第755回運営審議会承認)  
我が国においては、基礎科学の振興が叫ばれながら、大学等の研究環境の改善は長い間取り残されたままである。日本学術会議化学研究連絡委員会の調査によると、我が国の大学における化学関係の学科の研究実験室のスペースを研究者一人当たりにした場合、従来の大学と比べて2分の1から3分の1の広さに過ぎず、実験台やリヤンなどの占める面積を勘定に入れると、実質的には3分の1から4分

の1のスペースしかない極度の狭隘さである。

各種の危険を伴う化学実験の安全性を確保するためには、大学等の研究実験のスペースを抜本的に改善することが絶対に必要であり、差し当たり現在の面積を増増する必要がある。

## 日本学術会議主催公開講演会開催のお知らせ

本会議では、このたび、次の2つの公開講演会を開催いたします。是非、多数の方々の御来場をお願いします。

### I 公開講演会「高度技術と市民生活」

- 日時：平成2年10月13日(日)13時30分～17時
- 会場：兵庫県社町福祉センター大ホール  
(兵庫県加東郡社町社26番地)
- 演題と講演者  
①「高齢化社会と高度技術」  
原澤 道美(第7部会員、東京通信病院院長)
- ②「消費生活と高度技術」  
正田 彬(第2部会員、上智大学教授)
- ③「地域振興と人間主導型高度技術」  
竹内 啓(第3部会員、東京大学教授)

### II 公開講演会「資源エネルギーと地球環境に関する展望」

- 日時：平成2年10月30日(火)13時～17時
- 会場：日本学術会議講堂  
(東京都港区六本木7-22-34)  
(地下鉄「千代田線」乃木坂駅下車徒歩1分)
- 演題と講演者  
①「人間と環境」  
大島 康行(第4部会員、早稲田大学教授)
- ②「エネルギー資源」  
石井 吉徳(第5部会員、東京大学教授)
- ③「エネルギーと経済問題」  
則武 保夫(第3部会員、立正大学教授)
- ④「エネルギーとCO<sub>2</sub>対策」  
上之國親佐(第5部会員、摂南大学教授)

★ 両講演会とも、入場無料です。  
【問い合わせ先】  
日本学術会議事務局庶務課「公開講演会係」  
電話 03 403 6291 内線 227, 228

## 日学双書の刊行案内

日本学術会議の総会並びに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.7 「地球環境問題」
- ・日学双書 No.8 「人間は地球とともに生きられるか」  
両書とも、定価1,000円(消費税込、送料210円)

【問い合わせ先】  
(財)日本学術協力財団 (電話 03 403 9788)  
〒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

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1口20,000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	早 津 彦 哉
庶務幹事	祖父尼 俊 雄
会計幹事	渋谷 徹
国際交流幹事	長 尾 美奈子
編集幹事	佐 藤 茂 秋
会計監査	高 山 昭 三
"	加 藤 隆 一
賞等選考委員	大 西 克 成
	長 尾 美奈子
	土 川 清
	祖父尼 俊 雄
	菊 池 康 基
編 集 委 員	島 田 弘 康
	後 藤 純 雄
	菊 川 清 見
	林 真
企 画 委 員	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	㊟
ローマ字つづり	
生年月日, 性別	年 月 日 男 女

所属機関	(和)
部局 職名	(英)
所属機関 所在地	〒 電話 内線
	(和)
自宅 住所	(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ポイント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) ㊟			
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: 〒105 東京都港区新橋 5-23-7  
三造写真工業株式会社内 学会事務局

環境変異原研究 第12巻 第3号 1990年

平成3年3月10日 印刷

平成3年3月10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 03-3433-1869

ISSN 0910-0865