

# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

Vol.13 No.1 1991

# 日本環境変異原学会

## 第19回大会

福岡



会場 (都久志会館)



← 懇親会 ↑



大会会場



公開講演



受賞式 → ↑



ポスターセッション

環境変異原研究

第13巻第1号 1991年

目次

日本環境変異原学会第19回大会

特別講演記念論文

自然および誘導突然変異の抑制機構 関口 睦夫…………… 1

平成2年度学会奨励賞受賞者論文

ヒト細胞を用いた環境変異原の検出と作用機構 巽 紘一…………… 9

メチル基置換芳香族炭化水素の代謝的活性化 渡部 烈…………… 21

シンポジウム「環境化学物質の複合作用による変異原性の増強及び抑制」

亜硝酸および窒素酸化物との相互作用による変異原の生成、修飾とその抑制  
津田充有, 倉島由紀子…………… 31

多環芳香族炭化水素と NO<sub>2</sub> 暴露との複合作用による変異原の生体内生成  
大西克成, 木内武美, 宮西幸一, 片岡佳子, 加納堯子…………… 53

環境化学物質の複合作用による活性酸素生成と DNA 損傷:  
重金属化合物の役割 川西正祐, 山本互二, 井上純子, 伊藤貴美子…………… 61

金属の突然変異抑制作用とその機構 ——セレンを中心に——  
佐藤まゆみ, 八木孝司, 布柴達男, 西岡 一…………… 71

「複合作用」について考える 早津 彦哉…………… 85

教育講演「環境変異原のヒトへの新しいリスク解析法」

小核試験の最近の動向 林 真…………… 89

<sup>32</sup>P-ポストラベル法による DNA 付加体の解析  
若林敬二, 広瀬美砂子, 落合雅子…………… 97

放射線被曝者における生物学的線量推定のための4種の体細胞突然変異検出  
法の評価

秋山實利, 梅木繁子, 楠洋一郎, 平井裕子, 久代淳一, 京泉誠之, 中村 典…………… 103

日本学術会議だより (No. 19~21) …………… 109

付記

日本環境変異原学会 会 則…………… 115

” 役員名簿…………… 116

” 評議員名簿…………… 117

” 入会申し込み書…………… 118

” 住所・所属等変更届…………… 120

第 19 回大会特別講演論文

## 自然および誘導突然変異の抑制機構

九州大学医学部 関 口 睦 夫

### 1. はじめに

生物の遺伝情報は DNA 分子の中に保持されているので、DNA を安定に維持することは生物にとってきわめて重要である。そのため生物は正確な DNA 複製機構と DNA に生じた損傷を修復する機構をもっている。細胞の癌化は DNA の変化に基づくことが明らかにされているので、この問題は発癌やその抑制の機構を考える上でも重要である。このような観点から、自然突然変異と誘導突然変異の生起をコントロールしている細胞内の機構について考えてみたい。

DNA の複製は基本的に塩基の対合に依拠しているが、塩基対合における誤りの頻度は  $10^{-4}$  程度とみなされる。それにもかかわらず細胞内での DNA 複製が塩基対当り  $10^{-10}$  以下という高い精度を維持しているのは、誤った塩基対が生じないようにしている機構と、もし誤った対合が生じた時にそれを複製過程あるいはその直後に修復する装置を細胞がもっているからである。実際そのような機構に関する遺伝子が欠けた場合、その細胞は著しく高い自然突然変異率を示す。そこでそれらの遺伝子産物の働きを中心にその分子的機構を探るのが有効である。

鋳型となる DNA に傷ができた場合には、たとえ複製装置が正常であっても突然変異がおこる。それが誘導突然変異であるが、生物はそれを防ぐために DNA の傷を修復する精巧な機構をもっている。アルキル化剤によってできる DNA の傷を修復する酵素系の働きを中心にその機構について考察したい。

### 2. ミューテーター遺伝子と自然突然変異の制御

自然突然変異の頻度は一般にきわめて低いが、それでも生物の種類によって高低がある。このことは自然突然変異率も生物自体がコントロールしていることを意味する。これを最も端的に示すが、自然突然変異率が正常よりも高くなったミューテーター (mutator)、あるいは正常よりも低くなったアンチミューテーター (antimutator) の存在である。

変異をおこすとミューテーターやアンチミューテーターとなる遺伝子の産物は、本来自然突然変異率をその生物種に最も適した一定の値に保つために働いていると考えられる。その中には DNA の複製に直接関与するものもあるし、あるいは複製の過程で生じたエラーを取り除くものも含まれる。このことはミューテーター (またはアンチミューテーター) の本体や作用の研究を通じて自然突然変異を制御している機構を解くことができることを意味する。私達はこのような立場から大腸菌のミューテーターの研究を進め、その遺伝子のクローニングと産物の同定を行ってきた。Table 1 はこれまでに同定された大腸菌のミューテーターの性質を示したものである。これらはその働きから 4 つのグループに分けることができるので、それにしたがって説明したい。

第 1 のグループに属するのは、大腸菌の複製酵素である DNA ポリメラーゼ III の構成成分の遺伝子である。ポリメラーゼ III コア酵素は 5'→3' 方向にポリヌクレオチド鎖を伸長するポリメラーゼ活性と 3'→5' 方向に一本鎖 DNA を分解するエ

〒812 福岡市東区馬出 3-1-1

Mechanisms for controlling spontaneous and induced mutation frequencies

Mutsuo Sekiguchi

Faculty of Medicine, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

Table 1. 大腸菌のミューター

グループ	遺伝子	染色体上の位置	ミューターの性質		遺伝子産物の機能
			強さ(倍)	突然変異の種類	
I	<i>dna E</i>	4	10~100	様々の塩基置換	DNA ポリメラーゼ III のサブユニット $\alpha$
	<i>dna Q</i> ( <i>mut D</i> )	5	1000~10 <sup>6</sup>	"	同上 サブユニット $\epsilon$ (校正エキソヌクレアーゼ)
	<i>dam</i>	74	10~100	トランジション	DNA アデニンメチラーゼ
	<i>mut H</i>	61	10~100	"	ミスマッチ部分に作用するエンドヌクレアーゼ
II	<i>mut L</i>	95	10~100	"	ミスマッチ修復
	<i>mut S</i>	59	10~100	"	ミスマッチ部位につくDNA結合タンパク
	<i>uvr D</i>	85	10~100	"	DNA ヘリカーゼ II
III	<i>mut T</i>	3	100~1000	AT→CG	dGTP 分解酵素
	<i>mut Y</i>	64	100~100	GC→TA	アデニン DNA グリコシラーゼ
IV	<i>ung</i>	56	10	GC→AT	ウラシル DNA グリコシラーゼ

キソヌクレアーゼ活性をもっているが、前者は分子量 13.2 万の  $\alpha$  サブユニットに、後者は分子量 2.7 万の  $\epsilon$  サブユニットに存在する。実際それらをコードする遺伝子 *dnaE* ( $\alpha$  サブユニット), *dnaQ* ( $\epsilon$  サブユニット) に生じた変異の中に強いミューター活性をもつものが見いだされた (Horiuchi, Maki and Sekiguchi, 1989)。

DNA の複製はアデニンとチミン, グアニンとシトシンという相補的な塩基対合に依拠しているが、正確な対合を行うのに DNA ポリメラーゼ自体も関与していると考えられる。ポリメラーゼ活性をもつ  $\alpha$  サブユニットの変異がミューターとなるのはそれを示唆している。しかしミューターとして最も強い活性を示すのは *dnaQ* 遺伝子の変異で、中には野生株の 10 万倍近い頻度で自然突然変異を生じるミュータントも存在する (Horiuchi *et al.*, 1981)。このようなミュータントでは 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性が低いことが明らかにされている (Scheuermann *et al.*, 1983)。 $\epsilon$  サブユニット上の 3'→5' エキソヌクレアーゼは一本鎖の部分の特異的に分解するので、複製の過程で誤ってとりこまれた対合していない塩基がこの活性によって取り除かれる。*dnaQ* または *dnaE* 遺伝子の変異の中には  $\alpha$  サブユニットと  $\epsilon$  サブユニットの立体的な配位をゆがめ、その結果ミューターの表現型を示すものが存在すると考えられる。

DNA 複製にさいして生じたエラーは DNA ポ

リメラーゼ III 自体のもつエラー修正機構によってなおされるが、それでも残るエラーはミスマッチ修復によってなおされる。ミスマッチ修復は複製フォークが通過した後で起こるのでどちらのストランドが鋳型で、どちらがコピーであるかをまず区別する必要がある。それにはアデニンのメチル化が役立っている。DNA 中のアデニンの一部はメチル化されて 6-メチルアデニンになっているが、このメチル化は複製後しばらくしてから起こるので、複製直後の DNA では 6-メチルアデニンは鋳型鎖にのみ存在する。そこでミスマッチ修復酵素は 6-メチルアデニンの有無によって鋳型鎖とコピー鎖を識別し、コピー鎖のミスマッチ塩基を取り除いて修復する。アデニンをメチル化する酵素としては DNA アデニンメチラーゼが知られているが、この酵素を欠く *dam* ミュータント、あるいはこの酵素を過剰生産するミュータントはミューター活性を示す。

ミスマッチ修復には *dam* 遺伝子の他に *mutH*, *mutL*, *mutS*, *uvrD* 遺伝子が必要である (Table 1 のグループ II)。これらの遺伝子のいずれが欠けてもミスマッチ修復はおこらず、その株は野生株よりも 10~100 倍高い自然突然変異率を示す。最近これらの遺伝子が作るタンパク質が同定され、精製したタンパク質を用いてミスマッチ修復の詳細な機構が明らかにされつつある (Modrich, 1989)。ミスマッチ修復には DNA 上のシグナルとして GATC の配列が必要である。この配列中

の一方のストランドのアデニンがメチル化されていると、それが鋳型鎖として識別される。MutH タンパクはこの配列を認識して、メチル化されていないストランドに 5'-pGATC の末端を生じる形で鎖切断を入れる。MutS タンパクは塩基のミスマッチ部分を見つけて結合し、そこに MutL 蛋白, UvrD ヘリカーゼ, Ssb タンパクが作用して、メチル化されていないストランドのミスマッチ部分を含むヌクレオチド鎖を取り除く。生じたギャップの部分は DNA ポリメラーゼ I とリガーゼの働きで修復される。

このように DNA 複製における精度の維持は DNA ポリメラーゼ III 酵素自体のもつ正確な塩基対選択とエラー修正機構、さらに複製直後におこるミスマッチ修復によって保証されている。しかしそれ以外の機構も DNA 複製の精度維持に働いていることが、ミュータントを用いた研究から明らかにされている。

Table 1 のグループ III に属する 2 つの遺伝子は、そのミューター活性の特異性によって注目される。*mutT* 遺伝子が欠けると細菌は AT→CG トランスバージョンを特異的によくおこすようになり、そのような菌を長く培養しているとその DNA の GC 含量が上昇することが報告されている。この遺伝子は最近クローニングされ (Akiyama, Horiuchi and Sekiguchi, 1987)、遺伝子産物も同定された。MutT タンパクは dGTP を分解する活性をもっており、A と対合する dGTP の syn 型を分解することによってミス塩基対の生成を防いでいる可能性が高い (Akiyama *et al.*, 1989)。*mutY* は最近同定された遺伝子であるが、その変異の結果 *mutT* の場合と逆に GC→TA トランスバージョンがよくおこることが示されている (Au *et al.*, 1988)。

第 IV のグループとして示した *ung* 遺伝子の変異はミューターとしての活性は低い興味ある存在である。DNA 中のシトシンは自然の状態でも一定の率で脱アミノされてウラシルに変化するが、それがそのまま複製サイクルに入るとウラシルはアデニンと対合するので GC→AT 変異を生じる。*ung* 遺伝子の産物ウラシル DNA グリコシラーゼは DNA からウラシルを取り除いて修復

するので、上のような変異の生起を抑えていると考えられる。シトシンの脱アミノを促進する化学物質、たとえば重硫酸ソーダに対する感受性も *ung* ミュータントでは上昇することが知られている (Hayakawa and Sekiguchi, 1978)。

### 3. アルキル化剤による突然変異の誘起とその抑制

多くの化学物質が DNA に作用して突然変異を誘起することが知られているが、その代表としてアルキル化剤をとりあげ、その DNA に対する作用と生じたアルキル化部位の修復について述べる。アルキル化剤はまた強力な発癌作用ももつので、その関連においても注目されている。

アルキル化剤によってできる DNA の傷の種類は多く、最も単純なアルキル化剤の一つであるメチルニトロソウレア (MNU) によっても少なくとも 10 種以上の異なるメチル化塩基ができることが知られている。そのうち量的に最も多くできるのは 7-メチルグアニンで、ついで 3-メチルアデニン、O<sup>6</sup>-メチルグアニン、3-メチルグアニン、7-メチルアデニンなどのアルキル化プリンができ、その他にも微量であるが各種のアルキル化ピリミジンも生じる。その中で突然変異の誘起に最も関係があるとみなされているのは、O<sup>6</sup>-メチルグアニンである。グアニンは本来シトシンと塩基対をつくるが、その 6 位の酸素がメチル化されるとチミンとも対合するようになる。そのような塩基対合ができると、DNA 複製を通じて G<sup>m</sup>·C→G<sup>m</sup>·T→A·T という変化が起こり、GC 塩基対が AT 塩基対に変化する。このような変化がプロトオンコジンに起こると、それが細胞の癌化につながると考えられるが、実際にそれを支持する実験結果が得られている。

大腸菌からヒトに至るまで調べられたほとんどすべての生物は O<sup>6</sup>-メチルグアニンを修復する酵素をもっている (Sekiguchi and Nakabeppu, 1987; Lindahl *et al.*, 1988)。この酵素はアルキル化 DNA に作用して DNA 中の O<sup>6</sup>-メチルグアニンからメチル基を取り除き、それを酵素タンパク自体へ移す。それによって DNA は修復されるが、酵素タンパクに移されたメチル基はそのま

ま留まるので、この酵素は一回働くと失活してしまふ。

大腸菌は2つの型の O<sup>6</sup>-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼをもっている。一つは *ogt* 遺伝子でコードされる分子量 1.9 万の酵素で細胞内に構成的に存在する (Potter *et al.*, 1987)。もう一つは *ada* 遺伝子の産物で、この酵素 (分子量 3.9 万) はアルキル化剤処理によって適応的に合成される。正常の大腸菌には両酵素ともごく微量含まれているが、低濃度のアルキル化剤を含む培地中で菌を培養すると 1~2 時間後には多量の酵素 (*ada* 遺伝子産物) がつくられる。最近両遺伝子を欠く大腸菌のミュータントが分離されたが、それらはアルキル化剤に対する感受性が非常に高く、ごく微量のアルキル化剤処理によって突然変異を生じることが示されている (Takano, Nakamura and Sekiguchi, 1991)。

これら2つの遺伝子はクローニングされ、そのヌクレオチド配列も決定された。その結果 Ogt タンパクは 171 のアミノ酸、Ada タンパクは 354 のアミノ酸より成ることがわかったが、Ogt タンパクのアミノ酸配列は Ada タンパクの C 末端側のアミノ酸配列とよく似ている。Ada タンパクの 321 番目のシステイン残基は O<sup>6</sup>-メチルグアニンからメチル基をうけとる部位であるが、その周辺のアミノ酸配列は Ogt タンパクでもよく保存されている。Ada タンパクと Ogt タンパクはともに、アルキル化 DNA 中に微量存在する O<sup>4</sup>-メチルチミンからもメチル基をうけとることが知られている。

Ada タンパクは C 末端側に加えて N 末端側にもう一つのメチル基受容部位をもっている。メチル化された Ada タンパクの分析の結果、N 末端側のメチル受容部位は 69 番目のシステインであることが明らかになった。メチル化されたポリ dA・dT を基質にすると Cys-69 が特異的にメチル化されることから、この部位は DNA 中のリン酸基についたメチル基(メチルホスホトリエステル)からメチル基をうけとることが明らかになった。遺伝子操作によって Cys-69 をアラニンに変えると、メチルホスホトリエステルからのメチル基の転移はおこらなくなる (Takano, Nakabeppu and

Sekiguchi, 1988)。Ada タンパクはそのほぼ中央のところにプロテアーゼ感受性部位があり、微量のプロテアーゼ処理によって N 端側と C 端側のポリペプチドに分けることができるが、そのようにして得られた2つのポリペプチドはそれぞれ DNA のメチルホスホトリエステルからメチル基を転移する活性、O<sup>6</sup>-メチルグアニンからメチル基を転移する活性をもっている (Yoshikai, Nakabeppu and Sekiguchi, 1988)。

Ada タンパクは2つのメチルトランスフェラーゼ活性に加えて、*ada* 遺伝子および関連する遺伝子 (*alkA* など) の転写を促進する転写調節活性をもっているが、この活性は Ada タンパクがメチル化されることによって促進される。メチル化された Ada タンパクは *ada* 遺伝子のプロモーターに結合してその転写を促進する。メチル化されていない Ada タンパクも転写促進能をもっているが、その活性はメチル化された Ada タンパクの

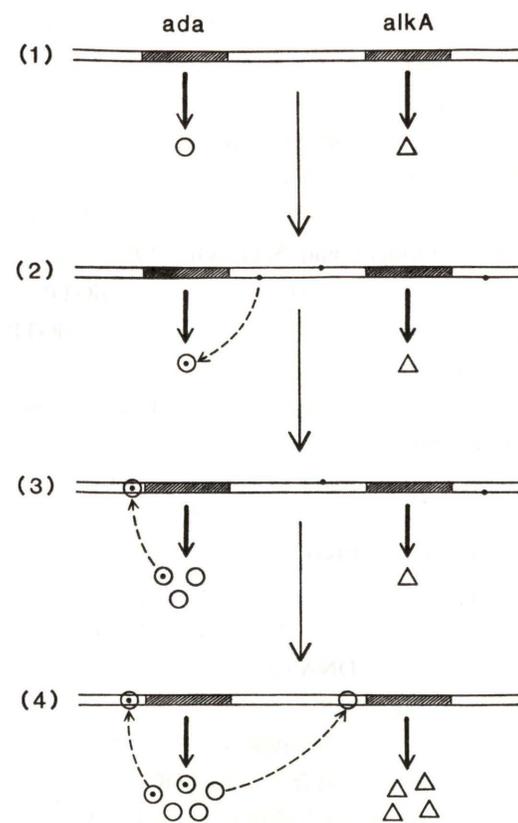


Fig. 1. 適応応答の機構。

方がはるかに高い。Cys-69 と Cys-321 をそれぞれアラニンに置換した変異型 Ada タンパクを用いた研究から、Ada タンパクの転写調節因子としての活性化には Cys-69 のメチル化が寄与していることが明らかにされた (Sakumi and Sekiguchi, 1989)。それに対し *alkA* 遺伝子の転写は正常の Ada タンパクでもメチル化された Ada タンパクでもほぼ同じ効率で促進されることが示されている。

この様な事実に基づいてアルキル化剤に対する適応応答のモデルがつくられたが、それを示したのが Fig. 2 である。メチル化された DNA からメチル基をうけとった Ada タンパクは転写促進因子として活性化され、それによって自己の遺伝子産物を大量につくらせる。いったん Ada タンパクが大量につくられると、それはメチル化の有無にかかわらず、*alkA* 遺伝子など他の *ada* レギュロンの遺伝子のプロモーターに結合してその転写を促進する。

*alkA* 遺伝子の産物は分子量 3.1 万のタンパクで、3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ II である。この酵素はアルキル化 DNA から3-メチルアデニンなどのアルキル化塩基を取り除くことができる (Sakumi and Sekiguchi, 1990)。3-メチルアデニンが DNA 中に存在するとそこで DNA 複製が阻止され、その結果細胞は増殖不能となる。*alkA* 遺伝子の産物 (グリコシラーゼ II) は3-メチルアデニンと糖の間のグリコシル結合を切り、それによって異常塩基は DNA から除かれる。その結果生じた脱塩基部位は AP エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼなどによって除かれ、生じた一本鎖のギャップの部分は DNA ポリメラーゼ I、リガーゼによって修復される。*ada* 遺伝子の支配下に適応的に発現が誘導される遺伝子としては、*alkA* の他に *alkB* や *aidB* が知られている。これらの遺伝子の産物のもつ酵素活性は未だ同定されていないが、他の種類のメチル化塩基の修復に関与している可能性が高い。

このように細胞をアルキル化剤にさらすと、アルキル化剤によってできる種々の DNA の傷をなおす酵素系が出現し、それによって細胞は致死や突然変異から免れる。この反応は非常に合目的

で、アルキル化剤を除いてしばらく菌を培養すると、これらの酵素の誘導はなくなってしまふ。この適応応答の終了も興味ある問題であるが、その機構は未だよくわかっていない。一つの可能性は Ada タンパクが特異的なプロテアーゼで分解されることである。実際 Ada タンパクをほぼその中央付近で切断するプロテアーゼが大腸菌中には存在し、その酵素で切られると Ada タンパクは転写促進活性を失う。その結果生じた Ada タンパクの分解産物は *ada* プロモーターに結合してリプレッサーとしての働きを示す。適応応答の終了にはこのような負の調節機構が働いている可能性もある (Akimaru *et al.*, 1990)。

#### 4. 哺乳動物細胞のメチルトランスフェラーゼ

哺乳動物の細胞にもメチルトランスフェラーゼが存在する。ヒトの細胞のメチルトランスフェラーゼは分子量約 2.4 万で、O<sup>6</sup>-メチルグアニンを修復するがメチルホスホトリエステルのメチル基を転移する活性はもっていない。

ところでヒトの癌由来の細胞株のなかにはメチルトランスフェラーゼ活性を欠くものが存在する (Day and Ziolkowski, 1979)。このような細胞はアルキル化剤で処理されたウイルスを再活性化する能力が低く、また細胞自体もアルキル化剤に対して高い感受性を示す。このことはヒトの細胞でもメチルトランスフェラーゼが DNA の傷をなおすのに大きな役割を果たしていることを示しているが、それでは癌細胞にメチルトランスフェラーゼ欠損が多いことはどういう意味があるのだろうか。それが癌化の原因か結果か、興味あるところである。細胞内の代謝過程でメチル基の供与体となる S アデノシルメチオニンは、生理的条件下で DNA をメチル化することが知られている。組織の代謝物の中には他にも DNA をメチル化する物質が存在すると考えられる。このように DNA は細胞内外の物質によって常にメチル化される危険にさらされているが、メチルトランスフェラーゼ欠損の縮胞はそのような DNA の傷をなおすことができないので癌化の可能性が高いという考えが成り立つ。一方、細胞が癌化すると様々の遺伝子の発現が変化することが知られてお

り、メチルトランスフェラーゼの遺伝子もそのような制御を受けているのかも知れない。この問題は今後さらに検討する必要があるが、いずれにせよ癌細胞にメチルトランスフェラーゼ欠損が多いことは癌の治療の面からみて注目に値することである。もしその癌がメチルトランスフェラーゼ欠損の細胞から成る場合には、アルキル化作用をもつ物質が制癌効果を発揮することが期待されるからである。

さてヒトのメチルトランスフェラーゼのcDNAのクローニングであるが、多くの研究者の努力にもかかわらずなかなか成功しなかった。それはこの酵素を純粋な状態まで精製するのが難しく、クローニングに必要なアミノ酸配列のデータが得られなかったからである。そこで我々は新しいアプローチ、すなわち cDNA 発現ベクターを用いてクローニングすることにした。幸いメチルトランスフェラーゼ欠損の Mer<sup>-</sup> 細胞があるので、Mer<sup>+</sup> の細胞から調製した cDNA ライブラリーを Mer<sup>-</sup> 細胞に移入して発現させ、アルキル化剤耐性となった細胞から cDNA を回収することにした。用いたベクターは EB ウイルスの複製起点 ori P をもち、他にハイグロマイシン B 耐性の遺伝子などをもつものであった。その結果トランスフォーマントの中から通常の Mer<sup>+</sup> 細胞の約 50 倍のメチルトランスフェラーゼ活性をもつ細胞株を得ることができ、それから cDNA を回収できた (Hayakawa, Koike and Sekiguchi, 1990)。その塩基配列を決定したところ、207 アミノ酸より成るタンパク質をコードし、そのアミノ酸配列は微生物のメチルトランスフェラーゼと高いホモロジーをもつことがわかった。

cDNAをもつ細胞ではメチルトランスフェラーゼが大量につくられているので、それから酵素をほぼ純粋の状態まで精製することができた (Koike et al., 1990)。そのアミノ酸配列を決定したところ、cDNA のヌクレオチド配列から予想される配列とはほぼ完全に一致したので、この cDNA が確かにメチルトランスフェラーゼをコードしていることが明らかになった。精製したタンパクは DNA 上の O<sup>6</sup>-メチルグアニンおよび O<sup>4</sup>-メチルチミンからメチル基をうけとり、メチ

ルホスホエステルからはメチル基をうけとらないことがわかった。このような点から、この酵素は大腸菌の構成的なメチルトランスフェラーゼである Ogt タンパクと構造的にも機能的にも近いといえそうである。

ヒトのメチルトランスフェラーゼの cDNA は私達とほぼ時を同じくして他の 2 つのグループによってもクローニングされた。1 つはイギリスの Karran のグループで、彼らは精製したウシの酵素のアミノ酸配列の 1 部を決定し、これをもとにオリゴヌクレオチドのプロープを合成してヒトの cDNA をクローニングした (Rydberg, Spurr and Karren, 1990)。一方アメリカの Mitra のグループはヒトの cDNA を大腸菌の中で発現させてクローニングした (Tano et al., 1990)。

いったん cDNA が分離できると、それをプロープとして遺伝子自体をクローニングすることが可能である。また種が違っても活性に必須な領域のアミノ酸配列は保持されている可能性が高いので、マウスやラットなどの実験動物の cDNA をクローニングし、さらにそれから遺伝子をクローニングすることができる。現在私達の研究室ではこのような方向の研究が進められており、この酵素の遺伝子の構造や発現の調節の機構について今後調べていきたいと考えている。

## 5. 謝辞

ここで述べた研究は九州大学医学部生化学第一講座および生体防御医学研究所生化学部門の多くの人達によって行なわれたものである。それぞれの人達の貢献は文献を見ていただくとして、御協力に感謝する次第である。またこの研究は文部省科学研究費補助金 (特別推進研究 61065007) によって行なわれた。

## 参 考 文 献

Akimaru, H., K. Sakumi, T. Yoshikai, M. Anai and M. Sekiguchi (1990) Positive and negative regulation of transcription by a cleavage product of Ada protein, *J. Mol. Biol.*, **216**, 261-273.  
Akiyama, M., T. Horiuchi and M. Sekiguchi (1987) Molecular cloning and nucleotide sequence of the *mutT* mutator of *Escherichia coli* that causes A: T to C: G transversion, *Mol. Gen. Genet.*, **206**,

9-16.

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. U.S.A.*, **86**, 3949-3952.  
Au, K. G., S. Clark, J. Miller and P. Modrich (1988) *Escherichia coli mutY* gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 8877-8881.  
Day, R. S., III and C. H. I. Ziolkowski (1979) Human brain tumor cell strains with deficient host-cell reactivation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-damaged adenovirus 5. *Nature*, **279**, 797-799.  
Hayakawa, H. and M. Sekiguchi (1978) Repair of deaminated cytosine residues of DNA: Biological significance of the absence of uracil from DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1312-1318.  
Hayakawa, H., G. Koike and M. Sekiguchi (1990) Expression and cloning of complementary DNA for a human enzyme that repairs O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA, *J. Mol. Biol.*, **213**, 739-747.  
Horiuchi, T., H. Maki and M. Sekiguchi (1989) Mutators and fidelity of DNA replication, *Bull. Inst. Pasteur*, **87**, 309-336.  
Horiuchi, T., H. Maki, M. Maruyama and M. Sekiguchi (1981) Identification of the *dnaQ* gene product and location of the structural gene for RNase H of *Escherichia coli* by cloning of the genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 3770-3774.  
Koike, G., H. Maki, H. Takeya, H. Hayakawa and M. Sekiguchi (1990) Purification, structure and biochemical properties of human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **265**, 14754-14762.  
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.  
Modrich, P. (1989) Methyl-directed DNA mismatch correction, *J. Biol. Chem.*, **264**, 6597-6600.  
Potter, P. M., M. C. Wilkinson, J. Fitton, F. J. Carr, J. Brennand, D. P. Cooper and G. P. Margison (1987) Characterization and nucleotide sequence

of *ogt*, the O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9177-9193.

Rydberg, B., N. Spurr and P. Karren (1990) cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase: cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells, *J. Biol. Chem.*, **265**, 9563-9569.  
Sakumi, K. and M. Sekiguchi (1989) Regulation of expression of the *ada* gene controlling the adaptive response: Interactions with the *ada* promoter of the Ada protein and RNA polymerase, *J. Mol. Biol.*, **205**, 373-385.  
Sakumi, K. and M. Sekiguchi (1990) Structures and functions of DNA glycosylases, *Mutation Res.*, **236**, 161-172.  
Scheuermann, R., S. Tams, P. M. J. Burgers, C. Lu and H. Echols (1983) Identification of the  $\epsilon$ -subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme as the *dnaQ* gene product: A fidelity subunit for DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 7085-7089.  
Sekiguchi, M. and Y. Nakabeppu (1987) Adaptive response: Induced synthesis of DNA repair enzymes by alkylating agents, *Trends in Genet.*, **3**, 51-54.  
Takano, K., T. Nakamura and M. Sekiguchi (1991) Roles of two types of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferases in DNA repair, *Mutation Res.*, **254**, 37-44.  
Takano, K., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1988) Functional sites of the Ada regulatory protein of *Escherichia coli*: Analysis by amino acid substitutions, *J. Mol. Biol.*, **216**, 261-271.  
Tano, K., S. Shiota, J. Collier, R. S. Foote and S. Mitra (1990) Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O<sup>6</sup>-alkylguanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 686-690.  
Yoshikai, T., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1988) Proteolytic cleavage of Ada protein that carries methyltransferase and transcriptional regulator activities, *J. Biol. Chem.*, **263**, 19174-19180.

## ヒト細胞を用いた環境変異原の検出と作用機構

京都大学医学部 異 紘 一

### 1. はじめに

生物体は脱プリンや脱アミノ化など自然に生じた DNA 変化や、変異原により誘発された DNA 損傷に対して修復機構を備えており、ゲノムの恒常性維持がはかられている。従って免疫システムと同様、DNA 修復も重要な生体防御装置の一つと言ってよい。半保存的 DNA 複製に先立って鋳型 DNA 上の損傷量に対する修復の効率が不十分であったり、複製自体に際してエラーが起こるとゲノムの変更につながり、それが検知可能な形質変化を伴う場合に「突然変異」となる。

高等動物の配偶子に突然変異が生ずれば遺伝影響を及ぼすが、体細胞に生じた突然変異も悪性腫瘍の発症・進展や老化の原因となることが次第に明らかになりつつある。老化に関与する標的遺伝子については未だ確実な情報は得られていないが、発がんやその悪性転化には優性発がん遺伝子群と劣性がん抑制遺伝子群に大別される多数の標的遺伝子があり、それらに起こる複数の(多重の)ゲノム変化が直接、間接に関与していることが判明してきた (Vogelstein *et al.*, 1989)。ネズミチフス菌を用いるエームス・テストは人間環境に存在する多数の工業生産物や自然産物の中から変異原性を有する物質を選別するのに多大の貢献をしたが、エームス検定系における変異原性と動物実験における発がん性が質的、あるいは量的に一致しない例や、高等動物(主に齧歯類動物)培養細胞検定系での変異原性の強さとかなり異なる結果を与える物質が存在することが明らかになった。これは細菌と高等動物が染色体構造や遺伝子の存

在様式の点で大きく違っていることや、変異原物質の代謝・修飾が類似ではない場合のあることを考えても十分に理解できる。さらに高等動物のなかですらヒトとマウス、ハムスター、ラットなどの齧歯類動物とでは DNA 修復の機構やその効率が異なっている場合のあることが紫外線やアルキル化剤について知られてきた。従ってヒトに対する環境変異原の危険度を評価するための資料は、細菌や齧歯類動物細胞についてではなく、ヒト細胞を用いて得られた知見に依るべきであり、より詳細にヒト細胞突然変異の特徴を明らかにすることが重要と考えられた。私達は EB ウイルスによる不死化で大量の細胞供給が可能となったリンパ芽球様細胞をヒト体細胞材料に選び、マイクロウェルプレート上で限界希釈に基づく彷徨試験を行って、十分に高い推計学的精度の下に突然変異頻度を測定することができるようになった。この方法で DNA 修復・複製・組換えといった DNA 基本代謝に欠陥があると考えられている高発がん性遺伝病の患者由来細胞についてその突然変異特性を検討した。

### 2. マイクロプレートを用いるヒトリンパ芽球様細胞の突然変異頻度測定

単細胞として増殖能を示し、コロニー形成を指標とする生存率解析が適用可能なヒト体細胞材料として従来からよく使われてきたヒト線維芽細胞初代培養では倍加数が有限であるために、変異試験に必要な大量の細胞を準備することが困難な場合が少なくない。SV 40 ウイルスでトランスフォ

〒606 京都市左京区吉田近衛町

Detection and Analyses of Mutations Induced by Environmental Mutagens in Human Cells

Kouchi Tatsumi

Department of Molecular Oncology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konocho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

ームした不死化線維芽細胞はほとんどの場合、染色体が不定の過剰異数性を獲得し突然変異解析には不向きである。一方、EB ウイルスでトランスフォームした不死化 B リンパ球のリンパ芽球様細胞では樹立後かなり長期にわたって二倍体にとどまっている。コロニー数算定のために、本来浮遊状態で増殖するリンパ芽球様細胞を軟寒天で非動化してコロニー形成を行わせることは不可能ではなかったが、例外的な細胞をのぞいて技術的に極めて困難で (Tatsumi *et al.*, 1980; 巽, 1990), しかもその平板効率は決して高くなかったため、余り利用されることがなかった。一方, Furth ら, および Kraemer らは限界希釈を行ったのちリンパ芽球様細胞をマイクロタイトレーションプレートでウェル中で増殖させる彷徨試験を案出して生存率解析を行い (Furth *et al.*, 1981; Kraemer *et al.*, 1980) さらに Furth らはこれに薬剤選択を組み合わせることで変異体存在比を算定する方法を開発した (Furth *et al.*, 1981)。私達も先ずマイクロプレート上で平板効率が 10% 以上を示すリンパ芽球様細胞株を選び出し, Furth らにならってこの彷徨試験を採用した。

予めリクローニングや HAT (ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン) 処理で変異体存在比のバックグラウンドをさげておいたリンパ芽球様細胞を, 少なくとも 100 個の変異体が生存できる細胞数と変異原用量の条件で誘発処理を行う。細胞集団が再び指数増殖期に入り, 変異指標の種類で決まる最大形質発現に要する日数を経過するまで培養維持する。その後, 非選択プレートには 0.67-20/ウェル, 選択プレートには  $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ /ウェルの細胞を播種し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2-3 週培養の後, 増殖コロニーを含む陽性ウェルと含まない陰性ウェルを判別する。プレート上の 96 ウェルへの細胞播種はランダム事象だから各ウェルでのコロニー形成はポアソン分布に従う。播種した全ウェル数 T に対する陰性ウェル数 N の比, 即ち陰性ウェルの確率を  $P(O) = N/T$  とすると, ウェル当りの平均コロニー形成単位 C は  $C = -\log_e[P(O)]$  で与えられ, これをウェル当り平均播種細胞数 M で除した値  $C/M$  が平板効率 PE である。変異体存在頻度 MF は選択

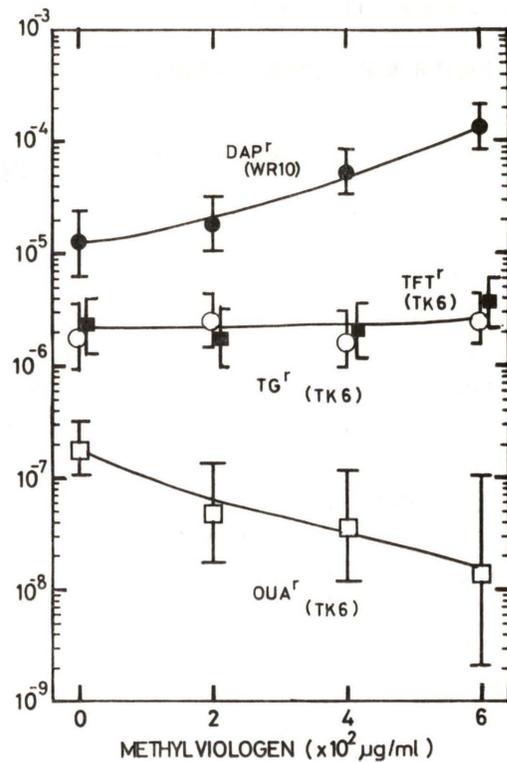


Fig. 1. TK6 細胞におけるウアバイン抵抗性 (OUA<sup>r</sup>), 6 チオ・グアニン抵抗性 (TG<sup>r</sup>), トリフルオロチミジン抵抗性 (TFT<sup>r</sup>) および WR10 細胞における 2,6-ジアミノプリン抵抗性 (DAP<sup>r</sup>) の各変異体存在頻度におよぼすパラコート (メチルビオロゲン) 37°C 3 時間処理の影響。

プレート上の平板効率 PEs と非選択プレート上の平板効率 PEO の比, PEs/PEO であらわすことができる。

彷徨試験では, 求められた変異体存在頻度の精度を 95% 信頼限界を目安として吟味でき (Furth *et al.*, 1981),  $\chi^2$  テストによって二つ以上の測定値間に有意差があるか否かの判定が簡単に行える利点がある。Fig. 1 に農薬パラコートが 6 チオ・グアニン抵抗性, ウアバイン抵抗性, さらにトリフルオロチミジン抵抗性を指標にした場合には, これらの突然変異を誘発しない実験例を示した。誘発の有無は非処理対照との単なる引き算で判定せず, 検定が行われた条件設定の適切さと共に表示されるべきと考える。

リンパ芽球様細胞の生存率は変異誘発処理後の経時的細胞数算定に基づき作成した増殖曲線の指

数増加部分の外挿から求めた。変異原処理直後の単細胞コロニー形成試験にもとづく生存率と比較すると, 変異原の種類によって外挿法は若干高い生存率を示す場合もあるが, 細胞集団に対する変異原の細胞致死作用の影響を単細胞コロニー形成より良く反映していると考えられる。

### 3. 高発がん性遺伝病患者細胞の突然変異の特徴

日光過敏と露光部の皮膚癌多発を主症状とする色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) は常染色体劣性遺伝病で患者由来細胞が紫外線の細胞致死作用に感受性が高い。除去修復能を欠く 7 つの相補性群と複製後修復の異常が疑われるバリエーション型があることがわかっている。すでにバリエーション型と A 群の線維芽細胞で紫外線の突然変異誘発に対する高感受性が報じられていたが (Maher *et al.*, 1979), 除去修復能を欠損した他の相補性群細胞についても A 群と同様であるか, 致死高感受性と突然変異高感受性は正比例関係にあるのかなどの点が明確でなかった。

Fig. 2 に示すように正常人由来対照細胞 HH 4, TK 6 や A 群 XP の保因者由来 XPF7NI に比べて 3 例の A 群および 3 例の C 群 XP 患者由来リンパ芽球様細胞株は殺菌灯紫外線 (UVC) の細胞致死作用に感受性が高い。一方, UVC の 6 チオ・グアニン抵抗性変異誘発に対して C 群 XP 細胞は正常人細胞よりも低線量で頻度上昇を認めるが, 等しい生存率を与える線量で比較すると, 両群はほぼ同一線上に重なる。これに対して 10% 生存率線量の 3.3 J/m<sup>2</sup> が自発頻度の 500 倍以上の 6 チオ・グアニン抵抗性変異を誘発する XP7NI をはじめとして XP2OS, XP150S の A 群 XP はいずれも等致死線量当りの比較でもはるかに高率に変異誘発が見られ, この点で C 群 XP と異なっていることが判明した (Fig. 3)。このように増感だけでなく変異体収率 (照射を受けた一定数の細胞当りの生存回収変異体細胞数) そのものが大きい (Fig. 4 上) 事実上, C 群に比べて A 群の除去修復能の欠損の程度が強いことから, 忠実度を犠牲にしてでも単細胞として生存せしめるような DNA 修復経路が A 群で働いている可能性を示唆する (Tatsumi *et al.*, 1987)。A 群と C 群の感

### SENSITIVITY OF HUMAN LYMPHOBLASTOID CELLS TO CYTOTOXIC EFFECT OF UV/C

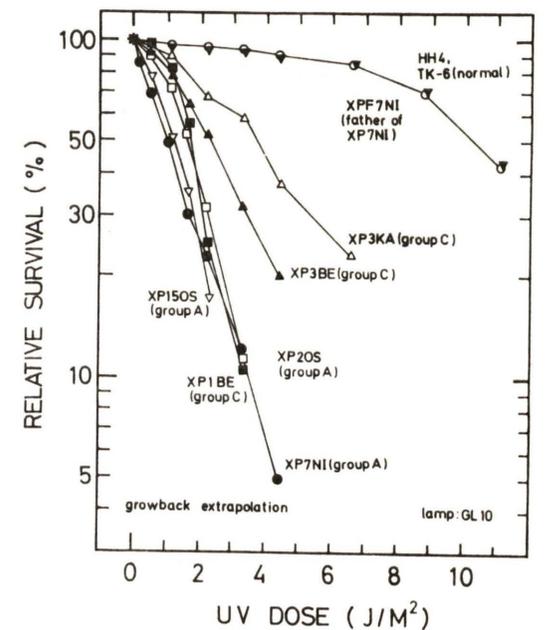


Fig. 2. ヒト・リンパ芽球様細胞の紫外線細胞致死作用に対する感受性。

### RELATIONSHIP BETWEEN UV-INDUCED MUTATION AND CYTOTOXICITY IN LYMPHOBLASTOID CELLS

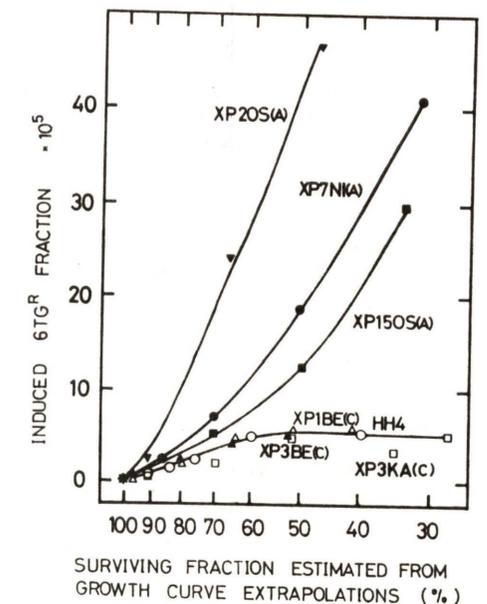
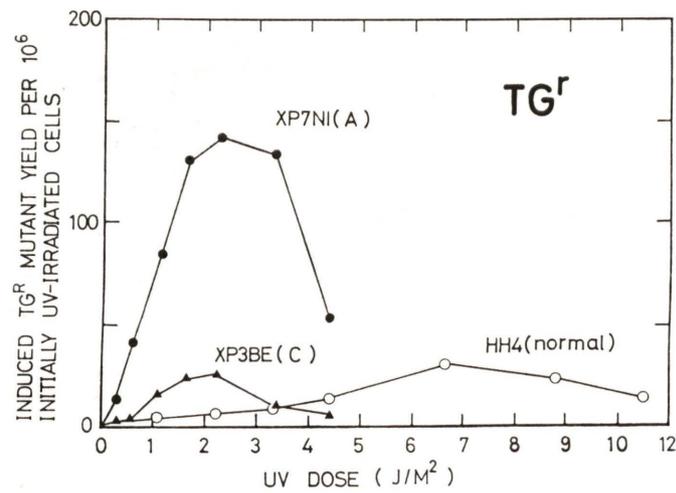


Fig. 3. ヒト・リンパ芽球様細胞の紫外線誘発 6 チオ・グアニン抵抗性突然変異誘発。

MUTANT YIELD PER  $10^6$  UV-IRRADIATED LYMPHOBLASTOID CELLS



MUTANT YIELD PER  $10^7$  UV-IRRADIATED LYMPHOBLASTOID CELLS

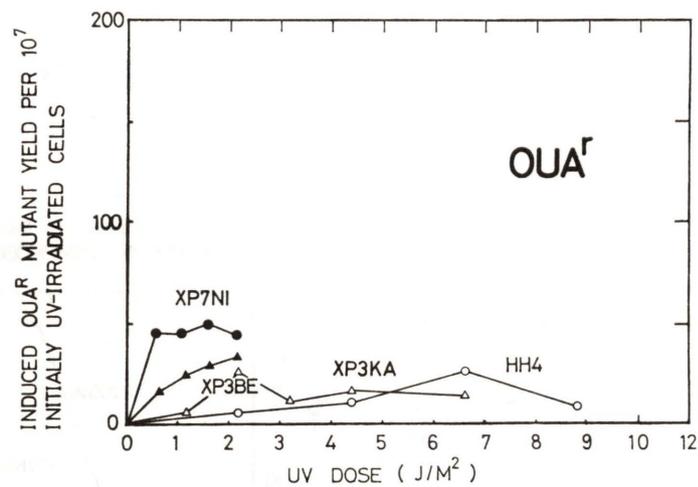


Fig. 4. 紫外線誘発6チオ・グアニン抵抗性変異(上パネル)とウアバイン抵抗性変異(下パネル)における色素性乾皮症相補性A群(●), C群(▲, △)患者, 正常人(O)由来リンパ芽球感受性の比較. 縦軸は照射  $10^6$  細胞(上パネル)または  $10^7$  細胞(下パネル)当りの生存回収変異体細胞数.

感受性の差異は優性突然変異のウアバイン抵抗性指標ではずっと小さくなっている(Fig. 4下)。ウアバイン抵抗性変異は Na/K・ATPase のウアバイン結合部位をコードする領域に生じたミスセンス変異に限られ、6チオ・グアニン抵抗性変異のように原因となるゲノム構造変化が多様(次節参照)ではない。極めて小さい欠失か、あるいはフレームシフトなどウアバイン抵抗性指標では検出され

ないような遺伝子変化がA群XP細胞で特に高率に誘発されているかもしれない。

末梢血管拡張性運動失調症(ataxia telangiectasia; AT)はリンパ網内系の腫瘍を好発する劣性遺伝病で患者由来細胞は電離放射線の細胞致死作用に感受性が高く、一時はXPの電離放射線版ではないかと疑われた。Fig. 5に示すようにAT患者由来細胞株AT1-1では対照の正常人由来細胞株TK6とほぼ同様に、 $^{137}\text{Cs-}\gamma$ 線の線量増加に応じて6チオ・グアニン抵抗性突然変異が誘発される。すなわちAT1-1細胞はTK6細胞に比べると、 $\gamma$ 線の細胞致死作用にたいして約2.3倍感受性がより高いのに、6チオ・グアニン抵抗性変異誘発の用量反応曲線に関する限り両細胞株間で有意の差が認められない。他のATリンパ芽球様細胞株GM2783でも同様に $\gamma$ 線に対して決してimmutableではなく対照正常人由来細胞と同じ変異感受性を有することが観察されており、

TOXICITY AND MUTAGENICITY OF GAMMA RAYS TO ATAXIA TELANGIECTASIA AND NORMAL LYMPHOBLAST

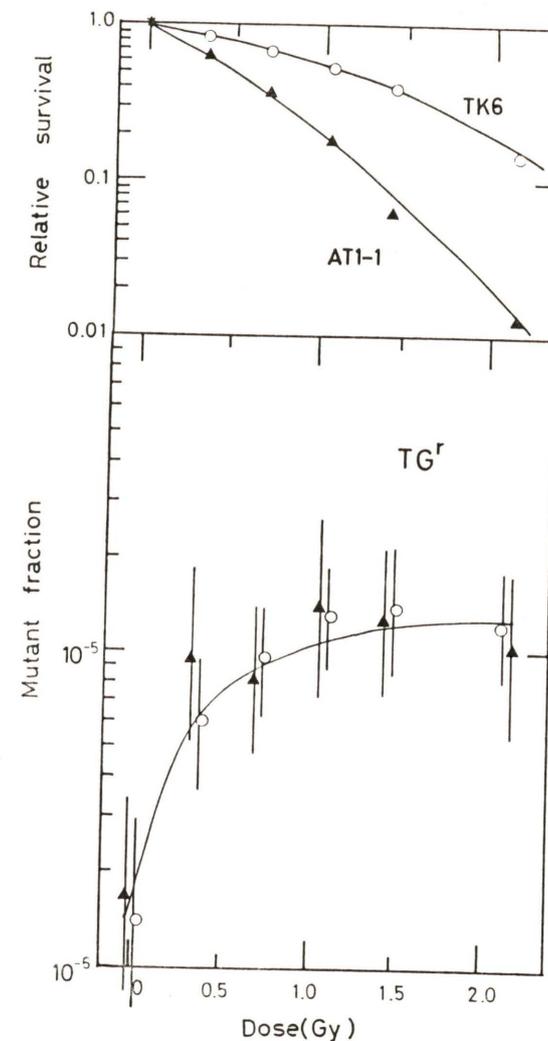


Fig. 5. 正常人由来リンパ芽球様細胞TK6と末梢血管拡張性運動失調症患者由来細胞AT1-1の $\gamma$ 線細胞致死作用(上パネル)および6チオ・グアニン抵抗性変異誘発作用(下パネル)に対する感受性.

ATリンパ芽球様細胞の一般的性質と考えてよい(Tatsumi and Takebe, 1984)。一方、ArlettらがAT線維芽細胞では電離放射線によって6チオ・グアニン抵抗性突然変異の新たな誘発を検出できないと報告している(Arlett and Harcourt, 1983)。線維芽細胞を用いる彼らの変異誘発実験が必ずしも十分な細胞量を用いて行われていない点が問題ではあるが、細胞の種類が異なると誘発変異の回収率が違う場合があるかどうか、同一患者材料での比較が必要である。 $\gamma$ 線の絶対線量に代えて生

TOXICITY AND MUTAGENICITY OF NCS TO LYMPHOBLASTOID CELLS

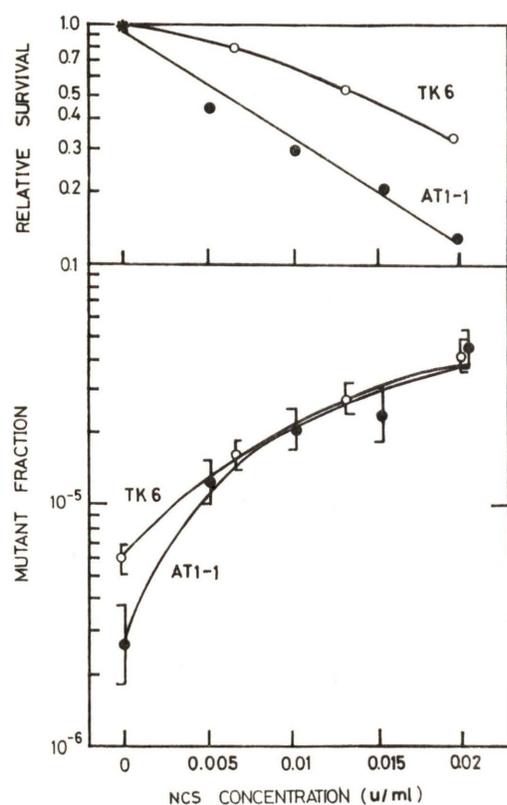


Fig. 6. 制がん剤ネオカルチノスタチンの細胞致死 (上パネル) および 6 チオ・グアニン抵抗性突然変異誘発作用の TK6 細胞と AT1-1 細胞の比較。

存率当りで誘発 6 チオ・グアニン抵抗性を比較すると、AT 細胞は正常人由来細胞にくらべて  $\gamma$  線突然変異誘発には低感受性のようにもみなせる。AT 細胞の  $\gamma$  線致死高感受性の成因为 6 チオ・グアニン抵抗性突然変異の成因为互いに独立であるか、逆に AT 細胞で欠損している DNA 修復機構のために 6 チオ・グアニン抵抗性突然変異体の取率が低いのか、両方の可能性が推測される。ほぼ同様の結果が制がん剤のネオカルチノスタチンについても得られた (Fig. 6)。

ファンコニ貧血 (Fanconi's anemia; FA) はやはり常染色体劣性遺伝病で、患者は非リンパ性急性白血病を好発する。患者細胞は DNA 鎖間架橋剤の細胞致死作用に感受性が高い。FA 患者由来 B リンパ芽球様細胞株 HSC 72, HSC 99 について

diepoxybutane (DEB) 及び mitomycin C (MMC) の細胞致死作用と突然変異誘発作用を検討し、HH 4, TK 6 の場合と比較した。MMC, DEB 共に TK 6 では用量依存性に 6 チオ・グアニン抵抗性を誘発する (Fig. 7 左)。HSC 72, 99 両株は  $D_0$  値の比較で、TK 6 に比べ約 8 倍 DEB の細胞致死作用に高感受性であるが、1  $\mu$ M 以上では 6 チオ・グアニン抵抗性変異は新たに誘発されるどころか非処理対照より低下した。ところが生存率にほとんど影響しない DEB 0.01~0.3  $\mu$ M では HSC 72, 99 では  $4 \times 10^{-6}$  の base line が  $3 \times 10^{-5}$  まで上昇し (Fig. 7 右)、特異な用量反応曲線を示した (Takebe *et al.*, 1987)。MMC 処理後の 6 チオ・グアニン抵抗性頻度も HSC 72, 99 では DEB の場合と同様であった。遠紫外線の誘発する 6 チオ・グアニン抵抗性変異と細胞致死の関係は FA 細胞でも正常人細胞と変わらなかった (Fig. 8), AT の場合と同じ様に、変異誘発損傷と致死損傷の相互関係が架橋生成剤については偏っているものと考えた。極低濃度の DNA 鎖間架橋剤によって有意の変異誘発が見られたことからファンコニ貧血症リンパ芽球様細胞は hypermutable とみなしうるが、検出可能な濃度範囲が極めて狭い点が、色素性乾皮症と UV の場合とは大きく異なっている。しかし生存率を余り低下させない濃度での高突然変異原性は、微量でもこの様な作用原が環境中に存在すればファンコニ貧血症患者の発がんの原因となる可能性を示唆している。

4. 6 チオ・グアニン抵抗性変異体の遺伝子変化

HPRT 遺伝子は 9 つのエクソンからなる全長約 42 kb の大きな遺伝子で Xq 26~Xq 27 に位置し、染色体 3, 5 番に 1 つずつ、11 番に 2 つ、計 4 つの偽遺伝子がある。6 チオ・グアニン抵抗性変異はこの HPRT 遺伝子の失活を指標とするものである。ヒト生殖細胞に生じた HPRT 欠損変異、すなわちレッシュ・ナイハン病患者の HPRT 遺伝子について構造が解析され、点突然変異から大きな欠失まで様々な変異が病因となっていること、保因者の解析からかなり頻りに新生突然変異が起こっていることが判ってきた。同様にして培養体細胞に起こった HPRT 欠損変異に

TOXICITY AND MUTAGENICITY OF DIEPOXYBUTANE IN LYMPHOBLASTOID CELLS

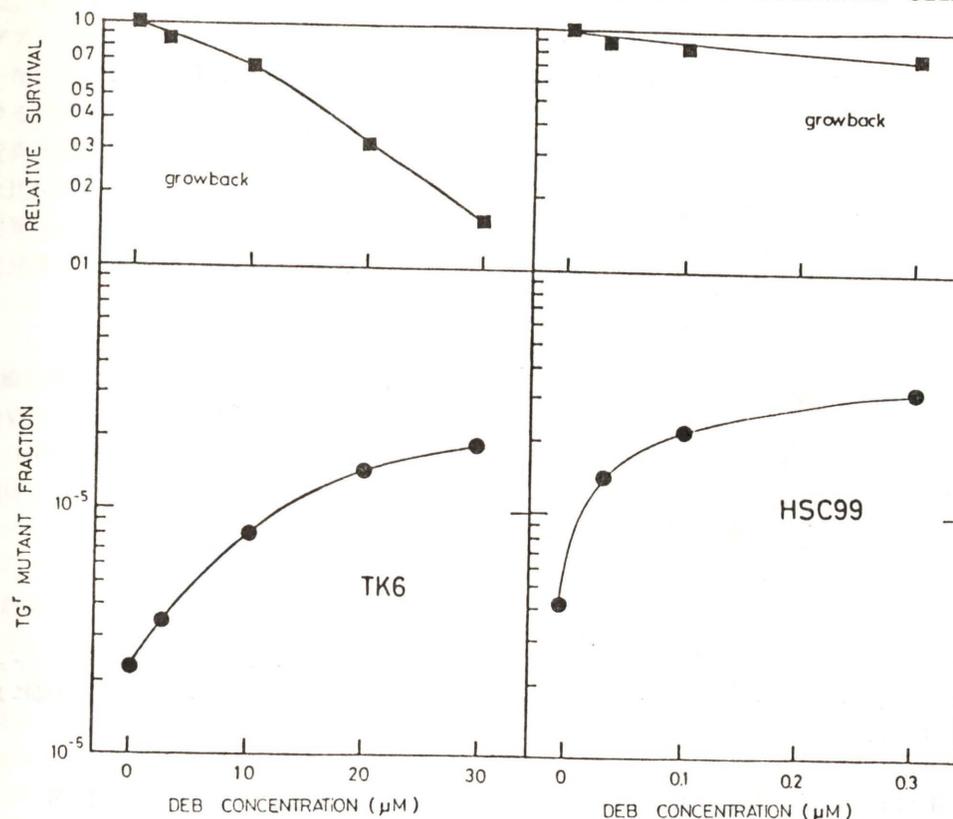


Fig. 7. ジエポキシブタンの細胞致死作用 (上パネル) と 6 チオ・グアニン抵抗性変異誘発 (下パネル) に対する正常人細胞 TK6 (左) とファンコニ貧血細胞 HSC99 (右) の感受性比較。横軸目盛は左右パネルで 100 倍異なる。

についても、cDNA 全長をプローブとしたサザン・ブロットハイブリダイゼーションにより大まかに構造変化の大小が区別できる。例えばゲノム DNA を制限酵素 EcoRI で消化した場合には、野生型細胞では偽遺伝子の 4 本のバンドの他に X 染色体上に存在する真性ゲノム HPRT 遺伝子が 11.0, 10.5, 8.3, 8.0 kb のバンドとして検出される。突然変異細胞では、点突然変異や極めて小さい DNA 変化 (数十 bp 以下) はサザン・ブロットでのバンドの違いとしては見分けられないが、大きな DNA の欠失、挿入などはバンドの位置変化、バンドの消失、新たなバンドの出現などとして検出できる。正常人由来 TK 6 細胞の自発 6 チオ・グアニン抵抗性突然変異体ではバンドの欠失が約 30% に見られた (Table 1)。一方、<sup>137</sup>Cs  $\gamma$  線誘発変異体においては 44% でバンドの欠失を

Table 1. 正常人由来リンパ芽球様細胞 TK6 の 6 チオ・グアニン抵抗性変異体における欠失変異の割合 (Tachibana *et al.*, 1990)

Treatment	Number of deletion mutants / Number of clones analysed
spontaneous	5/17
UV	0/14
$\gamma$	7/16

検出した (Tachibana *et al.*, 1990)。同様の検討は他の研究グループでも行われており、バンド変化を示す変異体の比率は報告者によりまちまちだが、私達の実験条件では、自発突然変異によって比較的高頻度に HPRT 遺伝子上に DNA の欠失が生じており、 $\gamma$  線照射によって、さらに高頻度で欠失が生じるものと解釈される。これに対し紫外線誘発変異細胞では、14 クローン解析した内

INDUCED MUTATION AS A FUNCTION OF SURVIVING FRACTION IN HUMAN LYMPHOBLASTOID CELLS

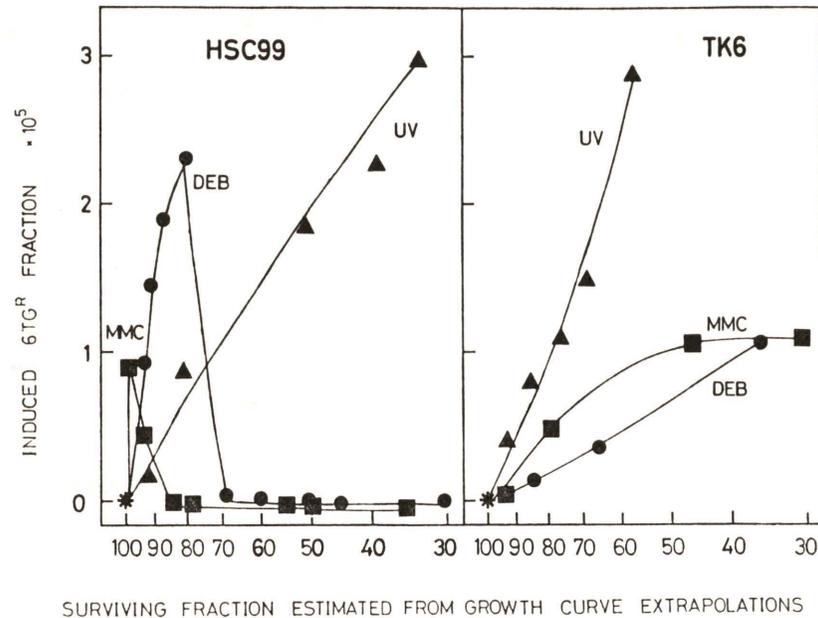


Fig. 8. フェンコニ貧血細胞 HSC99 と正常人細胞 TK6 の各種変異原の致死ヒット当りの 6 チオ・グアニン抵抗性変異体収率の比較. 縦軸は  $10^5$  処理細胞当りの生存回収変異体数. 横軸は増殖曲線外挿による生存率.

DIFFERENTIAL MUTABILITY OF APRT AND HPRT LOCI IN WR10 CELLS

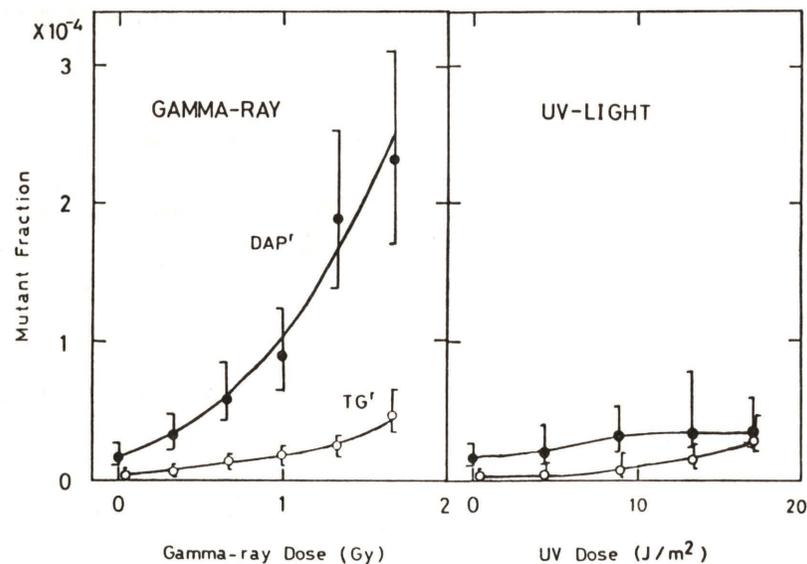


Fig. 9. 2,8-ジハイドロキシアデニン尿路結石症保因者由来リンパ芽球における  $\gamma$  線 (左パネル), 紫外線 (右パネル) 誘発変異の APRT, HPRT 2 座位間比較. DAP<sup>R</sup>: 2,6-ジアミノプリン抵抗性 (●) TG<sup>R</sup>: 6 チオ・グアニン抵抗性 (○). (縦線は 95% 信頼限界).

にバンドの変化したものは全く見られず対照的であった。また DNA 鎖間架橋剤が誘発する 6 チオ・グアニン抵抗性の HPRT 遺伝子解析は終わっていないが、前節に触れた AT 細胞や FA 細胞における奇異な作用量と誘発変異の関係、および誘発変異と細胞致死の関係はこれら遺伝病患者細胞では比較的大きなゲノム変化を伴うような型の突然変異体が DNA 修復欠損のために生存できず、変異体として回収されにくい可能性が考えられる。

5. 常染色体上の新しい変異検出指標

相同染色体が無い、機能していない X 染色体上の HPRT 遺伝子では細胞分裂組換えや不分離は期待できないし、前節のサザン・ブロット解析でバンドの変化が認められた欠失などによる変異はその範囲が HPRT 遺伝子を超えて大きい場合回収されにくいかもしれない。この点を明らかにするために常染色体上の新しい検出指標を利用し、同一細胞で 6 チオ・グアニン抵抗性指標と同時に比較する必要がある。私は常染色体劣性遺伝病、2,8 ジハイドロキシアデニン (DHA) 結石症の保因者から樹立したリンパ芽球様細胞を用いて、染色体 16 番長腕に位置するアデニン・フォスホリボシルトランスフェラーゼ (APRT) 遺伝子における前方突然変異  $aprt^{+/-} \rightarrow aprt^{-/-}$  を定量的に検出するシステムを開発した。その結果、APRT 変異の指標である 2,6 ジアミノプリン抵抗性は HPRT 変異の 6 チオ・グアニン抵抗性に比べ、自発変異でも約  $2 \times 10^{-5}$  で約 10 倍ほど高率であることを見出した。保因者由来細胞株 4 株はいずれも  $\gamma$  線細胞致死作用感受性に関し、正常人由来細胞と異なっていなかったが、この内の 1 株 WR10 では  $\gamma$  線照射後、4 日以降少なくとも 12 日まで  $\gamma$  線誘発 2,6 ジアミノプリン抵抗性変異頻度は安定で、線量増加に応じて  $2.3 \times 10^{-4}$  まで上昇した。最大発現は 7 日であった。 $\gamma$  線誘発突然変異の自発突然変異に対する頻度の相対増加は共に 10 倍前後で 6 チオ・グアニン抵抗性と 2,6 ジアミノプリン抵抗性で大きい差は無いが、ジアミノプリン抵抗性の放射線誘発による頻度の絶対増加は 6 チオ・グアニン抵抗性よ

り約 6 倍以上大きい (Fig. 9 左)。

一方、UV 誘発変異の効率は 2,6 ジアミノプリン抵抗性指標でも 6 チオ・グアニン抵抗性指標でもほぼ同じで自発変異頻度が元来高い 2,6 ジアミノプリン抵抗性変異の方が数倍の誘発にとどまるため有意の上昇を検出し難い (Fig. 9 右)。ヒト APRT 遺伝子は 5 つのエクソンからなり、全長は 2.3 kb で、HPRT の 43 kb よりはるかに小さいから、標的の大きさから 2 つの指標の違いを説明することには無理がある。APRT 遺伝子およびその近傍には TaqI と SphI の制限酵素断片長多型 (RFLP) が知られている。保因者由来細胞株の内、幾つかはこれらの RFLP についても異型接合体であることを確かめたので、allele loss を指標に 2,6 ジアミノプリン抵抗性変異体の解析を進めている。予備的検索により自発変異、 $\gamma$  線誘発変異では異型接合性喪失変異体がそれぞれ 75%, 90% と前節にふれたサザン・ブロット上で変化を認める 6 チオ・グアニン抵抗性変異体の割合よりも高いことが判っている。

以上の結果から紫外線のごとく点突然変異優位の変異原では APRT, HPRT どちらの座位でも変異体収率は大きく違わないが、自発変異や  $\gamma$  線誘発変異など大きなゲノム変化を伴う変異では常染色体上の APRT 座位検出指標がより有効であると結論できる。

染色体 17 番長腕上のチミジン・カイネース遺伝子のヘテロ欠損株の TK6 ではトリフルオロチミジン抵抗性、6 チオ・グアニン抵抗性、ウアバイン抵抗性の 3 つの突然変異を同時に調べることができるが、パラコートは新しい変異を誘発しない (Fig. 1)。パラコートの細胞致死作用に対して感受性は同じである WR10 では 2,6 ジアミノプリン抵抗性を指標とすると弱いながら有意の誘発が認められた (Fig. 1)。従ってヒト細胞を用いる変異原性検定になるべく多くの指標を用いるべきであろう。

自然突然変異や電離放射線による誘発突然変異のごとく欠失が関与する場合に欠失の大きさが標的遺伝子内にとどまらず、隣接の遺伝子も巻き込むほど広範である場合がありうる (多座位欠失)。HPRT 遺伝子が位置する X 染色体は半接合体か

ら、欠失の及んだ隣接遺伝子が細胞増殖に必須であれば6チオ・グアニン抵抗性変異体として回収されない。一方、相同染色体がある常染色体16番上のAPRT遺伝子にあっては機能対立遺伝子側に生じた欠失が広範な場合にも、遺伝子量効果が無視できるほど小さく、かつ失活対立遺伝子側に隣接するessential geneが無傷である限り2,6ジアミノプリン抵抗性変異体として生存できる。2つの検出マーカーの自然突然変異頻度の差異と構造解析の結果からも、用いた保因者由来細胞株が予め片方の染色体上に有する経世代変異は点突然変異であっても多座位欠失ではないことが予想されたが、ごく最近エキソン3上のナンセンス変異であることが報じられ、私達もこれを追試確認した。この他にX染色体上では起こり得ない機序として、染色体不分離や組換えなどが2,6ジアミノプリン抵抗性変異生成に関与することも十分に考えられる。

## 6. おわりに

ヒトリンパ芽球様細胞を試料に選ぶ突然変異検定系を用いて、XPおよびFA患者由来細胞では特定の作用原による突然変異誘発が正常人由来細胞に比し、高頻度であることが明らかとなり、ヒト細胞にはそれらの変異を抑制する機構が備わっていることが示唆された。

一方、致死作用高感受性にもかかわらずAT患者由来細胞では $\gamma$ 線やネオカルチノスタチン誘発変異感受性が正常人細胞と同じである事実やFA患者由来細胞においてDNA鎖間架橋剤が少しでも細胞毒性を発現する濃度に至ると全く変異体が認められなくなる事実は、6チオ・グアニン抵抗性指標のみで、これらの高発がん性遺伝病の突然変異感受性を評価してはならない可能性を示している。6チオ・グアニン抵抗性変異体のサザーン・ブロット解析の結果や、2,8ジハイドロキシアデニン尿路結石症保因者由来細胞を用いたAPRT座位における変異誘発の実験結果もこの考えを強く支持する。

常染色体異型接合体における遺伝子失活誘発変異の分子機構を明らかにすることは、現在続々と存在の証拠が集積しつつあるがん抑制遺伝子の失

活と腫瘍発生・悪性進展の関係を追究する上からも極めて重要である。このためにATやFAの患者由来リンパ芽球様細胞から人工的にAPRTヘテロ欠損株を作成する試みをすでに開始しており、これらの細胞におけるゲノム不安定性の意義をより明確にできるものと期待している。

## 7. 謝辞

このたび受賞の機会を与えていただいた本学会の諸先輩に厚く御礼申し上げますとともに、終始ご指導を賜った武部啓教授に深く感謝いたします。本研究は下記の諸氏との共同研究の成果であり、その一部は文部省科学研究費補助金(環境科学特別研究, がん特別研究, バイオがん), 科学技術庁原子力平和利用委託研究および日産振興財団の援助を受けました。

共同研究者: 立花 章, 藤森 亮, 有田 泉,  
豊田万里子, 法喜ゆう子, 武部 啓

## 参 考 文 献

- Arlett, C. F. and S. A. Harcourt (1983) Variation in response to mutagens amongst normal and repair-defective human cells, In: C. W. Lawrence (Ed.) Induced Mutagenesis: Molecular Mechanisms and Their Implication for Environmental Protection, Plenum, New York, pp. 249-266.
- Furth, E. E., W. G. Thilly, B. W. Penman, H. L. Liber and W. M. Rand (1981) Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plate, *Analyt. Biochem.*, **110**, 1-8.
- Kraemer, K. H., H. L. Waters and J. K. Buchanan (1980) Survival of human lymphoblastoid cells after DNA damage measured by growth in microtiter wells, *Mutation Res.*, **72**, 285-294.
- Maher, V. M., D. J. Dorney, A. L. Mendrala, B. Konze-Thomas and J. J. McCormick (1979) DNA excision-repair processes in human cells can eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet irradiation, *Mutation Res.*, **62**, 311-323.
- Tachibana, A., T. Ohbayashi, H. Takebe and K. Tatsumi (1990) Molecular changes in UV-induced and  $\gamma$ -ray-induced mutations in human lymphoblastoid cells, *Mutation Res.*, **230**, 159-166.
- Takebe, H., K. Tatsumi, A. Tachibana and C. Nishigori (1987) High sensitivity to radiation and chemicals in relation to cancer and mutation, In: E. M. Fiedler *et al.* (Eds.), *Radiation Re-*

search, Taylor and Francis, Inc., London, pp. 443-448.

Tatsumi, K., K. Bose, K. N. Ayres and B. Strauss (1980) Repair of neocarzinostatin-induced DNA damage by the apurinic/aprimidinic pathway in human lymphoma and lymphoblastoid cells, *Biochemistry*, **19**, 4761-4766.

Tatsumi, K. and H. Takebe (1984) Gamma-irradiation induces mutation in ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells, *Gann*, **75**, 1040-1043.

Tatsumi, K., M. Toyoda, T. Hashimoto, J. Furu-

yama, T. Kurihara, M. Inoue and H. Takebe (1987) Differential hypersensitivity of xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cell lines to ultraviolet light mutagenesis, *Carcinogenesis*, **8**, 53-57.

巽 紘一 (1990) ヒト細胞の入手と培養: リンパ球細胞の系統化, 染色体診断マニュアル (武部啓編), 講談社, pp. 1-30.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. E. Kern, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, Y. Nakamura and R. White (1989) Allelotype of colorectal carcinomas, *Science*, **244**, 207-211.

## メチル基置換芳香族炭化水素の代謝的活性化

東京薬科大学 第二衛生化学教室 渡部 烈

### はじめに

環境中に存在する癌原性物質のほとんどは脂溶性であり、化学的には安定である。これら安定な物質は、たとえ DNA と接触したとしてもこれを化学的に修飾しない。しかし、癌原性物質が体内に侵入すると、生体もつ“薬物代謝酵素”とよばれる一群の酵素によって代謝され、化学的に不安定な、反応性に富む活性代謝物に変換される。活性代謝物は DNA と接触すると、構成塩基の求核官能基と反応し、共有結合を形成する。化学修飾された DNA 塩基は、修復が不可能な場合に誤った遺伝情報を与えるために、細胞を死か変異に至らしめる。この過程は化学発癌におけるイニシエーションプロセスとよばれており、活性代謝物は、したがってイニシエーターである。環境中に存在する化合物が直接イニシエーターになる訳ではない。癌原性物質の代謝的活性化という、生体にとって不利な生物的化学反応の存在は、活性代謝物を捕捉し、解毒する薬物代謝酵素の存在で相殺されているかにみえる。しかし、癌原性物質の活性化に関与する酵素の活性が活性代謝物の不活性化に関与する酵素の活性よりも相対的に高い家系的な不均衡性や、過剰量の癌原性物質の侵入による活性代謝物のレベルの上昇は、DNA に対する化学修飾の頻度を高めるであろう。

この稿では、標記の癌原性物質の代謝的活性化と不活性化について、筆者の研究室における成果を中心に記述する。なお、抱合反応による癌原性物質の代謝的活性化機構全般に関しては、筆者らの総説を参照されたい (奥田・渡部, 1988)。

### 1. メチル基の導入による多環状芳香族炭化水素 (PAH) の強癌原性化

PAH には、それ自身の癌原性がきわめて微弱であるにもかかわらず、メチル基が導入されると、癌原性が著しく増大する例が多く知られている (Fig. 1) (Dipple, 1976; Selkirk, 1980)。例えば benz[*a*]anthracene (BA) では、7 または 12 位 (L-領域) へのメチル基の導入は、癌原性を著しく増強させ、7,12-dimethyl-BA (DMBA) は benzo[*a*]pyrene (BP) を凌ぐ既知 PAH 中で最強の癌原性物質とされている。Chrysene (CR) の場合も同様であり、5-methyl-CR (5-MCR) の癌原性は BP のそれに匹敵する。

### 2. P-450/sulfotransferase (ST) によるメチル-PAH の代謝的活性化

メチル基置換 PAH の代謝的活性化機構として、DMBA (Jerina, *et al.*, 1978) や 5-MCR (Hecht, *et al.*, 1978) では、BP と同様に PCB 前処置ラット肝で生成する湾領域ジオールエポキシドが活性代謝物であるとする説が提唱されている。しかし、これらの説は、メチル基が導入されることによって PAH の癌原性がなぜこれ程までに増強されるのかという根本的な疑問点に対し納得のゆく答えを与えていない。

筆者らは、未処置ラット肝における DMBA の主代謝物である 7-hydroxymethyl-12-methyl-BA (7-HMBA) (Watabe, *et al.*, 1982a), 12-hydroxymethyl-7-methyl-BA (12-HMBA) (Watabe, *et al.*, 1985c), および 7,12-dihydroxymethyl-BA (DHBA)

〒192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

Metabolic activation of carcinogenic methylarenes  
Tadashi Watabe

Laboratory of Drug Metabolism and Toxicology, Department of Hygienic Chemistry, Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-03, Japan

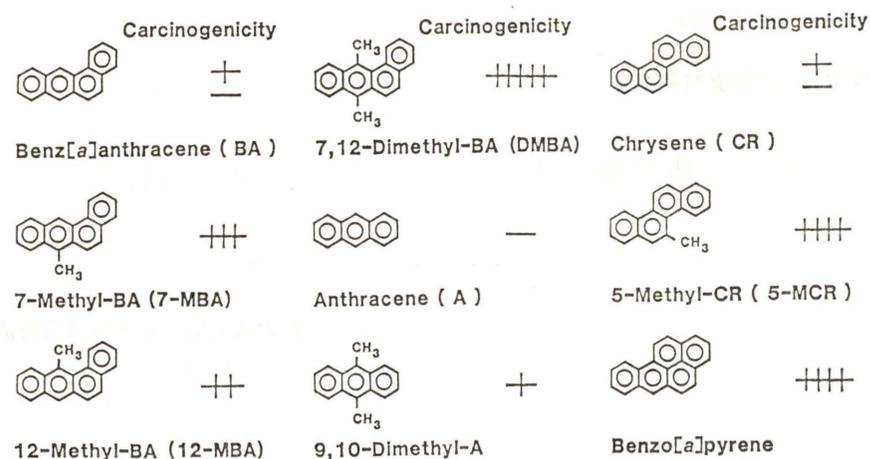


Fig. 1. Increase in carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons by methylation.

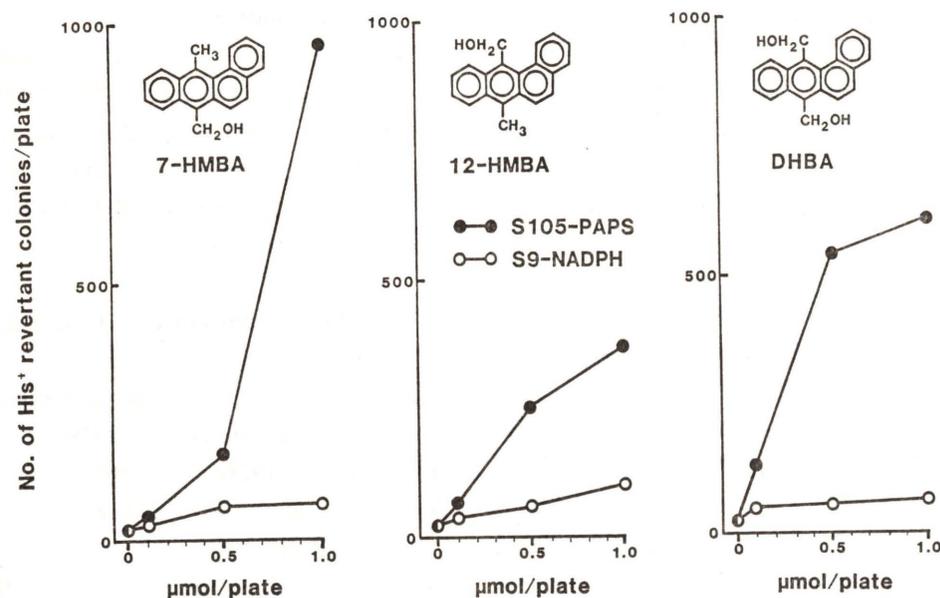


Fig. 2. Mutagenicity of hydroxy derivatives of DMBA toward *S. typhimurium* TA98 in the presence of metabolic activation systems.

(Watabe, *et al.*, 1985b), および 7-methyl-BA の主代謝物である 7-hydroxymethyl-BA (7-HBA) (Watabe, *et al.*, 1986a), ならびに 5-MCR の主代謝物である 5-hydroxymethyl-CR (5-HCR) (Okuda, *et al.*, 1986a) について, これらからラット肝細胞質中で PAPS を補酵素とする ST によって生成する活性な硫酸エステルを代謝物として単離し, 対応する合成標品と同定した。上記ヒドロキシメチル-PAH はいずれも母化合物メチル-

PAH と同様に強癌原性であるが, 両者とも *Salmonella typhimurium* TA 98 株に対し直接的には変異原性を示さない。しかし, ヒドロキシメチル-PAH はラット肝細胞質画分 (S105) と PAPS が共存すると, 例外無く強力な変異原性を示し, しかも変異原性の強度はラット肝 S9-NADPH 系共存の場合よりもはるかに大きい。その 1 例として, 7-HMBA, 12-HMBA および DHBA の場合を示す (Fig. 2)。ラット肝 S9-NADPH 系で生

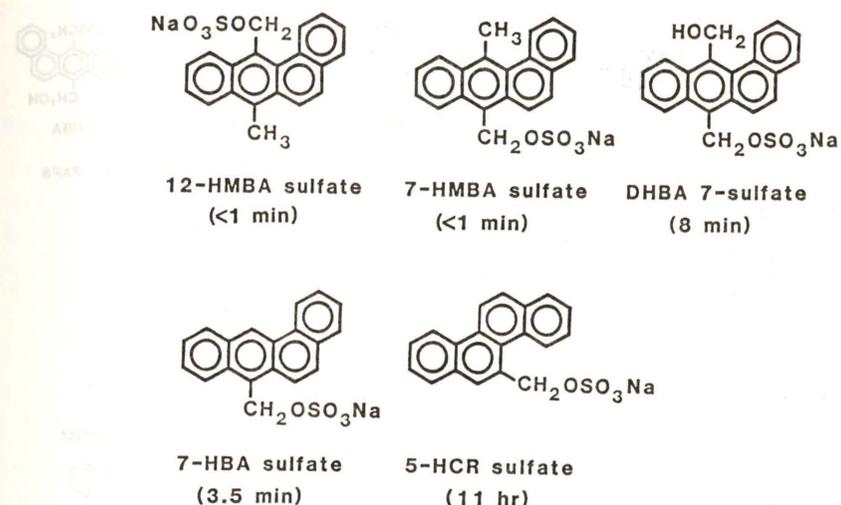


Fig. 3. Half-lives of sodium salts of highly mutagenic hydroxymethyl sulfate esters in water at 37°C.

成することが容易に予想される活性代謝物はエポキシドおよびジオールエポキシドであるので, TA 98 に対する変異原性を指標とする限り, ラット肝 S105 中に含まれる ST によって生成する活性硫酸エステルの方が, これら強癌原性ヒドロキシメチル-PAH の代謝物としてはより重要視されるべきであることを示していた。

代謝物として生成するヒドロキシメチル-PAH の硫酸エステルは, 5-HCR sulfate を除いて水中での半減期が短く (Fig. 3) (Watabe, *et al.*, 1987), OH<sup>-</sup> アニオンの攻撃を受けて元のアルコール体になるが, これら硫酸エステルは TA 98 に対する強力な直接的に作用する変異原である。仔ウシ胸腺 DNA に対してもヒドロキシメチル-PAH は, S105-PAPS 系存在下で強力な塩基修飾性を示し, 各硫酸エステルも DNA と直接反応して, 構成塩基を修飾した。例えば, 2 mg DNA/ml 溶液に対し, 100 nmol/ml の 7-HMBA, DHBA および 5-HCR の各硫酸エステルは, pH 7.4 においてそれぞれ 11.3, 0.68, および 0.24 分子/1000 bp もの高い修飾性を示した (Watabe, *et al.*, 1985a, 1987; Okuda, *et al.*, 1989a)。一般に, ヒドロキシメチル-PAH の硫酸エステルの水中での半減期の長さとは DNA に対する修飾率の大きさとの間には逆比例関係が成立する。

### 3. ヒドロキシメチル-PAH の硫酸エステルによる DNA 塩基の修飾

筆者らは, 7-HMBA (Fig. 4) (Watabe, *et al.*, 1985a), DHBA (Fig. 5) (Watabe, *et al.*, 1987), 5-HCR (Fig. 6) (Okuda, *et al.*, 1989a) の各硫酸エステルについて, 仔ウシ胸腺 DNA 構成塩基に対する共有結合的修飾を検討したところ, これら活性代謝物は, いずれも DNA を構成するプリン塩基の環外アミノ基を選択的に修飾していることが明らかになった。すなわち, 修飾された DNA を酵素的に水解し, 酸処理をした後に被修飾塩基を抽出し, HPLC で分離し, 合成標品と, HPLC, UV 吸収スペクトルおよび FD-MS により同定することによってこの事実が確かめられた。7-HMBA (Watabe, *et al.*, 1985a) および DHBA (Watabe, *et al.*, 1987) から代謝的に生成する活性硫酸エステルでは, 環外アミノ基に対する修飾比は adenine (A) < guanine (G) 塩基であるが, 5-HCR sulfate の場合は, A ≫ G 塩基であった (Okuda, *et al.*, 1989a)。

DNA の二重らせんを形成する水素結合の担い手としてのプリン塩基の環外アミノ基に対する修飾が DNA の高次構造の維持に及ぼす影響は計り知れない程大きいと考えられる。5-HCR sulfate については, Tada および Okuda らがごく最近 M13 フェージの一本鎖 DNA を鋳型とする DNA

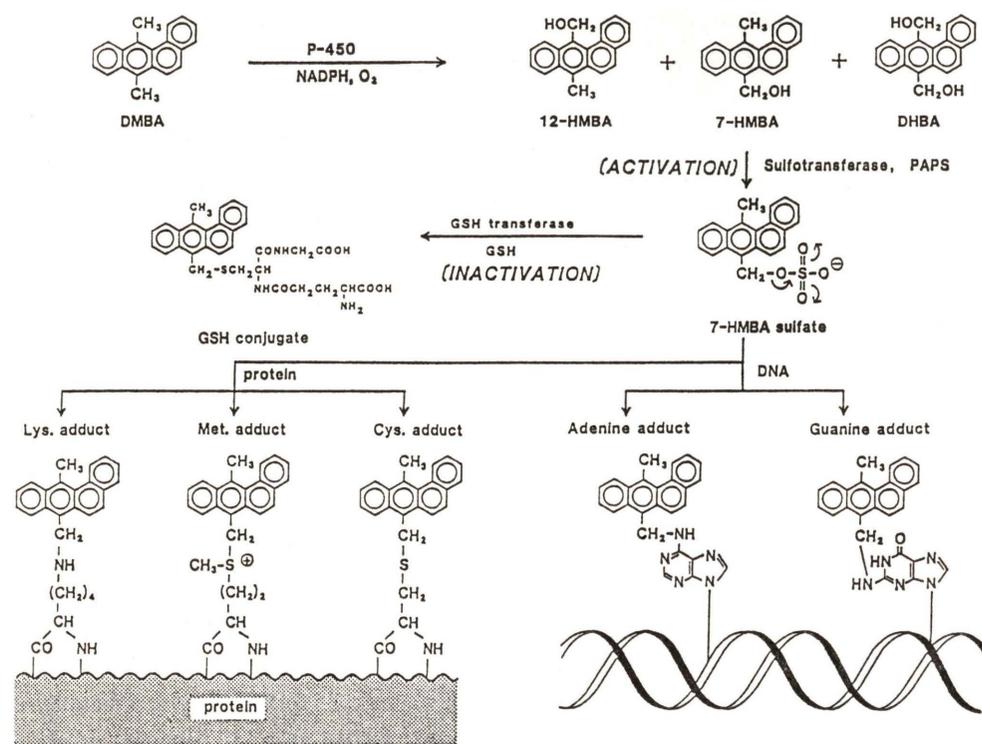


Fig. 4. Metabolic activation of the carcinogen DMBA by P-450/sulfotransferases via the proximate carcinogen 7-HMBA in rat liver.

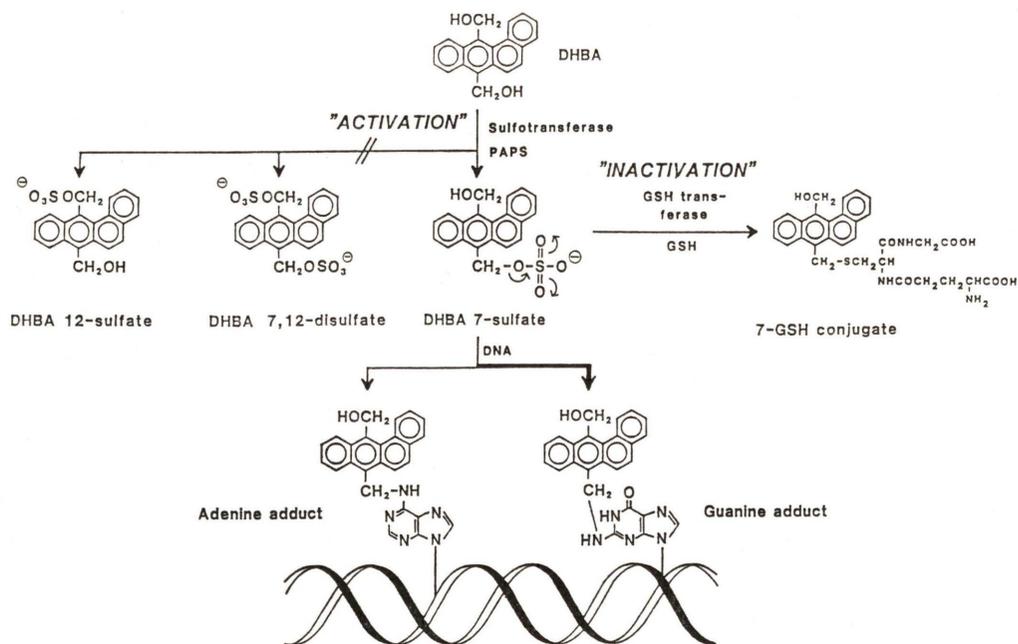


Fig. 5. Metabolic activation of the carcinogen DHBA by cytosolic sulfotransferases in rat liver.

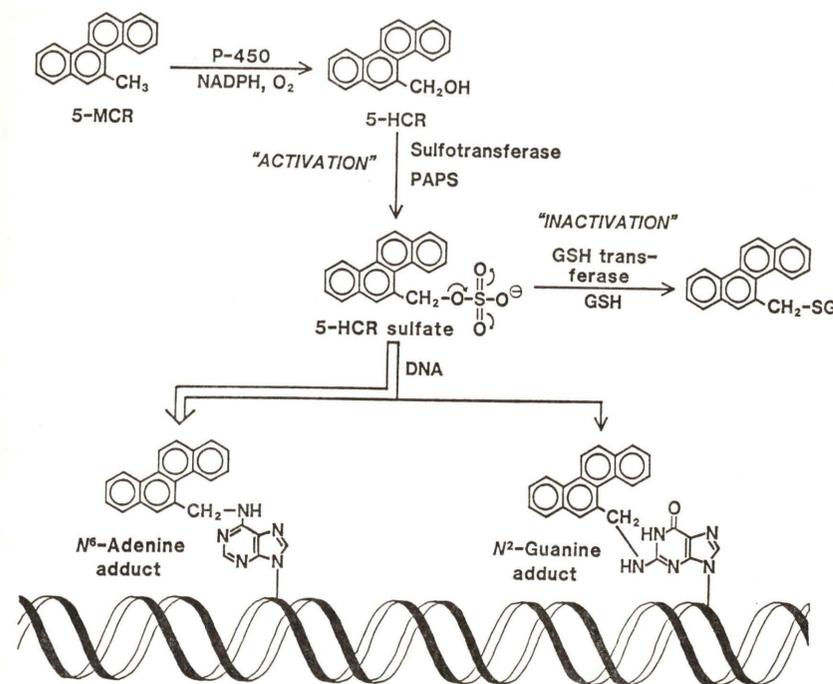


Fig. 6. Metabolic activation of the carcinogen 5-MCR by P-450/sulfotransferases via the proximate carcinogen 5-HCR in rat liver.

polymerase による DNA 複製を阻害するタイプの修飾であることを指摘している。

Wisconsin の Miller らのグループは、筆者らの研究の成果を追試し、幼若ラットにおいて *in vivo* で 7-HMBA が肝染色体 DNA 塩基に対し、筆者らが既に示していた仔ウシ胸腺 DNA に対する 7-HMBA sulfate による修飾 (Watabe, *et al.*, 1985a) と同じタイプの修飾を起こすことを報告している (Surh, *et al.*, 1987)。

#### 4. ヒドロキシメチル-PAH の硫酸エステル化を触媒するラット肝 ST

ST は異物の OH, NH, SH 基に対するスルホニル化を触媒し (Watabe, *et al.*, 1985d), これらに対応するスルホネートに変換することによって異物を極性化し、体外に排泄する重要な役目を果たしている。異物を硫酸抱合化する ST は, alcohol ST (AST), phenol ST (PST), および arylamine N-ST に大別される (Jakoby, *et al.*, 1984a)。AST については、異物のみならずステロイドの主として 3 位の OH の硫酸抱合にも関与してい

ることもあって、早くから研究がすすんでいる。AST アイソザイムについては、Jakoby ら (1984a) や Singer (1985) の両グループが、ラット肝細胞質の AST は、少なくとも 3 種のサブユニットから成るホモオリゴマーで構成されていると報告している。恐らく彼らによって流布されたのであろうが、AST の N-末端アミノ酸配列は、N-末端が修飾されているために測定できないという国際的な噂がまことしやかに語られていた。

しかし、筆者らの研究室の小倉らは、AST が精製すると凝固変性・不溶化し易いため、N-末端アミノ酸自動分析計の試料室中に溶液として注入できないことを見出し、この問題を解決し、AST アイソザイムの部分分子構造に関する情報を入手し始めた (Ogura, *et al.*, 1990b)。ヒドロキシメチル-PAH は AST アイソザイムによって硫酸抱合化されるが、PST によってはこの反応は触媒されない。

ラット肝細胞質中にはヒドロキシメチル-PAH を活性化する AST のアイソザイムが少なくとも 4 種類存在することが筆者らの研究室において小

Table 1. Homology comparison in cDNA nucleotide and deduced amino acid sequences of ASTs with those of other STs and SMP-2<sup>a)</sup>

		Amino acid sequences <sup>b)</sup>						
		Alcohol STs				SMP-2	Phenol ST PST-1	Estrogen ST EST
		ST-40	ST-41	ST-20	ST-21			
Nucleotide sequences <sup>c)</sup>	ST-40	99.7	99.6	90.1	90.8	75.4	41.3	43.9
	ST-41	99.7	99.6	90.5	91.2	75.7	41.3	41.3
	ST-20	94.5	94.8	90.5	97.9	74.3	39.8	43.0
	ST-21	94.6	95.0	99.0		75.4	40.2	42.6
	SMP-2	85.0	85.1	84.8	85.5		41.0	41.8
	PST-1	59.0	59.2	57.9	57.7	56.9		54.3
	EST	60.9	60.9	60.0	59.9	61.4	61.7	

a) The numbers in the lower left triangle of the table give % nucleotide sequence homologies and are separated by a diagonal space from the upper right triangle in which % amino acid sequence homologies are given.

b) Percentage of matched amino acid sequences between various ST isozymes are given.

c) Percentage of matched nucleotide sequences between various ST isozymes as determined by Micro-Genie program.

倉らによって明らかにされた。これらの主アイソザイムであり、筆者らにより命名された STa に対する抗体を用いて行われた Western blot の結果は、Jakoby らや Singer によって示されていた AST に関する概念を根本から覆すものであった。現在では、筆者らは cDNA クローニングの成果 (Ogura, *et al.*, 1989, 1990a) を背景にしてラット肝の AST アイソザイムは、いずれも 283 箇のアミノ酸残基から構成されるきわめて相同性の高いホモあるいはヘテロオリゴマーであり、内因性基質として dehydroepiandrosterone や cortisol を硫酸抱合化するのみならず、ヒドロキシメチル-PAH を硫酸抱合化することにより活性化する酵素であると認識している。AST の 4 種のアイソザイムのサブユニットタンパク質をコーディングする cDNA には、全鎖の中で僅か 3 塩基のみ (ST-40 および ST-41 cDNA, アミノ酸対応で 1 残基) ならびに 8 塩基のみ (ST-20 および ST-21 cDNA, アミノ酸対応で 6 残基) が異なるものが存在することがごく最近明らかになった (Table 1)。Ozawa らによって最近明らかにされたラット肝の PST アイソザイムである PST-1 のサブユニットタンパク質をコードするラット肝 cDNA (Ozawa, *et al.*, 1990) との相同性は低く、異物の代謝とは無関係とされる estrogen ST のサブユニットタンパク質 EST をコードする cDNA (Nash,

*et al.*, 1988) との相同性も低い。しかし、ラット肝に存在することが 10 年前に明らかにされ、老化現象を解明するマーカータンパク質として注目されている“老化指標タンパク” senescence marker protein 2 (SMP-2) (Chatterjee, *et al.*, 1987) とのアミノ酸配列における相同性は高い。しかし、SMP-2 がどのような (酵素としての) 機能を有するかは明らかにされていない。筆者らは最近の論文で SMP-2 は AST のアイソザイムの一種であろうと予言している (Ogura, *et al.*, 1990a)。

STa をコードする ST-40 cDNA の翻訳領域の pKK 223-3 プラスミドへの組込みと STa サブユニットタンパク質の大腸菌における発現実験がごく最近小倉らによって成功をおさめ、遺伝子組換え STa はラット肝より単離した STa と同質の酵素活性をもつことが判明した。同様の手法により、SMP-2 は AST としての機能をもつタンパク質であることが近く筆者らによって立証されるであろう。AST を研究している筆者らは“癌と老化”の問題に対し意外に近い場所に居るのかも知れない。

##### 5. ヒドロキシメチル-PAH の硫酸エステルを抱合解毒する glutathione S-transferase (GST)

メチル-およびヒドロキシメチル-PAH は、全て成熟ラットおよびマウスの肝を標的臓器としな

い。これら癌原性物質はほとんどの場合上記動物の皮膚に塗布し、皮膚における発癌を惹起させるために用いられる。メチル-PAH を投与したこれら成熟動物の肝は、P-450 によってメチル-PAH をヒドロキシメチル-PAH とした後、STa をはじめとする AST アイソザイムによって活性硫酸エステルに変換しているはずであるのに、肝の染色体 DNA を損傷する結果としての肝癌を誘発しない。

ラット肝細胞質 S 105-PAPS 系に肝中に常在する濃度の最低値の GSH (4-5 mM) を添加すると、ヒドロキシメチル-PAH は、共存する TA 98 の変異を誘導することもなく (Fig. 7) (Watabe, *et al.*, 1986b), 仔ウシ胸腺 DNA 塩基の修飾もなかった (Fig. 8) (Watabe, *et al.*, 1987)。このとき、生成した全ての活性硫酸エステルは、化学的に安定で、不活性な GSH 抱合体に速やかに変換され、これらは単離同定された (Figs. 4-6) (Watabe, *et al.*, 1982b, 1986b; Okuda, *et al.*, 1986b)。

ラット肝 S 105 を熱処理し、GST 共存下ヒドロキシメチル-PAH 硫酸エステルを DNA や TA 98 に直接作用させると、DNA 塩基修飾と TA 98 の著しい変異は相変らず起こる。しかし、熱処理しない S 105 では、これらの現象は全く起こらない。S 105 中には明らかに代謝的に生成するヒドロキシメチル-PAH 硫酸エステルを解毒する GST が存在する。筆者らの研究室の平塚らは、この GST をラット肝から単離することに成功し、reactive sulfate を GSH 抱合する Y タンパク質にちなんで、GST Yrs-Yrs と命名した (Hiratsuka, *et al.*, 1990)。GST Yrs-Yrs はホモ二量体酵素で、サブユニット Yrs の N-末端アミノ酸配列 (Table 2), およびこの酵素に対する抗体を用いての検討結果から、未知のクラスに属する GST であることが判明した。

ラット肝 GST アイソザイムに関しては、多くの研究者達によって究明し尽くされていると信じられていて、既知の *alpha*, *mu*, *pi* クラス GST 以外に新しいクラスの GST が出現することは信じ難い状況であった。筆者らの GST Yrs-Yrs は、GST アイソザイムの検索に常用される基質

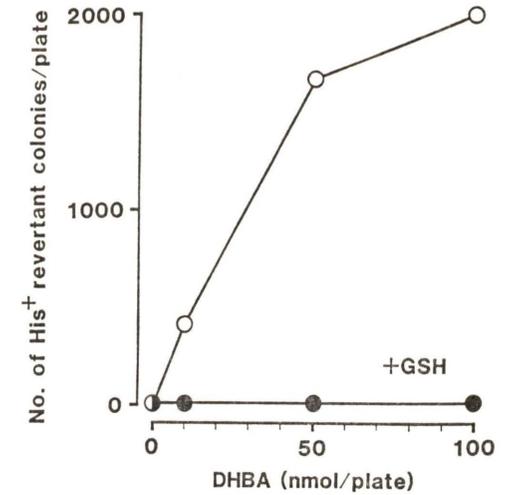


Fig. 7. Effect of GSH on mutagenicity of DHBA toward *S. typhimurium* TA98 in the presence of hepatic cytosol and PAPS.

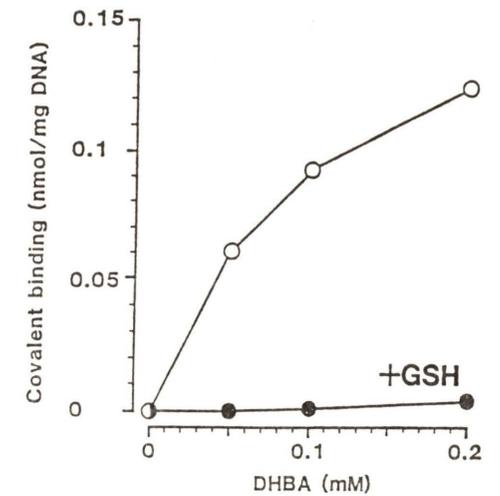


Fig. 8. Effect of GSH on covalent binding of DHBA to calf thymus DNA in the presence of hepatic cytosol and PAPS.

CDNB および DCNB に対して殆ど活性を示さないが、ヒドロキシメチル-PAH 硫酸エステルに対して特異的な活性を示す点でユニークであった。

筆者らが GST Yrs-Yrs に関する論文を刊行した翌年 (1991) GST アイソザイム研究をライフワークとしてきた Ketterer ら (英) が、Yrs サブユニットタンパク質の N-末端アミノ酸配列と相同性がきわめて高い GST アイソザイムを 2 種報

Table 2. Comparison of N-terminal amino acid sequences of three classes of rat GST subunits and a new *theta* class of GST subunits

Class	GST subunit	N-Terminal amino acid sequence																										
		1	5	10	15	20	25																					
<i>Alpha</i>	Ya (1)	S	G	K	P	V	L	H	Y	F	N	A	R	G	R	M	E	C	I	R	W	L	L	A	A	A	—	—
	Yc (2)	P	G	K	P	V	L	H	Y	F	D	G	R	G	R	M	E	P	I	R	W	L	L	A	A	A	—	—
	Yk (8)	E	V	K	P	K	L	Y	Y	F	Q	G	R	G	R	M	E	V	I	R	W	L	L	A	T	A	—	—
	Yl (10)	P	G	K	P	V	L	H	Y	F	D	G	R	G	R	M	E	P	I	?	?	L	L	A	A	A	—	—
<i>Mu</i>	Yb1 (3)	P	M	I	L	G	Y	W	N	V	R	G	L	T	H	P	I	R	L	L	L	E	Y	T	D	S	—	—
	Yb2 (4)	P	M	I	L	G	Y	W	D	I	R	G	L	A	H	A	I	R	L	F	L	E	Y	T	D	T	—	—
	Yb3 (6)	P	M	T	L	G	Y	W	D	I	R	G	L	A	H	A	I	R	L	L	L	E	Y	T	D	S	—	—
	Yn1 (6)	P	M	T	L	G	Y	W	D	I	?	G	L	A	H	A	I	?	L	L	L	—	—	—	—	—	—	—
	Yn2 (9)	P	V	T	L	G	Y	W	D	I	?	G	L	G	H	A	I	?	L	L	L	—	—	—	—	—	—	—
	Yb4 (3)	A	M	I	L	G	Y	W	N	V	R	G	L	T	H	P	I	R	L	L	L	E	Y	T	D	S	—	—
	Yo (11)	?	M	V	L	G	Y	W	D	I	R	G	L	A	H	A	I	R	M	L	L	E	F	T	D	T	—	—
<i>Pi</i>	Yp (7)	P	P	Y	I	V	Y	F	P	V	R	G	R	C	E	A	T	R	M	L	L	A	D	Q	G	Q	—	—
<i>Theta</i>	E (5)	V	L	E	L	Y	L	D	L	S	Q	P	C	R	A	I	Y	I	F	A	K	K	N	N	I	—	—	
	? (12)	G	L	E	L	Y	L	D	L	S	Q	P	C	R	A	V	Y	I	F	A	K	K	N	G	I	—	—	
	? (?)	G	L	E	L	Y	L	D	L	S	Q	P	S	R	A	V	Y	I	F	A	K	K	N	G	I	—	—	
	Yrs (?)	G	L	E	L	Y	L	D	L	S	Q	P	S	R	A	V	Y	I	F	A	K	K	N	G	I	—	—	

Numerals in parentheses represent subunit number proposed by Jakoby, Ketterer and Mannervik (1984b).

?: not assigned. The N-terminal amino acid sequences of the subunit proteins, except Yk, Yn1, Yn2, Yo, Yl, E, 12, and Yrs, were determined by the cDNA-cloning method.

告した (Meyer, *et al.*, 1991)。現在は, *theta* ( $\theta$ ) クラスと命名された GST Yrs-Yrs のファミリーは, これによって賑やかになってきた。

ヒドロキシメチル-PAH の硫酸抱合活性と STa 抗体に対し交叉性を示すタンパク質はラット, マウスの皮膚に存在するが (Okuda, *et al.*, 1989b), GST Yrs-Yrs 活性とそのタンパク質の存在は抗体を用いた検索の結果, 見出されなかった (Hiratsuka, *et al.*, 1990)。この事実は, おそらく, メチル-PAH およびヒドロキシメチル-PAH がなぜこれら動物の皮膚を発癌標的臓器とするのかという命題に対する答えの一つを提供することになるものと思われる。

#### おわりに

上述の一連の研究は, 1980 年に東京薬科大学に於て, 筆者の現在の研究室で開始された。その間, 多数の大学院および学部学生の皆さんの知力と汗と情熱が注ぎ込まれてきた。全ての方々の氏名を記して, 感謝の意を表すべきであるが, 紙数の制約で, それができないのが残念です。唯一

言, 皆さんに研究室を代表して告げたいことは, 私達の研究は佳境に入りつつあり, 以前にも増して興奮が研究室を覆っているということです。

#### 引用文献

- Chatterjee, B., D. Majumdar, O. Ozbilen, C. V. R. Murty and A. K. Roy (1987) Molecular cloning and characterization of cDNA for androgen-repressible rat liver protein, SMP-2, *J. Biol. Chem.*, **262**, 822-825.
- Dipple, A. (1976) Polynuclear aromatic hydrocarbons, In: C. E. Searle (Ed.), *Chemical Carcinogens*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 245-314.
- Jerina, D. M., H. Yagi, R. E. Lehr, D. R. Thakker, M. Schaefer-Ridder, J. M. Karle, W. Levin, A. W. Wood, R. L. Chang and A. H. Conney (1978) The bay region theory of carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons, In: H. V. Gelboin and P. O. P. Ts'ao (Eds.), *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Academic Press, New York, pp. 173-188.
- Hecht, S. S., E. LaVoie, R. Mazzaresse, S. Amin, V. Bedenko and D. Hoffmann (1978) 1, 2-Dihydro-1, 2-dihydroxy-5-methylchrysene, a major activated metabolite of the environmental carcinogen 5-

- methylchrysene, *Cancer Res.*, **38**, 2191-2194.
- Hiratsuka, A., N. Sebata, K. Kawashima, H. Okuda, K. Ogura, T. Watabe, K. Satoh, I. Hatayama, S. Tsuchida, T. Ishikawa and K. Sato (1990) A new class of rat glutathione S-transferase Yrs-Yrs Inactivating reactive sulfate esters as metabolites of carcinogenic arylmethanols, *J. Biol. Chem.*, **265**, 11973-11981.
- Jakoby, W. B., M. W. Duffel, E. S. Lyon and Ramaswamy (1984a) Sulfotransferases active with xenobiotics: comments on mechanism, In: J. W. Bidges and L. F. Chasseaud (Eds.), *Progress in Drug Metabolism*, vol. 8, Taylor & Francis Ltd., Philadelphia, pp. 11-33.
- Jakoby, W. B., B. Ketterer and B. Mannervik (1984b) Glutathione transferases: Nomenclature, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2539-2540.
- Mayer, D. J., B. Coles, S. E. Pemble, K. S. Gilmore, G. M. Fraser and B. Katterer (1991) *Theta*, a new class of glutathione transferases purified from rat and man, *Biochem. J.*, **274**, 409-415.
- Nash, A. R., W. K. Glenn, S. S. Moore, J. Kerr, A. R. Thompson and E. O. P. Thompson (1988) Oestrogen sulfotransferase: Molecular cloning and sequencing of cDNA for the bovine placental enzyme, *Aust. J. Biol. Sci.*, **41**, 507-516.
- Ogura, K., J. Kajita, H. Narihata, T. Watabe, S. Ozawa, K. Nagata, Y. Yamazoe and R. Kato (1989) Cloning and sequence analysis of a rat liver cDNA encoding hydroxysteroid sulfotransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 168-174.
- Ogura, K., J. Kajita, H. Narihata, T. Watabe, S. Ozawa, K. Nagata, Y. Yamazoe and R. Kato (1990a) cDNA cloning of the hydroxysteroid sulfotransferase STa sharing a strong homology in amino acid sequence with the senescence marker protein SMP-2 in rat livers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 1494-1550.
- Ogura, K., T. Sohtome, A. Sugiyama, H. Okuda, A. Hiratsuka and T. Watabe (1990b) Rat liver cytosolic hydroxysteroid sulfotransferase (sulfotransferase a) catalyzing the formation of reactive sulfate esters from carcinogenic polycyclic hydroxymethylarenes, *Mol. Pharmacol.*, **37**, 848-854.
- Okuda, H., A. Hiratsuka, H. Nojima and T. Watabe (1986a) A hydroxymethyl sulphate ester as an active metabolite of the carcinogen, 5-hydroxymethylchrysene, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 535-538.
- Okuda, H., K. Miwa, H. Nojima and T. Watabe (1986b) Inactivation of the carcinogen, 5-hydroxymethylchrysene, by glutathione conjugation via a sulphate ester in hepatic cytosol, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 4573-4576.
- Okuda, H., H. Nojima, K. Miwa, N. Watanabe

- and T. Watabe (1989a) Selective covalent binding of the active sulfate ester of the carcinogen 5-(hydroxymethyl) chrysene to the adenine residue of calf thymus DNA, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**, 15-22.
- Okuda, H., H. Nojima, N. Watanabe and T. Watabe (1989b) Sulphotransferase-mediated activation of the carcinogen 5-hydroxymethylchrysene: species and sex differences in tissue distribution of the enzyme activity and a possible participation of hydroxysteroid sulphotransferases, *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 3003-3009.
- 奥田 晴宏, 渡部 烈 (1988) 抱合反応による発癌物質の代謝活性化, *衛生化学*, **34**, 75-91.
- Ozawa, S., K. Nagata, D. Gong, Y. Yamazoe and R. Kato (1990) Nucleotide sequence of a full-length cDNA (PST-1) for aryl sulfotransferase from rat liver, *Nucleic Acid Res.*, **18**, 4001.
- Selkirk, J. K. (1980) Chemical carcinogenesis: a brief overview of the mechanism of action of polycyclic hydrocarbons, aromatic amines, nitrosamines, and aflatoxins, In: T. J. Slaga (Ed.), *Carcinogenesis*, vol. 5, Raven Press, New York, pp. 1-31.
- Singer S. S. (1985) Preparation and characterization of the different kinds of sulfotransferases, In: D. Zakim and D. A. Vessay (Eds.), vol. 1, Wiley-Interscience Publication, New York, pp. 95-159.
- Surh, Y.-J., C.-C. Lai, J. A. Miller and E. C. Miller (1987) Hepatic DNA and RNA adduct formation from the carcinogen 7-hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene and its electrophilic sulfuric acid ester metabolite in preweanling rats and mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 576-582.
- Watabe, T., T. Ishizuka, M. Isobe and N. Ozawa (1982a) A 7-hydroxymethyl sulfate ester as an active metabolite of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene, **215**, 403-405.
- Watabe, T., T. Ishizuka, N. Ozawa and M. Isobe (1982b) Conjugation of 7-hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene (7-HMBA) with glutathione via a sulphate ester in hepatic cytosol, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2542-2544.
- Watabe, T., F. Fujieda, A. Hiratsuka, T. Ishizuka, Y. Hakamata and K. Ogura (1985a) The carcinogen, 7-hydroxymethyl-12-methylbenz[a]anthracene, is activated and covalently binds to DNA via a sulphate ester, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3002-3005.
- Watabe, T., A. Hiratsuka, K. Ogura and K. Endoh (1985b) A reactive hydroxymethyl sulfate ester formed from the carcinogen, 7, 12-dihydroxymethylbenz[a]anthracene, by rat liver sulfotransferase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**,

694-699.

Watabe, T., T. Ishizuka, T. Fujieda, A. Hiratsuka and K. Ogura (1985c) Sulfate esters of hydroxymethyl-methyl-benz[a]anthracenes as active metabolites of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Jpn. J. Cancer Res.*, **76**, 684-698.

Watabe, T., H. Okuda, A. Hiratsuka and K. Miwa (1985d) The S-sulfate formation from 4-nitrobenzyl mercaptan in rat liver cytosol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**, 687-693.

Watabe, T., Y. Hakamata, A. Hiratsuka and K. Ogura (1986a) A 7-hydroxymethyl sulphate ester as an active metabolite of the carcinogen, 7-hydroxymethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, **7**, 207-214.

sis, **7**, 207-214.

Watabe, T., A. Hiratsuka and K. Ogura (1986b) Regioselective glutathione conjugation of the carcinogen, 7,12-dihydroxymethylbenz[a]anthracene, via reactive 7-hydroxymethyl sulfate ester in rat liver cytosol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **134**, 100-105.

Watabe, T., A. Hiratsuka and K. Ogura (1987) Sulphotransferase-mediated covalent binding of the carcinogen 7,12-dihydroxymethylbenz[a]anthracene to calf thymus DNA and its inhibition by glutathione transferase, *Carcinogenesis*, **8**, 445-453.

環境変異原研究 **13**: 31-52 (1991)

シンポジウム「環境化学物質の複合作用による変異原性の増強及び抑制」

亜硝酸および窒素酸化物との相互作用による  
変異原の生成、修飾とその抑制

国立がんセンター研究所 生化学部 \*津田 充 宥, 倉島由紀子

1. 緒言

日常、我々が環境汚染問題等との関連に係わる窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>) とは NO と NO<sub>2</sub> をさすが、広義の窒素酸化物 (本稿では、NO<sub>x</sub> と記す) には、HNO<sub>2</sub>(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) や N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 等も含まれている。窒素は +5 から -3 までの酸化数を取りうる。窒素の各酸化数に対応する代表的な NO<sub>x</sub> を Table 1 に示した。又、亜硝酸イオン及び NO からの、相互化学変換式を Fig. 1 に示した。

さて、亜硝酸塩や NO<sub>2</sub> と生体との係わりについては、従来、主として、食品成分や医薬品、環境物質等との相互作用による変異、がん原物質の生成という立場から、負の影響面を取り扱う事が多かった。がん予防対策や、排気ガス、酸性雨等

の環境汚染問題といった社会的要請からも、当然の経緯であり、環境化学や食品衛生化学、発がん分野等の人々が研究に携わってきた。

Table 1. 窒素の酸化数と代表的化合物

Oxidation number	Nitrogen oxide	Acid/Base	Ion
+5	N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	HNO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
+4	NO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	—	—
+3	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	HNO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sup>+</sup>
+2	NO	—	—
+1	N <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
0	N <sub>2</sub>	—	—
-1	—	NH <sub>2</sub> OH	—
-2	—	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	N <sub>2</sub> H <sub>5</sub> <sup>+</sup>
-3	—	NH <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

中馬一郎 (1984) より引用

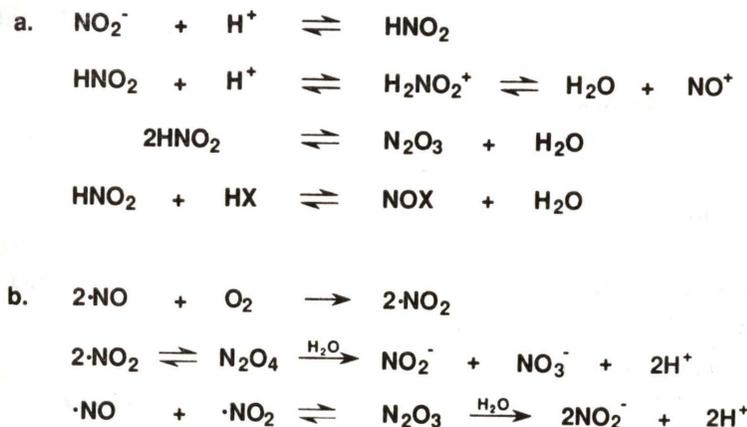


Fig. 1. a. 亜硝酸塩の酸性水溶液中で生成するニトロソ化試剤.  
b. 一酸化窒素から酸素共存下で生成するニトロソ化試剤.

〒104 東京都中央区築地 5-1-1

\* 現国立衛生試験所安全性生物試験研究センター 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Mutagen Formation, Modulation and Inhibition by Interaction with Reactive Nitrogen Oxides  
Mitsuhiro Tsuda and Yukiko Kurashima

Biochemistry Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

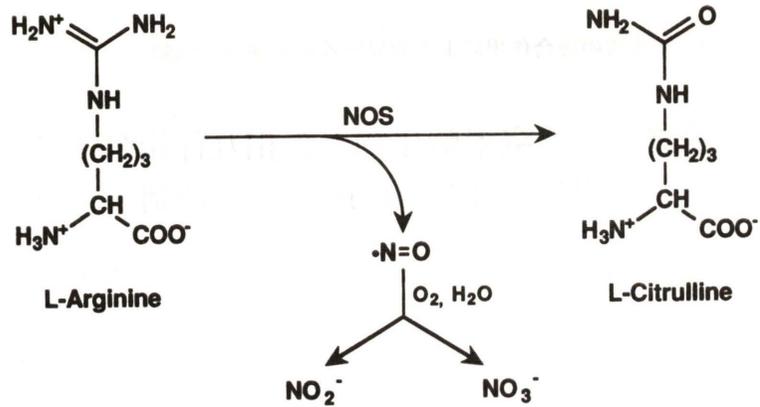


Fig. 2. L-Arginine からの酵素的酸化窒素 ( $\cdot\text{NO}$ ) の生成と  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  への変換。  
NOS: 一酸化窒素合成酵素 (Nitric oxide synthase)

他方、医療の分野での NOX との係わりは、他の分野とはやや異なっており、前述の諸分野の人々との交流は少なかった様に思う。その一例をあげれば、麻酔薬としての笑気 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) の利用があるが、最も重要であったのは、循環器系医療における血管拡張薬の利用であろう。ニトログリセリン、亜硝酸アミルやニトロプルシッド等を狭心症等の治療に用いてきた百年以上の長い歴史があり、この分野では、主として、一酸化窒素がその研究の対象となってきた。

ところが、1985 年頃から、双方の分野で重要な発見が相継ぎ、二つの分野が密接な関係をもつようになってきた (Moncada *et al.*, 1988; Marletta, 1989)。発がん研究の分野では、体内ニトロ化合物 (NOC) の生成と取り組んできた Tannenbaum, Marletta らによって、lipopolysaccharide (LPS) により活性化したマクロファージ ( $M\phi$ ) が、interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 等のサイトカイン存在下で、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  を産生する事が見出された (Stuehr and Marletta, 1985)。これは、その後の研究で、L-arginine のグアニジド基窒素からの酵素的 NO の産生に起因する事が示された (Tayeh and Marletta, 1989) (Fig. 2)。

他方、循環器系分野では、1980 年 Furchgott らが、血管内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) を発見、1987 年、Moncada らは、その本体が NO であり、やはり L-arginine を基質として酵素的に産生される事を示

した (Palmer *et al.*, 1987)。

$M\phi$  が産生する NO は、その殺細胞作用の担い手としての役割が、又、EDRF としての NO は、guanylate cyclase の活性化を誘起して細胞内 cGMP を上昇させ、血管を弛緩させる機能が示されている。更に、NO は非荷電分子であり、細胞膜を自由に透過出来るため、細胞内情報伝達物質として、多様な生理活性発現の重要な担い手としての役割が提唱されている (Moncada *et al.*, 1988; Collier & Vallane; 1989)。今や、NO に対する、がん研究分野、成人病研究分野等での関心が高まり、NOX に関する共通のパイプ網が広がりつつある。

著者らは、発がん研究の立場から、亜硝酸と生体との係りに興味をもってきた。本稿では、亜硝酸との相互作用による変異原の生成及び抑制という観点から、著者らの知見を中心に論述し、更に、L-arginine 由来の活性 NOX のニトロ化反応への関与について言及する。

## 2. 人体の亜硝酸塩への曝露

ヒトの亜硝酸塩への曝露は、従来、食品のボツリヌス菌汚染に対する殺菌作用やハム、ソーセージ等の発色の目的で、食品添加物として使用された際に起るか、又は、漬物等の保存中におこる、野菜中の硝酸塩のバクテリアによる亜硝酸塩への還元が、その主要源と考えられてきた。従って、食品への亜硝酸塩添加の是非について、発がん性

Table 2. 主な野菜中の硝酸塩及びアスコルビン酸含量

Vegetable	mg per 100 g raw vegetable		ASC/ $\text{NO}_3^-$ molar ratio
	Nitrate*1	Ascorbic acid*2	
Komatsuna	365	75	0.072
Celery	285	6	0.007
Spinach	217	65	0.106
Daikon (root)	192	15	0.027
Edible burdock	185	4	0.008
Chinese cabbage	182	22	0.043
Lettuce	170	13	0.027
Leaf mustard	148	70	0.166
Broccoli	75	160	0.751
Cabbage	56	44	0.278
Cauliflower	48	70	0.517
Eggplant	43	5	0.041
Welsh onion	35	14	0.142
Carrot	22	6	0.095
Cucumber	16	13	0.284
Brussels sprouts	12	150	4.486
Sweet pepper	11	80	2.525
Potatoes	8.3	23	1.005
Sweet potatoes	7.8	30	1.311
Corn	4.5	10	0.812
Asparagus (green)	4.4	12	0.974
Onion	2.2	7	0.994
Tomatoes	2.0	20	3.788

\*1 Fine *et al.*, (1982); 谷口他 (1985) より引用

\*2 食品成分表 (1988) より引用

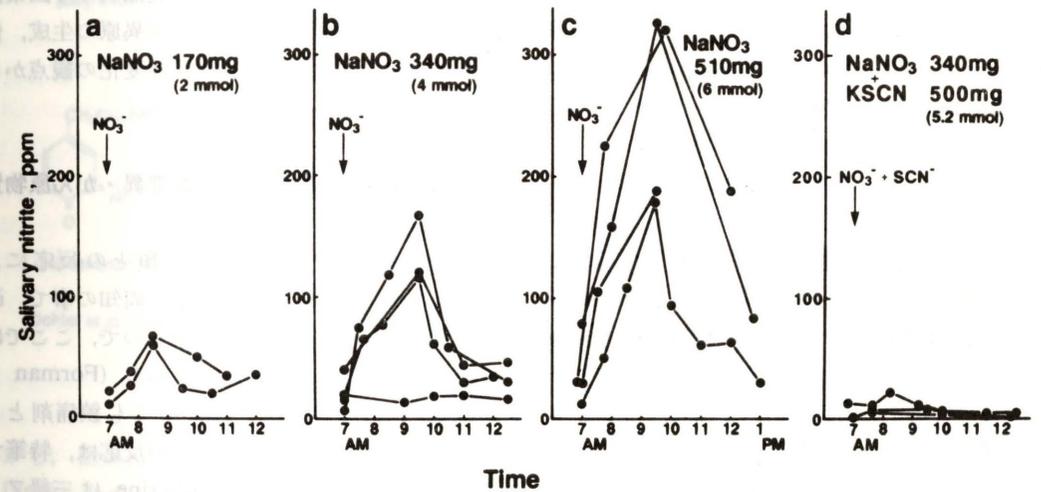


Fig. 3. 硝酸塩摂取後のヒト唾液中亜硝酸塩濃度の経時変化とそのチオシアン塩摂取による阻害効果 (同一被験者による実験結果)。

NOC 生成との関連で多くの議論がなされてきた (Smith, 1978, 1980)。ところが、1974 年、Tannenbaum らは、ヒト唾液中に存在する亜硝酸塩が、野菜や飲料水等から摂取した硝酸塩から口腔

内バクテリア (*Staphylococcus sp.*, *Veillonella sp.*, *Nocardia sp.* 等) により体内変換されて生成したものである事を示し、体内ニトロ化反応への関与を示唆した (Tannenbaum *et al.*, 1974)。更に、

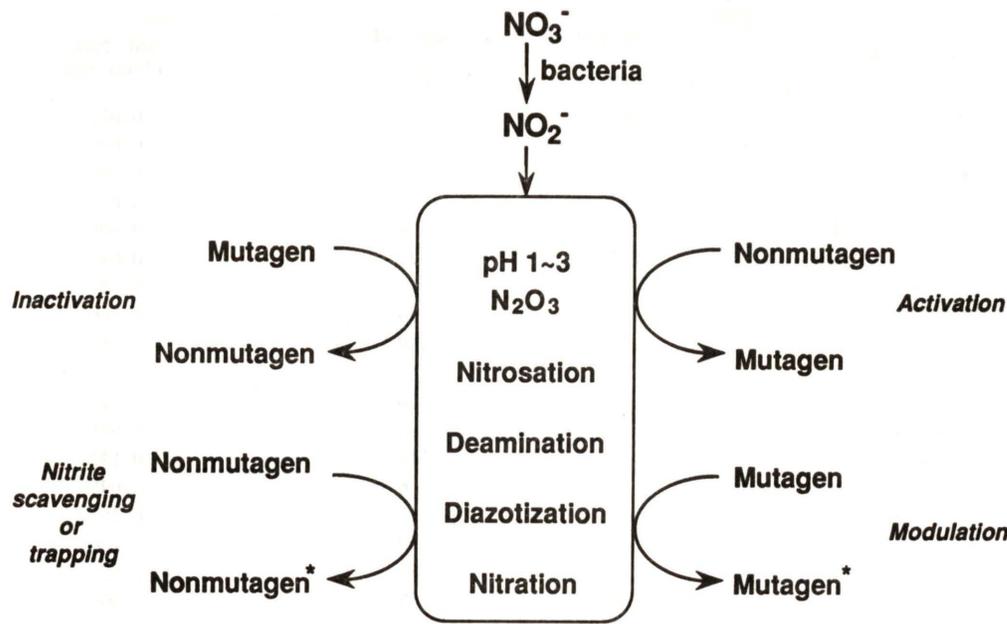


Fig. 4. ヒト胃内で予想される亜硝酸との相互作用による変異・がん原物質の生成、修飾及び抑制.

摂取された硝酸塩は、消化管より吸収された後、血流から唾液腺を介して再び口腔内に分泌され、バクテリアにより亜硝酸塩に還元されるという体内循環を繰り返しながら、最終的に、その大部分が尿中へと排泄される事が示されている (Bartholomew & Hill, 1984)。主要な野菜中の硝酸塩及び ascorbic acid (ASC) 含量を Table 2 に示した。又、Fig. 3 には、硝酸塩自体を摂取したボランティアの唾液中亜硝酸塩濃度の経時変化を示した。今日では、ヒトの亜硝酸塩への曝露の90% 近くは、野菜や飲料水から摂取した硝酸塩の体内変換によるものと考えられている (Kawabata *et al.*, 1979)。Stephany & Schuller (1980) は、摂取した硝酸塩の約 6% が、体内で亜硝酸塩に変換されると見積っている。即ち、ヒトが 5 m mol/day の硝酸塩 ( $\text{NO}_3^-$ , 310 mg, 日本人の一日平均摂取量は 3~4 m mol) を摂取した場合、0.3 m mol の亜硝酸塩 ( $\text{NO}_2^-$ , 13.8 mg) に曝露される事になる。

日常の食生活を通して曝露された亜硝酸塩が、我々の体内でどのような運命をたどり、又、食品成分や医薬品、生体成分等と相互作用するかを以下に論述する。

### 3. 亜硝酸が関与する化学反応と変異原活性変化

亜硝酸は一般に、アミン・アミド類と室温下で反応して、ジアゾ化、脱アミノ化、ニトロソ化及びニトロ化反応等に関与する。食品成分や医薬品等と亜硝酸との相互作用による変異原の生成、修飾及び抑制に関して、変異原活性変化の観点から分類してみたのが Fig. 4 である。

### 4. 食品等の亜硝酸処理による変異・がん原物質の生成

二級アミンやアルキルアミド類との反応により、発がん性 NOC が生ずる事は周知の事で、改めて紙面を割く必要もないと思うので、ここでは最近の成書を紹介するにとどめる (Forman & Shuker, 1989)。しかし、その中でも鎮痛剤として用いられた aminopyrine との反応は、特筆すべきかと思う。即ち、aminopyrine は三級アミンであるがジメチルエナミン ( $\text{R}_2\text{C}=\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) 構造を有するため、亜硝酸と反応して強力な発がん物質、N-nitrosodimethylamine (NDMA) を、生成する事である。Aminopyrine は dimethylamine よりも、数万倍ニトロソ化速度が大きい

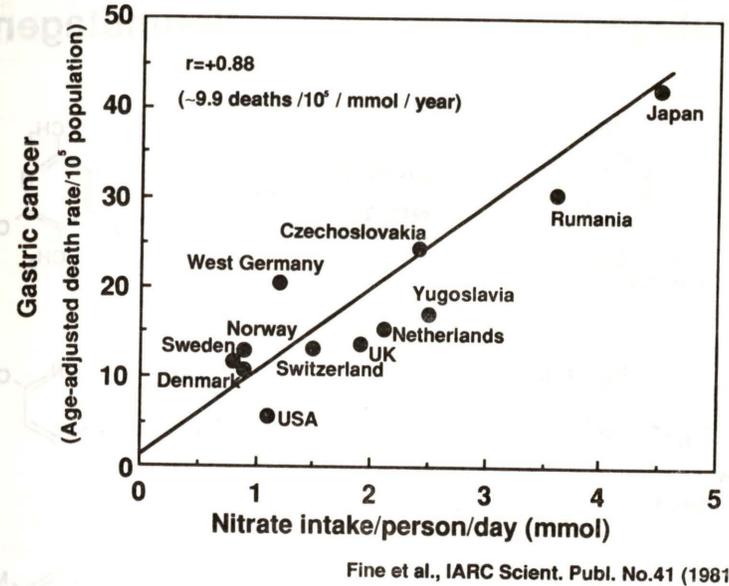


Fig. 5. 各国の硝酸塩摂取量と胃がん死亡率との相関.

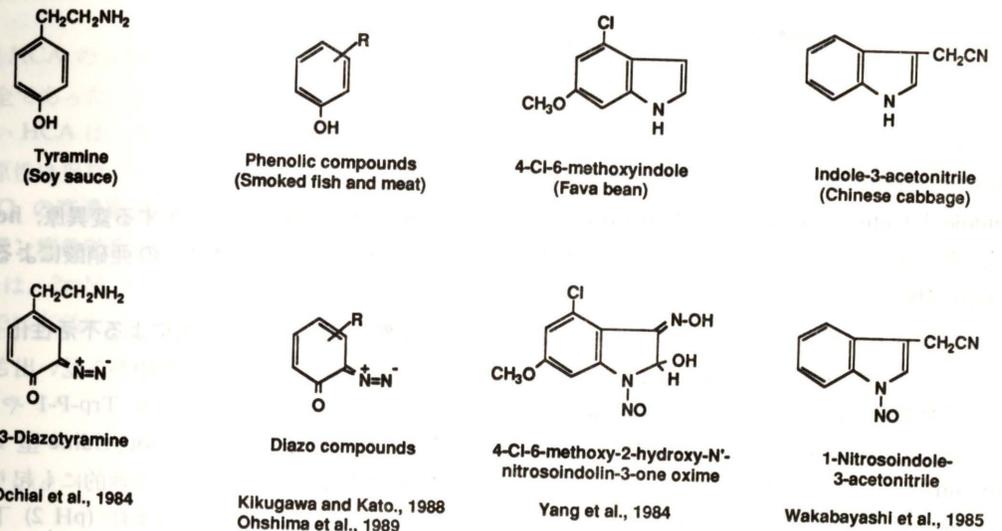


Fig. 6. 食品成分の亜硝酸処理による直接変異原の生成.

事から、医薬品としての使用が制限されている (Lijinsky *et al.*, 1972, 1974; 谷村 & 酒井, 1981)。Fine らが示した、12ヶ国の国民一人当たりの硝酸塩摂取量と胃がん死亡率とのよい相関 (Fig. 5) は、種々と批判もあるが、日本人に胃がんが多い原因の一つとして、体内 NOC 生成が重要であるという作業仮説の根拠を提示した (Fine *et al.*, 1982)。以来、食品の亜硝酸処理による直接変異

原前駆体物質の検索が活発に行なわれるようになった (長尾, 1984; Wakabayashi *et al.*, 1989)。例えば、落合らは、醤油の亜硝酸処理で生ずる直接変異原の一つとして 3-diazotyramine を同定した (Ochiai *et al.*, 1984) (Fig. 6)。このジアゾ化合物は、経口投与によりラットに口腔がんを誘発する事も確認されており (Fujita *et al.*, 1987)、亜硝酸処理により生成する新しいタイプの変異・

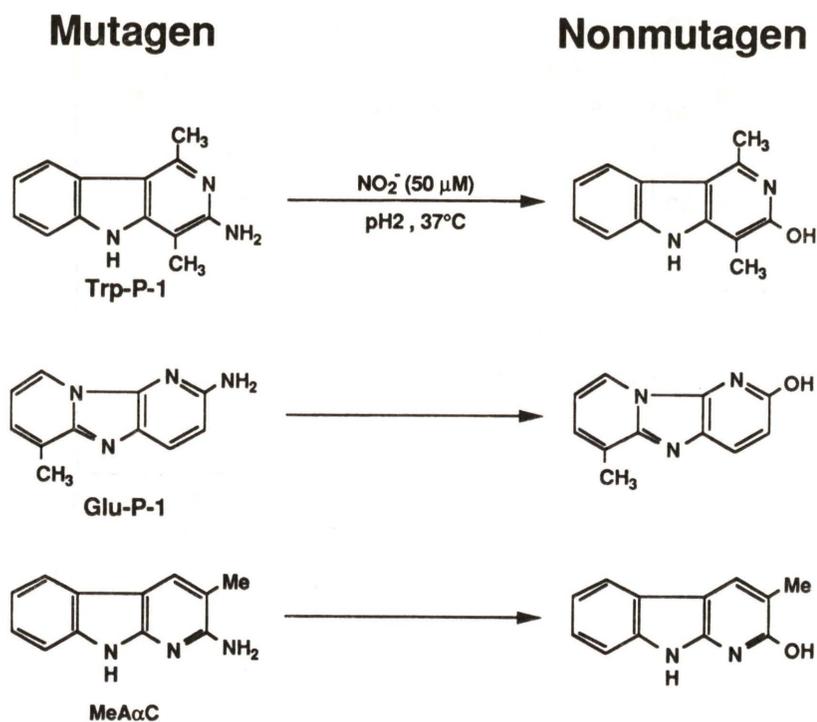


Fig. 7. 亜硝酸処理による非 IQ 型 heterocyclic amines の不活性化.

がん原物質として注目された。又、若林らは、白菜を亜硝酸処理して生成する変異原の前駆体として indole-3-acetonitrile 等を同定、N-nitrosoindole 類が、直接変異原性を示す事を報告した (Wakabayashi, 1985)。

一方、日本と同様、胃癌発生率の高い地域として南米のコロンビアが知られている。このアンデス山岳地帯には、飲料水中の硝酸塩含量が非常に高い地域がある (Cuello *et al.*, 1976)。Tanenbaum らは、この地方で常食されるファバ豆 (Fava beans) と呼ばれる“そら豆”の一種に着目した (Yang *et al.*, 1984)。ファバ豆は、亜硝酸処理により非常に強い直接変異原性を示したが、その変異原前駆体として、天然には珍しい塩素原子を含むインドール化合物、4-Cl-6-methoxyindole を同定した (Fig. 6)。この他にも、食品の亜硝酸処理により、直接変異原となる前駆物質の存在が多数報告されている (長尾, 1984; Wakabayashi, 1989)。しかし、このような変異原の生成は、生理的に可能な胃内亜硝酸濃度 (50 μM 以下) では検出され難く、実際のヒトの胃内で、どの程度生

成するのかは明らかでない。

#### 5. 食品の加熱分解により生ずる変異原, heterocyclic amines (HCA) の亜硝酸による活性変化

##### a. 変異原 HCA の亜硝酸による不活性化

蛋白質や食品の加熱分解物中から見いだされた強力な変異・がん原物質である Trp-P-1 や Glu-P-1 等 (非 IQ 型又は 2-aminopyridine 型 HCA) は、50 μM (2.3 ppm) という生理的にも起りうる低濃度の亜硝酸塩と胃の酸性条件 (pH 2) 下で処理すると脱アミノ水酸化体となり、変異原性を消失する (Tsuda *et al.*, 1980, 1981a, 1985) (Fig. 7)。

一方、IQ や MeIQx の様な imidazol 環上にアミノ基を有する HCA (IQ 型) は、同様の亜硝酸処理に著しい抵抗性を示し、不活性化は起らなかった (Tsuda *et al.*, 1985)。この IQ 型 HCA の亜硝酸に対する抵抗性は、aminoimidazol 環の強いプロトンーションにより、求電子試剤 NO<sup>+</sup> の攻撃阻害が起っているためと考えられる。又、非

Table 3. 変異原性ヘテロサイクリックアミンの亜硝酸及び次亜塩素酸処理後の変異活性残存率 (%)<sup>a</sup>

Heterocyclic amine	Nitrite <sup>b</sup>	Hypochlorite <sup>c</sup>
Trp-P-1	2	0
Trp-P-2	2	0
Glu-P-1	2	0
Glu-P-2	3	2
AαC	2	5
MeAαC	1	2
Phe-P-1	58 <sup>d</sup>	0
Lys-P-1	91	15
IQ	85	0
MeIQ	88	0
MeIQx	98	2
4,8-DiMeIQx	103	1
7,8-DiMeIQx	98	3

<sup>a</sup> Mutagenicity with S9 mix

<sup>b</sup> 0.4 mM compound was treated with 2 mM sodium nitrite in 0.14 N HCl at 37°C for 30 min

<sup>c</sup> 0.2 mM compound was treated with 2.4 mM sodium hypochlorite at 37°C for 30 min

<sup>d</sup> 120 min treatment

IQ 型 HCA の Phe-P-1 では、不活性化は起るが不完全であった。Lys-P-1 の如く、アミノ基をもたない HCA は、予想通り、亜硝酸とは反応せず変異原性は保持された (Table 3)。

##### b. IQ の高濃度亜硝酸による活性変化とチオシアン塩の効果

IQ は、2 mM の亜硝酸塩処理 (pH 2, 37°C, 30 分) では有効な脱アミノ化は起らず、変異原活性

の変化もみられなかった (Table 3)。この IQ 型変異原の亜硝酸抵抗性の割合を知る目的で、更に高濃度 (20 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) での亜硝酸処理を検討した。又、ニトロソ化反応における強力な促進剤であるチオシアン塩 (SCN<sup>-</sup>) 共存による影響も調べてみた (Tsuda & Ohgaki, 1987c)。即ち、IQ (0.1 mM) を 20 mM NaNO<sub>2</sub> 水溶液 (pH 2 緩衝液, 37°C) 中で処理した場合は、IQ の分解が徐々に起り、対応する脱アミノ水酸化体 (I, m/z: 199, M<sup>+</sup>) を与えた。この反応条件下での IQ の分解速度 t<sub>1/2</sub> は約 2 hr であった。一方、同じ反応条件下で SCN<sup>-</sup> (50 mM) が共存した場合には、IQ は更に速やかに分解し、I とは異なり、UV 照射下で蛍光を示す物質 (II) へと選択的に変化した。

SCN<sup>-</sup> 共存下での IQ の分解速度 t<sub>1/2</sub> は約 1 hr であった。蛍光物質 II は mass スペクトルの解析により Fig. 8 に示す脱アミノ化体 (m/z: 183 M<sup>+</sup>) と同定された。この SCN<sup>-</sup> 共存下での IQ の脱アミノ化反応は、2 mM 亜硝酸塩処理でも起る事を HPLC 及び TLC により確認した。

チオシアン塩は、ヒト唾液中に常在 (~1 mM) し、喫煙者ではその濃度が 2~3 倍高い事が知られている (Maliszewski & Bass, 1955; Ruddell *et al.*, 1977)。

一方、松島らは IQ を更に高濃度亜硝酸処理 (50 mM NaNO<sub>2</sub>, pH 3, 30°C, 3 hr) する事により、アミノ基のニトロ基置換が起り、強力な直接

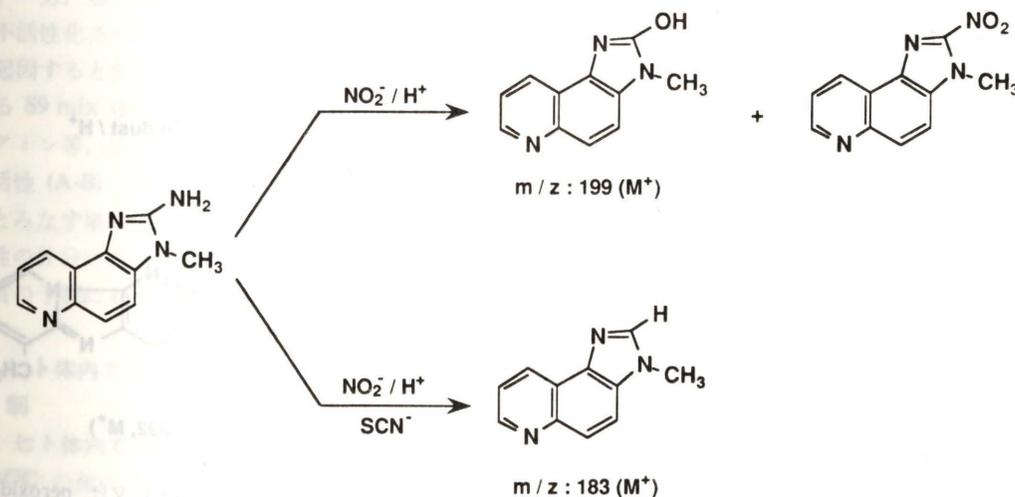


Fig. 8. IQ の亜硝酸処理による脱アミノ化とそのチオシアンイオン共存効果.

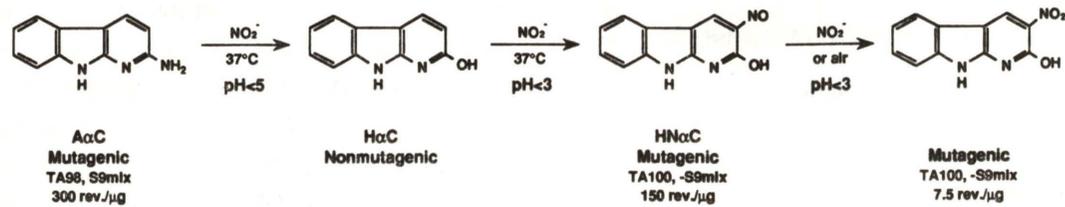


Fig. 9. Amino- $\alpha$ -carboline (A $\alpha$ C) の亜硝酸処理による変異原活性変化。

変異原物質 ( $9 \times 10^5$  rev./ $\mu$ g)  $\text{NO}_2$ -IQ が生成する事を報告している (笹川他, 1987; Sasagawa *et al.*, 1988)。

### c. Amino- $\alpha$ -carboline (A $\alpha$ C) の亜硝酸による変異原活性変化

非 IQ 型 HCA に属する A $\alpha$ C の亜硝酸処理による変異原活性変化は, Trp-P や Glu-P とは少し様子が異なっていた (Tsuda *et al.*, 1981a)。即ち, Fig. 9 にみられる如く, pH 3~5 での亜硝酸処理 ( $0.5 \text{ mM NO}_2^-$ , 30 分) では, 主に, 脱アミノ水酸化体 (H $\alpha$ C) を与えて不活性化しますが, pH < 3 では, H $\alpha$ C から赤褐色の C-ニトロソ化合物 (HNaC) へと変化し直接変異原性を示した。新たに生じた HNaC は, 更に長時間, 亜硝酸処理する事により 3- $\text{NO}_2$  体へと酸化され, HNaC よりは弱い直接変異原性 (7500 rev./mg) を示した (津田, 未発表)。一方, 3 位が Me 化された MeA $\alpha$ C では, 同様の亜硝酸処理では脱アミノ水酸化体のみを与え, 不活性化が起った (Tsuda *et al.*, 1985)。

### d. 唾液による Glu-P-1 の不活性化

亜硝酸塩 1.3 mM (60 ppm) を含むヒト唾液を, 煮沸後遠心分離 (2000 rpm, 10 分) し, 上清をクエン酸緩衝液 (pH 2) で 25 倍希釈した溶液 ( $\text{NO}_2^-$ ,  $50 \mu\text{M}$ ) 中で, Glu-P-1 ( $20 \mu\text{M}$ ) を  $37^\circ\text{C}$ , 30 分間 incubate する事により, 脱アミノ水酸化体が生成する事を TLC で確認した。更に, 食事モデルとして, 人工胃液-牛乳-唾液 (14 : 10 : 1, v/v) 混液 ( $\text{NO}_2^-$ :  $50 \mu\text{M}$ , pH 2.7) 中で処理した場合でも, Glu-P-1 の脱アミノ水酸化体を TLC により検出した (津田, 未発表)。従って, ヒト胃内でも, 亜硝酸に反応性の高い非 IQ 型 HCA の不活性化が起ると予想される。

### e. 水道水による加熱分解変異原の不活性化

主題から少しそれるが, 意外な事実として, 著者らは, 変異原性 HCA 類の殆んどが塩素処理された水道水により, すみやかに不活性化される事を見出した (Tsuda *et al.*, 1983a, 1985) (Table 3)。この水道水による HCA の不活性化は, 次亜塩素酸によるアミノ基の酸化によるものであり, Glu-P-1 に関しては, その不活性化黄色産物の NMR 及び mass スペクトルの解析結果から, azo dimer の形成によるものであると結論した (Fig. 10) (Tsuda *et al.*, 1983a, 1985)。この Azo Glu-P-1 [ $m/z$ : 392 ( $\text{M}^+$ ), 364 ( $\text{M}^+-\text{N}_2$ )] は,  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下での Peroxidase による不活性化 (Yamada *et al.*, 1979) の際に生ずる黄色産物と同一物質であり, Zn 未還元により Glu-P-1 を回収した (津田他, 1981b)。IQ の次亜塩素酸処理では青色 azo-

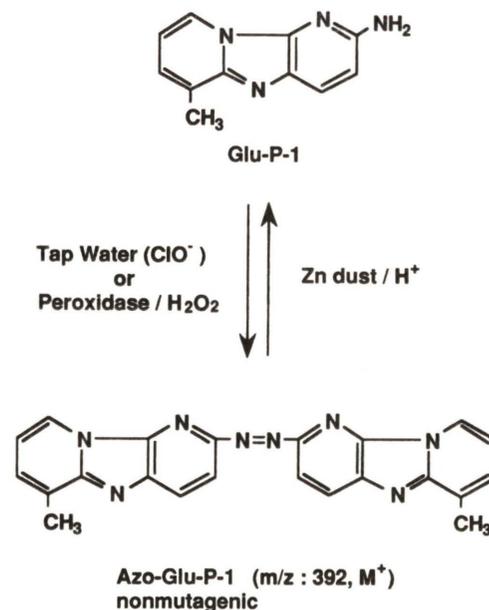


Fig. 10. Glu-P-1 の水道水 ( $\text{ClO}^-$ ) 又は peroxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2$  による azo-dimer の生成。

Table 4. 種々の加熱分解物中の塩基性抽出物の亜硝酸及び次亜塩素酸処理による変異原活性変化と IQ 型変異原寄与率の評価

Pyrolyzate	Treatment			Percentage of mutagenicity due to IQ-type mutagens <sup>a</sup>
	None	Nitrite	Hypochlorite	
Revertants/mg of basic fraction				
Sardine	16000 <sup>b</sup>	15600 <sup>b</sup> (97) <sup>c</sup>	1500 <sup>b</sup> (9) <sup>c</sup>	88
Beef	2900	2200 (76)	30 (1)	75
Horse mackerel	27319	15869 (58)	2843 (10)	48
Cigarette smoke condensate	7280	1123 (15)	680 (9)	6
Albumin	28613	3218 (11)	1922 (7)	4

<sup>a</sup> % mutagenicity due to IQ-type mutagens in crude pyrolyzate = % residual mutagenicity after nitrite treatment - % residual mutagenicity after hypochlorite treatment.

<sup>b</sup> Revertant numbers are averages for duplicate plates corrected for the number of spontaneous revertant colonies, 30  $\mu$ l of S9 was used.

<sup>c</sup> Percent residual activity.

dimer [ $m/z$ : 392 ( $\text{M}^+$ ), 364 ( $\text{M}^+-\text{N}_2$ )] を与えた (Tsuda *et al.*, 1985)。

### f. 加熱分解食品の変異原活性に占める IQ 型変異原の寄与推定法

IQ 型及び非 IQ 型変異原の亜硝酸による脱アミノ化反応速度の差を利用する事により, 加熱分解食品が示す変異原活性における IQ 型及び非 IQ 型 HCA の寄与を推定出来ることを示した (Tsuda *et al.*, 1985)。その応用例を Table 4 に示した。即ち, 加熱食品の粗塩基性抽出物の示す変異原活性 (S9 mix 存在下) のうち, 次亜塩素酸処理により消失する部分が, 全 HCA (IQ 型+非 IQ 型) に起因する変異原活性 (A) とみなすことが出来る。一方, 亜硝酸処理 ( $2 \text{ mM NO}_2^-$ , pH 1) により不活性化される変異原活性 (B) を非 IQ 型 HCA に起因すると仮定 (亜硝酸処理により, 新たに生ずる S9 mix 依存性変異原活性, 例えば, ニトロソアミン等, は無視出来るとして) すれば, 変異原活性 (A-B) が IQ 型 HCA に起因する変異原活性とみなす事が出来る。この粗抽出物中の変異原活性の仕分け法は, 加熱分解食品が示す変異原の性質の予測に有効な方法として用いられている。

## 6. ヒト体内でのニトロソ化合物の生成とその抑制

### (1) ヒト体内での NOC 生成の実証

NOC の体内生成は, アルキルアミンと亜硝酸塩を経口投与して, 食道がんや肝がんを誘導した

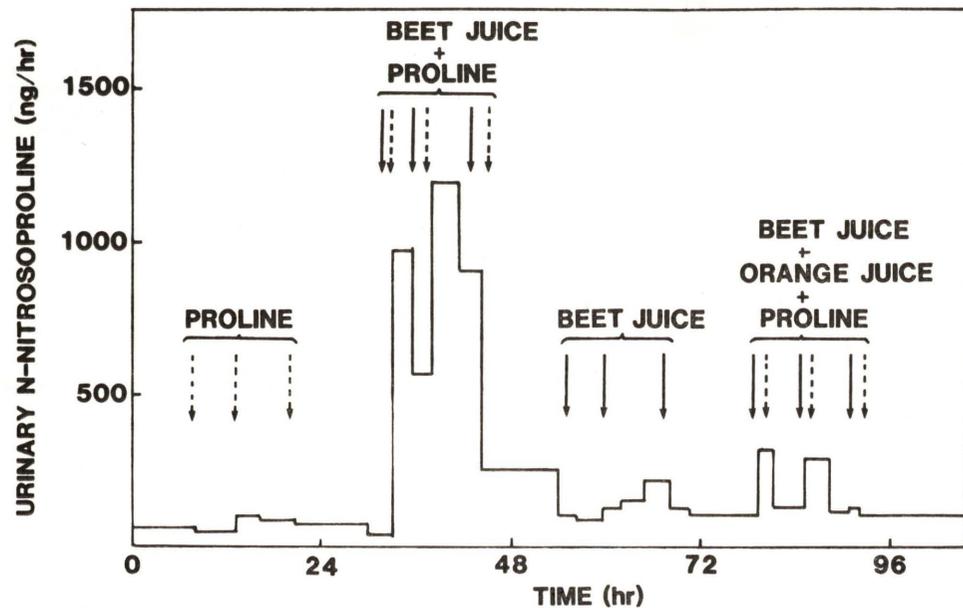
Sander の実験で実証されて以来, 数多くの研究がなされてきた (Sander, 1969; 谷村 & 酒井, 1981)。しかし, ヒト体内での NOC 生成の事実が確認されたのは十年程前の事である。

1981 年, Ohshima & Bartsch (1981) は, ヒト体内での NOC 生成を実証する, 興味あるボランティア実験の結果を報告した。それは, ボランティアにビートジュース ( $\text{NO}_3^-$ , 325 mg 相当) と proline (500 mg) を摂取させ, その後の尿中の N-nitrosoproline (NPRO) 排泄量を測定するというものであった。その一実験例を Fig. 11 に示した。このボランティア実験の安全性根拠は以下の様な理由に基づいていた。即ち, NPRO は, ① 変異原性を示さず且つ非発がん性 NOC である。② 体内で代謝をうけず, 定量的に尿中に排泄される。③ proline は食品中にも遊離アミノ酸として, 多量に存在しており, 安全な物質である。

Fig. 11 から明らかな様に, 硝酸塩と proline を一緒に摂取した後での尿中 NPRO 量は, 顕著に増加した。更に, オレンジジュース (ASC 源) を組み合わせ摂取した場合には, 尿中 NPRO 排泄量が著しく減少した事も, NPRO が体内生成した事を裏付けていると同時に, 発がん性 NOC の体内生成が, ASC により抑制出来る事を明瞭に示す結果であった (Ohshima *et al.*, 1982)。

### (2) ヒト尿から新含硫ニトロソ化合物を発見

1983 年, 著者らは, NOC に特異的検出感度を示す GC-TEA (thermal energy analyzer) を用



Ohshima et al., Banbury Report 7 (1982)

Fig. 11. Proline 及びビートジュース摂取後のヒト尿中 N-nitrosoproline 排泄量の増加とそのオレンジジュース (ascorbic acid 源) 飲用効果.

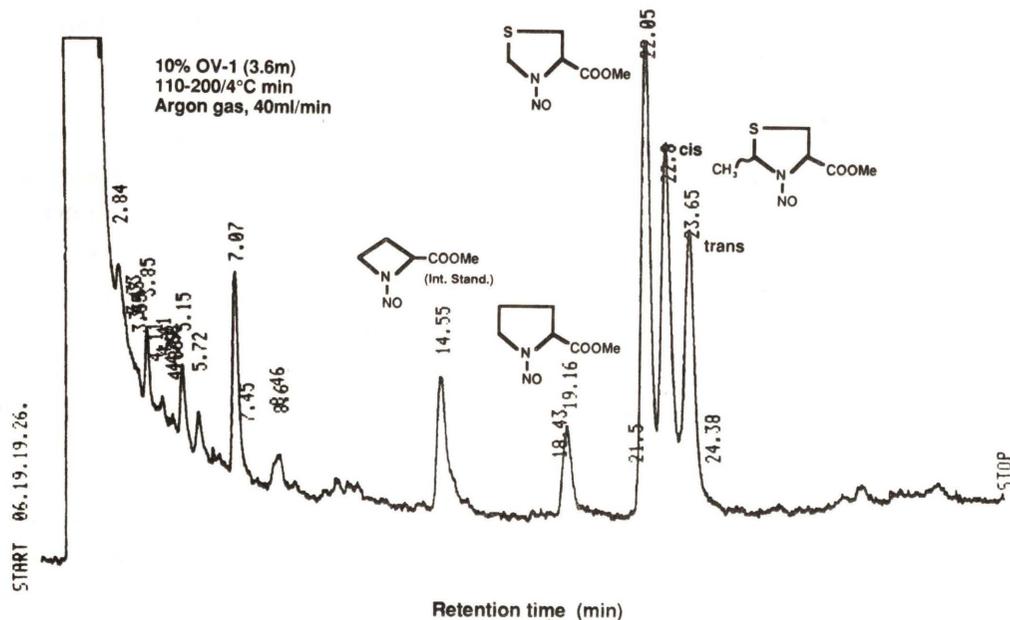


Fig. 12. ヒト尿中 N-ニトロソアミノ酸の GC-TEA による分析例.

いて、ヒト尿中の NOC を分析していた際に、NPRO とは異なる 3 種の未知 NOC ピークがきまって出現する事に注目した。種々、検討の結果、

果、Fig. 12 に示すような、含硫アミノ酸 thioproline (TPRO, thiazolidine-4-carboxylic acid) 及び 2-methylthiopropionitrile (MTPRO, cis/trans) の

ニトロソ体、N-nitrosothiopropionitrile (NTPRO, N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid) 及びそのメチル体 (NMTPRO, cis/trans) である事をつきとめた (Fig. 12) (Tsuda et al., 1983b; Ohshima et al., 1983)。これらの含硫ニトロソアミノ酸 (NAA) は、NPRO より常に大量に尿中に出現する事から、その発がん性の有無や尿中への由来に大きな関心が示された。

NTPRO 及び TPRO に関して、以下の事が判明している。

- NTPRO 及び TPRO はヒト尿中の常在成分である (Tsuda et al., 1987b)。
- NTPRO には変異原性がなく、NPRO 同様、非発がん性 NOC と考えられている (Tahira et al., 1984; Mirvish et al., 1973)。
- NTPRO は代謝を受けず、定量的に尿中へと排泄される (Ohshima et al., 1984)。
- TPRO のニトロソ化速度は proline より約千倍大きく、且つ亜硝酸濃度に対して一次の反応速度を示す (Tahira et al., 1984)。
- TPRO 及び MTPRO は食品の加熱により、Cysteine と HCHO 又は  $\text{CH}_3\text{CHO}$  との縮合反応で容易に生成する (Tsuda et al., 1987a; Tsuda et al., 1988a; Kurashima et al., 1990)。
- ヒト尿中に排泄される NTPRO の大部分は、体内生成によるものである (Tsuda et al., 1988)。

以上の NTPRO 及び TPRO が示す諸性質に基づいて、次の二点から注目されてきた。

イ. NTPRO はヒト体内でのニトロソ化能を評価する、現在知られる最も敏感な指標物質

である。

ロ. TPRO はヒト体内で亜硝酸捕捉剤となり、発がん性 NOC の生成を抑制している。

### (3) 喫煙の体内ニトロソ化反応に及ぼす影響

ヒト尿中に NTPRO 及び NMTPRO が見い出されて以来、その由来に関して食事要因と共に喫煙の影響も予想されてきた (Hoffmann & Brunemann, 1983; Ladd et al., 1984)。著者らは、東京衛生病院 (杉並区) 林高春院長らの協力を得て、日本人 Seventh-Day Adventists (SDA) 36 人の 24 時間尿の分析を行った。SDA の人々は宗教上の理由から肉食主義をとっており、喫煙、飲酒、肉食の習慣がない事から、その尿中 NAA 排泄量に大変興味があった。その分析結果を、一般男性 (喫煙者及び非喫煙者) の尿分析結果と比較したのが Table 5 である。一般男性間でも、含硫 NAA 排泄量が喫煙者で有意に高くなる傾向が認められたが、喫煙者と SDA 間で比較するとその差が一層明瞭であった。アルコール摂取や肉食の影響等も無視出来ないと思われた。そこで、食事要因を可及的コントロール (低硝酸塩規定食) しながら喫煙の影響を調べたボランティア実験の結果が Fig. 13 である。これは、喫煙により体内ニトロソ化が促進されることを明瞭に示した実験例の一つである (Tsuda et al., 1986a)。その促進の理由として、次の二点が掲げられる。

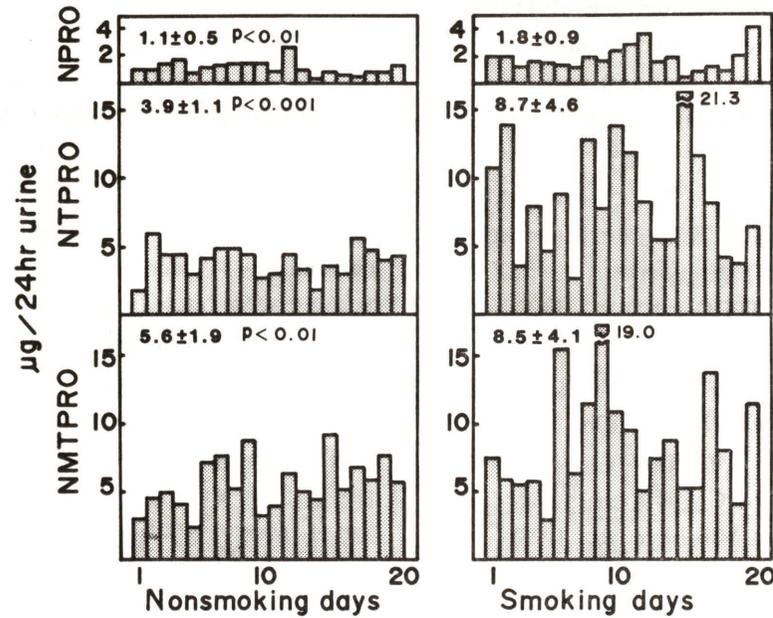
- たばこ煙中  $\text{NO}_x$  の体内ニトロソ化への関与
- 唾液中  $\text{SCN}^-$  塩の喫煙による上昇とその体内ニトロソ化の促進作用

たばこ煙中には、 $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}$  95%,  $\text{NO}_2$  5%) が約  $500 \mu\text{g}/\text{cigarette}$  で含まれている (Hoffmann &

Table 5. 一般健康人及び日本人セブンスデーアドベンティスト (SDA) における尿中ニトロソアミノ酸 (NAA) 排泄量

NAA	$\mu\text{g}/24 \text{ hr urine (Mean} \pm \text{SD)}$		
	Seventh-Day Adventists	General Population Nonsmokers	Smokers
NPRO	$3.3 \pm 3.5^{*1}$	$1.6 \pm 1.1^{*1}$	$2.2 \pm 1.2$
NTPRO	$5.1 \pm 3.4$	$6.4 \pm 5.5^{*1}$	$10.5 \pm 6.5^{*1}$
NMTPRO	$4.0 \pm 3.2$	$5.4 \pm 3.7^{*2}$	$8.8 \pm 4.1^{*2}$
Total NAA	$13.1 \pm 10.8$	$13.4 \pm 7.2^{*3}$	$21.5 \pm 9.9^{*3}$

GP: 7 male smokers ( $n=17$ ) and 10 male nonsmokers ( $n=19$ ),  
SDA: 18 male nonsmokers ( $n=18$ )  $^{*1} p < 0.05$ ,  $^{*2} p < 0.02$ ,  $^{*3} p < 0.01$



M. Tsuda et al., Cancer Letters 30 117, 1986

Fig. 13. ヒト尿中 N-ニトロソアミノ酸排泄量に及ぼす喫煙の影響。  
一男性ボランティアによる実験結果、尿採取日には、被験者は規定食を摂取した。  
喫煙本数は 20 cigarette/day.  
NPRO: N-nitrosoproline, NTPRO: N-nitrosothioprolines  
NMTPRO: N-nitrosomethylthioprolines (cis/trans).

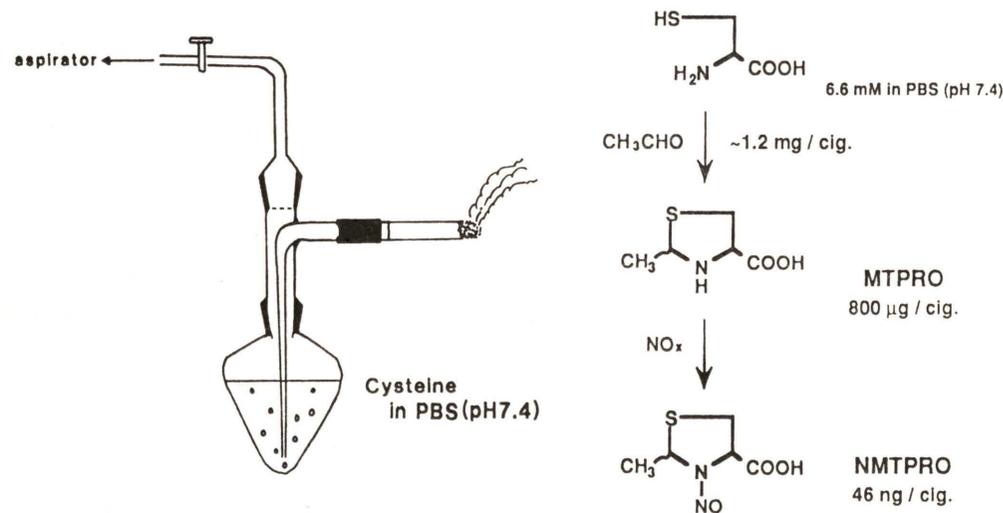


Fig. 14. Cysteine リン酸緩衝液 (pH 7.4) にたばこ煙を通じて生成する methylthioprolines (MTPRO) 及び N-nitrosomethylthioprolines (NMTPRO).

Wynder, 1986)。従って、20本/日の喫煙では、10 mg 前後の NO<sub>x</sub> を毎日、体内吸入する事になる。NO 自体はニトロソ化能を示さないが、肺胞中で NO<sub>2</sub> (free radical) への酸化が起ると

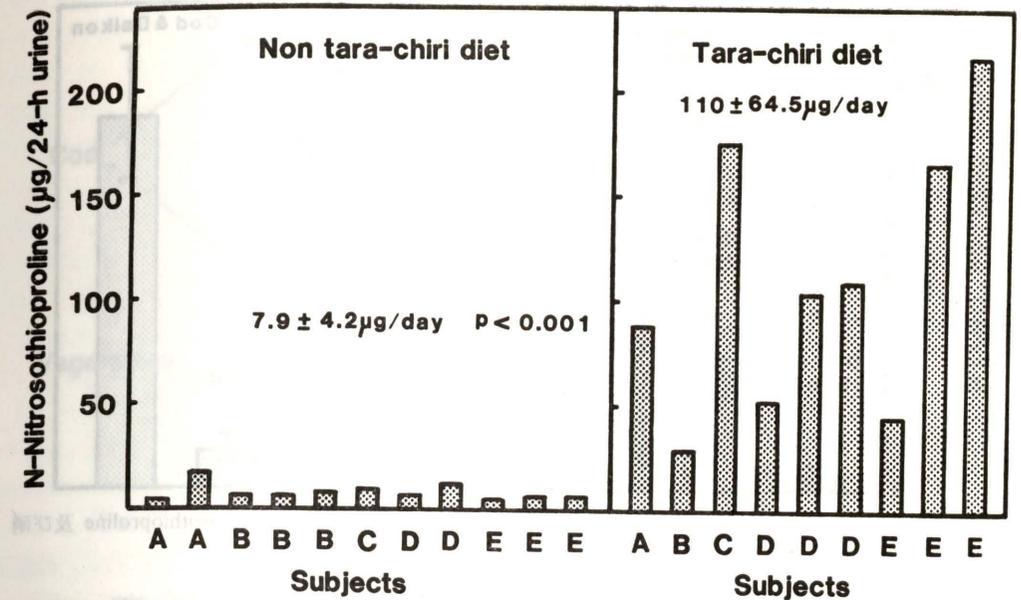
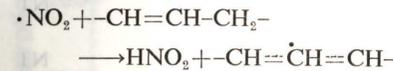


Fig. 15. ヒト尿中 N-nitrosothioprolines 排泄量に及ぼす“タラちり食”摂取の効果。

の平衡によるニトロソ化剤 N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の生成が考えられると共に、NO<sub>2</sub> は肺組織の不飽和脂肪酸等の活性メチレンからの水素引き抜き反応で HNO<sub>2</sub> を生成し、ニトロソ化に関与すると考えられる (Pryor & Lightsey, 1981)。



一方、たばこ煙中には、CH<sub>3</sub>CHO が ~700 µg/cigarette で含有する事が知られている (Hoffmann & Wynder, 1986)。そこで、喫煙により尿中 NMTPRO 量が増加する理由をさぐる目的で、かつて、Braven らが試みた様に、cysteine のリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中へのたばこ煙の bubbling 実験 (Fig. 14) を行って、MTPRO 及び NMTPRO の生成量を調べた (Braven et al., 1967)。その結果を Fig. 14 に示した。中性生体環境での NO<sub>x</sub> によるニトロソ化の可能性を示唆している (Tsuda & Ohgaki, 1986b)。

喫煙による体内ニトロソ化の促進における唾液中 SCN<sup>-</sup> の影響に関しては、Ladd らが、ボランティア (喫煙者 16 人、非喫煙者 8 人) へのプロリン負荷テストで明瞭に示している (Ladd et al., 1984)。著者らのボランティア実験 (Fig. 13) にお

いても、SCN<sup>-</sup> による促進が一部関与している事は否定出来ないが、食事の硝酸塩制限下に実施した事から、むしろ NO<sub>x</sub> による影響ではないかと考えられる。

#### (4) 体内ニトロソ化における食事要因“タラちり現象”からの情報

ヒト尿中への NAA 排泄量は体内でのニトロソ化能を反映しているという考えから、尿中 NAA 量と食事要因との関係について解析を進めていた。しかし、当初は、いずれも“五十歩百歩”といった調子で決定的要因が見出せなかった。又、24 時間尿の提供者を確保する事も困難な作業であった。その様な試行錯誤を繰り返していたある時、異常に高い NTPRO 含量 (通常の十倍程度) を示す尿試料に遭遇した。著者と同じマンションに住む人からの 24 時間尿であった。尿採取日の食事内容を調べてみると、たまたま“タラちり鍋”料理を食べた日という事であった。著者の家族で食卓実験を行って得た尿の分析結果が Fig. 15 である。結果は一目瞭然、“タラちり食”には、ヒト尿中の NTPRO 排泄量を著しく増加させる効果のある事が分った (Tsuda et al., 1988a)。更に、その因果関係を明らかにする目的で、調理したタラ魚肉と大根の“食べ合わせ”実験を試み、

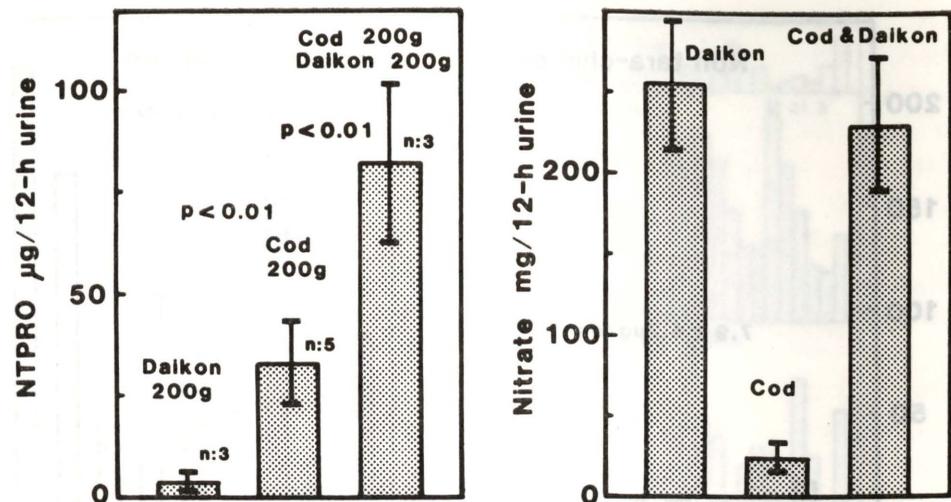


Fig. 16. 調理したタラ魚肉及び大根を摂取したボランティア (一人) の尿中 N-nitrosothiopropine 及び硝酸塩排泄量。

Table 6. 沸煮調理したタラ, 大根, タラ+大根中の formaldehyde 及び硝酸塩含量並びに Thiopropine, N-nitrosothiopropine 生成量とその formaldehyde, cysteine 添加沸煮効果

Homogenate	Amount (g) used	Amounts <sup>a</sup> in total homogenate			
		TPRO (µg)	NTPRO (µg)	Formaldehyde (mg)	Nitrate <sup>b</sup> (mg)
Japanese radish	100	38	<0.5	0.38	161
Cod	100	397	<0.5	3.18	0.6
Cod plus Japanese radish	100	758	<0.5	2.61	171
Japanese radish plus formaldehyde	0.015	576	NT <sup>c</sup>	7.42	NT
Cod plus L-Cysteine	0.40	15400	NT	0.27	NT

<sup>a</sup> Means of values in at least two experiments.  
<sup>b</sup> As NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.  
<sup>c</sup> NT, not tested.

尿中 NTPRO 及び硝酸塩排泄量への効果を調べた (Fig. 16)。Table 6 にはその食品分析の結果を示した。調理した食品からは、NTPRO は検出されなかった。これらの分析結果を基に、“タラちり鍋” 摂取で起った現象を整理したのが Fig. 17 である。即ち、寒流魚であるタラの抗凍結成分といわれる trimethylamine oxide (TMAO) から生じた大量の HCHO は、cysteine と縮合反応する事により TPRO を生成する。一方、大根: 白菜等の野菜から供給された硝酸塩は、口腔内細菌により亜硝酸塩へと変換され、これが胃液の酸性条件下でニトロソ化反応に関与して、NTPRO

(非変異原性) を生成、尿中に排泄されたという図式である。タラ中の TMAO から酵素分解で HCHO が生成する際に、多量の dimethylamine も副生するが (Zeisel & DaCosta, 1986), TPRO と dimethylamine とのニトロソ化速度間には 10<sup>4</sup> の差がある事から (Mirvish, 1975), TPRO が亜硝酸捕捉剤となって発がん性 NDMA の生成を阻止していると考えられる。この“タラちり現象” が契機となって、食品中に TPRO の生成系が種々存在する事が判明した。

#### (5) ヒト体内でのニトロソ化能の評価

ヒト体内でニトロソ化反応が日常茶飯事として

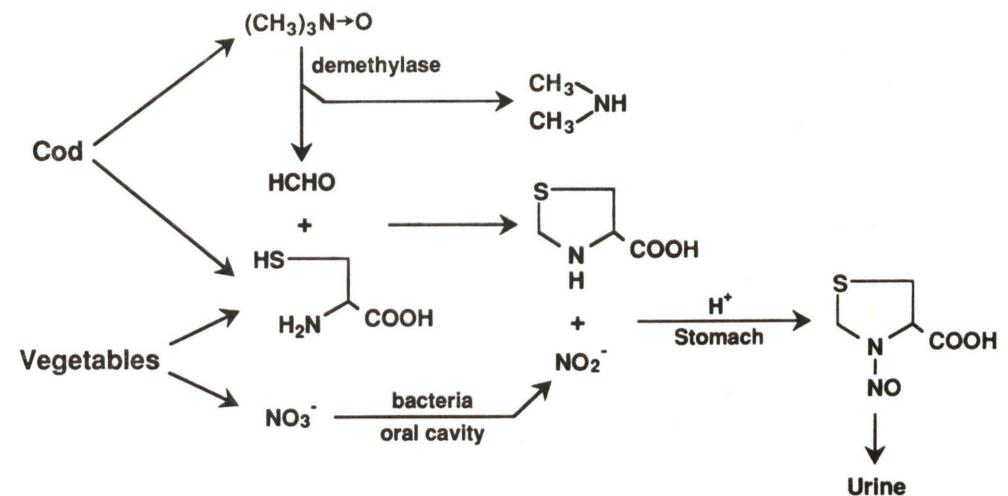


Fig. 17. “タラちり食” 摂取によるヒト体内での N-nitrosothiopropine の生成経路。

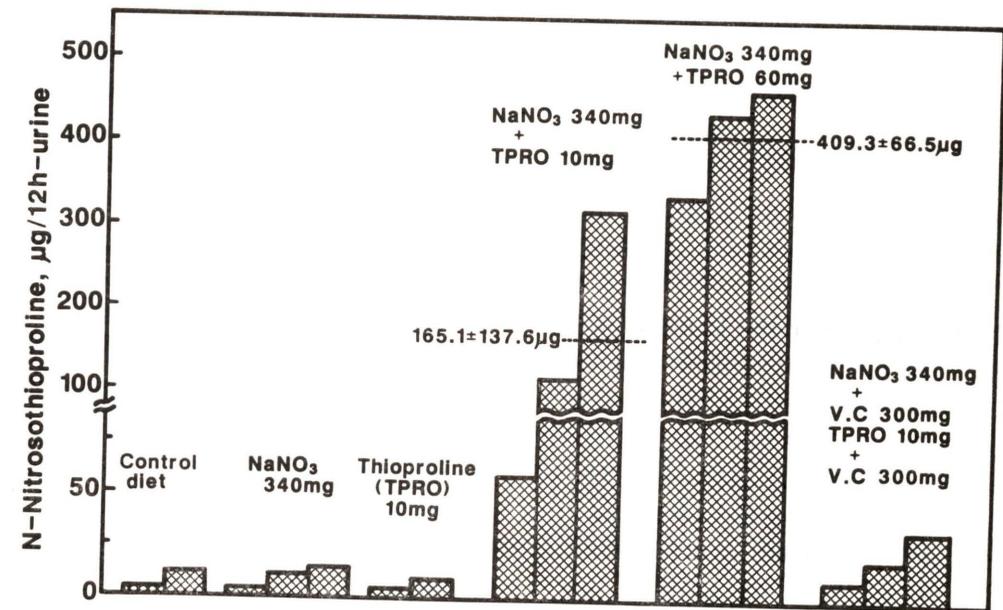


Fig. 18. 硝酸塩及び thiopropine 摂取によるヒト体内 N-nitrosothiopropine の生成とその ascorbic acid (V.C.) による抑制。

起っている事は、尿中に NPRO や NTPRO 等が常時、排泄されている事からも明らかである。それでは一体、ヒト体内では、実際にどの程度まで NOC 生成が可能であろうか。ボランティアによる TPRO 摂取後の NTPRO への変換を指標として体内ニトロソ化能の測定を試みた結果を Fig. 18 に示した。6 m mol の硝酸塩と共に、

TPRO を 0.45 m mol (60 mg) 摂取した場合、最高 4 µ mol (650 µg) の NTPRO 生成がみられた。もし、aminopyrine のように、そのニトロソ化速度が TPRO と同程度のものを前駆体として摂取した場合は、発がん性 NOC, NDMA が 4 µ mol (300 µg) 程度生成する事を示している。事実、Spiegelhalder らは、そのボランティア実

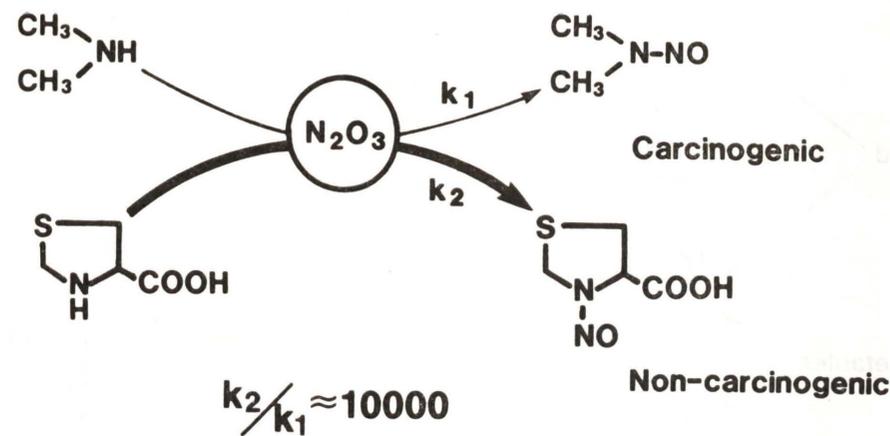


Fig. 19. 亜硝酸捕捉剤 thioproline による発がん性ニトロソ化合物の生成抑制.

験において、被験者にビール (0.5 l) を事前に摂取させ、NDMA の代謝を抑制しながら硝酸塩 6 m mol 及び aminopyrine 500 mg (2.16 m mol) を摂取させた場合、NDMA が 25~1800  $\mu\text{g}$  (計算値) 生成したと報告している (Spiegelhalder & Preussmann, 1985)。ちなみに、ラットでは、NDMA を飲料水に 30 ppb の濃度で溶かして与え続けると肝がんが発生する (Preussmann, 1984)。

#### (6) 亜硝酸捕捉剤 thioproline による発がん抑制

TPRO のニトロソ化速度は、dimethylamine に比して  $10^4$  倍大きいと考えられる (Mirvish, 1975) 事から、著者らは TPRO のヒト体内における亜硝酸捕捉剤としての働きによる発がん性 NOC の生成抑制の役割について提唱してきた (Fig. 19) (Tahira *et al.*, 1984; Tsuda *et al.*, 1988a)。

この TPRO による発がん抑制効果は、田平らの動物実験により証明されている (Tahira *et al.*, 1988)。即ち、F-344 ラットに、亜硝酸塩を飲料水 (0.1~0.2%) として、又、methylbenzylamine (MBA) を飼料 (0.25%) に混ぜて与えたところ、100% の高率で前胃にがんが発生した。一方、TPRO を飼料 (0.25~0.5%) に加えて MBA と同時に与えた場合、この胃がん発生率は 22% まで低下した。発がん性 NOC, N-nitrosomethylbenzylamine の体内生成が、TPRO により競合的阻害をうけた事による発がん抑制である。

#### (7) 食品の加熱調理による thioproline の生成

TPRO は食品の加熱により多かれ少なかれ生成するが、特に、タラ科魚肉 (2~3 ppm) や乾燥シイタケ (2~8 ppm)、家畜肝臓食品 (9~18 ppm) 等が高い生成系を有している (Tsuda *et al.*, 1987a; 津田 & 倉島, 1988c, 1989a; Tsuda

Table 7. 野菜の煮沸による thioproline 生成量とその formaldehyde 添加煮沸による顕著な増加

Vegetable	Thioproline formed by boiling*1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ vegetable (raw)	
	Without Formaldehyde	With*2 Formaldehyde
Broccoli $\blacktriangle$	116	2986
Asparagus (green) $\blacktriangle$	78	980
Cauliflower	65	1418
Chinese chive (Nira) $\blacktriangle$	42	717
Daikon	38	576
Spinach $\blacktriangle$	31	814
Brussels sprouts $\blacktriangle$	24	666
Sweet pepper $\blacktriangle$	24	446
Welsh onion (Negi)	23	378
Chinese cabbage	13	60
Celery	9	102
Cabbage	8	263
Carrot $\blacktriangle$	8	124
Lettuce	8	77
Garlic	7	238
Cucumber	4	109

$\blacktriangle$  Green-yellow vegetables

\*1: Boiled in distilled water for 5-8 min.

\*2: Boiled with 15 mg HCHO/100 g vegetable

*et al.*, 1988a; Kurashima *et al.*, 1990)。野菜類も生では TPRO は検出されないか、0.2 ppm 以下であったが、煮沸により少量ではあるが TPRO が生成した。一般に緑黄色野菜では、淡色野菜に比して生成量が高かった (Table 7)。野菜における HCHO 添加煮沸後の TPRO の生成増加は、野菜中の遊離 cysteine 含量を反映している。(津田, 1987d; Tsuda *et al.*, 1988b)。更にインドネシアやタイ南部で食用に供されているジェンコール豆 (Djenkol beans, 乾燥品) の場合は、加熱なしでも 44 ppm と高い濃度を示し、煮沸する事により 680 ppm という TPRO の特異的高濃度生成を示した (津田他, 1989c)。この事は chemoprevention や機能性食品等の観点からも興味があり、ジェンコール豆を常食している人々の尿中 NTPRO 排泄量に関心がもたれる。

#### 7. L-Arginine からの一酸化窒素の生成とそのニトロソ化反応への関与

##### (1) 一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発見

ヒトの硝酸塩代謝研究は 1910 年代より始まっており、低硝酸塩食を与えた時の尿中硝酸塩排泄量は、摂取した硝酸塩量より多い事が既に示されていた (石綿 & 谷村, 1982)。Tannenbaum らはこの点に注目し、当初は、腸内細菌等による窒素酸化物 (NOX) 産生の関与を考えていた (Tannenbaum, 1978)。しかし、この可能性は、無菌ラットを用いても、排泄される硝酸塩量に差がないことから否定された。Tannenbaum らは更に、

ヒトに毎日一定量の低硝酸塩食を与えて、尿中の硝酸塩排泄量に関する、長期観察を行っていた。ところが、この実験中に、一人の被験者が下痢を起した際に、尿中硝酸塩排泄量が異常に増加するという現象が起った (Wagner *et al.*, 1984)。この偶発の発見が契機となって、その後、LPS 及び IFN- $\gamma$  等の存在下で M $\phi$  を活性化すると、培養液中に多量の  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  が産生することが見いだされた (Stuehr & Marletta, 1985)。この M $\phi$  の活性化に伴う  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  の産生は、Marletta らにより、L-arginine を基質とする一酸化窒素合成酵素 (NOS) 誘導によるものである事が示された (Tayeh & Marletta, 1989)。Tannenbaum や Marletta らとは独立に、Moncada ら (1988) により血管内皮由来弛緩因子 (EDRE) もやはり NO である事が見いだされて以来、NO の重要な生理機能について急速な展開をみている事は緒言でも触れた。

##### (2) 活性化 M $\phi$ による TPRO 及び proline のニトロソ化

LPS (E. coli) により活性化された M $\phi$  様培養細胞 (J774.1) は、INF- $\gamma$  の共存下で  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  を産生する。三輪らは、この活性化 M $\phi$  (J774.1) の培養系に morpholine を添加すると、中性培養液中でも N-nitrosomorpholine が生成する事を報告した (Miwa *et al.*, 1987)。更に、著者らは、活性化 M $\phi$  (J774.1) による TPRO 及び proline のニトロソ化についても検討した (Miwa, Tsuda *et al.*, 1989)。その結果を Table 8 に示した。

Table 8. 活性化したマクロファージ様細胞 (J774.1) における亜硝酸塩、N-nitrosothioproline 及び N-nitrosoproline の生成

Cells <sup>a</sup>	LPS <sup>a</sup> IFN	Substance added			Product <sup>c</sup>		
		Thioproline (5 mM)	Proline (5 mM)	$\text{NO}_2^-$ <sup>b</sup> (100 $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{M}$ )	NTPRO ( $\mu\text{M}$ )	NPRO ( $\mu\text{M}$ )
+	+	+	-	-	69.9	3.53	ND
+	+	-	-	-	72.1	ND	ND
+	-	+	-	-	2.2	0.12	ND
-	+	+	-	+	95.3	0.16	ND
+	+	-	+	-	60.2	ND	0.12
-	+	-	+	+	98.3	ND	ND

<sup>a</sup> Cells ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ), LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), IFN- $\gamma$  (100 U/ml).

<sup>b</sup> Nitrite added at time 0. ND: not detected.

<sup>c</sup> Results after 72 hr incubation.

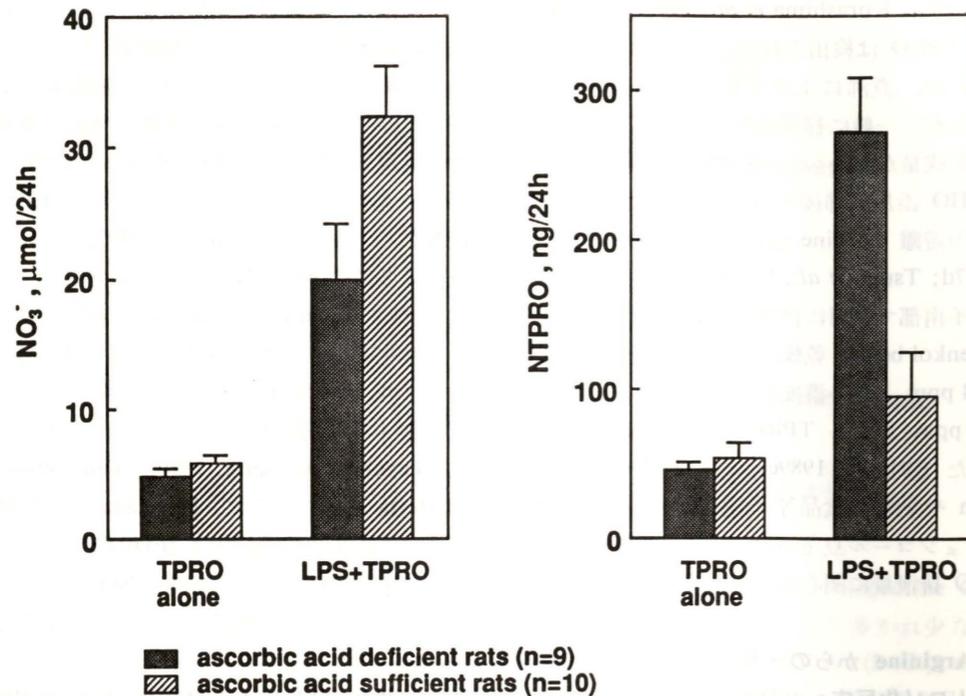


Fig. 20. Ascorbic acid 合成酵素欠損 (ODS) ラットにおける *E. coli* lipopolysaccharide 及び thioproline 腹腔内投与による硝酸塩及び N-nitrosothioproline の生成.

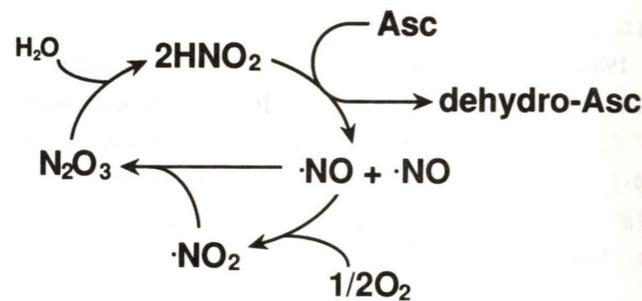


Fig. 21. 酸素共存下での一酸化窒素 ( $\cdot\text{NO}$ ) からのニトロソ化試剤の生成.

Mφ が関与する場合も、TPRO のニトロソ化が proline に比して速く、亜硝酸捕捉剤として優れている事が分った。非活性化 Mφ の培養液中に亜硝酸塩を、活性化 Mφ 培養液中の亜硝酸塩濃度と同等レベル以上に添加しても、顕著な NTPRO の生成は起らなかった事から、NOC 生成に細胞の存在が重要な事を示唆した。

### (3) 炎症を誘発した ASC 欠乏ラットにおける硝酸塩の産生と体内 NOC 生成

ラットは、通常 ASC を体内合成出来るが、

ASC 合成酵素を欠損した変異ラット (wistar 系) が株化されており、ODS (osteogenic disorder syndrome, od/od) ラットと呼ばれている (Mizushima *et al.*, 1984)。この ODS ラットは、ASC を飲料水として補給せずに飼育すると約 2 週間で壊血病状態となる。勿論、ASC を飲料水として与え続けられれば、正常に成育する。

著者らは、この ODS ラットを用いて、LPS (*E. coli*, 1 mg/kg) 及び TPRO (20 mg/rat) を腹腔内投与した後の、硝酸塩及び NTPRO の尿中排

泄量に対する ASC 欠乏の影響を調べた (Kosaka *et al.*, 1989, 1990)。Fig. 20 にその結果を示した。

この ODS ラットを用いた炎症モデル実験の結果は、次の二点を明らかにした。

- LPS 刺激により誘発した炎症に伴って産生される NOX は、体内ニトロソ化に関与する。
- ASC 欠乏状態では、体内 NOC 生成が著しく促進される。

LPS 刺激による炎症に伴って Mφ 等で誘導された NOS により、L-arginine から生成した NO (free radical) は、体内で Fig. 21 に示す NOX 間の相互変換をしていると考えられる (Mirvish, 1981)。ASC は NO を安定化させることにより、ニトロソ化能を有する活性 NOX ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$  etc) の生成を抑制して、体内 NOC 生成を減少させると考えられる (ASC 供給ラット)。一方、ASC 欠乏ラットでは、NO は容易に  $\text{NO}_2$  に酸化され、 $\text{N}_2\text{O}_3$  が生成して NOC 生成を有利にしたものと説明される。

## 8. おわりに

我々は、長い間、亜硝酸(塩)の生体への影響について、多くの場合、胃の酸性条件下での相互作用 (Intragastric interaction) による変異・がん原物質の生成とその抑制に関心をもってきた。一方、冒頭でも述べた如く、L-arginine を基質とする内因性一酸化窒素生成系の発見により、従来の窒素酸化物 (NOX) に対する理解を大幅に修正する必要が生じている。又、NOX の extragastric interaction に関する知見の集積が、一層重要性を増してきたといえる。とりわけ、ニトロソ化能を有する活性 NOX (例えば  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$  等) の NO からの体内生成機序や挙動は、食品や医薬品成分との相互作用による変異・がん原物質生成とも関連しており、この分野での研究の新たな展開が望まれる。

## 参考文献

Bartholomew, B., and M. J. Hill (1984) The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary

nitrate. *Fd. Chem. Toxicol.*, **22**, 789-795.  
 Braven, J., G. J. Bonker, M. L. Fenner and B. L. Tonge (1967) The mechanisms of carcinogenesis by tobacco smoke: some experimental observations and hypothesis, *Br. J. Cancer*, **21**, 623-633.  
 中馬一郎 (1984) 窒素酸化物とはどういうものか、環境と人体 (III) 窒素酸化物 (中馬一郎, 江上信雄, 武部啓編) 東京大学出版会, pp. 1-11.  
 Collier, J. and P. Vallance (1989) Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems, *TIPS*, **10**, 427-431.  
 Cuello, C., P. Correa, W. Haenszel, G. Gordillo, C. Brown, M. Archer and S. Tannenbaum (1976) Gastric cancer in Colombia. I. Cancer risk and suspect environmental agents. *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**, 1015-1020.  
 Fine, D. H., B. C. Challis, P. Hartman and J. Van Ryzin (1982) Endogenous synthesis of volatile nitrosamines: model calculations and risk assessment. In: H. Bartsch, I. K. O'Neill, M. Castgnaro, M. Okada and W. Davis (Eds.), *N-Nitroso Compounds: Occurrence and Biological Effects*, IARC Scientific Publications No. 41, IARC, Lyon, 379-396.  
 Forman, O. and D. Shuker (1989) Nitrate, nitrite and nitroso compounds in human cancer, *Cancer Surveys*, **8**, 203-492.  
 Fujita, Y., K. Wakabayashi, S. Takayama, M. Nagao and T. Sugimura (1987) Induction of oral cavity cancer by 3-diazotyramine, a nitrosated product of tyramine present in foods. *Carcinogenesis*, **8**, 527-529.  
 Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature*, **288**, 373-376.  
 Hibbs, J. B., R. R. Taintor and Z. Vavrin (1987) Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite, *Science*, **235**, 473-476.  
 Hoffmann, D. and K. Brunemann (1983) Endogenous formation of N-nitrosoproline in cigarette smokers, *Cancer Res.*, **43**, 5570-5574.  
 Hoffmann, D. and E. L. Wynder (1986) Chemical constituents and bioactivity of tobacco smoke, In: D. Zaridze and R. Peto (Eds.), *Tobacco, a major international health hazard*, IARC Scientific Publ. No. 74, IARC, Lyon, 145-165.  
 石綿 肇, 谷村 顕雄 (1982) 硝酸塩および亜硝酸塩の生体内運命, *衛生化学*, **28**, 171-183.  
 Kawabata, T., H. Ohshima, J. Uibu, M. Nakamura, M. Matsui and M. Hamano (1979) Occurrence, formation and precursors of N-nitroso compounds in Japanese diet, In: E. C. Miller, J. A. Miller, I. Hirono, T. Sugimura and S. Takayama (Eds.), *Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and*

- Modulators of Carcinogenesis, Japan Sci. Soc. Press/Univ. Park Press, Tokyo/Baltimore, 195-209.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1988) Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite. *Food and Chemical Toxicology*, **26**, 209-214.
- Kosaka, H., M. Tsuda, Y. Kurashima, H. Esumi, N. Terada, Y. Ito and M. Uozumi (1990) Marked nitrosation by stimulation with lipopolysaccharide in ascorbic acid deficient rats, *Carcinogenesis*, **11**, 1887-1889.
- Kosaka, H., J. S. Wishnok, M. Miwa, C. D. Leaf and S. R. Tannenbaum (1989) Nitrosation by stimulated macrophages. Inhibitors, enhancers and substrates, *Carcinogenesis*, **10**, 563-566.
- Kurashima, Y., M. Tsuda and T. Sugimura (1990) Marked formation of thioazolidine-4-carboxylic acid, an effective nitrite trapping agent *in vivo*, on boiling of dried shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1945-1949.
- Ladd, K. F., H. L. Newmark and M. C. Archer (1984) N-Nitrosation of proline in smokers and nonsmokers, *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 83-87.
- Lijinsky, W. (1974) Reaction of drugs with nitrous acid as a source of carcinogenic nitrosamines, *Cancer Res.*, **34**, 255-258.
- Lijinsky, W., E. Conrad and R. Van de Bogart (1972) Carcinogenic nitrosamines formed by drug/nitrite interactions, *Nature*, **239**, 165-167.
- Maliszewski, T. F. and D. E. Bass (1955) 'True' and 'apparent' thiocyanate in body fluids of smokers and nonsmokers, *J. Appl. Physiol.*, **8**, 289-291.
- Marletta, M. A. (1989) Nitric oxide: biosynthesis and biological significance, *TIBS*, **14**, 488-492.
- Mirvish, S. S. (1975) Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and *in vivo* occurrence, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **31**, 325-351.
- Mirvish, S. S. (1981) Ascorbic acid inhibition of N-nitroso compound formation of chemical, food and biological systems, In: M. S. Zedeck and M. Lipkin (Eds.), *Inhibition of Tumor Induction and Development*, Plenum Press, NY, pp. 101-126.
- Mirvish, S. S., O. Bulay, R. G. Runge and K. Patil (1973) Study of the carcinogenicity of large doses of dimethylnitramine, N-nitroso-L-proline and sodium nitrite administered in drinking water to rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 1435-1442.
- Miwa, M., D. J. Stuehr, M. A. Marletta, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum (1987) Nitrosation of amines by stimulated macrophages, *Carcinogenesis*, **8**, 955-958.
- Miwa, M., M. Tsuda, Y. Kurashima, H. Hara, Y. Tanaka and K. Shinohara (1989) Macrophage-mediated N-nitrosation of thioproline and proline, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 373-378.
- Mizushima, Y., T. Harauchi, T. Yoshizaka and S. Makino (1984) A rat mutant unable to synthesize vitamin C, *Experimentia*, **40**, 359-361.
- Moncada, S., M. W. Radomski and R. M. J. Palmer (1988) Endothelium-derived relaxing factor: Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2495-2501.
- 長尾美奈子 (1984) ニトロソ化前駆物質の存在, 代謝「癌'84」, 17-24.
- Ochiai, M., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1984) Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **75**, 1-3.
- Ohshima, H. and H. Bartsch (1981) Quantitative estimation of endogenous nitrosation in human by monitoring N-nitrosoproline excretion in the urine, *Cancer Res.*, **41**, 3658-3662.
- Ohshima, H., M. Friesen, C. Malaveille, I. Brouet, A. Hautefeuille and H. Bartsch (1989) Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyl diazonium ions as reactive products, *Fd. Chem. Toxicol.*, **27**, 193-203.
- Ohshima, H., M. Friesen, I. K. O'Neill and H. Bartsch (1983) Presence in human urine of a new N-nitroso compound, N-nitrosothiazolidine 4-carboxylic acid, *Cancer Lett.*, **20**, 183-190.
- Ohshima, H., I. K. O'Neill, M. Friesen, J.-C. Bérézat and H. Bartsch (1984) Occurrence in human urine of new sulphur-containing N-nitrosamino acids, N-nitrosothiazolidine, 4-carboxylic acid and its 2-methyl derivative, and the formation, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **108**, 121-128.
- Ohshima, H., B. Pignatelli and H. Bartsch (1982) Monitoring of excreted N-nitrosamino acids as a new method to quantitate endogenous nitrosation in humans, In: P. N. Magee (Ed.), *Nitrosamines and Human Cancer, Banbury Report 12*, Cold Spring Harbour Laboratory, NY, 297-317.
- Palmer, R. M. J., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*, **327**, 524-526.
- Preussmann, R. (1984) Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance, *Naturwissenschaften*, **71**, 25-30.
- Pryor, W. A. and J. W. Lightsey (1981) Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: initiation of lipid peroxidation and the product of nitrous acid, *Science*, **214**, 435-437.
- Ruddell, W. S., L. M. Blendis and C. L. Walters (1977) Nitrite and thiocyanate in the fasting and secreting stomach and in saliva, *Gut*, **18**, 73-77.
- Sander, J. and G. Bürkle (1969) Induction of malignant tumors in rats by simultaneous feeding of nitrite and secondary amines (Ger.), *Z. Krebsforsch.*, **76**, 93-96.
- Sasagawa, C., M. Muramatsu and T. Matsushima (1988) Formation of direct mutagens from aminoimidazoazaarenes by nitrite treatment, *Mutation Res.*, **203**, 386.
- 笹川千晶, 滝本めぐみ, 松島泰次郎 (1987) 亜硝酸による Amino-imidazo-azaarenes から直接型変異原の生成, 環境変異原研究, **9**, 41.
- Smith, R. J. (1978) Ever so cautiously, the FDA move toward a ban on nitrites, *Science*, **201**, 887-891.
- Smith, R. J. (1980) Nitrites: FDA beats a surprising retreat, *Science*, **209**, 1100-1101.
- Spiegelhalter, B. and R. Preussmann (1985) *In vivo* nitrosation of aminopyrine in humans: use of 'ethanol effect' for biological monitoring of N-nitrosodimethylamine in urine, *Carcinogenesis*, **6**, 545-548.
- Stephany, R. W. and P. L. Schuller (1980) Daily dietary intakes of nitrate, nitrite and volatile N-nitrosamines in the Netherlands using the duplicate portion sampling technique, *Oncol.*, **37**, 203-210.
- Stuehr, D. J. and M. A. Marletta (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7738-7742.
- Tahira, T., H. Ohgaki, K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1988) Inhibitory effect of thioproline on carcinogenesis by N-benzylmethylamine and nitrite, *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 511-516.
- Tahira, T., M. Tsuda, K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1984) Kinetics of nitrosation of thioproline, the precursor of a major nitroso compound in human urine, and its role as a nitrite scavenger, *GANN*, **75**, 889-894.
- 谷口茂彦, 河田安史, 高橋浩二郎, 川本奉之 (1985) 生体と硝酸塩-哺乳動物での対応-蛋白質核酸酵素, **30**, 808-815.
- 谷村顕雄, 酒井綾子 (1981) 医薬品と亜硝酸塩との反応による N-ニトロソ化合物の生体内生成の可能性について, 衛生試験所報告, **99**, 1-16.
- Tannenbaum, S. R., D. Fett, V. R. Young, P. D. Land and W. R. Bruce (1978) Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine, *Science*, **200**, 1487-1489.
- Tannenbaum, S. R., A. J. Sinskey, M. Weisman and W. Bishop (1974) Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation, *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 79-84.
- Tayeh, M. A. and M. A. Marletta (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate, tetrahydrobiopterin is required as a cofactor, *J. Biol. Chem.*, **264**, 19654-19658.
- Tsuda, M., Y. Takahashi, M. Nagao, T. Hirayama and T. Sugimura (1980) Inactivation of mutagens from pyrolysates of tryptophan and glutamic acid by nitrite in acidic solution, *Mutation Res.*, **78**, 331-339.
- Tsuda, M., M. Nagao, T. Hirayama and T. Sugimura (1981a) Nitrite converts 2-amino- $\alpha$ -carboline, an indirect mutagen, into 2-hydroxy- $\alpha$ -carboline, a non-mutagen, and 2-hydroxy-3-nitroso- $\alpha$ -carboline, a direct mutagen, *Mutation Res.*, **83**, 61-68.
- 津田充有, 若林敬二, 長尾美奈子, 平山 雄, 杉村 隆 (1981b) 西洋ワサビペルオキシダーゼによる Glu-P-1 の不活性化生成物の化学構造について, 第 10 回日本環境変異原学会 (東京) 講演要旨集, p. 75.
- Tsuda, M., K. Wakabayashi, T. Hirayama, T. Kawachi and T. Sugimura (1983a) Inactivation of potent pyrolysate mutagens by chlorinated tap water, *Mutation Res.*, **119**, 27-34.
- Tsuda, M., T. Hirayama and T. Sugimura (1983b) Presence of N-nitroso-L-thioproline and N-nitroso-L-methylthioproline in human urine as major N-nitroso compounds, *GANN*, **74**, 331-333.
- Tsuda, M., T. Kakizoe, T. Hirayama and T. Sugimura (1984) New type of N-nitrosamino acids, N-nitroso-L-thioproline and N-nitroso-L-methylthioproline, found in human urine as major N-nitroso compounds, In: I. K. O'Neill, R. C. von Borstel, L. E. Long, C. T. Miller and H. Bartsch (Eds.), *N-Nitroso Compounds, Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer*, IARC Sci. Publ. No. 57, IARC, Lyon, 87-94.
- Tsuda, M., C. Negishi, R. Makino, S. Sato, Z. Yamaizumi, T. Hirayama and T. Sugimura (1985) Use of nitrite and hypochlorite treatments in determination of the contributions of IQ-type and non-IQ-type heterocyclic amines to the mutagenicities in crude pyrolyzed materials, *Mutation Res.*, **147**, 335-341.
- Tsuda, M., J. Niitsuma, S. Sato, T. Hirayama, T. Kakizoe and T. Sugimura (1986a) Increase in the levels of N-nitrosoproline, N-nitrosothioproline and N-nitroso-2-methylthioproline in human urine by cigarette smoking, *Cancer Lett.*, **30**, 117-124.
- Tsuda, M. and H. Ohgaki (1986b) Influence of cigarette smoking on the formation of N-nitroso compounds in the human body. *Smoking Research Foundation Annual Research Report (Japanese)*, 24-31.
- Tsuda, M., Y. Kurashima, S. Sato and T. Sugimura (1987a) Thioproline as a nitrite trapping agent in the human body and its ubiquitous occurrence in foods. *Sulfur Amino Acid*, **10**, 271-277 (Japanese with English abstract).
- Tsuda, M., A. Nagai, H. Suzuki, T. Hayashi, M. Ikeda, M. Kuratsune, S. Sato and T. Sugimura (1987b) Effect of cigarette smoking and dietary

## 多環芳香族炭化水素と NO<sub>2</sub> 暴露との複合作用による 変異原の生体内生成

<sup>1</sup>徳島大学医学部, <sup>2</sup>東京都立衛生研究所 大西克成<sup>1</sup>, 木内武美<sup>1</sup>, 宮西幸一<sup>1</sup>,  
片岡佳子<sup>1</sup>, 加納堯子<sup>2</sup>

### 1. はじめに

これまでの研究で沢山の環境変異原物質が発見されてきた。これらの変異原が大なり小なり人体に作用しているわけだが、個々の物質がそれぞれ作用しているだけでなく、変異原物質を含む多くの化学物質と共に複合作用して人体に作用していると考えられる。この複合作用には、人体外で複数の物質が相互作用して別の物質となつて作用する場合と、複数の物質が人体に入ってから相互作用して別の物質となつて作用する場合とが考えられる。また、人体に入った物質が既に体内に存在する物質と相互作用する場合も考えられる。その作用の仕方としては、相互作用して生じた物質の活性が相互作用する前の個々の物質の相加的な活性よりも増加している場合と減少している場合とがある。

相互作用する物質としてはいろいろな組み合わせが考えられるが、ここでは多環芳香族炭化水素 (PAH) と二酸化窒素ガスとの複合作用について述べる。人体外で、つまり大気中で浮遊粒子状物質に吸着しているか、または、濾紙に吸着させた PAH が二酸化窒素ガスによってニトロ化され、変異原性が強いニトロ PAH になることは既に報告されている (Pitts Jr. *et al.*, 1978; Tokiwa *et al.*, 1981)。従って、PAH が吸着した大気中の粒子状物質を吸入し、それが肺内に存在するときに

二酸化窒素ガスに暴露されると、細胞外の粒子の PAH がニトロ化することは当然予想されるが、細胞内に取り込まれた粒子中の PAH または生体内に吸収された PAH がニトロ化されるのかどうかはまだ証明されていない。このことを証明するために、経気道で PAH を含む粒子を暴露させた後に、二酸化窒素に暴露させ、尿中にニトロ PAH を証明したとしても、そのニトロ化が細胞内または生体内で起こったのか、生体 (細胞) 外で起こったのかはわからない。従って、ここでは pyrene, fluoranthene, fluorene, anthracene, または chrysene などの PAH を実験動物の腹腔内に投与して、二酸化窒素を暴露した。このとき生体内でニトロ化反応が起きて、尿中に変異原性があるニトロ PAH の代謝産物が排泄されることを明らかにした。更に、PAH 投与と同時に第 3 の複合作用物質として L-ascorbic acid または DL- $\alpha$ -tocopherol を経口投与することによって尿の変異原性が減少することも示した。一部は既に発表済みである (Kanoh *et al.*, 1987; Kanoh *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.*, 1990)。

### 2. 二酸化窒素暴露濃度の決定

二酸化窒素濃度が 10.2 ppb の 28 m<sup>3</sup> の密閉室内で輻射熱型の石油ストーブを点火すると、室内の二酸化窒素濃度は 40 分間で平均 68.1 ppb に

<sup>1</sup> 〒770 徳島市蔵本町 3-18-15, <sup>2</sup> 〒160 東京都新宿区百人町 3-24-1

*In vivo* formation of mutagens by intraperitoneal administration of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals during exposure to nitrogen dioxide

Yoshinari Ohnishi<sup>1</sup>, Takemi Kinouchi<sup>1</sup>, Koichi Miyanishi<sup>1</sup>, Keiko Kataoka<sup>1</sup> and Takako Kanoh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Bacteriology, School of Medicine, The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramotocho, Tokushima-shi, 770 Japan, <sup>2</sup>Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

factors on the amounts of N-nitrosothiazolidine 4-carboxylic acid and N-nitroso-2-methylthiazolidine 4-carboxylic acid in human urine, In: H. Bartsch, I. K. O'Neill and R. Schulte-Hermann (Eds.), The Relevance of N-Nitroso Compounds in Human Cancer: Exposures and Mechanisms, IARC Sci. Publ. No. 84, IARC, Lyon, 446-450.

Tsuda, M. and H. Ohgaki (1987c) Effects of thiocyanate on nitrosation and deamination of bioactive amines by nitrite in stomach pH conditions. Smoking Research Foundation Annual Research Report (Japanese), 178-185.

津田充有 (1987d) 含硫アミノ酸, チオプロリン及びメチルチオプロリンの発がん抑制における意義の研究, 文部省「がん特別研究」研究報告集録 (昭 62 癌), pp. 848-852.

Tsuda, M., N. Frank, S. Sato and T. Sugimura (1988a) Marked increase in the urinary level of N-nitrosothioproline after ingestion of cod with vegetables, *Cancer Res.*, **48**, 4049-4052.

Tsuda, M., Y. Kurashima, R. Sunano and T. Sugimura (1988b) Formation of thioproline, an effective nitrite trapping agent, in various cooked vegetables, II nd International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis, Ohito, Japan, Abstracts, p. 60.

津田充有, 倉島由紀子 (1988c) タラおよびその他の魚肉類におけるチオプロリンの定量およびその存在意義に関する研究, 食肉に関する助成研究調査成果報告書 (伊藤記念財団), **6**, 351-357.

津田充有, 倉島由紀子 (1989a) ヒト体内での亜硝酸捕捉剤チオプロリンのニワトリ, ブタおよびウシ肝臓からの高濃度検出, 食肉に関する助成研究調査成果報告書 (伊藤記念財団), **7**, 430-433.

津田充有, 倉島由紀子, 江角浩安, 杉村 隆 (1989b) インドネシア産食用豆 Djengkol 豆調理による亜硝酸捕捉剤, チオプロリンの顕著な生成について, 環境変異原研究, **11**, 128.

Tsuda, M., Y. Kurashima and T. Sugimura (1990)

Evaluation of nitrite trapping capacity of thioproline in the human body, In: I. K. O'Neill, J. S. Chen, S. H. Lu and H. Bartsch (Eds.), Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, Tobacco smoke and mycotoxins, IARC Sci. Publ. No. 105, IARC, Lyon, 137-142.

Wagner, D. A., V. R. Young, S. R. Tannenbaum, D. S. Schultz and W. M. Deen (1984) Mammalian nitrate biochemistry: metabolism and endogenous synthesis, In: I. K. O'Neill and R. C. V. Borstel (Eds.), N-Nitroso Compounds: Occurrence and Biological Effects and Relevance to Human Cancer, IARC Sci. Publ. No. 57, IARC, Lyon, 247-253.

Wakabayashi, K., M. Nagao, M. Ochiai, T. Tahira, Z. Yamaizumi and T. Sugimura (1985) A mutagen precursor in Chinese cabbage, indole-3-acetonitrile, which becomes mutagenic on nitrite treatment, *Mutation Res.*, **143**, 17-21.

Wakabayashi, K., M. Nagao and T. Sugimura (1989) Mutagens and carcinogens produced by the reaction of environmental aromatic compounds with nitrite, *Cancer Surveys*, **8**, 385-399.

Yamada, M., M. Tsuda, M. Nagao, M. Mori and T. Sugimura (1979) Degradation of mutagens from pyrolysates of tryptophan, glutamic acid and globulin by myeloperoxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 769-776.

Yang, D., S. R. Tannenbaum, G. Büchi and G.C.M. Lee (1984) 4-Chloro-6-methoxyindole is the precursor of a potent mutagen (4-chloro-6-methoxy-2-hydroxy-1-nitrosoindolin-3-one oxime) that forms during nitrosation of the fava bean (*Vicia faba*), *Carcinogenesis*, **5**, 1219-1224.

Zeisel, S. H. and K.-A. Da Costa (1986) Increase in human exposure to methylamine precursors of N-nitrosamines after eating fish, *Cancer Res.*, **46**, 6136-6138.

上昇した (Kinouchi *et al.*, 1988)。この同じ部屋で湯を沸かすために都市ガスを燃焼させると点火前に 11 ppb であった二酸化窒素濃度が 13 分間で 263 ppb になった (Kinouchi *et al.*, 1986)。また、たばこの煙中の二酸化窒素濃度は 80-120 ppm と報告されている (Bokhoven and Niessen, 1961)。雄の動物に二酸化窒素を 16 時間暴露したときの 50% 致死濃度 (LC<sub>50</sub>) は、Golden 系ハムスターで 28 ppm, ICR マウスで 38 ppm, Wistar ラットで 49 ppm, Hartley モルモットで 62 ppm と報告されている (Takenaka *et al.*, 1979)。従って、動物に暴露させる二酸化窒素濃度としては、たばこの煙の 1/5 で、都市ガス燃焼室 (台所) の 76 倍の濃度の 20 ppm を使用した。

### 3. 二酸化窒素ガスの暴露方法

実験動物としては 6 週令の雄の ICR マウス (体重 24-26 g), Syrian golden ハムスター (50-90 g), Wistar ラット (90-110 g), Hartley モルモット (300-350 g) を用いた。

直径 19 cm, 容量約 6 liter のガラス製の暴露容器にマウス 5 匹, ハムスター 3 匹, ラット 2 匹, またはモルモット 1 匹を入れて、空気または 20 ppm の二酸化窒素ガスを上部から 350 ml/min の

流速で導入して 24 時間暴露し、tricaprylin に溶かした PAH を体重 kg 当り 400 mg を手早く腹腔内に注射し、さらに 24 時間空気または二酸化窒素に暴露し、その間の尿を氷冷した容器中に採取した。

L-ascorbic acid または DL- $\alpha$ -tocopherol はそれぞれ生理食塩水または corn oil に溶かして、PAH 投与直前にマウスの胃内に体重 kg 当り 2 g を投与した。

採取した尿はまずメンブレンフィルターで除菌し、酢酸緩衝液で pH 6 にした後  $\beta$ -glucuronidase と arylsulfatase で 37°C, 24 時間処理した。有効成分を dichloromethane で抽出し、preincubation 法で *Salmonella typhimurium* TA98 株と TA100 株、また、ときには TA98NR 株や TA98/1, 8-DNP<sub>6</sub> 株に対する変異原性を測定した。

### 4. 二酸化窒素暴露・pyrene 投与マウス尿の変異原性と生成物の分析

Fig. 1a に示したように、二酸化窒素を暴露し、pyrene を投与したマウスの 24 時間尿は酵素処理後、TA98 株 (-), (+) S9 で強い変異原性を示した。TA100 株に対しても少し弱い変異原性を示しており、尿中に複数の変異原の代謝産物

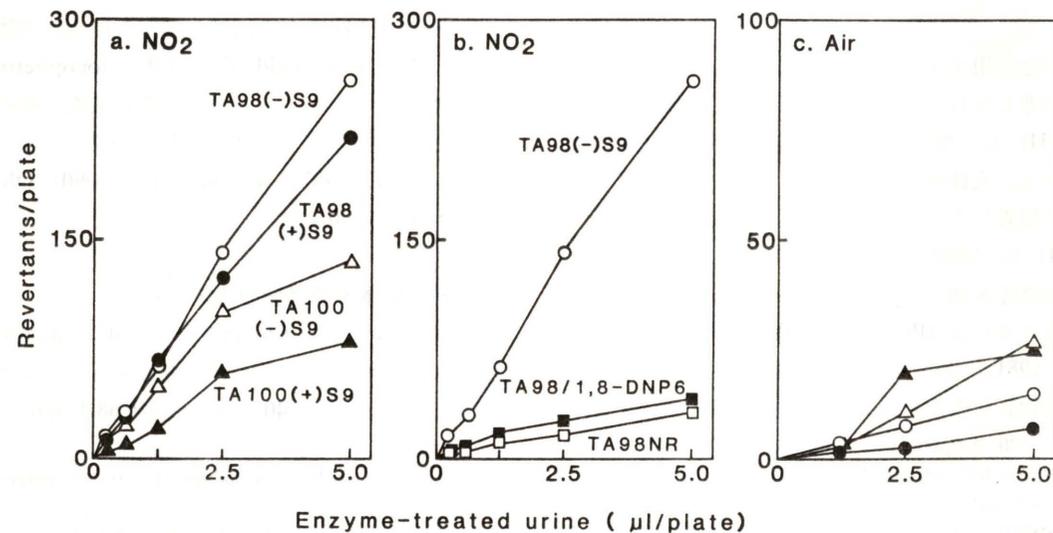


Fig. 1. 二酸化窒素暴露・pyrene 投与マウス尿の変異原性。

a, b は二酸化窒素を暴露して pyrene を投与したマウス尿の変異原性, c は二酸化窒素を暴露せずに空気中で pyrene を投与したマウス尿の変異原性を示し、記号は a と同じである。

が存在していることが示唆された。また、nitroreductase (-) 株である TA98NR 株に対しては (-) S9 で変異原性が著明に減少しているため、尿試料中にニトロ化合物が存在していることが推定された (Fig. 1b)。二酸化窒素を暴露せずに、pyrene 投与だけのマウスの尿の変異原性は非常に弱かった (Fig. 1c)。

pyrene を投与し、二酸化窒素を暴露しない対照群の尿を  $\beta$ -glucuronidase 処理後に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で調べたところ、弱変異原性の 1-hydroxypyrene が検出された (Kanoh *et al.*, 1987)。二酸化窒素を暴露したときには 1-hydroxypyrene の他に、(+ S9 で強い変異原性を示す 1-nitro-6-hydroxypyrene と直接変異原の 1-nitro-8-hydroxypyrene とが混合した画分として検出され、更に、直接変異原の 1-nitro-3-hydroxypyrene が検出され、確かにニトロ化合物が生体内で生成して抱合体として尿中に排泄されていることが明らかになった (Kanoh *et al.*, 1987)。

### 5. 複合作用によって生成される化合物の量

二酸化窒素暴露・pyrene 投与マウスの尿中の代謝産物を分析することによって、生成物が投与した pyrene の何%に相当するのかを計算した。生成物は HPLC で分画し、UV 吸収 (240 nm) と変異原性を測定した。各々の代謝産物の量はその吸光係数が一部不明であるため、変異原性から推定した。このときの実験では、二酸化窒素の前暴露は 48 時間で、pyrene 投与量は 800 mg/kg であった (Kanoh *et al.*, 1987)。マウス 12 匹の 24 時間尿 15 ml の抽出 10 倍濃縮液 1.5 ml の内 0.08 ml を HPLC で分画した。二酸化窒素暴露が直接影響していない 1-hydroxypyrene 画分の His<sup>+</sup> 復帰変異集落数は、TA98 株 (-) S9 で 148, (+) S9 で 61 His<sup>+</sup>/plate であった。標準 1-hydroxypyrene の変異原性は、TA98 株 (-), (+) S9 でそれぞれ 16, 1.3 His<sup>+</sup>/nmol であった。従って、マウス 1 匹当りの 24 時間尿中に排泄された 1-hydroxypyrene 量は、(-) S9 で計算すると

$$148/16 \times 15/12 \times 1/0.08 = 14.5 \text{ nmol}$$

(+) S9 で計算すると

$$61/1.3 \times 15/12 \times 1/0.08 = 73.3 \text{ nmol}$$

になった。マウス 1 匹当りの pyrene 投与量は 0.1109 mmol であったので、(-), (+) S9 の変異原性から計算した pyrene から 1-hydroxypyrene に変換した量は、投与量のそれぞれ 0.013%, 0.066% であった。

次に、1-nitro-6-hydroxypyrene と 1-nitro-8-hydroxypyrene とは HPLC で同じ画分に来たが、この画分の変異原性は (-), (+) S9 でそれぞれ 855, 4371 His<sup>+</sup>/plate であった。この画分すべてが 1-nitro-6-hydroxypyrene だと仮定し、Ball *et al.* (1984) の変異原性試験結果によると TA98 株 (-), (+) S9 で 22, 87 His<sup>+</sup>/nmol であるので、同様に計算すると、pyrene から 1-nitro-6/8-hydroxypyrene に変換した量は、投与量の 0.055, 0.71% であった。この画分すべてが 1-nitro-8-hydroxypyrene と仮定すると、1-nitro-8-hydroxypyrene の変異原性は (-), (+) S9 で 31, 19 His<sup>+</sup>/nmol であるので、0.039, 0.32% であった。また、1-nitro-6-pyrenol と 8-pyrenol との混合比が 1:1 のときの変異原性は (-), (+) S9 で 11, 72 His<sup>+</sup>/nmol であるので、0.110, 0.086% であった。Manabe *et al.* (1985) によると 1-nitro-6/8-hydroxypyrene の変異原性は TA98 株 (-), (+) S9 で 96.4, 46.9 His<sup>+</sup>/nmol であるので、0.012, 0.13% であった。

1-nitro-3-hydroxypyrene の変異原性は、TA98 株 (-), (+) S9 でそれぞれ Ball *et al.* (1984) によると 112, 36 His<sup>+</sup>/nmol であり、Manabe *et al.* (1985) によると 992, 11.8 His<sup>+</sup>/nmol であるので、変換率は Ball *et al.* によると 0.013, 0.017%, Manabe *et al.* によると 0.002, 0.051% であった。

従って、以上 3 種のニトロ体の全生成率は最低 0.014, 最高 0.37% になった。また、水酸化体への変換率は 0.027-0.44% であった。

### 6. 二酸化窒素暴露・PAH 投与マウス尿の変異原性

5 種類の PAH をそれぞれ腹腔内に投与したマウスの酵素処理尿の変異原性をマウス体重 100 g

Table 1. 二酸化窒素暴露・各種 PAH 投与マウス尿の変異原性

Arene	暴露ガス	His <sup>+</sup> /プレート/1時間尿/体重 100 g			
		TA 98		TA 100	
		(-) S9	(+) S9	(-) S9	(+) S9
None	空 気	40	0	116	76
	NO <sub>2</sub>	0	40	76	76
Pyrene	空 気	104	40	144	260
	NO <sub>2</sub>	1,840	1,620	1,330	812
Fluoranthene	空 気	121	72	0	124
	NO <sub>2</sub>	1,790	1,020	3,450	1,480
Fluorene	空 気	32	64	96	0
	NO <sub>2</sub>	684	244	324	600
Anthracene	空 気	12	44	0	44
	NO <sub>2</sub>	492	448	180	212
Chrysene	空 気	12	0	0	28
	NO <sub>2</sub>	680	292	160	372

当り、1時間尿当りで Table 1 に示した。pyrene 投与のときと同じように、fluoranthene 投与でも空気暴露では弱く、二酸化窒素暴露で強い変異原性がある化合物が生体内で生じていることがわかった。fluorene, anthracene または chrysene をそれぞれ投与して、二酸化窒素を暴露した場合にも、pyrene や fluoranthene を投与したときよりは弱いが、変異原性を示した。pyrene 投与以外のときも、TA98NR 株 (-) S9 で変異原性が減少したので、これらの場合にもニトロ化合物が生成しているものと考えられた。勿論、PAH を投与せずに、二酸化窒素暴露だけでは尿の変異原性が特に上昇することはない。

#### 7. 二酸化窒素暴露・PAH 混合液投与マウス尿の変異原性

上記 5 種類の PAH をそれぞれ単独投与のときの 1/5 量、つまり体重 kg 当り 80 mg を混合してマウス腹腔内に投与し、二酸化窒素を暴露したときの尿の変異原性は、単独投与のときの復帰変異集落数の 1/5 を加えた値よりも、TA98 株 (-), (+) S9 および TA100 株 (-), (+) S9 でそれぞれ 1.30, 1.48, 1.42, 1.67 倍の値を示し、統計学的に有為に増加し、相乗効果が観察された。

#### 8. ハムスター、ラット、モルモットの尿の変異原性

マウス以外の動物に pyrene または fluoranthene を投与して二酸化窒素を暴露したときの尿の変異原性を Table 2 に示した。ハムスターではマウスの尿よりむしろ強い変異原性であった。ラットとモルモットでは弱いが、明らかに二酸化窒素を暴露しないときより高い変異原性を示した。また、nitroreductase (-) の TA98NR 株に対して低い変異原性を示したので、4 種すべての動物で PAH が二酸化窒素暴露によってニトロ化することが推定された。

たばこの煙 (主流煙) 中の二酸化窒素濃度は 2 で述べたように 80-120 ppm であるが、一酸化窒素も一緒に測定すると 170-240 ppm であり、このような主流煙を吸入すると、呼気中には両酸化窒素の 4.4-12.8% しか排出されず、87-96% は呼吸器で吸収されている (Bokhoven and Nissen, 1961)。従って、空气中に一定濃度で存在する二酸化窒素の吸収の程度は呼吸量に比例することになる。Table 2 の変異原性が生体内に吸収された二酸化窒素による PAH のニトロ化のためだとすると、ニトロ化の程度は呼吸量に比例することになる。ハムスターの呼吸量は明らかでないが、体重 g 当り、単時間当りの呼吸量はマウスが最も大であり、(1.210 ml/g/min)、ラット、モルモットの順で呼吸量が小となり (松岡理, 1980)、

Table 2. 二酸化窒素暴露・pyrene または fluoranthene 投与各種動物尿の変異原性

動物種と投与化学物質	暴露ガス	His <sup>+</sup> /プレート/1時間尿/体重 100 g				
		TA 98		TA 100		
		(-) S9	(+) S9	(-) S9	(+) S9	
マウス	None	空 気	0	13	0	27
		NO <sub>2</sub>	0	17	17	67
	Pyrene	空 気	18	123	0	18
		NO <sub>2</sub>	1,600	1,280	777	377
	Fluoranthene	空 気	53	53	0	63
		NO <sub>2</sub>	1,250	830	1,680	890
ハムスター	None	空 気	0	0	0	24
		NO <sub>2</sub>	17	34	0	17
	Pyrene	空 気	21	74	0	63
		NO <sub>2</sub>	1,780	1,530	1,080	536
	Fluoranthene	空 気	191	127	0	150
		NO <sub>2</sub>	3,200	1,780	7,720	4,390
ラット	None	空 気	0	0	0	0
		NO <sub>2</sub>	0	0	0	0
	Pyrene	空 気	0	96	0	143
		NO <sub>2</sub>	176	176	316	328
	Fluoranthene	空 気	81	142	0	81
		NO <sub>2</sub>	565	367	871	443
モルモット	None	空 気	0	6	0	6
		NO <sub>2</sub>	0	12	0	12
	Pyrene	空 気	101	22	0	34
		NO <sub>2</sub>	187	158	216	158
	Fluoranthene	空 気	93	82	21	103
		NO <sub>2</sub>	348	300	683	311

Table 2 の結果と矛盾しない。ヒトの呼吸量はマウスの約 1/10 であり、モルモットの約 3/5 であるといわれている (松岡理, 1980) ので、ヒトの場合も生体内に基質が存在すれば二酸化窒素暴露によってニトロ化が起こるものと考えられる。

#### 9. 二酸化窒素暴露・低濃度 pyrene 投与マウス尿の変異原性

マウスで暴露二酸化窒素濃度を 20 ppm から 10 ppm と 5 ppm に減少し、投与する pyrene 量を体重 kg 当り 200, 100, 50, 25, 10 mg に減少したときの尿の変異原性を調べたところ、TA98 株 (-), (+) S9 の変異原性が pyrene 量増加に比例して直線的に増加した。また、二酸化窒素が 10 ppm のときは 5 ppm のときの約 2 倍の変異

原性を示した (Kanoh *et al.*, 1990)。2 で述べた都市ガスによる部屋の二酸化窒素濃度は 0.263 ppm であるので 5 ppm は 19 倍の濃度であり、低濃度の二酸化窒素、低濃度の PAH でもニトロ化反応が起こる可能性が考えられる。

#### 10. vitamin 同時経口投与による変異原性の抑制

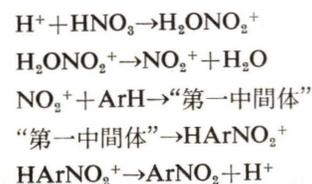
二酸化窒素は酸化性が強い物質であるので、二酸化窒素暴露中に抗酸化剤である L-ascorbic acid または DL- $\alpha$ -tocopherol を PAH 投与直前にマウス胃内に投与して尿試料の変異原性を調べた。Table 3 に示したように、L-ascorbic acid 投与では尿の変異原性が 64.6-71.7%, 約 70% 減少した。また、 $\alpha$ -tocopherol では 26.4-51.3% 減少した。

Table 3. vitamin 経口投与による二酸化窒素暴露・pyrene 投与マウス尿の変異原性の抑制

経口投与 vitamin	His <sup>+</sup> /1時間尿/体重 100 g			
	TA 98		TA 100	
	(-) S9	(+) S9	(-) S9	(+) S9
None	2,010	1,790	1,150	656
L-ascorbic acid	711	576	326	196
DL- $\alpha$ -tocopherol	1,480	940	560	470

## 11. おわりに

二酸化窒素暴露と同時に pyrene をマウスに投与したときに尿中に排泄された代謝産物が、nitrohydroxypyrenes および hydroxypyrene のグルクロン酸抱合体または硫酸抱合体であった。これらの nitrohydroxypyrenes が生体内で生成するときに、ニトロ化が先に起こるのか、水酸化が先に起こるのかが問題となる。1-nitropyrene (1-NP) をラットに経口投与したとき、尿中には投与後 12 時間では 1-acetylamino-6-hydroxypyrene と 1-acetylamino-8-hydroxypyrene のグルクロン酸抱合体が主として検出される (Kinouchi *et al.*, 1986)。また、二酸化窒素暴露と同時に 1-hydroxypyrene をマウスに投与したときの尿中代謝産物は、二酸化窒素暴露と同時に pyrene を投与したときとほぼ同じ結果であった (Kanoh *et al.*, 1990)。これらの結果から、生体内では水酸化が先に起こって、その後にニトロ化が起こったものと推定している。ニトロ化の機構としては、



というように、まず nitronium ion  $\text{NO}_2^+$  が生じ、それが基質である arene と反応して nitroarenium ion 中間体  $\text{HArNO}_2^+$  が生じ、さらに、nitroarene  $\text{ArNO}_2$  が生じると考えられる (Olah *et al.*, 1981) が、強酸が存在しているわけではないので生体内でも同様の反応が進むかどうかはわからない。マウスに二酸化窒素を暴露すると、血液や尿中の  $\text{NO}_2^-$  イオンは検出できなかったが、

血中の  $\text{NO}_3^-$  イオンは  $6.4 \mu\text{g/ml}$  から  $19.5 \mu\text{g/ml}$  に増加し、尿中の  $\text{NO}_3^-$  は  $47 \mu\text{g/ml}$  から  $515 \mu\text{g/ml}$  に増加した (Kanoh *et al.*, 1987)。従って、これらのイオンが、 $\text{NO}_2^+$  によるニトロ化に関与しているものと考えられる。

二酸化窒素暴露によって生体内でニトロ化反応が起こることを述べたが、生体内で morpholine や dimethylamine のニトロ化が起こることについては既に報告されている (Iqbal *et al.*, 1980, 1981)。

以上、PAH から mononitro 体の生成について述べたが、mononitro PAH を投与して二酸化窒素を暴露したときに、発がん性が非常に強い dinitro PAH が生体内で生成されるかどうかについて興味があり、現在実験中である。しかし、水酸化反応が先に起こるので、dinitro 体はできにくいのではないかと推定している。また、benzo-[a] pyrene のような発がん剤を投与して、二酸化窒素を暴露したときにどのように修飾されるのかについても実験中である。

## 12. 謝辞

ここに述べた筆者等の研究の一部は、厚生省がん研究助成金、文部省科学研究費補助金、日米医学協力研究会研究費の援助を受けた。

## 参考文献

- Ball, L. M., M. J. Kohan, L. D. Claxton and J. Lewtas (1984) Mutagenicity of derivatives and metabolites of 1-nitropyrene: activation by rat liver S9 and bacterial enzymes, *Mutation Res.*, **138**, 113-125.
- Bokhoven, C. and H. J. Niessen (1961) Amounts of oxides of nitrogen and carbon monoxide in cigarette smoke, with and without inhalation, *Nature*, **192**, 458-459.
- Iqbal, Z. M., K. Dahl and S. S. Epstein (1980) Role of nitrogen dioxide in the biosynthesis of nitrosamines in mice, *Science*, **207**, 1475-1477.
- Iqbal, Z. M., K. Dahl and S. S. Epstein (1980) Biosynthesis of dimethylnitrosamine in dimethylamine-treated mice after exposure to nitrogen dioxide, *J. Natl. Cancer Inst.*, **67**, 137-141.
- Kanoh, T., M. Fukuda, E. Hayami, T. Kinouchi, K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Nitro reaction in mice injected with pyrene during exposure to nitrogen dioxide, *Mutation Res.*, **245**, 1-4.

- Kanoh, T., M. Fukuda, I. Mizoguchi, T. Kinouchi, K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1987) Detection of mutagenic compounds in the urine of mice administered pyrene during exposure to  $\text{NO}_2$ , *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 1057-1062.
- Kinouchi, T., H. Tsutsui and Y. Ohnishi (1986) Detection of 1-nitropyrene in yakitori (grilled chicken), *Mutation Res.*, **171**, 105-113.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji, H. Tsutsui, S. L. Hoare and Y. Ohnishi (1988) Mutagenicity and nitropyrene concentration of indoor air particulates exhausted from a kerosene heater, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 32-41.
- 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.
- Manabe, Y., T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1985) Identification and quantification of highly mutagenic nitroacetoxypyrenes and nitrohydroxypyrenes in diesel-exhaust particles, *Mutation Res.*, **158**, 3-18.
- 松岡 理 (1980) 実験動物からヒトへの外挿——考察

- と資料——, ソフトサイエンス社, 東京, p. 59.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, K. Miyahashi, T. Kanoh and M. Fukuda (1990) Metabolism of 1-nitropyrene oxides and effect of nitrogen dioxide on arene activation, In: P. C. Howard, S. S. Hecht and F. A. Beland (Eds.), *Nitroarenes: Occurrence, Metabolism, and Biological Impact*, Plenum Press, New York, pp. 85-93.
- Pitts Jr., J. N., K. A. van Cauwenberghe, D. Grosjean, J. P. Schmid, D. R. Fritz, W. L. Belser Jr., G. B. Knudson and P. M. Hynds (1978) Atmospheric reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons; facile formation of mutagenic nitro derivatives, *Science*, **202**, 5155-519.
- Takenaka, S., H. Horiuchi and F. Shimizu (1979) Hypersensitivity of Golden hamster to short-term nitrogen dioxide exposure, *Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.*, **8**, 7-25.
- Tokiwa, H., R. Nakagawa, K. Morita and Y. Ohnishi (1981) Mutagenicity of nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide, *Mutation Res.*, **85**, 195-205.

## 環境化学物質の複合作用による活性酸素生成と DNA 損傷: 重金属化合物の役割

京都大学医学部 公衆衛生学教室 川西正祐, 山本互二,  
井上純子, 伊藤貴美子

### 1. はじめに

これまで, DNA の損傷に起因する遺伝毒性は主に単一の化学物質について研究されてきたが, 化学物質の複合作用による遺伝毒性はこれからの重要な研究課題である。我々は化学物質の複合作用の中でも, 特に重金属が関与するものに注目している。DNA はそのリン酸や塩基で重金属イオンを配位することができ, 細胞の核は生理的に鉄や銅などの重金属イオンを含んでいる。また重金属の暴露があったときには特に核に蓄積しうる (Sissoef *et al.*, 1976)。そのため単独では遺伝毒性の認められない環境化学物質と重金属が複合作用によってはじめて遺伝毒性を示す可能性もある。重金属と他の化学物質との複合作用による DNA 損傷について, (1) 両者ともに環境からの暴露による場合, (2) 環境からの暴露に由来する重金属と, 生体の細胞内で生理的に存在する内因性の化学物質との複合作用による場合, (3) 細胞内の重金属と, 外因性の化学物質との複合作用による場合の3つが考えられる。発がんの過程において細胞内の重金属が外因性の化学物質を活性化するとすれば, 発がん物質の非酵素的活性化機構として捉えることもできる。有機発がん物質は多くの場合, 薬物代謝酵素によって活性化されるが, 重金属による非酵素的活性化機構が存在するとすれば非常に興味深い。

このような視点から化学物質の複合作用による遺伝毒性について, いくつかの異なった手法を組み合わせることで検討した。

### 2. 実験方法とその原理

#### (1) 単離 DNA の損傷

単離した DNA 分子を用いて, 化学物質による DNA 損傷を検出し, その塩基特異性を詳細に検討した [Fig. 1]。DNA としては, ヒトがん原遺伝子の c-Ha-ras-1 の突然変異を起こす部分 (第 12 コドン) を含むフラグメント等をサブクロニングした。次に  $^{32}\text{P}$  でこの DNA をラベルした。これにより DNA 試料として, 二本鎖で両端のうち一方の端だけがラベルされたものが 4 種類 (97, 261, 337, 341 base pair) 得られた (Yamamoto *et al.*, 1989)。次に, この DNA 試料を重金属化合物などの複数の化学物質と反応させた。その反応液から DNA を回収し電気泳動にかけ, DNA が切断されて短くなっているかどうかを調べた。電気泳動の前に特別な処理を行わない場合, その DNA 切断は DNA のバックボーンである糖リン酸エステルの損傷を表す。また, 電気泳動の前に, 1 M のピペリジン溶液中で 20 分間, 90°C に加熱した場合, 塩基が損傷された部位においても, その処理により DNA 切断が生じ, 電気泳動にて検出が可能となる。これは

〒606 京都市左京区吉田近衛町

Oxygen radicals and DNA damage induced by interaction of environmental chemicals: The role of metal compounds

Shosuke Kawanishi, Koji Yamamoto, Sumiko Inoue and Kimiko Ito

Department of Public Health, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

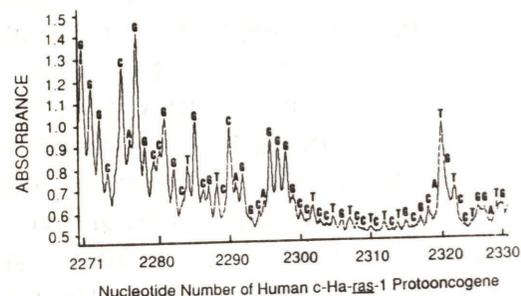
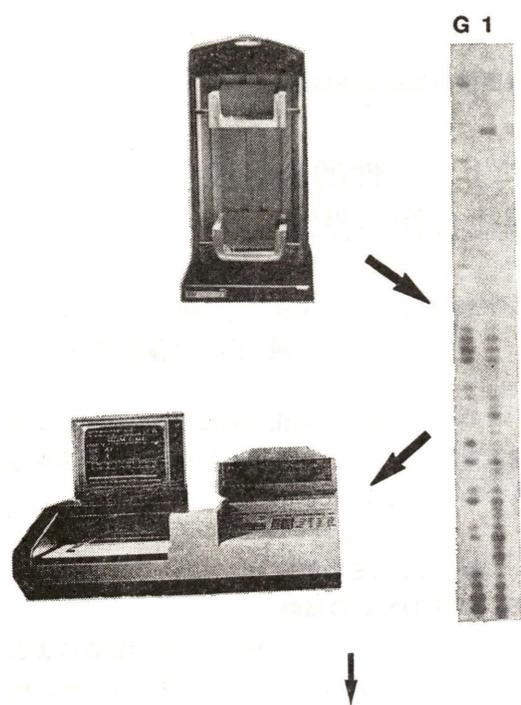


Fig. 1. 化学物質による単離 DNA の損傷の検出と塩基特異性の解析法。  
グラフは銅 (II) と 2,5-ジヒドロキシピフェニルによる <sup>32</sup>P-DNA の損傷を示す。図の左が 5' 側。

DNA の配列決定法である Maxam-Gilbert 法の応用である。電気泳動後のゲルのオートラジオグラムには、各塩基での損傷を示すバンドが得られ、それをレーザーデンストメーターでスキャンすることにより、化学物質と DNA との反応の強さと特異性が解析できる。

### (2) 培養細胞での DNA 損傷

単離した DNA で明らかにした化学物質による DNA 損傷が細胞内においてどの程度起こるかをパルスフィールドゲル電気泳動法により解析した。パルスフィールドゲル電気泳動法は最近開発

されたもので、従来の電気泳動法では分離できなかった 0.1~5 Mb (10<sup>6</sup> 塩基対) 程度の巨大 DNA 分子の分離に適している。ヒト染色体 DNA は 50 Mb 以上であるが、化学物質によって二本鎖 DNA 切断が生じると数 Mb 程度の巨大 DNA 断片がパルスフィールドゲル電気泳動法により検出できる。細胞はヒト培養細胞 (Raji 細胞) を使い、化学物質と一定時間 incubation したのち、低融点アガロースゲルに包埋する。このアガロースプラグを proteinase K, 界面活性剤を含む緩衝液中で処理し、細胞の融解および消化を行ったあとパルスフィールドゲル電気泳動 (CHEF-DR11, Bio-Rad, 200 V, パルスタイム 60 sec. 15 hr, 90 sec. 10 hr) を行い、エチジウムブロマイド染色により、DNA 二本鎖切断を検出した。

### (3) 電子スピン共鳴法

DNA 損傷を起こす活性種が何であるかについて、電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance; ESR) で検討した。ESR とは、ラジカル (不対電子を持つ分子) に磁場をかけ電子スピンのエネルギー準位を二つに分裂させ、その差に相当するマイクロ波の吸収を検出する方法である。酸素ラジ

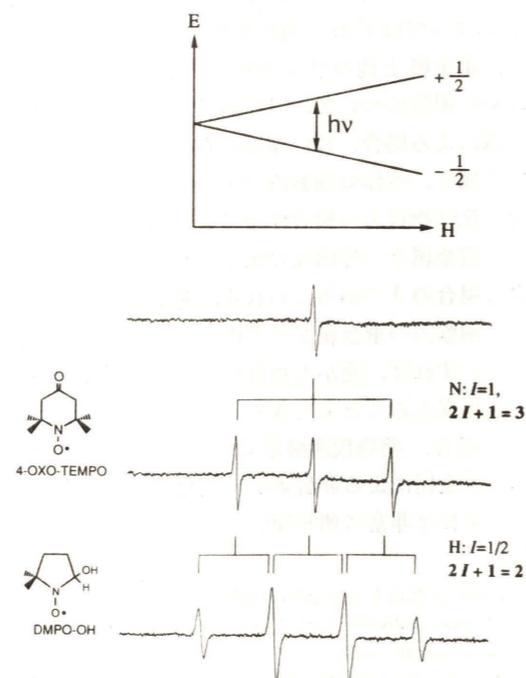


Fig. 2. 電子スピン共鳴法 (ESR) によるラジカルの検出。

カル等を検出するために、各種のスピントラップ剤 (DMPO (5, 5-dimethylpyrroline-N-oxide), POBN( $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron)) を用いて検討した [Fig. 2]。一重項酸素の生成も 2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-piperidone と反応して生成する安定なニトロオキシドラジカル (2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-piperidone-N-oxyl; 4-oxo-TEMPO) を検出する方法で測定した (Moan and Wold, 1979; Lion *et al.*, 1976; Kawanishi *et al.*, 1986a)。4-oxo-TEMPO では不対電子によるシグナルは核スピンの窒素原子により 3 つに分裂する。DMPO の OH ラジカル付加体である DMPO-OH ではシグナルが窒素原子により 3 つに分裂し、さらに核スピンの 1/2 の水素原子により各々が 2 つに分裂する結果、1:2:2:1 のスペクトルを与える。

以下にそれぞれの化合物について、研究結果を詳述する。

### 3. 発がん性重金属と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の複合作用による DNA 損傷

ここではまず発がん性重金属と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の複合作用による DNA 損傷をとりあげる [Fig. 3]。発がん性重金属化合物は単独では単離した DNA を損

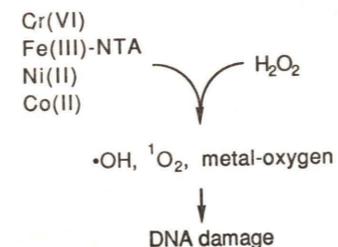


Fig. 3. 発がん性重金属化合物による DNA 損傷の分子機構に関する仮説。

Table 1. 発がん性重金属化合物と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との複合作用による活性酸素の生成と DNA 損傷の塩基特異性

Carcinogenic metal	Cr(VI)	Fe(III)-NTA	Ni(II)	Co(II)
Active species formed	·OH, <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	·OH	[Ni-O] <sup>2+</sup>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> , [Co-O] <sup>2+</sup>
Site specificity of DNA damage	G>T~C~A	G~T~C~A	C~T~G>A	G>T~C>A
Reference	a	b	c	d

- (a) Kawanishi *et al.*, 1986.  
 (b) Inoue and Kawanishi, 1987.  
 (c) Inoue and Kawanishi, 1989; Kawanishi *et al.*, 1989.  
 (d) Yamamoto *et al.*, 1989.

傷しないが、動物や培養細胞に投与すると DNA 損傷をもたらすことが報告されている (Sharma and Tlukder, 1987)。発がん性重金属は環境からの暴露によるものを想定しているが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> についてはクロフィブレイトのようにペルオキシジムの増殖を介して細胞内の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を上昇させる化学物質の暴露によるものと生理的に細胞内に存在するものの両者を想定している。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> そのものは核内での生成も示唆されており (Peskin and Shlyahova, 1986)、プロモーターまたは弱い発がん物質とされている (Zimmerman and Cerutti, 1984)。我々はこれまでの研究で発がん性重金属の 6 価クロム、ニトリロ三酢酸鉄 (III) キレート (Fe(III)-NTA)、ニッケル (II)、およびコバルト (II) がそれぞれ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との複合作用により酸素ラジカルや一重項酸素を生じ DNA 損傷をもたらすことを明らかにした [Table 1]。6 価クロムの場合は OH ラジカルと一重項酸素 (励起状態の酸素分子) が、Fe(III)-NTA では OH ラジカルが、ニッケル (II) では金属酸素錯体 (クリプト OH ラジカル) が、コバルト (II) では一重項酸素が、それぞれ生じ、DNA 損傷に関与することが示された。我々が *in vitro* の実験により提唱した金属発がんの活性酸素説 (Kawanishi *et al.*, 1986a, 1989b) は、*in vivo* でも実証されつつある (Snyder, 1988; Sugiyama *et al.*, 1987; Umemura *et al.*, 1990; Kasprzak *et al.*, 1990)。

### (1) 6 価クロム化合物

6 価クロム化合物の発がん性は疫学と動物実験で認められている。Ames テストは S-9 (薬物代謝酵素) の添加なしで陽性である。3 価クロム化合物は発がん性も変異原性も認められていない (Bianchi *et al.*, 1983)。クロム化合物による DNA

損傷を検討したところ、6価クロム ( $\text{Na}_2\text{Cr}^{\text{VI}}\text{O}_4$ ) と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の共存下で、単離 DNA の切断が起こった。リン酸エステルの切断に加えて塩基の損傷も起こったことが示唆された。3価クロム ( $\text{CrCl}_3$ ) では DNA 損傷は認められなかった。Maxam-Gilbert 法を併用し DNA の損傷の塩基特異性を検討した結果、いずれの塩基においても切断が認められるが、特にグアニン残基における切断がやや顕著であった。

DNA 損傷のメカニズムを解明するため、ESR で反応中に生成する活性酸素を測定したところ、6価クロムと  $\text{H}_2\text{O}_2$  の反応中に OH ラジカルの付加体 (DMPO-OH, POBN-OH) が生じた。OH ラジカルスカベンジャーであるマニトール、ギ酸及び安息香酸は DMPO-OH の生成を阻害した。以上から6価クロムと  $\text{H}_2\text{O}_2$  の反応中に OH ラジカルが生成し、その OH ラジカルが DNA の塩基および糖リン酸エステルを攻撃するものと考えられる (Kawanishi *et al.*, 1986a)。

一重項酸素の生成も ESR で検出され、それは GMP や dGMP の添加で著しく抑制された。これらのことから、6価のクロムと  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応中に OH ラジカルに加えて、一重項酸素が生成し、グアニン残基を特異的に攻撃すると考えられる。これはグアニンでの切断が顕著であることに一致する。

このように6価クロムは  $\text{H}_2\text{O}_2$  の存在下、OH ラジカル、一重項酸素を生成させ、DNA 鎖の切断と塩基の損傷をもたらすことが示された (Kawanishi *et al.*, 1986a)。最近、Wetterhahn らは追試で我々と同様の結果を得ると共に、グルタチオンの働きにも注目している (Aiyar *et al.*, 1990)。

## (2) ニトリロ三酢酸鉄(III)キレート

ニトリロ三酢酸鉄キレート ( $\text{Fe(III)-NTA}$ ) は発がん性 (Ebina *et al.*, 1986) が報告されている。 $\text{Fe(III)-NTA}$  の単離 DNA に対する化学反応性を検討したところ、 $\text{Fe(III)-NTA}$  は  $\text{H}_2\text{O}_2$  の存在下で DNA を強く損傷した。他のアミノポリカルボン酸の鉄キレートでは DNA の切断は認められなかった。DNA 損傷の塩基特異性については、各塩基がほとんど一律に切断された。ESR により  $\text{Fe(III)-NTA}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  からの OH ラジ

カルの生成が明らかになり、この OH ラジカルが DNA を損傷すると考えられる。(Inoue and Kawanishi, 1987)。他のアミノポリカルボン酸のうち  $\text{Fe(III)-HEDTA}$  は  $\text{Fe(III)-NTA}$  と同程度の OH ラジカルを生成させるが、DNA 損傷をもたらさない。OH ラジカルは活性が高く、生成した位置よりたかだか数十オングストローム以内の分子としか反応できないため、立体構造上 DNA の極く近傍で OH ラジカルを生成しうる  $\text{Fe(III)-NTA}$  のみが DNA 損傷をもたらすものと推定される。

## (3) ニッケル化合物

ニッケル化合物は発がん性が疫学と動物実験で認められている (Sunderman, 1981)。また、動物実験や培養細胞で DNA 損傷 (Ciccarelle and Wetterhahn, 1982; Robison and Costa, 1982) や脂質過酸化をもたらす (Athar *et al.*, 1987) という報告もある。これらの毒性には活性酸素が関与している可能性があるが、これまでニッケル化合物による活性酸素の生成は報告されていなかった。そこである種のニッケル錯体を用いてその可能性を検討した。

ESR で検討したところ、 $\text{Ni(II)-オリゴペプチド錯体}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応中に DMPO-OH や POBN-OH が生じた。OH ラジカルスカベンジャーの効果の解析から、 $[\text{Ni-O}]^{2+}$  のような金属-酸素錯体がクリプト OH ラジカルとして挙動している可能性がある。クリプト OH ラジカルは結合型の活性酸素と考えられ、OH ラジカルスカベンジャーによる阻害が弱いことに基づいている (Youngman and Elstner, 1981)。 $\text{Ni(II)}$  に配位させたオリゴペプチドのうち、OH ラジカル付加物の生成能は tetraglycine > pentaglycine > triglycine の順で、diglycine は生成能がほとんどなかった。 $\text{Ni(II)GlyGlyHis}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応では、クリプト OH ラジカル以外にスーパーオキシドや一重項酸素も生成した (Inoue and Kawanishi, 1989)。

$\text{Ni(II)}$  イオンと単離 DNA との反応性についても検討した。 $\text{Ni(II)}$  は  $\text{H}_2\text{O}_2$  の存在下で DNA 損傷をもたらした。一重項酸素スカベンジャーのうちアジドイオンにより DNA 損傷は阻害され

たが、DABCO によっては阻害されなかった。OH ラジカルスカベンジャーであるエタノールやマニトールは阻害しなかった。DNA 損傷の塩基特異性についてはシトシン、チミン、グアニンでの切断が強かった。以上から、 $\text{Ni(II)}$  は DNA と結合し  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応により DNA 損傷をもたらすと推定される。DNA 損傷をおこす活性物質はフリー OH ラジカルや一重項酸素ではなく、 $\text{Ni-酸素錯体}$  である可能性がある (Inoue and Kawanishi, 1989; Kawanishi *et al.*, 1989d)。ヒト培養細胞を硫化ニッケル  $\text{NiS}$  で処理し、パルスフィールドゲル電気泳動で分析した結果、二本鎖 DNA 切断によると見られる巨大 DNA 断片が認められた。

## (4) コバルト

コバルトは動物実験で発がん性が知られており、培養細胞においても DNA 損傷をもたらすことが報告されている (Robison *et al.*, 1982)。

コバルト化合物と単離 DNA との反応性を検討したところ、 $\text{Co(II)}$  は  $\text{H}_2\text{O}_2$  の存在下で DNA を強く損傷した。これは一重項酸素スカベンジャーにより阻害されたが、OH ラジカルスカベンジャーによっては阻害されなかった。また、DNA 損傷の塩基特異性についてはグアニン残基がやや強く損傷された。これらの結果は DNA 損傷における一重項酸素の関与を示す。

ESR で、DMPO を用いて検討したところ、 $\text{Co(II)}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応中に DMPO-OH が生じた。 $\text{Co(II)}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  とが反応して OH ラジカルを生成すると推定されるが、OH ラジカルスカベンジャーの効果は明確には認められないことから、 $[\text{Co-O}]^{2+}$  のような金属-酸素錯体がクリプト OH ラジカルとして挙動すると考えられる。 $\text{Co(II)}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の存在下で 2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-piperidone からニトロオキシドラジカルが生成するが、それを一重項酸素スカベンジャーが阻害した。以上から、 $\text{Co(II)}$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の反応でクリプト OH ラジカルと一重項酸素が生成するが、特に一重項酸素が DNA 損傷をもたらすうえで重要であると考えられる (Yamamoto *et al.*, 1989)。化学発光を検出する系で、重水中での発光の増強が見られた (Kawanishi *et al.*, unpublished

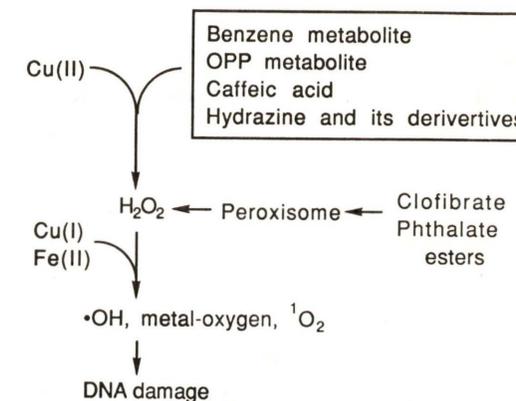


Fig. 4. 重金属イオンの発がん物質活性化における役割。

data)。これは一重項酸素の生成を支持する。コバルトは  $\text{H}_2\text{O}_2$  以外にも、亜硫酸イオン ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) との相互作用によっても DNA 損傷をもたらす。この反応の活性種は硫酸ラジカル ( $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ) であることが判明した (Kawanishi *et al.*, 1989c)。

## 4. 重金属と発がん物質の複合作用による DNA 損傷: $\text{H}_2\text{O}_2$ の関与

次に、必ずしも発がん性が明らかではない重金属と発がん物質との複合作用による DNA 損傷をとりあげる [Fig. 4]。我々はこれまでの研究で、ベンゼン代謝物 (Kawanishi *et al.*, 1989a)、オルトフェニルフェノール代謝物 (Inoue *et al.*, 1990)、カフェー酸 (Inoue *et al.*, unpublished data)、ヒドラジン (Yamamoto and Kawanishi, 1991a)、メチルヒドラジン (Kawanishi and Yamamoto 1991)、ヒドラジン (Yamamoto and Kawanishi, 1991b) がそれぞれ銅や他の金属との複合作用により DNA 損傷をもたらすことを明らかにした。特にこれらの発がん物質と銅の複合作用による DNA 損傷については、その反応において  $\text{H}_2\text{O}_2$  が生成し、さらにそれが銅と反応して DNA 損傷をもたらすことが示された [Fig. 4]。このことから、これらの発がん物質が生体内において  $\text{H}_2\text{O}_2$  の生成という共通の経路を介して相対的に作用する可能性が示唆される。

細胞内での  $\text{H}_2\text{O}_2$  の活性化には鉄イオンの関与が考えられているが、我々の単離 DNA での実験結果は鉄イオンの関与を否定はしないが、銅イ

オンの関与を示唆するものである。銅と  $H_2O_2$  の反応による DNA 損傷のメカニズムについては特に詳しくとりあげる (Yamamoto and Kawanishi, 1989)。この場合、生成する活性種は OH ラジカルではなく、銅過酸化物または銅酸素錯体であることが示唆された。

#### (1) 銅化合物

銅は細胞内において核にも含まれており、機能的にもクロマチンの構造に関係している。銅については未だ発がん性の証拠がないが、肝炎および肝癌の自然発生がみられる LEC ラットでは、その肝臓に銅が高濃度に蓄積していることが判明した。この肝癌の発生には銅が関与している可能性がある。また以下の項目で述べる各種の発がん物質はいずれも銅(II)の存在下で DNA を損傷し、それらすべての場合で  $H_2O_2$  の生成が DNA 損傷のため必要である。そこでまず、銅と  $H_2O_2$  による DNA 損傷を検討した。銅(II)と  $H_2O_2$  の両者と DNA を反応させると、チミンおよびグアニンがすくよくよ損傷された。この DNA 損傷は一重項酸素スカベンジャーにより抑制されたが、OH ラジカルスカベンジャーによっては抑制されなかった。これは生成している活性種がフリー OH ラジカルではないことを示唆する結果である。各種のアルコールによる DNA 損傷の抑制を検討したところ、エタノールなどより相対的にフリー OH ラジカルと反応しにくい三級ブチルアルコールが、逆に DNA 損傷を強く抑制した。また ESR で DMPO-OH の生成が見られたがエタノールなどの OH ラジカルスカベンジャーによる抑制が弱かった。これらの結果から、DNA 損傷を起こす活性種はフリー OH ラジカルではなく、クリプト OH ラジカルとしての性質を持つと考えられる。その構造としては、銅過酸化物 ( $Cu^I(OOH)$ ) または銅酸素錯体 ( $Cu^I(O) \leftrightarrow Cu^{II}(\cdot O^-) \leftrightarrow Cu^{III}=O$ ) の可能性がある。銅と  $H_2O_2$  との反応による DNA 損傷は、従来、フェントン反応からの類推でフリー OH ラジカルだとされていたが、この研究 (Yamamoto and Kawanishi, 1989) はその仮説を覆すものである。

以上の結果から、銅と  $H_2O_2$  との反応により銅過酸化物または銅酸素錯体が生成し DNA を損

傷することが推定された。さらに以下のように、この反応は、ある種の発がん物質の銅存在下での DNA 損傷に関与しうる。これは薬物代謝酵素なしに変異原性を示す発がん物質または Ames テストにより変異原性を示さない発がん物質の遷移金属による活性化の可能性を示唆するものである。

#### (2) ベンゼン

ベンゼンはヒトに白血病を起こす可能性があり、また、動物実験では白血病以外に Zymbal 腺腫、乳癌、リンパ腫をもたらすことが知られている。ベンゼンおよびその代謝物と DNA とを反応させた結果、1, 2, 4-ベンゼントリオールは銅(II)の存在下で糖リン酸エステルの切断および塩基の損傷を起こすと考えられた (Kawanishi *et al.*, 1989a)。DNA 損傷の塩基特異性としてはグアニンとチミンの損傷が強かった。この DNA 損傷はカタラーゼおよびパソキプロイン (銅(I)の特異的なキレート剤) で阻害されることから、DNA 損傷をもたらすのは銅と  $H_2O_2$  から生じた活性種である可能性が考えられる (Yamamoto and Kawanishi, 1989)。ベンゼンの発がん性は、1, 2, 4-ベンゼントリオールに代謝された後、銅と反応して  $H_2O_2$  の生成を介して DNA を損傷することによる可能性が示唆された。

#### (3) オルトフェニルフェノール

防カビ剤であるオルトフェニルフェノールはラットで発がん性が認められているが、DNA 損傷のメカニズムは不明であった。オルトフェニルフェノールおよびその代謝物と単離 DNA とを反応させた結果、2, 5-ジヒドロキシビフェニルだけが銅(II)の存在のもとで DNA の損傷をもたらした (Inoue *et al.*, 1990)。パソキプロインが DNA 損傷を阻害した。カタラーゼも DNA 損傷を阻害した。OH ラジカルスカベンジャーは DNA 切断をほとんど阻害しなかった。Maxam-Gilbert 法によりチミンおよびグアニンが、特に 5'-CTG-3' および 5'-GTC-3' のチミンが損傷していることが判明した。ESR スペクトルの結果から 2, 5-ジヒドロキシビフェニルの自動酸化過程でセミキノンラジカルが生成することが分かった。銅(II)によりセミキノンは急速に増加しその後減少するがカ

タラーゼによっても増加するのでセミキノンラジカル自身が DNA の損傷をもたらすものではないと考えられる。以上の結果からオルトフェニルフェノールの代謝物である 2, 5-ジヒドロキシビフェニルが銅(II)イオンの存在のもとで DNA 損傷をもたらすのは銅と  $H_2O_2$  から生じた活性種である可能性が考えられる (Yamamoto and Kawanishi, 1989)。

#### (4) カフェー酸

植物性食品に含まれるカフェー酸は、Ames テストで陰性であるが、最近、発がん性が動物実験で認められるようになった (Hirose *et al.*, 1990)。カフェー酸は銅(II)の存在下で DNA 損傷をもたらした。パソキプロインが DNA 損傷を阻害した。カタラーゼも DNA 損傷を阻害し  $H_2O_2$  の関与が示唆された。カフェー酸は 50  $\mu M$  で極大の DNA 損傷をもたらした。それ以上の濃度では DNA 損傷の減少が認められた。OH ラジカルスカベンジャーは DNA 損傷をあまり阻害しなかった。Maxam-Gilbert 法により、カフェー酸と Cu(II) とを反応させた DNA ではチミン、特に 5'-CTG-3' および 5'-GTC-3' のチミンが損傷していることが判明した。

Raji 細胞をカフェー酸で処理しパルスフィールドゲル電気泳動を行った結果、二本鎖 DNA 切断が認められた。以上の結果からカフェー酸は銅(II)存在下で単離 DNA の損傷および細胞内の DNA の損傷をもたらすことが判明した。

#### (5) ヒドラジン化合物

##### a ヒドラジン

ヒドラジン ( $NH_2NH_2$ ) またはその誘導体は各種の産業に用いられており、動物実験で発がん性が認められている (Toth, 1975)。また S-9 を加えなくても変異原性を示す。ヒドラジンは通常の濃度では DNA と直接には反応しないため、DNA 損傷が起こるとすると、薬物代謝酵素以外のなんらかの機構で活性化される必要がある。遷移金属の存在下で DNA と反応させたところ、マンガン(III)、マンガン(II)、銅(II)の存在下で DNA 損傷が起こった。マンガン(III)とマンガン(II)の存在下ではヒドラジンは各塩基に同じ程度に損傷をもたらした。この反応では ESR により DMPO-

OH の生成が認められ、DNA 損傷は OH ラジカルによってもたらされたと考えられる。このヒドラジンとマンガンによる OH ラジカルの生成はカタラーゼによっては抑制されず、スーパーオキシドディスムターゼによって抑制された。これは良く知られているフェントン反応とは異なり、 $H_2O_2$  を経由しない OH ラジカル生成反応である点で非常に興味深いものである。反応機構としてはマンガンとスーパーオキシドとの反応によりマンガン-酸素錯体が生じ、さらにそれがヒドラジンと反応して OH ラジカルを生成すると考えられる。それに対して、銅(II)の存在下では DNA の塩基のうちチミンが強く損傷された。特に 5'-GTC-3' の配列のチミンの損傷が強かった。この、銅存在下での DNA 損傷はカタラーゼにより阻害されるため、 $H_2O_2$  が関与しており、先に述べた銅と  $H_2O_2$  との反応により活性種が生じ、DNA 損傷が起こると考えられる。なお、ESR の実験でスピントラップ剤として DMPO または POBN を用いたところ、水素原子の付加体が生じた。この水素原子はスピントラップ剤の存在しない系では酸素と反応してスーパーオキシド及び  $H_2O_2$  を生成する可能性がある (Yamamoto and Kawanishi, 1991a)。

##### b メチルヒドラジン

1, 2-ジメチルヒドラジンはラットで、選択的に大腸癌を発生させる (Toth, 1977)。1, 2-ジメチルヒドラジンは銅(II)及びマンガン(III)の存在下で DNA 損傷をもたらした。反応機構については、ヒドラジンと同様に、マンガン(III)の存在下では OH ラジカルが DNA を損傷した。銅(II)の存在下では  $H_2O_2$  が生成しさらに銅と反応して DNA を損傷することを示す実験結果を得た。銅(II)の存在下では 1, 1'-ジメチルヒドラジン及びモノメチルヒドラジンも同様の機構で DNA を損傷した (Kawanishi and Yamamoto, 1991)。

##### c ヒドララジン

ヒドラジンの芳香族誘導体のヒドララジンは高血圧の治療薬であるが、マウスで発がん性を示したという報告がある。また、S-9 の添加なしで変異原性を示す。また副作用として systemic lupus erythematosus (SLE) に似た自己免疫疾患があり、

その場合、患者の血清中に抗核抗体が認められている。ヒドララジンは銅(II)の存在下でDNAを損傷した。特にグアニンの損傷が強かった。カタラーゼがこのDNA損傷を阻害するため、 $H_2O_2$ が生成しそれが銅と反応して活性種を生ずると推定される。高速液体クロマトグラフィーによる分析では生成物はフサラジンが約80%、フサラジノンが約15%である。ESRおよび液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリーを用いた解析から、銅存在下でのヒドララジンの自動酸化ではいくつかのラジカルその他の中間体が生成することが明らかになり、それらもDNA損傷を起こしている可能性がある(Yamamoto and Kawanishi, 1991b)。

#### d ヒト培養細胞におけるヒドラジン化合物とマンガン化合物との相互作用によるDNA損傷

ヒドラジン化合物による細胞内DNA損傷を検討するため、ヒドラジン化合物を単独あるいは金属イオンで前処理したあと培養細胞に加えパルスフィールドゲル電気泳動法でDNA切断を検出した。その結果、検討したヒドラジン化合物はすべて単独ではヒト培養細胞に加えてもDNA損傷を引き起こさなかったが、ヒドラジン、メチルヒドラジン、1,1-ジメチルヒドラジンおよび1,2-ジメチルヒドラジンではMn(II)の前処理により主として1~2Mb程度に切断された巨大DNA断片が認められた。ヒドラジン化合物とマンガンによる細胞内DNA損傷のメカニズムについては今後さらに検討する必要があるが、化学物質の複合作用による遺伝毒性のひとつとして注目される。

#### 5. おわりに

我々は環境汚染物質の複合作用による発がんのメカニズムを明らかにする目的で、単離DNAとの反応性をがん原遺伝子を試料として用いて検討し、更に培養細胞のDNA損傷の解析を行った。また、その反応にどのような活性種が関与しているかをESR-スピントラップ法で検討してきた。これまでの研究で、発がん性の重金属が $H_2O_2$ との複合作用でDNA損傷をもたらすことが示された。さらに、重金属以外の発がん物質でAmesテスト陰性の場合(あるいは陽性でも薬物代謝酵

素による活性化を必要としない場合)についても検討したところ、その発がん物質又は代謝物が銅などの重金属との複合作用の結果、活性酸素を生成し、DNA損傷をもたらすことが多いことが判明した。

環境汚染物質の複合作用による毒性の研究はもとより重要なものであるが、以上の研究結果から特に重金属化合物の関与する複合作用が極めて興味ある問題であることが示された。今後、さらに深く研究する必要がある。

#### 参考文献

Aiyar, J., H. J. Berkovits, R. A. Floyd and K. E. Wetterhahn (1990) Reaction of Chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: Reactive intermediates and resulting DNA damage, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 595-603.

Athar, M., S. K. Hansan and R. C. Srivastava (1987) Evidence for the involvement of hydroxyl radicals in nickel mediated enhancement of lipid peroxidation: Implications for nickel carcinogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1276-1281.

Bianchi, V., L. Celotti, G. Lanfranchi, F. Majone, G. Marin, A. Montaldi, G. Sponza, G. Tamino, P. Venier, A. Zantedeschi and A. G. Levis (1983) Genetic effects of chromium compounds, *Mutat. Res.*, **117**, 279-300.

Ciccarelli, R. B. and K. E. Wetterhahn (1982) Nickel distribution and DNA lesions induced in rat tissues by the carcinogen nickel carbonate, *Cancer Res.*, **42**, 3544-3549.

Ebina, Y., S. Okada, S. Hamazaki, F. Ogino, F. J. Li. and O. Midorikawa (1986) Nephrotoxicity and renal cell carcinoma after use of iron- and aluminum-nitritotriacetate complexes in rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**, 107-113.

Hirose, M., S. Fukushima, T. Shirai, R. Hasegawa, T. Kato, H. Tanaka, E. Asakawa and N. Ito (1990) Stomach carcinogenicity of caffeic acid, sesamol and catechol in rats and mice, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 207-212.

Inoue, S. and S. Kawanishi (1987) Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitritotriacetate and hydrogen peroxide, *Cancer Res.*, **47**, 6522-6527.

Inoue, S. and S. Kawanishi (1989) ESR Evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel(II) complex of glycylglycyl-L-histidine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 455-451.

Inoue, S., K. Yamamoto and S. Kawanishi (1990)

DNA damage induced by metabolites of *o*-phenylphenol in the presence of copper(II) ion, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 144-149.

Kasprzak, K. S., B. A. Diwan, N. Konishi, M. Misra and M. Rice (1990) Initiation by nickel acetate and promotion by sodium barbital of renal cortical epithelial tumors in male F344 rats, *Carcinogenesis*, **11**, 647-652.

Kawanishi, S., S. Inoue and S. Sano (1986a) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5952-5958.

Kawanishi, S., S. Inoue, S. Sano and H. Aiba (1986b) Photodynamic guanine modification by hematoporphyrin is specific for single-stranded DNA with singlet oxygen as a mediator, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6090-6095.

Kawanishi, S., S. Inoue and M. Kawanishi (1989a) Human DNA damage induced by 1, 2, 4-benzene-triol, a benzene metabolite, *Cancer Res.*, **49**, 164-168.

Kawanishi, S., S. Inoue and K. Yamamoto (1989b) Hydroxyl radical and singlet oxygen production and DNA damage induced by carcinogenic metal compounds and hydrogen peroxide, *Biol. Trace Elem. Res.*, **21**, 367-372.

Kawanishi, S., K. Yamamoto and S. Inoue (1989c) Site-specific DNA damage induced by sulfite in the presence of cobalt(II) ion: Role of sulfate radical, *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 3491-3496.

Kawanishi, S., S. Inoue and K. Yamamoto (1989d) Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide, *Carcinogenesis*, **10**, 2231-2235.

Kawanishi, S. and K. Yamamoto (1991) Mechanism of site-specific DNA damage induced by methylhydrazines in the presence of copper(II) or manganese(III) *Biochemistry*, **30**, 3069-3075.

Lion, Y., M. Delmelle and A. Van de Vorst (1976) New method of detecting singlet oxygen production, *Nature*, **263**, 442-443.

Moan, J. and E. Wold (1979) Detection of singlet oxygen by ESR, *Nature*, **279**, 450-451.

Peskin, A. V. and L. Shlyahova (1986) Cell nuclei generate DNA-nicking superoxide radicals, *FEBS Lett.*, **194**, 317-321.

Robison, S. H., O. Cantoni and M. Costa (1982) Strand breakage and decreased molecular weight of DNA induced by specific metal compounds, *Carcinogenesis*, **3**, 657-662.

Robison, S. H. and M. Costa (1982) The induction of DNA strand breakage by nickel compounds in cultured Chinese hamster ovary cells, *Cancer Lett.*, **15**, 35-40.

Sharma, A. and G. Talukder (1987) Effects of metals on chromosomes of higher organisms, *Environ.*

*Mutag.*, **9**, 191-226.

Sissoëff, I., J. Grisvard and E. Guillé (1976) Studies on metal ions-DNA interactions: Specific behaviour of reiterative DNA sequences, *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **31**, 165-199.

Snyder, R. D. (1988) Role of active oxygen species in metal-induced DNA strand breakage in human diploid fibroblasts, *Mutation Res.*, **193**, 237-246.

Sugiyama, M., A. Ando, A. Furuno, N. B. Furlong, T. Hidaka and R. Ogura (1987) Effects of vitamin E, vitamin B<sub>2</sub> and selenite on DNA single strand breaks induced by sodium chromate (VI), *Cancer Lett.*, **38**, 1-7.

Sunderman, F. W. Jr. (1981) Recent research on nickel carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, **40**, 131-141.

Toth, B. (1975) Synthetic and naturally occurring hydrazines as possible cancer causative agents, *Cancer Res.*, **35**, 3693-3697.

Toth, B. (1977) The large bowel carcinogenic effects of hydrazines and related compounds occurring in nature and in the environment, *Cancer* **40**, 2427-2431.

Umemura, T., K. Sai, A. Takagi, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitritotriacetate (Fe-NTA), *Carcinogenesis*, **11**, 345-347.

Yamamoto, K., S. Inoue, A. Yamazaki, T. Yoshinaga and S. Kawanishi (1989) Site-specific DNA damage induced by cobalt (II) ion and hydrogen peroxide: Role of singlet oxygen, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**, 234-239.

Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1989) Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper(II) ion and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15435-15440.

Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1991a) Site-specific DNA damage induced by hydrazine in the presence of manganese and copper ions: The role of hydroxyl radical and hydrogen atom, *J. Biol. Chem.* **266**, 1509-1515.

Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1991b) Free radical production and site-specific DNA damage induced by hydralazine in the presence of metal ions or peroxidase/hydrogen peroxide, *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 905-914.

Youngman, R. J. and E. F. Elstner (1981) Oxygen species in paraquat toxicity: The crypto-OH radical, *FEBS Lett.*, **129**, 265-268.

Zimmerman, R. and P. Cerutti (1984) Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T<sup>1/2</sup>/C18 fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 2085-2087.

## 金属の突然変異抑制作用とその機構

—セレンを中心に—

京都大学医学部放射能基礎医学教室 佐藤まゆみ<sup>1</sup>, 八木孝司<sup>1</sup>  
同志社大学工学部生化学研究室 布柴達男<sup>2</sup>, 西岡 一<sup>2</sup>

### 1. 緒言

1975年, 我々は金属化合物の変異原性をバクテリアを用いてスクリーニングし, クロムやカドミウムなどの変異原性を報告した (Nishioka, 1975)。1985年, 金属の抗変異原性を調べ, セレンやヒ素などの化合物が紫外線や種々の化学変異原による誘導突然変異を抑制することを報告し, (Nunoshiba *et al.*, 1987), 以来その機構を研究してきた。ここではセレンを中心に, これまでに得られた知見から金属の突然変異抑制作用とその機構を紹介する。

セレンの生体に対する作用については古くから研究され, いくつかの重要な働きが明らかにされている。ほ乳類の必須微量元素の一つであり (Thompson *et al.*, 1969), 赤血球などに存在するグルタチオンペルオキシダーゼの反応中心にはセレンが含まれ, 生体内での抗酸化作用に重要な役割を果たしていることが知られている (Rotruck *et al.*, 1973)。また, 土壌中のセレン濃度の高い地域ではがん発生率が低いことが, 疫学的に証明されている (Shamberger, 1970; Schrauzer *et al.*, 1977)。このことからがん予防効果が期待され, 米国などではセレンの添加された健康食品が販売されている。しかし, がんを予防する機構については何もわかっていない。

本研究は, [I] セレン化合物, 特に亜セレン酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) が紫外線や種々の化学変異原によって誘発される大腸菌の突然変異を抑制するか, その機構は何か, および, [II] 低濃度の  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  前処理は, 変異原の致死および突然変異生成を抑制するか, つまり防護効果があるか, その機構は何か, について調べたもので, いくつかの知見を得たので報告する。この研究が, セレンの生体への作用の機構解明の一助になれば, と考えている。

### 2. 実験材料および方法

#### (1) 使用菌株, 培地および培養

この実験に使用した菌株とその遺伝的特性を, Table 1 に示した。突然変異抑制試験に使用した *E. coli* WP2uvrA/pKM101 は, 除去修復能を欠損し, かつ plasmid pKM101 (アンピシリン耐性, *mucAB* 遺伝子を含む) の導入により突然変異の誘発頻度が高められている。*umuC* 発現試験に用いた *S. typhimurium* TA1535/pSK1002は, そのプラスミド pSK1002 に *umuC-lacZ* 融合遺伝子を含み, 変異原処理によりこの遺伝子が発現して  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する UmuC-LacZ 融合タンパクが生成されるので, この酵素活性を測定し *umuC* の発現量を求めた。

1) 〒606 京都市左京区吉田近衛町

2) 〒602 京都市上京区今出川通烏丸東入ル

Mutation Inhibitory Effect of Metal and Its Mechanism—in case of Selenium

Mayumi Sato<sup>1</sup>, Koji Yagi<sup>1</sup>, Tatsuo Nunoshiba<sup>2</sup> and Hajime Nishioka<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoecho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

<sup>2</sup> Laboratory of Biochemistry, Doshisha University, Karasuma Imadegawa, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

Table 1. Characteristics of *E. coli* and *S. typhimurium* strains used in the experiment

Strain	Genotype	Reference
<i>E. coli</i>		
WP2	<i>trpE65, malB15, lon-11, sulA1</i>	Witkin (1956)
CM561	as WP2, but <i>lexA102, malB+</i>	Bridges (1972)
WP2uvrA/pKM101	as WP2, but <i>uvrA</i> with pKM101	Nunoshiba <i>et al.</i> (1984)
TK603	<i>uvrA6, his-4, thr-1, leu-6</i> <i>proA2, thi-1, ara-14, galK2</i> <i>lacY1, xyl-5, mtl-1, tsx-33</i> <i>rpsL31, supE44, ilv-325</i>	Kato <i>et al.</i> (1977)
TK610	as TK603, but <i>umuC36</i>	Kato <i>et al.</i> (1977)
BS23	<i>thy, his, ada</i>	Sedwick <i>et al.</i> (1980)
<i>S. typhimurium</i>		
TA1535/pSK1002	<i>uvrB, rfa, bio, hisG46</i> with pSK1002	Oda <i>et al.</i> (1985)

Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 前処理による変異原への防護効果は、*E. coli* WP2 および BS23 を用いて調べた。

WP2uvrA/pKM101 は、NB/NaCl 培地 (アンピシリン 20 μg/ml 含む) で、他の *E. coli* の各株は NB 培地で一晚、振とう培養し (37°C), 1/10 に希釈した後、5~8×10<sup>8</sup> cells/ml となるまで二次培養し、遠心分離により菌洗浄の後、M9 緩衝液に再懸濁させたものを各実験に使用した。*S. typhimurium* TA1535/pSK1002 は LB 培地で一晚培養し、TGA 培地で二次培養した後、大腸菌と同様に調製して実験に使用した。

## (2) 突然変異抑制試験

突然変異誘発のためには、UV および数種の化学変異原が使用された。これらは、4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO), 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2), methyl methane-sulfonate (MMS), ethyl methane-sulfonate (EMS), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) である。

UV 照射は、10 W Toshiba germicidal UV lamp を用い、各線量を照射した。化学変異原処理は、菌液と変異原の DMSO 溶液を 10:1 で混合し、37°C で 60 分間振とうした後、遠心分離により変異原を除去し、菌を M9 に再懸濁させた。無希釈および 10<sup>-5</sup>~15<sup>-6</sup> に希釈された菌液の 0.1 ml を、それぞれ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 添加 (0.5 mg または 1 mg/plate) および無添加の SEM プレートに塗布し、2 晩培養の後、復帰変異体数および

生菌数を計算した。この試験および以下の試験において、プレートは duplicate とし、各表にはその平均値が記載された。

## (3) ストレプトマイシン抵抗性前進変異試験

UV 照射された WP2uvrA/pKM101 の 0.1 ml を M9 緩衝液 0.9 ml, NB 軟寒天培地 2 ml とともに、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 添加および無添加の NB プレートに重層した。細胞の発現時間を与えるため、37°C で 4 時間培養した後、ストレプトマイシンを 100 μg 含む NB 軟寒天培地 2 ml を重層した (最終濃度 5 μg/ml)。4 日間の培養後、5 μg/ml-ストレプトマイシン抵抗性変異体のコロニー数を計数した。(Kosako *et al.*, 1983)

## (4) umuC 発現試験

小田ら (Oda *et al.*, 1985) および布柴ら (Nunoshiba *et al.*, 1987) の方法に従った。*S. typhimurium* TA1535/pSK1002 の M9 懸濁液を UV に照射し、その 1.5 ml を Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 添加 (5 または 10 μg) および無添加の TGA 培地 1.5 ml に加え、37°C で振とう培養した。各培養時間の後、菌濃度 (OD<sub>600</sub>) と β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。培養液 0.2 ml を Z-緩衝液 1.8 ml に加え、トルエン (20 μl) を加えて細胞膜を破壊し、37°C で 40 分間振とうしてトルエンを除去した。これを 28°C で 5 分間静置した後、β-ガラクトシダーゼの基質として 4 mg/ml の ONPG (o-Nitrophenol-β-D-galactopyranoside) を 0.2 ml に加え、28°C で 30 分間酵素反応を行わせた。1 ml の IM-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 添加により反応を停止させ、OD<sub>420</sub> および OD<sub>550</sub>

Table 2. Mutation-inhibitory effect of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on UV-, 4NQO-, AF-2-, MMS-, EMS-, MNNG- and ENNG-induced mutations in *E. coli* WP2uvrA/pKM101

Mutagen	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> [mg/plate]	Survivals		Trp <sup>+</sup> revertants		Ratio* [%]
		[/plate]	[%]	[/plate]	[/10 <sup>7</sup> survivals]	
None	0	109	100	103	9.4	100
(DMSO)	0.5	111	102	87	7.8	84
	1.0	112	103	48	4.3	47
	UV	0	100	100	468	47.0
(0.1 J/m <sup>2</sup> )	0.5	114	114	299	26.2	64
	1.0	101	101	133	13.2	28
	4NQO	0	143	100	845	59.3
(0.4 μg/ml)	0.5	141	99	673	47.7	80
	1.0	136	95	439	32.4	52
	AF-2	0	86	100	932	108.4
(0.05 μg/ml)	0.5	95	110	661	69.6	71
	1.0	100	116	550	55.0	59
	MMS	0	71	100	340	47.9
(5 mg/ml)	0.5	73	103	228	31.9	67
	1.0	77	108	159	20.6	47
	EMS	0	45	100	262	58.2
(1 mg/ml)	0.5	50	111	166	33.2	63
	1.0	49	109	73	14.9	28
	MNNG	0	67	100	297	44.3
(4 μg/ml)	0.5	61	91	249	40.8	84
	1.0	89	133	203	22.8	68
	ENNG	0	54	100	544	100.7
(2 μg/ml)	0.5	61	113	461	75.6	85
	1.0	58	107	247	42.6	45

\* Ratio represents the percentage of Trp<sup>+</sup> revertants/plate to the control.

を測定した。β-ガラクトシダーゼ活性は、次の Miller の式 (Miller, 1972) により求めた。

β-ガラクトシダーゼ活性 (unit)

$$= 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / (t \cdot v \cdot \text{OD}_{600})$$

t: 酵素反応時間 [分] ... 30

v: 菌液容量分率 ... 0.1

## (5) Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 前処理された細胞に対する変異原の致死と突然変異

細胞を NB 培地で一晚培養した後、1/10 に希釈し、200 μM-Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を含む培地で対数増殖期になるまで二次培養し、M9 緩衝液に懸濁させた。化学変異原として、MNNG または MNU を使用し、各濃度で 60 分 37°C 作用させ、菌洗浄後、SEM プレートに塗布して突然変異頻度を、希釈後 LB 寒天培地に塗布して生存率を、コロニー計数より算出した。

## (6) 細胞粗抽出

Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 前処理した菌を遠心分離し、MT 緩衝液 (70 mM HEPES (pH 7.1), 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 5% glycerol) に懸濁させ、0°C で超音波破碎し、4°C で遠心分離し、上清を回収した。Biorad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) により蛋白定量を行った。

## (7) O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチル転移酵素 (MTase) 活性の測定

0.3 mg 蛋白相当の細胞粗抽出液に [<sup>3</sup>H-CH<sub>3</sub>]O<sup>6</sup>-methylguanine (2600 cpm) を含む salmon sperm DNA 溶液 25 μl を加え、総量 0.3 ml とし、37°C で 1 時間培養した。氷冷トリクロ酢酸 1 ml を加えて反応を止め、80°C で 30 分加熱して DNA を加水分解し、15 分間氷冷して蛋白を沈澱させ、GF/C グラスフィルターで回収した。プロトゾー

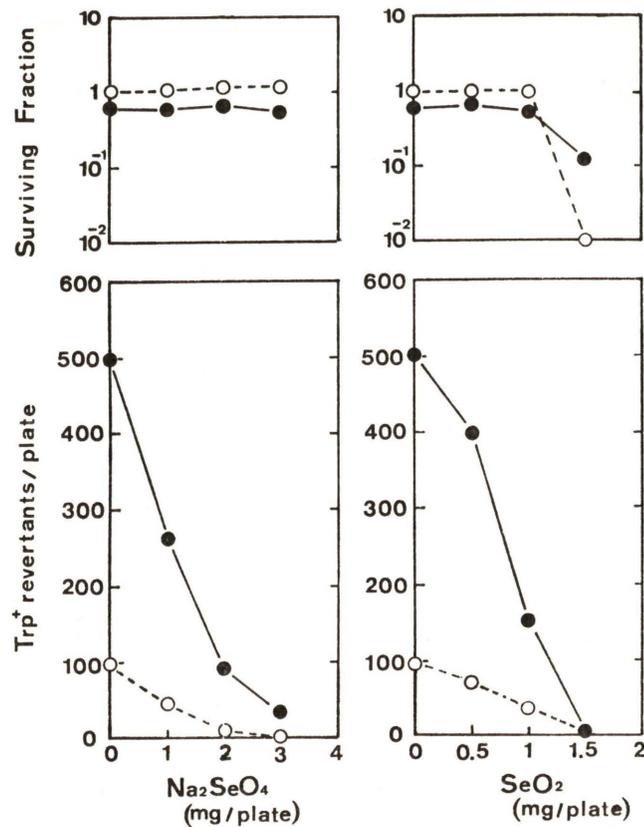


Fig. 1. Mutation-inhibitory effect of  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  and  $\text{SeO}_2$  on UV-induced mutagenesis. UV-irradiated ( $0.27 \text{ J/m}^2$ ; ●) or non-irradiated (○) cells were spread on SEM plate containing various amount of Se compound and the numbers of revertants and survivals were counted after incubation for 2 days.

ル  $200 \mu\text{l}$  に蛋白沈澱を溶解し、1% 酢酸を含むアクアゾール  $8 \text{ ml}$  を加え、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。(Yagi *et al.*, 1984).

#### (8) グルタチオン (GSH) の定量

$2 \text{ mg/ml}$  の 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を含む  $0.2 \text{ M}$  リン酸ナトリウム緩衝液  $2 \text{ ml}$  に、細胞粗抽出液  $0.2 \text{ ml}$  を加え、 $\text{OD}_{412}$  を測定し、検量線から濃度を決定した。(Boyne *et al.*, 1972)

### 3. 突然変異抑制

#### (1) 各種セレン化合物による突然変異抑制

*E. coli* WP2uvrA/pKM101 に、UV 照射または変異原処理で DNA 損傷を与えた後、SEM プレートに塗布して突然変異コロニーを形成させる

際に、プレートに  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ( $25\text{--}50 \mu\text{g/ml}$ ) を加えておくと、加えない場合に比べて、突然変異コロニー数が  $1/2$  から  $1/4$  に減少した (Table 2)。この抑制効果は、用いたすべての変異原による突然変異および自然突然変異に対して観察され、しかも量効果関係を示した。また、Fig. 1, Fig. 2, Table 3 に示すように、sodium selenate ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ), selenium dioxide ( $\text{SeO}_2$ ), selenomethionine も同様に、UV および MNNG 誘発突然変異を明瞭に抑制した。しかし、selenoethionine, 6-selenopurine および 6-selenoinosine にはこの効果は見られなかった。

#### (2) $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ による致死および増殖阻害の有無の確認

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$  の突然変異抑制効果が、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  自身による変異細胞への致死または増殖阻害による

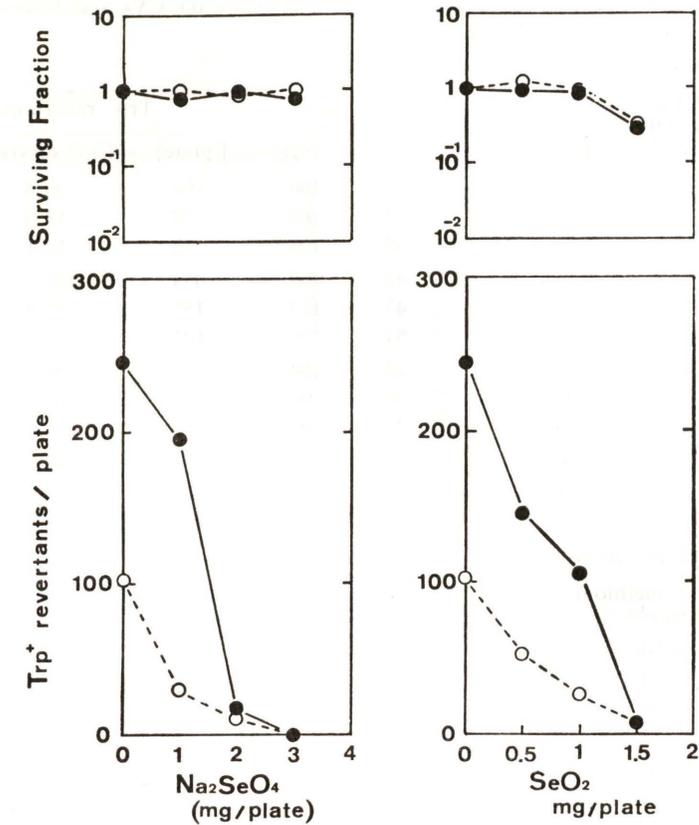


Fig. 2. Mutation-inhibitory effect of  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  and  $\text{SeO}_2$  on MNNG-induced mutagenesis. MNNG-treated ( $4 \mu\text{g/ml}$ ): ●) or non-treated (○) cells were spread on SEM plate containing various amount of Se compounds and the numbers of revertants and survivals were counted after incubation for 2 days.

ものではないことを確認しておく必要がある。まず突然変異抑制試験に使用された SEM プレートの  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  は生存率には影響しない濃度であるから、変異抑制が、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  の致死効果によるものではないことは明らかである。また cell cycle の遅延により DNA 修復が充分に行われたために突然変異が減少する可能性があるが、別の実験で、使用された濃度が、細胞増殖の速度に影響しないことを確認している。さらに、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  がトリプトファン代謝などに作用して、 $\text{Trp}^+$  復帰変異体の増殖を特異的に阻害をしている可能性があるが、 $\text{Trp}^+$  復帰変異体の細胞を増殖させ、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  添加 VB プレートでコロニー形成させると、コロニー数およびそれらの大きさとともに、添加しない場合と有為な差がなかったので、

この可能性も除去された。また、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  が、UV 誘発ストレプトマイシン抵抗性前進変異を抑制する (Table 4) ことからこの可能性は否定される。また、変異原は菌液との処理後、遠心分離により除去しているため、SEM プレート内の  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  が、変異原を化学的に不活化したために変異原性が低下して、突然変異を減少させた可能性も否定される。

#### (3) DNA 修復への関与

これらの結果から、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  は DNA の正確な修復を促進 (あるいは不正確な修復を阻害) するなど、DNA 修復に関与する可能性が強く示唆された。事実、シナムアルデヒド (Ohta *et al.*, 1983) やバニリン (Ohta *et al.*, 1988) は組換え修復を、タンニン酸は除去修復を (Shimoi *et al.*,

Table 3. Mutation-inhibitory effect of selenomethionine on UV- and MNNG-induced mutations in *E. coli* WP2uvrA/pKM101

(a) UV-induced mutation

UV [J/m <sup>2</sup> ]	Seleno-L- or -DL-methionine [ $\mu$ g/plate]	Survivals		Trp <sup>+</sup> revertants		Ratio* [%]
		[/plate]	[%]	[/plate]	[/10 <sup>7</sup> survivals]	
0	-L- 0	40	100	106	26.5	100
	25	43	108	57	13.3	54
	75	43	108	52	12.1	49
0.6	0	42	100	454	108	100
	25	47	112	152	32.3	33
	75	54	129	123	22.8	27
0	-DL- 0	40	100	106	26.5	100
	25	39	98	103	26.4	97
	75	37	93	58	15.7	55
0.6	0	42	100	454	108	100
	25	45	107	175	38.9	39
	75	59	140	137	23.2	30

(b) MNNG-induced mutation

MNNG [ $\mu$ g/plate]	Seleno-L-methionine [ $\mu$ g/plate]	Survivals		Trp <sup>+</sup> revertants		Ratio* [%]
		[/plate]	[%]	[/plate]	[/10 <sup>7</sup> survivals]	
0	0	274	100	132	48.2	100
	25	260	93	98	37.7	74
	50	245	89	77	31.4	58
	75	256	93	61	23.8	46
5	0	274	100	711	259	100
	25	275	100	499	181	70
	50	288	105	379	132	53
	75	259	95	170	65.3	23

\* Ratio represents the percentage of Trp<sup>+</sup> revertants/plate to the control.

Table 4. Mutation-inhibitory effect of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on UV-induced SM<sup>r</sup> forward mutation in *E. coli* WP2uvrA/pKM101

UV [J/m <sup>2</sup> ]	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> [mg/plate]	Survivals		SM <sup>r</sup> mutants		Ratio* [%]
		[/plate]	[%]	[/plate]	[/10 <sup>7</sup> survivals]	
0	0	47	100	31	6.5	100
	2	40	85	24	5.9	91
0.6	0	46	100	937	206	100
	2	33	75	240	74	36

\* Ratio represents the percentage of SM<sup>r</sup> mutants /10<sup>7</sup> survivals to the control.

1985) 促進することにより、また亜硫酸ナトリウムは *umuC* 発現を阻害し、かつ *uvrA*, *recA* による正確な修復能を高める (Nunoshiba *et al.*, 1987) ことにより突然変異を抑制することが報告されている。本実験で用いた菌株 WP2uvrA/pKM101 は除去修復欠損株であるが、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> によって突然変異が抑制されるので、その機構には除去修

復以外の修復が関与していると考えられる。

(4) SOS-mutagenesisの抑制

Table 2 に示した変異原のうち、UV と 4NQO は主に DNA のプリン塩基に付加体を形成して損傷するが、それらの DNA 損傷は SOS 応答を誘導する (Walker, 1984)。SOS 応答により発現が誘導される遺伝子群のひとつである *umuDC*

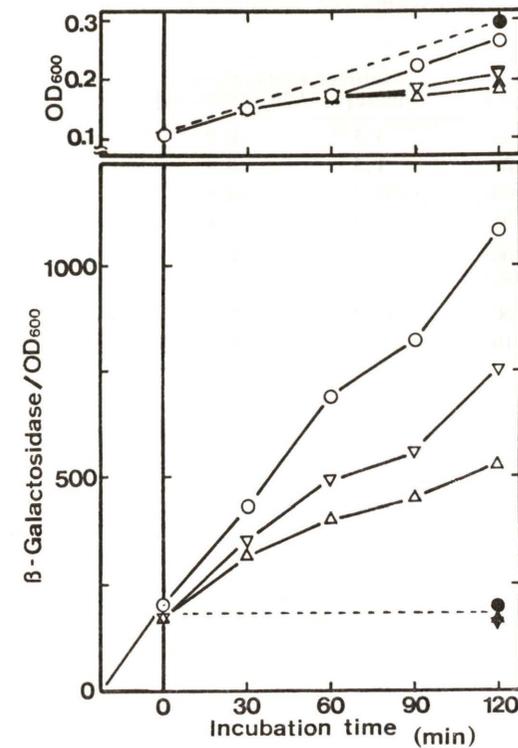


Fig. 3. Inhibitory effect Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> and  $\beta$ -galactosidase activity corresponding to *umuC* gene expression induced by UV in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002. Cells were irradiated to UV with a dose of 1.5 J/m<sup>2</sup> (—), or non-irradiated (---), and then incubated in TGA medium containing Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> at 1.65  $\mu$ g/ml ( $\nabla$ ) or at 3.3  $\mu$ g/ml ( $\Delta$ ).

(Shinagawa *et al.*, 1983) は、UV や 4NQO による突然変異誘発に必要であり (Shinoura *et al.*, 1983a), DNA ポリメラーゼ III や RecA との相互作用により DNA 損傷部位での非相補的な塩基の挿入を促進し、突然変異を誘発すると考えられている (Bridges *et al.*, 1985)。

そこで、UV や 4NQO 誘発突然変異に対する Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> の抑制機構を明らかにするために、小田らの開発した *umu*-test を用いて、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> の SOS-mutagenesis への関与を調べた。すなわち、UV 損傷を与えた菌を Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 添加および無添加の培地で培養し、*umuC* 発現量を比較する実験を行った。

その結果、Fig. 3 に示すように、培地に Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を 3.3  $\mu$ g/ml 添加すると、*umuC* の発

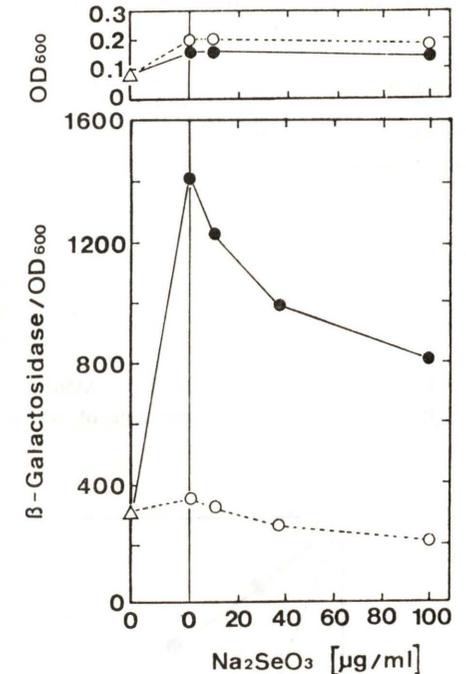


Fig. 4. Inhibitory effect of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on  $\beta$ -galactosidase activity corresponding to *umuC* gene expression induced by MNNG in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002. Cells were treated with MNNG (37°C, 60 min) at a concentration of 4  $\mu$ g/ml (—), or non-treated (---), and after cell washing, incubated for 120 min ( $\Delta$ : 0 min) in TGA medium containing Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> various concentrations.

現は、約 40% に阻害された。ここで、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を TGA 培地の代りに、Z-buffer に加えても、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は低下しなかった。このことは Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> は  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定の際の酵素反応系には影響していないことを示している。また、培養 60 分間に Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> による増殖阻害はないので、非特異的に遺伝子発現や蛋白合成が阻害されたのではないと考えられる。

Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> が *umuC* 遺伝子発現を阻害することは、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> による UV や 4NQO 誘発突然変異の抑制は、SOS-mutagenesis が直接的あるいは間接的に阻害されたからであると考えられる。すなわち Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>、あるいは細胞内での代謝生成物 (selenomethionine, selenoprotein, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> など (Kramer *et al.*, 1988)) が、SOS 応答に関与する RecA, LexA などに作用して、直接 SOS 応

Table 5. Mutation-inhibitory effect of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on MNNG-induced mutation in *E. coli* *umuC* and *lexA* deficient

Strain	MNNG [μg/ml]	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> [mg/plate]	Survivals		Number of revertants*		Ratio** [%]
			[/plate]	[%]	[/plate]	[/10 <sup>7</sup> survivals]	
TK610 ( <i>uvrA</i> , <i>umuC</i> )	0	0	40	100	3.5	0.9	100
	5	0	35	88	1.5	0.4	44
CM561 ( <i>lexA</i> )	0	0	39	100	93.5	84.6	100
	4	1	37	95	4.0	9.6	11
		1.5	571	77	0	0	—
	4	0	744	100	1.5	0.2	100
		1.5	702	100	344	49	100
		1.5	769	110	155	20	41

\* Iis<sup>+</sup> for TK610, and Trp<sup>+</sup> for CM561.

\*\* Ratio represents the percentage of revertants/plate to the control.

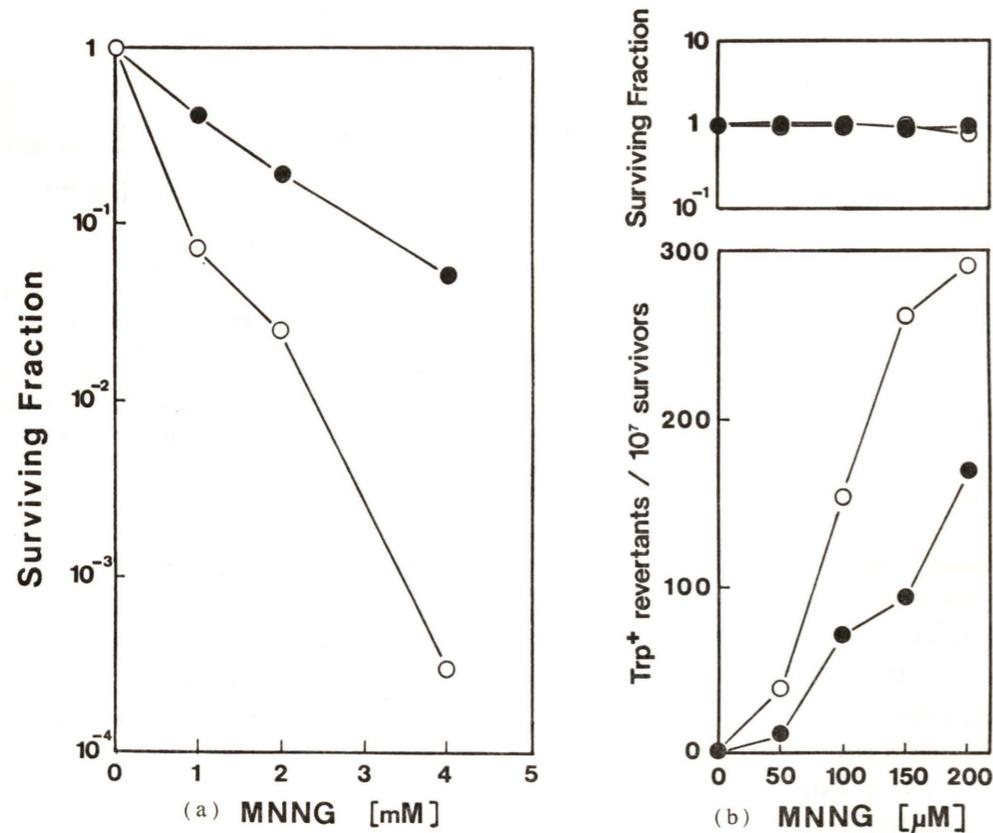


Fig. 5. Effect of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on MNNG survival (a) and mutation (b) in *E. coli* WP2 (wild). The *E. coli* was preincubated with (●) or without (○) 200 μM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, and then washed and treated with MNNG for 60 min.

答の誘導を阻害したか、あるいは何か別の機構により DNA 損傷修復を促進し、SOS 応答のシグナルとなる一本鎖 DNA の生成を減少させ、間接的に SOS 応答を減少させたと考えられること

る。また、Table 2 に見られるように、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> は自然突然変異をも減少させた。*umuC* 欠損株は wild 株より自然突然変異頻度が低いことを確認している (Kuraoka *et al.*, 1990) ので、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

が *umuC* 発現を低下させ、その結果、自然突然変異が減少した可能性が考えられる。

### (5) アルキル化 DNA 修復への関与

MNNG などのアルキル化剤は DNA 塩基をアルキル化して DNA 損傷を生ずるが、その修復には O<sup>6</sup>-メチルグアニン DNA メチル転移酵素 (O<sup>6</sup>-MTase) やグリコシラーゼが働くことがわかっている (Samson *et al.*, 1977)。また、MNNG, EMS, メチルニトロソウレア (MNU), エチルニトロソウレア (ENU) は、*umuC* 欠損株においても野生株と同程度に突然変異を誘発すること (Shinoura *et al.*, 1983b)、塩基の変化も GC→AT トランジションが 95% をしめ、O<sup>6</sup>-メチルグアニンの向いに T が対合すると考えられること (Shinoura *et al.*, 1983a) から、UV や 4NQO と異なり、突然変異誘発に *umuDC* 遺伝子は不必要であると考えられている。しかし、*umuC* 遺伝子発現はアルキ

ル化剤によっても誘導され (Otsuka *et al.*, 1985)、SOS-mutagenesis の関与を示唆する報告 (Vericat *et al.*, 1988) もある。従って、アルキル化剤の濃度や DNA 上のアルキル化の量によっては SOS 応答が誘導され、RecA, UmuDC, Pol III による誤塩基対形成が生じることも考えられる。我々は、MNNG 処理した TA1535/pSK1002 での *umuC* 遺伝子発現を調べたが、その結果、Fig. 4 に示すように、MNNG によっても *umuC* は発現し、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を培地に添加するとその発現量が明瞭に抑制されることを見いだした。従って、UmuDC 機能が MNNG-mutagenesis に関与しているとすると、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> がその発現を阻害し、その結果 MNNG 誘発突然変異が抑制されたと説明できる。

一方、*umuC* 欠損株および SOS 応答が誘導されない *lexA* 変異株を用いて、MNNG 誘発復帰

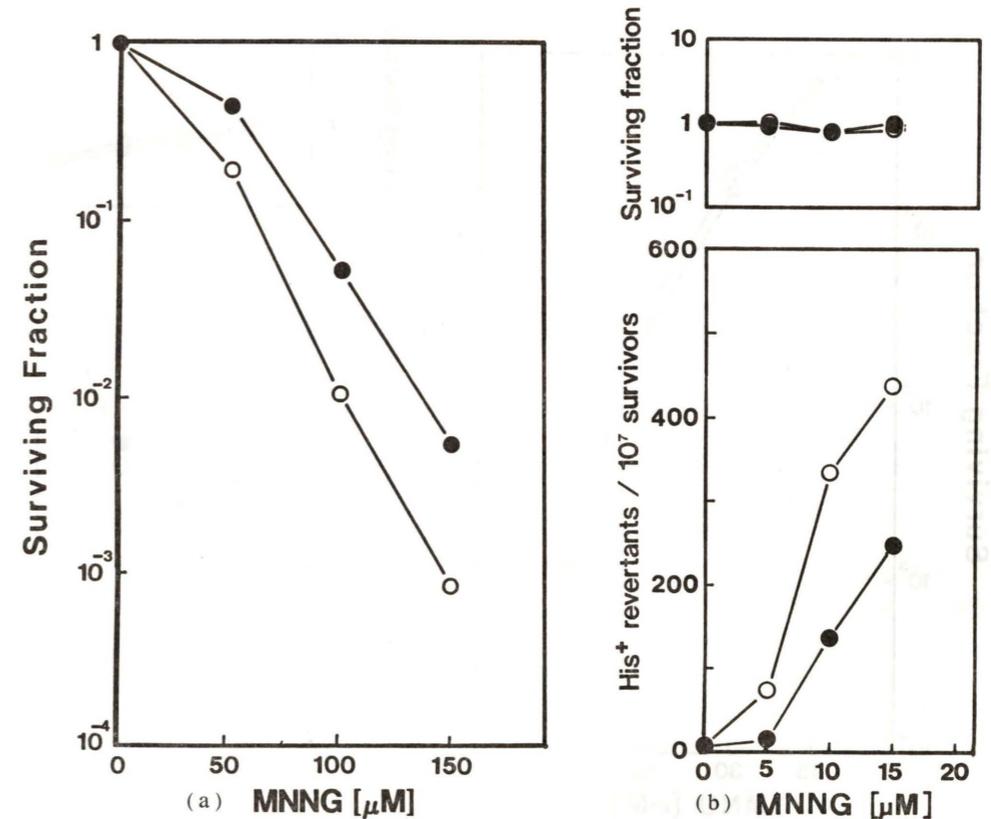


Fig. 6. Effect of Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> on MNNG survival (a) and mutation (b) in *E. coli* BS23 (*ada*). The *E. coli* was preincubated with (●) or without (○) 200 μM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, and then washed and treated with MNNG for 60 min.

変異に対する  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  の作用を検討した結果、Table 5 に示すように、TK603 (*uvrA*), TK610 (*uvrA*, *umuC*) および CM561 (*lexA*) においても、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  は明瞭に突然変異を抑制することが観察された。このことは  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  は SOS-

mutagenesis 以外にも作用して、突然変異を抑制していることを示している。また、 $\text{O}^6$ -MTase や グリコシラーゼによって正確な DNA 修復が促進された可能性も考えられるが、これを確認するためにはさらに検討が必要である。

Table 6. Effect of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ -preincubation on  $\text{O}^6$ -methylguanine DNA methyltransferase (MT) activity and glutathione (GSH) content in *E. coli* WP2 and BS23 (*ada*)

	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ [ $\mu\text{M}$ ]	Strains	
		WP2	BS23
MT [fmole-methyl/mg-protein/h]	0	330 $\pm$ 59 (100%) <sup>a</sup>	372 $\pm$ 12 (100%)
	200	406 $\pm$ 4 (123%)	300 $\pm$ 18 (81%)
GSH [ $\mu\text{g}$ /mg-protein]	0	12.9 $\pm$ 0.8 (100%)	12.7 $\pm$ 1.3 (100%)
	200	5.4 $\pm$ 1.3 (42%) <sup>b</sup>	8.8 $\pm$ 0.9 (69%) <sup>b</sup>

a, activity is in parentheses.

b,  $p < 0.05$  vs. control by Student's t test.

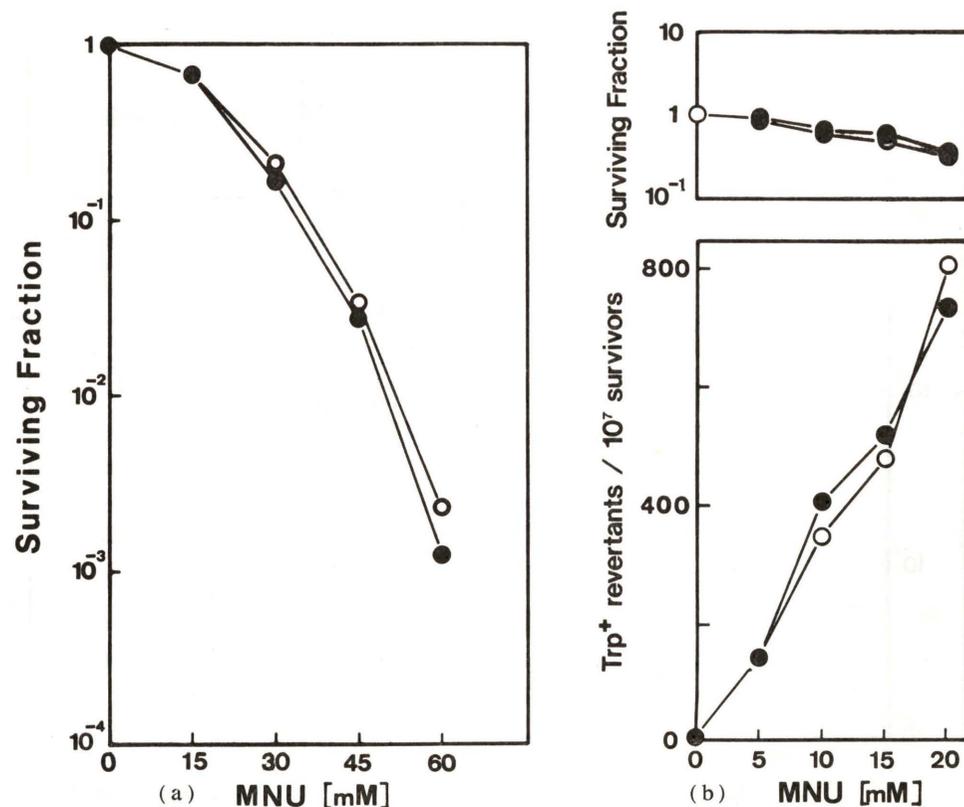


Fig. 7. Effect of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  on MNU survival (a) and mutation (b) in *E. coli* WP2 (wild). The *E. coli* was preincubated with (●) or without (○) 200  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , and then washed and treated with MNU for 60 min.

#### 4. 低濃度 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 前処理による細胞の変異原に対する防護効果

##### (1) MNNG に対する防護効果

細胞を低濃度の薬剤であらかじめ処理しておくと、高濃度の薬剤に対して抵抗性を獲得する現象が知られてきた。この現象は適応応答 (Adaptive response) と呼ばれ、活性酸素 (Dempfle *et al.*, 1983; Christman *et al.*, 1985) やアルキル化剤 (Lindahl *et al.*, 1988) でその機構が詳しく研究され、DNA 修復酵素や活性酸素消去系の誘導などによると考えられている。

我々は、セレンにもこのような防護作用があるかについて調べるため、大腸菌 WP2 を低濃度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (200  $\mu\text{M}$ ) で前処理し、UV やアルキル化剤の致死および突然変異誘発に対する効果を調べた。

その結果、UV の致死には防護効果は見られなかったが、Fig. 5a, 5b に示すように、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  前処理により MNNG による致死および突然変異誘発は、明瞭に抑制された。これは、アルキル化剤で見られる適応応答と類似している。

##### (2) 適応応答の関与

アルキル化剤における適応応答は、*ada* 遺伝子がコードする  $\text{O}^6$ -MTase がメチル化され、それがシグナルとなって、*ada* や *alk* などの DNA 修復遺伝子の発現に誘導がかかるために生じる。従って、もし  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  がこの適応応答誘発に関与しているとするならば、*ada* 欠損株では  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  前培養による MNNG への防護効果は現れないはずである。しかし、Fig. 6a, 6b に示すように、*ada* 欠損株である BS23 においても、WP2 程ではないが、生存率の上昇と突然変異頻度の減少が見られた。そこで  $\text{O}^6$ -MTase 活性を調べた結果、どちらの菌株においても、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  前培養による  $\text{O}^6$ -MTase 活性の有意な増加は見られなかった (Table 6)。これらの結果は、MNNG の致死および突然変異誘発に対する  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  の防護効果は、アルキル化剤への細胞の適応応答とは異なる機構によると考えられる。

##### (3) グルタチオン濃度の減少

MNNG は、グルタチオン (GSH) などの細胞内チオールにより、メチルニトロサミンに代謝さ

れて、DNA をメチル化することが報告されている (Kerklaan *et al.*, 1983)。また Sedwick ら (1980) は、MNNG 高感受性の *E. coli* を単離し、その細胞内チオール濃度が低いことを見いだしている。従って、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  もなんらかの機構で GSH 濃度を減少させ、その結果、MNNG の代謝が阻害された可能性が考えられる。

そこで、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  前処理した細胞の粗抽出液中の GSH 濃度を測定すると、前処理しない場合と比較して、WP2 では 42%、BS23 では 69%と、有意に低いことを見いだされた (Table 6)。WP2 の GSH 濃度が BS23 より低いことは、MNNG による致死や突然変異誘発に対する  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  の防護効果が WP2 において、より大きく現れることと一致する。また、DNA のメチル化に GSH を必要としない MNU では、Fig. 7a, 7b に示したように、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  の防護効果は全く現れなかった。

この結果からも、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  前処理によって GSH 濃度が低下し、このため MNNG による DNA のメチル化が抑制され、結果として致死および突然変異誘発に対して保護効果を示したと推論することができる。

GSH 濃度が減少する機構として、いくつかの可能性が考えられる。一つは、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  が GSH と直接反応して GS-Se-SG を生成し (Kramer *et al.*, 1988)、GSH が消費される。他は、セレンはグルタチオンペルオキシダーゼの構成成分なので、セレンの取り込みによりその合成が誘導され、あるいは活性が高められ、その結果、基質である GSH が消費されることである。大腸菌にグルタチオンペルオキシダーゼが存在するかどうかは、報告によって異なるが (Smith *et al.*, 1979)、我々は、予備的ではあるが、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (200  $\mu\text{M}$ ) 処理によって WP2 のグルタチオンペルオキシダーゼ活性が増加する結果を得ている。

#### 5. 結語

低濃度の  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  前処理は、SOS-mutagenesis を抑制し、UV や 4NQO による突然変異を抑制すること、アルキル化 DNA の修復を促進すること、また、MNNG 細胞毒性に対して抵抗性を誘

導すること、それは GSH 濃度の減少によると考えられることが示唆された。これらの機構がヒトの発がんの抑制にも働くかどうかは不明であるが、その可能性の一つとして、我々はヒト HeLa 細胞に  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  を前処理すると大腸菌の場合と同様に MNNG の細胞毒性を軽減させることを見いだしている。

#### 参 考 文 献

- Boyen, A. F. and G. L. Ellman (1972) A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components, *Anal. Biochem.*, **46**, 639-653.
- Bridges, B. A., R. P. Mottershead, M. A. Rothwell and M. H. L. Green (1972) Repair-deficient bacterial strains suitable for mutagenicity screening: Tests with the fungicide captan, *Chem. Biol. Interact.*, **5**, 77-84.
- 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., U.S.A.*, **82**, 4139-4197.
- Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson and B. N. Ames (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*, *Cell*, **41**, 753-762.
- Demple, B. and J. Halbrook (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*, *Nature*, **304**, 466-468.
- Foster, P. and E. Eisenstadt (1985) Induction of transversion mutations in *Escherichia coli* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine is SOS dependent, *J. Bacteriol.*, **163**, 213-220.
- Hill, R. F. (1958) A radiation sensitive mutant of *E. coli*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **30**, 636-637.
- Kato, T. and T. Shinoura (1977) Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* deficient in induction of mutations by ultraviolet light, *Mol. Gen. Genet.*, **158**, 121-131.
- Kerklaan, P., S. Bouter and G. Mohn (1983) Isolation of a mutant of *Salmonella typhimurium* strain TA1535 with decreased levels of glutathione (GSH<sup>-</sup>), *Mutation Res.*, **122**, 257-266.
- Kosako, M. and H. Nishioka (1982) New forward mutation assay using low-concentration streptomycin resistance mutation in *E. coli* strains with plasmid pKM101, *Sci. Eng. Rev. Doshisha Univ.*, **22**, 239-249.
- Kramer, G. and B. N. Ames (1988) Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) in *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, **201**, 169-180.
- Kuraoka, I., M. Hashimoto, T. Teranishi, T. Nunoshiba and H. Nishioka (1990) Analysis of the role of *umuDC* and *mucAB* proteins for SOS mutagenesis in UV-irradiated *Escherichia coli*, *Sci. Eng. Rev. Doshisha Univ.*, **31**, 1-9.
- Lindahl, T. and B. Sedgwick (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents, *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 133-157.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbour Lab., Cold Spring Harbour, pp. 352-355.
- Nishioka, H. (1975) Mutagenic activities of metal compounds in bacteria, *Mutation Res.*, **31**, 185-189.
- Nunoshiba, T. and H. Nishioka (1984) Protective effect of R-factor plasmid pKN101 on lethal damage by UV and chemical mutagens in *Escherichia coli* strains with different DNA repairing capacities, *Mutation Res.*, **141**, 135-139.
- Nunoshiba, T. and H. Nishioka (1987) Sodium arsenite inhibits spontaneous and induced mutations in *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, **184**, 99-105.
- Oda, V., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa (1985) Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Res.*, **147**, 219-229.
- Ohta, T., K. Watanabe and M. Moriya (1983) Analysis of the antimutagenic effect of cinnamaldehyde on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, **192**, 309-315.
- Ohta, T., M. Watanabe, Y. Shirasu and T. Inoue (1988) Post-replication repair and recombination in *uvrA umuC* strains of *Escherichia coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound, *Mutation Res.*, **201**, 107-112.
- Otsuka, M., V. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1985) Ability of various alkylating agents to induce adaptive and SOS responses: A study with *lacZ* fusion, *Mutation Res.*, **146**, 149-154.
- Rotruck, J. T., A. L. Pole, H. E. Canther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman and W. G. Hoekstra (1973) Biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, **179**, 588-590.
- Samson, L. and J. Cairns (1977) A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*, *Nature*, **267**, 281-283.
- Schrauzer, G. N., D. A. White and G. J. Schneider (1977) Cancer mortality correlation studies-III: Statistical associations with dietary selenium intakes., *Bioinorg. Chem.*, **7**, 23-34.
- Sedgwick, B. and P. Robins (1980) Isolation of mutants of *Escherichia coli* with increased resistance to alkylating agents: Mutants deficient in thiols

- and mutants constitutive for the adaptive response, *Mol. Gen. Genet.*, **180**, 85-90.
- Shamberger, R. T. (1970) Relationship of selenium to cancer. I. Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**, 931-936.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita and T. Kada (1985) Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r, *Mutation Res.*, **149**, 17-23.
- Shinagawa, H., H. Iwasaki, T. Kato and A. Nakata (1983) Cloning and characterization of the *umu* operon responsible for inducible mutagenesis in *Escherichia coli*, *Gene*, **23**, 167-174.
- Shinoura, Y., T. Ise, T. Kato and B. W. Glickman (1983a) *umu* mediated misrepair mutagenesis in *Escherichia coli*: extent and specificity of SOS mutagenesis, *Mutation Res.*, **111**, 51-59.
- Shinoura, Y., T. Kato and B. W. Glickman (1983b) A rapid and simple method for the determination of base substitution and frameshift specificity of

- mutagens, *Mutation Res.*, **111**, 43-49.
- Smith, J. and A. Shrift (1979) Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase, *Comp. Biochem. Physiol.*, **63B**, 39-44.
- Thompson, J. N. and M. L. Scott (1969) Role of selenium in the nutrition of the chick, *J. Nutr.*, **97**, 335-342.
- Walker, G. C. (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, **48**, 60-93.
- Witkin, E. M. (1956) Time, temperature and protein synthesis: A study of UV-induced mutation in bacteria, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **21**, 123-140.
- Yagi, T., D. B. Yarosh and R. S. Day, III (1984) Comparison of repair of O<sup>6</sup>-methylguanine produced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse and human cells, *Carcinogenesis*, **5**, 593-600.

## 「複合作用」について考える

岡山大学 薬学部 早津彦哉

### 1. はじめに

変異原物質の生物に対する影響を考えるに当たって、「複合作用」を知ることは大切である。複数の化合物が同時ないしは近接した時間内に働いて、独特の変異原活性を示す例が数多く知られてきている。それらが、現実に生物影響に結びつくかどうかは、大変むずかしい問題であり、我々の持っている科学知識は、未だそれを十分に論じられる段階には到達していないと考える。我々はどうのような化合物の組合せが、思いもよらぬ複合作用をもたらすかを見つけていく必要がある。そしてその複合作用のメカニズムを明らかにし、次へ

の発展を期することが重要である。

人間が変異原と接触し、それらを身体の中へと取り込んでいく過程で、「複合作用」として興味をひくのは、変異原あるいはその前駆体と、一般環境因子（例えば、空気や光）、さらには生体や食物の成分、などとの相互作用である。また、変異原同志の作用もあるかもしれない (Hayatsu *et al.*, 1988; De Flora *et al.*, 1991) (Fig. 1 参照)。

私達の研究室では、この観点から、Ames test やショウジョウバエ体細胞変異の系を用いて研究を進め、次のようなことを見出している。すなわち、(1) 変異原性が出現したり、増強されたりす

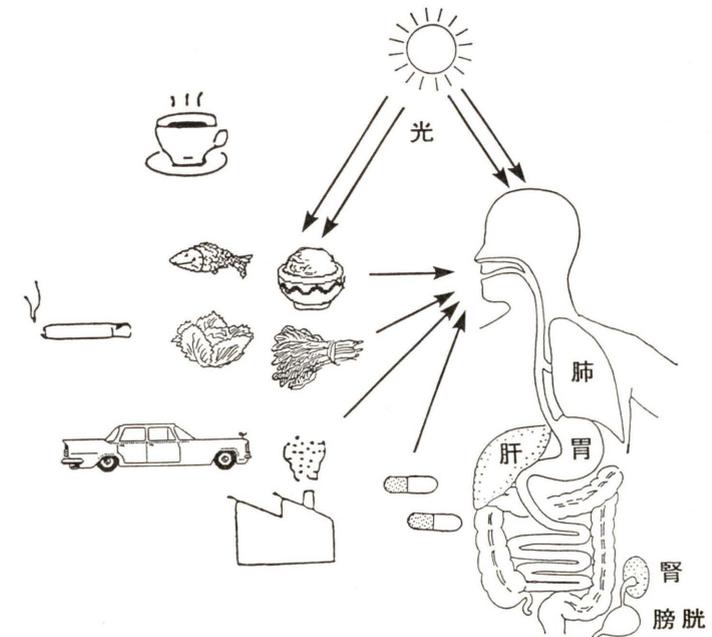


Fig. 1. 変異原物質のソースと複合作用の可能性.

〒700 岡山市津島中 1-1-1

On Modulating Factors for Mutagenic Compounds

Hikoya Hayatsu

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700, Japan

る場合：「ニトロサミン+光」，「米飯+亜硝酸」，「ヘテロサイクリックアミン+ニトロサミン+光」。(2) 変異原性が抑制される場合：「ヘテロサイクリックアミン，多環芳香族+ヘミン，クロロフィル」，「変異原物質+脂肪酸」などである。以下これらの現象につきかいつまんで説明を加える。

## 2. 変異原性が出現したり，増強したりするもの

### (1) ニトロサミン+光

ニトロサミン類は通常 S9 で代謝活性化してはじめて Ames test (TA 100, TA 1535) で変異原性が陽性となる。しかし，我々はブラックライトによる近紫外光照射でニトロソモルホリンが直接変異原物質に変化することを見出した (Hayatsu *et al.*, 1984; Shimada and Hayatsu, 1985)。この活性化にはリン酸イオンの共存が必要であること，ニトロソピロリジン，ニトロソペリジンでも同様の反応が起ることも明らかになった。さらに，この反応生成物を分離し，その構造を研究した結果，ニトロソペリジンから生成する直接変異原は  $\alpha$  位の水酸化体のリン酸エステルであることが分かった (Shimada *et al.*, 1987; Arimoto *et al.*, 1989) (Fig. 2)。

### (2) 米飯と亜硝酸

炊いた白米を 50 mM NaNO<sub>2</sub>, pH 3, 37°C, 1hr 処理し，次いでアセトン抽出，アセトンを溜去した後残る水溶液をブルーレーヨン吸着すると，変異原物質がブルーレーヨン吸着物中に見出された (Hayatsu and Hayatsu, 1989)。これには TA 100, -S9 で陽性な物質が少なくとも 3 種含まれ，TA 98, -S9 で陽性な物質が少なくとも 1 種ある。この変異原性出現は，亜硝酸濃度を 5 mM に下げても観察された。亜硝酸処理によってこれら直接変異原性の生成物を与える前駆体は，米粒本体よりも糠の部分に多く含まれることもわかっている。

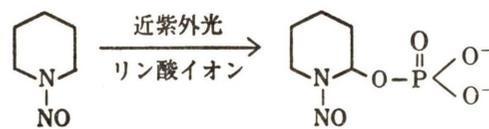


Fig. 2. ニトロソペリジンの光照射による活性化。

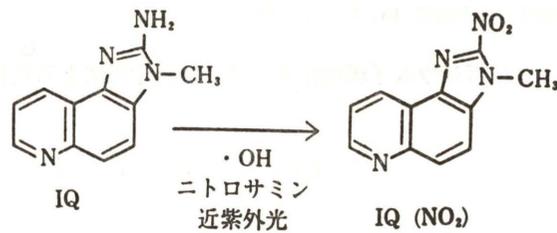


Fig. 3. IQ の酸化をニトロサミンと光が仲介する。

### (3) ヘテロサイクリックアミン+ニトロサミン+光

ニトロサミンに近紫外光を照射すると活性化されることを上にのべたが，この反応液中に IQ を入れておくと，IQ が活性化されて直接変異原になることを見出した (Arimoto and Hayatsu, in press)。このとき起っている化学変化は，Fig. 3 に示したように，IQ(NO<sub>2</sub>) の生成である。恐らく活性酸素が反応に与っていると考えられる。同様の活性化は MeIQ や MeIQx でも起る。またテストした種々のニトロサミンのうちでニトロソジメチルアミンが最も有効であった。

この反応は，2 つの異なる種類の変異原物質が光の媒介で相互作用をする好例と考えられる。

## 3. 変異原性が抑制される場合

### (1) ヘテロサイクリックアミン，多環芳香族+ヘミン，クロロフィル

ヘミンとクロロフィルはいずれもメタロポルフィリン誘導体であり，動植物体中の成分である。我々はこれらのポルフィリン類が Trp-P-2 などのヘテロサイクリックアミン類や，ベンゾ(a)ピレンなどの多環性芳香族炭化水素の変異原性を抑制することを約 10 年以前に見出し研究してきた (Arimoto *et al.*, 1980a; Arimoto *et al.*, 1980b; Arimoto *et al.*, 1987)。この抑制は Ames test で最初観察されたが，その後ショウジョウバエ体細胞変異テスト系でも検出された (Negishi *et al.*, 1989)。後者のテスト系では，幼虫に変異原と抑制物質を摂食させるという方法なので，人間がこれらの物質を食べるという状況に似ている。この抑制は，Fig. 4 に示すような複合体が，ポルフィリン環と変異原物質の間で生成することが原因

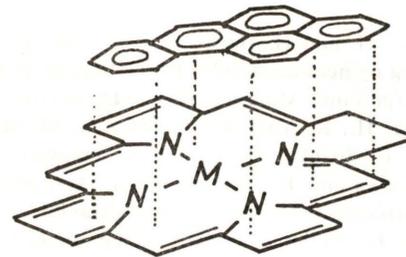


Fig. 4. ポルフィリン環と多環変異原との複合体。

と考えられる (Negishi *et al.*, 1989; Arimoto and Hayatsu, 1989)。

### (2) 変異原物質+脂肪酸

オレイン酸やリノール酸などの長鎖脂肪酸が種々の変異原の Ames test での活性を阻害する (Hayatsu *et al.*, 1981; Hayatsu *et al.*, 1983)。また短鎖脂肪酸がニトロソジメチルアミンの大腸菌 WP 2 に対する変異原性を妨害する (Negishi and Hayatsu, 1984)。オレイン酸が Trp-P-2 の活性を阻害するのは，ミセルを形成し，その中に Trp-P-2 分子を捕捉することによる (Hayatsu *et al.*, 1983)。また C 6 脂肪酸 (caproate) はニトロソジメチルアミンをバクテリアがとり込むステップを阻害することが示された (Negishi and Hayatsu, 1984)。

## 4. 複合作用の意味するもの

実験室内で示されたこれらの複合作用が，実際の環境の場や人間の体内で起りうるかが重要な関心事である。はじめに述べたように，これは判定が困難であり，起り得るとも得ないとも言えない。いろいろな因子がからんでくることは明らかである。私としては，上にのべたいろいろな知見は，当初予想もしなかった興味深い事実であり，それらを見出したことは「複合作用」についていろいろと考えるチャンスを与えてくれた。これらの観察事実と，メカニズムの一部が明らかになったことにより，現実に起り得そうな場面を考える基礎ができたと思う。

## 参考文献

- Arimoto, S. and H. Hayatsu (in press) Formation of 2-nitro-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a directly mutagenic product, by near-ultraviolet irradiation of a mixture of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and N-nitrosodimethylamine, *Mutation Res.*
- Arimoto, S. and H. Hayatsu (1989) Role of hemin in the inhibition of mutagenic activity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-P-2) and other aminoazaarenes, *Mutation Res.*, **213**, 217-226.
- Arimoto, S., T. Negishi and H. Hayatsu (1980a) Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens, *Cancer Letters*, **11**, 29-33.
- Arimoto, S., Y. Ohara, K. Hiramoto and H. Hayatsu (1987) Inhibitory effect of myoglobin and hemoglobin on the direct-acting mutagenicity of protein pyrrolysate heterocyclic amine derivatives, *Mutation Res.*, **192**, 253-258.
- Arimoto, S., Y. Ohara, T. Negishi and H. Hayatsu (1980b) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 662-668.
- Arimoto, S., H. Shimada, S. Ukawa, M. Mochizuki and H. Hayatsu (1989) Formation of directly mutagenic  $\alpha$ -hydroxy-N-nitrosopiperidine phosphate ester by near-ultraviolet irradiation of N-nitrosopiperidine in phosphate buffer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 1140-1146.
- De Flora, S., P. Zanacchi, A. Izzotti and H. Hayatsu (1991) Mechanisms of food-borne inhibitors of genotoxicity relevant to cancer prevention, in *Mutagens in Food: Detection and Prevention*, H. Hayatsu (Ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 157-180.
- Hayatsu, H., S. Arimoto and T. Negishi (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Res.*, **202**, 429-446.
- Hayatsu, H., S. Arimoto, K. Togawa and M. Makita (1981) Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: Inhibition by oleic and linoleic acids, *Mutation Res.*, **81**, 287-293.
- Hayatsu, H. and T. Hayatsu (1989) Mutagenicity arising from boiled rice on treatment with nitrous acid, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 1021-1023.
- Hayatsu, H., K. Hamasaki, K. Togawa, S. Arimoto and T. Negishi (1983) Antimutagenic activity in extracts of human feces, in *Carcinogens and Mutagens in the Environment, Vol. 2: Naturally Occurring Compounds*, H. F. Stich (Ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 91-99.

Hayatsu, H., H. Shimada and S. Arimoto (1984) Activation of promutagenic N-nitrosomorpholine and other N-nitrosoalkylamines by near-ultraviolet irradiation in the presence of phosphates, *Gann*, **75**, 203-206.

Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki and H. Hayatsu (1989) Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4, 3-b] indole (Trp-P-2), *Carcinogenesis*, **10**, 145-149.

Negishi T., and H. Hayatsu (1984) Inhibitory effect of saturated fatty acids on the mutagenicity of N-nitrosodimethylamine, *Mutation Res.*, **135**, 87-

96.

Shimada, H. and H. Hayatsu (1985) Mutagenicity arising by near-ultraviolet irradiation of N-nitrosomorpholine, *Mutation Res.*, **143**, 165-168.

Shimada, H., K. Yakushi, A. Ikarashi, M. Mochizuki, E. Suzuki, M. Okada, S. Yokoyama, T. Miyazawa and H. Hayatsu (1987) Activation of N-nitrosodialkylamines by near-ultraviolet irradiation: Formation of directly acting mutagens and DNA-damaging products, *IARC Scientific Publications*, No. **84**, 364-366.

環境変異原研究 **13**: 89-96 (1991)

教育講演「環境変異原のヒトへの新しいリスク解析法」

## 小核試験の最近の動向

国立衛生試験所変異遺伝部 林 真

### 1. はじめに

マウスの骨髄を用いる小核試験は化学物質の安全性を評価する試験法の一つとして広く用いられている。これは、被験物質をマウスに投与し、一定時間毎に骨髄細胞の塗抹標本を作製して、小核を持つ幼若な赤血球の出現頻度を計測することにより、染色体異常誘発性を評価するものである。この試験法に関しては、米国 EPA の Gene-Tox Program による総説があるので、参照されたい (Heddle *et al.*, 1983; Mavournin, *et al.*, 1990)。

これまでは、化学物質の染色体異常誘発性を評価するために小核試験が用いられてきたが、最近では他の方面にも小核を観察する方法が応用されるようになってきており、技術的な改良も行われている。ここでは、1) aneuploid の検出、2) 末梢血を用いる方法、3) 細胞遺伝学的モニタリング、および 4) 小核検出の機械化の現状の4つのトピックスについて現状をまとめてみたい。

### 2. Aneuploid の検出

小核の観察に特殊染色を施し、aneuploidy を誘発する化学物質を特異的に検出しようとする試みがなされている。Aneuploidy は近年、がん原性、ヒトの先天性異常などの面において重要視されている (Oshimura and Barrett, 1986)。従って、小核を誘発した化学物質が、染色体の構造異常を誘発するものか、または数的な異常を誘発するものかを識別することは重要なことである。自己免疫疾患である強(鞏)皮症(硬皮症, scleroderma pigmentosum, CREST syndrome) の患者の血清に

は、動原体に対する抗体が含まれていることが知られている。その抗体を用いて免疫蛍光抗体法で小核を染色すると、動原体を含むものと、含まないものとを区別することができる。この方法を用いることにより、誘発された小核が染色体の断片に由来するものか、1本または数本の染色体(または染色分体)に由来するものかを同定し、被験物質が aneuploid を誘発するものかどうかを判定しようとするものである。この免疫組織化学的方法 (CREST 法) が、*in vitro* の小核の標本に応用されたのは 1988 年頃からで (Thomson and Perry, 1988; Degross and Tanzarella, 1988; Hennig *et al.*, 1988), *in vivo* のマウス骨髄細胞への適応は 1990 年になってからである (Gudi *et al.*, 1990; Miller and Adler, 1990)。

これまでに発表されたデータの一部を Table 1 にまとめる。染色体の構造異常を誘発する clastogen によって誘発された小核のうち、動原体を持つものの割合は数%程度であるが、数的な異常を誘発する aneuploidogen によって誘発された小核は、高率に動原体を含んでいることが示されている。次に、ヒトリンパ球培養、チャイニーズハムスターの培養細胞株、およびマウス骨髄を用いた実験の陰性対照群に出現した小核のうち、動原体を持っているものの割合を Table 2 に示す。表からもわかるように、自然状態で誘発された小核の約半数は動原体を含んでいることがわかる。このことは、自然状態では、切断や交換型のような染色体の構造異常の他に、数的な異常も同定度の頻度で起こっていることを示唆している。

〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

The present state of the micronucleus assay

Makoto Hayashi

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

Table 1. 動原体を持つ小核の割合 (%)

Clastogen			
X-ray	10.8% (0.5 Gy), 3.4 (2.5)	ヒトリンパ球培養	Tomson & Perry, 1988
	<12	ヒトリンパ球培養	Fenech & Morley, 1989
	9.1 (0.5 Gy), 8.9 (1.0)	CI-1	Degrassi & Tanzarella, 1988
	3.2 (100 rad), 1.8 (150), 2.7 (200), 3.4 (250)	マウス骨髄	Gudi <i>et al.</i> 1990
MMC	4.2 (3E-7M)	ヒトリンパ球培養	Tomson & Perry, 1988
	4.5 (5 mg/kg)	マウス骨髄	Miller & Adler, 1990
MMS	42.4 (50 μM), 28.8 (100), 8.8 (200), 6.3 (300)	CHO	Eastmond & Tucker, 1989
Aneuploidogens			
Benomyl	63.8 (3.44 μM), 74.6 (10.3), 84.8 (34.4)	CHL	Eastmond & Tucker, 1989
Chloral hydrate	79.9 (10E-4M), 89.3 (15E-4M)	CI-1	Degrassi & Tanzarella, 1988
Colcemid	78.6 (2E-7M)	ヒトリンパ球培養	Thomson & Perry, 1988
Colchicine	82-92	ヒトリンパ球培養	Fenech & Morley, 1989
	84.6 (50E-9M), 83.9 (100)	CI-1	Degrassi & Tanzarella, 1988
	66.0 (1.0 mg/kg)	マウス骨髄	Miller & Adler, 1990
Vinblastine sulfate	83.9 (0.022 μM), 94.6 (0.044), 91.0 (0.066), 93.6 (0.088)	CHO	Eastmond & Tucker, 1989
Vincristine sulfate	88.9 (0.1 mg/kg), 79.0 (0.2), 56.9 (0.5), 86.7 (1.0)	マウス骨髄	Gudi <i>et al.</i> , 1990

動原体を持つ小核の割合を % で、かっこ内にそのときの用量を示してある。

Table 2. 陰性対照群にみられた動原体を持つ小核の割合 (%)

61.5%	ヒトリンパ球培養	Thomson & Perry, 1988
46	ヒトリンパ球培養 (20-35歳)	Fenech & Morley, 1989
50	(65歳以上)	
46.8	CH cell line CI-1	Degrassi & Tanzarella, 1988
49.3	CHO	Eastmond & Turcker, 1989
30.0	マウス骨髄	Miller & Adler, 1990

この CREST 法以外にも、細胞の分裂装置に損傷を与えて小核を誘発するような化学物質を検出するための方法が報告されている。Yamamoto ら (1980), Högstedt ら (1985) は、紡錘体阻害剤などによって誘発された小核は、染色体の構造異常由来の小核よりも、大きなことを報告している。また、Vanderkerken ら (1989) は、マウスの骨髄に観察される小核の大きさ、C-バンド染色による染色性、DNA 含量を考慮する方法を報

告している。さらに、セントロメアに対する DNA のプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行う方法も報告されている (Ford *et al.*, 1988)。

Aneuploidogen, spindle poison によって小核が誘発されることはよく知られているが、その生成の機構に関しては不明な点が多い。ここに述べたような特殊染色法を用いることにより、小核生成の機構が clastogen の場合と同様に、aneuploidogen, spindle poison についても解明されることが期待される。

### 3. 末梢血を用いる方法

これまで、*in vivo* 小核試験を行うための実験材料としては、マウスの骨髄が最も一般的に用いられてきた。MacGregor らによって、末梢血中の赤血球を観察することにより、小核の誘発を検出することが示され (1980)、その後、いろいろ

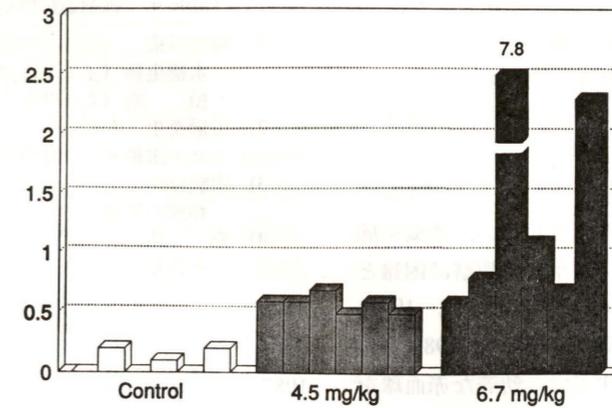


Fig. 1. ラット末梢網赤血球を用いた cyclophosphamide の小核試験。

改良も加えられている (Choy and MacGregor, 1984; Choy *et al.*, 1985)。しかし、動物を生かしたまま経時的に試験できるなど、多くの利点が示されている割には一般化していないようである。その理由の一つとして、標本作製や観察などの技術的な問題が未解決のまま残されている点をあげることが出来る。

末梢血を用いる小核試験は、目的によって大きく2種類に分けることができる。その一つは、成熟した赤血球を観察して、化学物質の長期間処理の影響を評価しようとするものである (Schlegel and MacGregor, 1982; Barale *et al.*, 1985; Jauhar *et al.*, 1988)。ヒトが変異原に暴露されるのは低濃度で長期間のことが多く、遺伝子の突然変異や染色体異常の誘発についても、化学物質の慢性的な影響を評価できる系が必要となる。骨髄中の幼若な赤血球を観察対象とする通常の小核試験では、化学物質の急性的な影響しか評価できないが、末梢の成熟赤血球を観察する方法を用いることにより、慢性的な影響が評価できるはずである。ただし、ヒトやラットでは、末梢血中に出た小核を持つ赤血球は、異常赤血球として脾臓ですみやかに壊されてしまうので、観察対象細胞とはなり難い (Schlegel and MacGregor, 1984)。一方、幸いなことにマウスではこの機能が不完全であるために、小核を有する赤血球も壊されることなく、正常な赤血球と同様の寿命 (約 30 日) を全うする。従って、マウスを用いる限り、少なくとも赤血球の寿命の期間中、小核を有する赤血球を

Table 3. 末梢網赤血球を用いる小核試験の特徴

- 1) 動物を殺さずに試験を行うことができる  
同一個体で経時的な変化を追うことができる  
毒性の蓄積効果などの詳細な検討が出来る  
他の毒性試験と動物を共有することができる
- 2) 赤血球の幼若度を細かく分類することができる  
マウスだけでなくラットも使うことができる
- 3) AO 染色のために信頼性の高い観察ができる  
ラットの肥満細胞顆粒の識別もできる
- 4) 実験操作が簡単である
- 5) 標本は長期保存できないので、作製後速やかに観察しなければならない

蓄積することができ、被験物質の比較的長期間投与の影響を評価することができる。ただし、実際には化学物質の長期投与の影響を評価したデータは少なく、これまでに benzene (Barale *et al.*, 1985; Choy *et al.*, 1985; Rithidech *et al.*, 1988), 1,3-butadiene (Jauhar *et al.*, 1988) など少数例が報告されているのみである。

他の一つは、末梢血中の幼若赤血球を観察するもので、骨髄中の多染性赤血球を用いる小核試験と同等の結果を得ようとするもので、MacGregor ら (1980, 1990), Tice ら (1987) の報告がある。ここでは著者らが開発中の、アクリジンオレンジ (A. O.) の超生体染色法による末梢の網赤血球を観察する方法 (Hayashi *et al.*, 1990) を紹介する。Table 3 に末梢網赤血球を用いる小核試験の特徴をまとめておく。なおこの A. O. 超生体染色法は、JEMS・MMS 分科会の第 5 回共同研究でその有効性が評価された。この共同研究には 46 機関が参加し、23 種類の作用機序の異なる化学

物質について実験が行われた。その結果、機関間で再現性の良い小核の誘発が観察された。このことは、末梢網赤血球を観察する A. O. 超生体染色法が、化学物質の安全性評価のための試験法として適用可能なことを示している。

前にも述べたように、ラットやヒトでは脾臓で小核を持った赤血球は壊されてしまい、脾臓を摘出したラットやヒトでないと小核の観察は困難とされていた (Schlegel and MacGregor, 1984; Schlegel *et al.*, 1986; Everson *et al.*, 1988)。しかし、A. O. 超生体染色法では、幼若な赤血球をさらに細かく分類することが可能になり、非常に幼若な網赤血球 (I 型および II 型) のみを観察対象とすることにより、ラットの末梢血も小核試験のための実験材料として使えることが判明した。一例を Fig. 1 に示す。これは、cyclophosphamide を 42 日間経口投与したラットから採血して、小核の誘発性をみたものである。4.5 mg/kg といった低用量群においても、対照群と比較して有意な小核の誘発が観察できた。このことは、他の一般毒性試験の動物 (マウスでもラットでも) より採血して、小核用の標本をつくることにより、被験物質の染色体異常誘発性を同時に検討することが可能であることを示している。

ヒトの末梢赤血球においても、小核が観察できることを示唆するような報告 (Schlegel *et al.*, 1986) がある。この A. O. 超生体染色法を適応することによって、化学療法の影響を末梢血で簡便にモニターできるようになれば、臨床面においても利用価値が高いものと思われる。

さらに、末梢血は非常に均質な細胞集団であり、小核試験の機械化のためにも、良好な材料となることが期待される。

#### 4. 細胞遺伝学的モニタリング

小核試験を用いたモニタリングとして次のようなものが考えられる (Table 4)。

環境汚染、特に水質汚染のモニタリングの目的で、両生類 (Jaylet *et al.*, 1986a, 1986b; Gauthier *et al.*, 1989; Van Hummelen *et al.*, 1989) や魚類 (Hooftmen and de Raat, 1982; Das and Nanda 1986; Maddock *et al.*, 1986; Hose *et al.*,

Table 4. 細胞遺伝学的モニタリング

1) 環境汚染	水棲生物 (イモリ, ツメガエル, 魚類) 植 物 (ムラサキツユクサ)
2) 労働衛生	ヒト末梢リンパ球培養
3) 実験疫学	粘膜の剝離細胞
4) 臨 床	骨髓細胞 摘脾患者の末梢血

1987) の末梢血を用いて、小核の誘発を測定し、汚染の有無の推定をしようとする試みがある。一般的に魚類の染色体は哺乳類のものと比較して、数が多く、小さい。よって、染色体異常や姉妹染色分体交換を直接観察するには多くの困難を伴う。一方、小核試験では直接染色体を観察する必要はなく、核型に関係なく実験材料を目的に応じて選択できることが特徴の一つである。したがって、染色体の数がいかに多くても、また、いかに小さくとも、そのこと自体が実験の障害とはならない。ただし、現状はまだ方法を開発している段階であり、今後具体的なデータの蓄積が期待される。

次に、労働衛生の分野で、工場労働者を対象とした研究が行われている。すなわち、労働環境における変異原に対する暴露状況を把握する手法として、小核を観察する方法が採用されるようになってきた。この目的には、ヒトの末梢リンパ球培養を用いる方法が一般的に用いられている。この方法の難しい点は、いかにして観察対象細胞を限定するかにある。ヒトが化学物質に暴露されることによって付いた DNA 上の傷を正確に反映させるには、最初の分裂が終了してから、2 回目の分裂に入るまでの細胞のみを観察対象としなければならない。現在最も広く用いられている方法は、細胞核の分裂には影響を与えないが、細胞質の分裂を阻害することが知られている cytocharasin B (Cyt-B) を用いて 2 核細胞を作り、その細胞を観察対象とするものである (Feneck and Moley, 1985)。しかし、Cyt-B 自体に細胞毒性があり、多極分裂にともなった小核の出現が観察されている (Norppa *et al.*, 1990)。Cyt-B に代る方法と

して、BrdU をリンパ球培養に加え、抗 BrdU 抗体を用いて免疫組織学的に識別しようとする試みもなされている (Norppa *et al.*, 1990)。

ヒトリンパ球培養を用いた小核試験についても、具体的なデータの報告は ethylene oxide (Högstedt *et al.*, 1983a), styrene (Högstedt *et al.*, 1983b; Nordenson and Beckman, 1984), cyclophosphamide (Sorsa *et al.*, 1988) など数種に限られている。

疫学の分野においても、口腔粘膜や、食道の粘膜の剝離細胞に出現する小核を観察する方法が用いられており、intervention study などの endpoint の 1 つとして使われている (Stich, 1987; Muñoz *et al.*, 1987)。ただし、この剝離した表皮細胞を用いる方法は、小核の出現様式、出現のタイミングや存在時間など不明な点も多く、方法論的にも確立しているとはいえず、まだまだ改良の余地が残されている。

臨床面においては、小核の出現頻度をみることによって、化学療法を受けている患者の状況を監視するための指標の一つとすることが考えられている。骨髓細胞に出現する小核を観察した報告もあるが (Abe *et al.*, 1984)、サンプルの採取を考えると、末梢血を用いる方法が優れている。すでに末梢赤血球を用いる方法も試みられており (Schlegel *et al.*, 1986)、今後この方面の研究が盛んになることが期待される。

#### 5. 小核検出の機械化

小核を持つ細胞を機械的に測定しようとする試みは、ここ数年にわたってなされているが、現実に稼働しているものはほとんどない。手法的に大きく分けると、イメージアナライザを用いる方法と、フローサイトメータを用いる方法がある。小核試験の機械化が期待される理由としては、小核は小さな球状構造体として観察され、画像としては非常に単純な形状であることと、哺乳類の赤血球を観察対象細胞とする場合には、唯一の DNA を包含する細胞内構造体であることがあげられる。前者はイメージアナライザを用いて小核の同定を試みる場合に大きな利点となり、後者はフローサイトメータを用いて機械化する根拠になっている。

上記のように、ある意味では理想的な状況にあるにもかかわらず、未だに機械化が完成していない理由として、小核の出現頻度が非常に低いこと、標的が非常に小さいことなどが考えられる。頻度が低いために、小核同定の精度の高さが要求される。イメージアナライザ、フローサイトメータ共にある精度で小核を同定する事は現時点でも可能である。ただし、実用化するためには少なくとももう一桁精度を高めなければならない。次に標的が小さい点に関しては、光学顕微鏡の理論分解能に近いところでデータを取らねばならないし、フローサイトメータに関しても蛍光検出器の感度を上げなければならない。顕微鏡の光学系が直接結果に反映されること、フローサイトメータ

Table 5. イメージアナライザと顕微鏡観察結果の比較

	New cellulose column method (Purified PE/NE fraction)				Schmid method (Whole bone marrow)			
	Automatic		Manual		Manual		Manual	
	MN	PE/E	MN	PE/E	MN	PE/E	MN	PE/E
Control	%	%	%	%	%	%	%	%
1st count	0.26	55.3	0.28	52.8	0.02	46.0		
2nd count	0.22	55.6	0.18	51.9	0.04	47.0		
3rd count	0.26	55.4	0.20	50.7	0.14	47.6		
TEM								
1st count	5.63	48.4	6.08	46.9	3.88	44.0		
2nd count	5.69	48.6	6.12	44.7	5.04	37.7		
3rd count	5.75	48.0	6.70	43.2	4.00	38.8		

Romagna and Staniforth (1989) の Table 6 の一部を引用。

の感度を上げることによりS/N比が悪くなるなどの点を考慮しなければならず、ハード面の改良を含めた取り組みが必要である。

イメージアナライザで、げっ歯類の赤血球を観察するものには、Romagna と Staniforth (1989) が開発しているシステムがあり、現在最も完成度の高いものであると考えられる。彼らの発想は、標本の作製に時間と手間暇をかけて、できるだけ均一で良好な標本をつくり、機械による観察精度を高めようとするものである。そのために、セルロースカラムを用いて骨髓細胞集団より赤血球だけを分離し、ノイズの少ない標本を作製して、測定誤差を可能な限り軽減する試みをしている。さらに、このセルロースカラムを用いると、ギムザ染色で〈偽の小核〉として観察されるラットの肥満細胞由来の顆粒も除去されるので、ラットもマウス同様に用いることができる。Table 5 に Romagna と Staniforth (1989) の結果の一部を引用する。この表より、機械で測定した結果と、顕微鏡観察の結果の間に大きな差の無いこと、さらに、機械で測定したものが、ばらつきの少ない結果が得られていることがわかる。

Cyt-B 法によるヒトリンパ球培養を用いた標本を、イメージアナライザで測定しようとする試みが、Tates ら (1990) によってなされている。Gallocyanin, naphthol yellow-S で二重染色した標本を用いて、顕微鏡のイメージをコンピュータに取り込み、核が2つ同一細胞質中にあるかどうかの確認と、小核の同定をコンピュータに行わせるものである。画面上にコンピュータが判定した結果が表示され、同時に結果が集計、記憶されるシステムになっている。

最後に、フローサイトメータによる機械化の現状に関しては、いくつかの研究室で試みられているが、未だに実用の段階に入ったものはない。フローサイトメータは小核を持った赤血球を認識する事は可能であるし、マウスの骨髓細胞や末梢血を用いた場合に、顕微鏡観察の結果と良く相関するデータも得られている (Hayashi *et al.*, 1990)。しかし、測定に伴うノイズの制御が困難であり、この節のはじめにも述べたようにS/N比を充分高めることが最大の課題として残っている。

## 6. おわりに

以上みてきたように、小核試験は化学物質の安全性を評価するための一試験法としてだけではなく、その特性を生かして他の分野にも応用されるようになってきた。また、免疫学的、分子生物学的な手法を用いることにより、小核誘発物質を clastogen と aneuploidogen に区別することが可能になりつつある。今後、小核を観察するという手法が毒性学の分野のみならず、他の分野でも幅広く用いられること、また、他の分野で得られた知識を導入することにより、小核を観察することの質的な改良がなされることが期待される。

## 参考文献

Abe, T., T. Isemura and Y. Kikuchi (1984) Micronuclei in human bone-marrow cells: Evaluation of the micronucleus test using human leukemia patients treated with antileukemic agents, *Mutation Res.*, **130**, 113-120.

Barale, R., R. Giorgelli, L. Migliore, R. Ciranni, D. Casini, D. Zucconi and N. Loprieno (1985) Benzene induces micronuclei in circulating erythrocytes of chronically treated mice, *Mutation Res.*, **144**, 193-196.

Choy, W. N. and J. T. MacGregor (1984) Density-gradient enrichment of newly-formed mouse erythrocytes, *Mutation Res.*, **130**, 159-164.

Choy, W. N., J. T. MacGregor, M. D. Shelby and R. T. Maronpot (1985) Induction of micronuclei by benzene in B6C3F1 mice: Retrospective analysis of peripheral blood smears from the NTP carcinogenesis bioassay, *Mutation Res.*, **143**, 55-59.

Das, R. K. and N. K. Nanda (1986) Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent, *Mutation Res.*, **175**, 67-71.

Degrassi, F. and C. Tanzarella (1988) Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: A new assay for the detection of aneuploidy, *Mutation Res.*, **203**, 339-345.

Eastmond, D. A. and J. D. Tucker (1989) Kinetochores localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: A new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents, *Mutation Res.*, **224**, 517-525.

Everson, R. B., C. M. Wehr, G. L. Erexson and J. T. MacGregor (1988) Association of marginal folate depletion with increased human chromosomal damage *in vivo*: Demonstration by analysis of micronucleated erythrocytes, *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**,

525-529.

Fenech, M. and A. A. Morley (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, **147**, 29-36.

Ford, J. H., C. J. Schultz and A. T. Correll (1988) Chromosome elimination in micronuclei: A common cause of hypoploidy, *Am. J. Hum. Genet.*, **43**, 733-740.

Gauthier, L., Y. Levi and A. Jaylet (1989) Evaluation of the clastogenicity of water treated with sodium hypochlorite or monochloramine using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles waltl*), *Mutagenesis*, **4**, 170-173.

Gudi, R., S. S. Sandhu and R. S. Athwal (1990) Kinetochores identification in micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes: An assay for the detection of aneuploidy-inducing agents, *Mutation Res.*, **234**, 263-268.

Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.*, **245**, 245-249.

Hayashi, M., H. Norppa, T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1990) Automation of mouse micronucleus test by flow cytometry and image analysis, *Cytometry*, **sup. 4**, 35.

Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell, M. F. Salamone (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **123**, 527-449.

Henning, U. G. G., N. L. Rudd and D. I. Hoar (1988) Kinetochores immunofluorescence in micronuclei: A rapid method for the *in situ* detection of aneuploidy and chromosome breakage in human fibroblasts, *Mutation Res.*, **203**, 405-414.

Högstedt, B., B. Gullberg, K. Hedner, A.-M. Kolnig, F. Mitelman, S. Skerfving and B. Widegren (1983a) Chromosome aberrations and micronuclei in bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes in human exposed to ethylene oxide, *Hereditas*, **98**, 105-113.

Högstedt, B., B. Akesson, K. Axell, B. Gullberg, F. Mitelman, R. W. Pero, S. Skerfving and H. Welinder (1983b) Increased frequency of lymphocyte micronuclei in workers producing reinforced polyester resin with low exposure to styrene, *Scand. J. Work Environ Health*, **9**, 241-246.

Högstedt, B. and A. Karlsson (1985) The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used, *Mutation Res.*, **156**, 229-232.

Hoofman, R. N. and W. K. de Raat (1982) Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the pe-

ripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate, *Mutation Res.*, **104**, 147-152.

Hose, J. E., J. N. Cross, S. G. Smith and D. Diehl (1987) Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California, *Marine Environ. Res.*, **22**, 167-176.

Jauhar, P. P., P. R. Henika, J. T. MacGregor, C. M. Wehr, M. D. Shelby, S. A. Murphy and B. H. Margolin (1988) 1,3-Butadiene: induction of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of B6C3F1 mice exposed by inhalation for 13 weeks, *Mutation Res.*, **209**, 171-176.

Jaylet, A., P. Deparis, V. Ferrier, S. Grinfeld and R. Siboulet (1986a) A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution, *Mutation Res.*, **164**, 245-257.

Jaylet, A., F. Deparis and D. Gaschignard (1986b) Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of axolotl larvae following *in vivo* exposure to mutagenic agents, *Mutagenesis*, **1**, 211-215.

MacGregor, J. T., C. M. Wehr and D. H. Gould (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test, *Environ. Mutagen.*, **2**, 509-514.

MacGregor, J. T., C. M. Wehr, P. R. Henika and M. D. Shelby (1990) The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fund. Appl. Toxicol.*, **14**, 513-522.

Maddock, M., H. Northrup and T. J. Ellingham (1986) Induction of sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in hematopoietic tissue of a marine fish following *in vivo* exposure to genotoxic carcinogens, *Mutation Res.*, **172**, 165-175.

Mavournin, K. H., D. H. Blakey, M. C. Cimino, M. F. Salamone and J. A. Heddle (1990) The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **239**, 29-80.

Miller, B. M. and I.-D. Adler (1990) Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, *Mutagenesis*, **5**, 411-415.

Muñoz, N., M. Hayashi, L. J. Bang, J. Wahrendorf, M. Crespi and F. X. Bosch (1987) Effect of riboflavin, retinol, and zinc on micronuclei of buccal mucosa and esophagus: A randomized double-blind intervention study in China, *J. Natl. Cancer Inst.*, **79**, 687-691.

Nordenson, I., and L. Beckman (1984) Chromosomal aberrations in lymphocytes of workers exposed to

low levels of styrene, *Human Hered.* **34**, 178-182.  
 Norppa, H., M. Hayashi, J. Maki-Paakkanen and M. Sorsa (1990) The micronucleus assay in lymphocytes, in *Mutation and the Environment*, Part B, pp. 207-216, Wiley-Liss, Inc.  
 Oshimura, M. and J. C. Barrett (1986) Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: Mechanisms and biological significance in cancer, *Environ. Mutagen.*, **8**, 129-159.  
 Rithidech, K., W. W. Au, V. M. S. Ramanujam, E. B. Whorton, Jr. and M. S. Legator (1988) Persistence of micronuclei in peripheral blood normochromatic erythrocytes of subchronically benzene-treated male mice, *Environ. Mol. Mutagen.*, **12**, 319-329.  
 Romagna, F. and C. D. Staniforth (1989) The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, **213**, 91-104.  
 Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1982) The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: Detection of chronic chromosome breakage in mice, *Mutation Res.*, **104**, 367-369.  
 Schlegel, R. and J. T. MacGregor (1984) The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fisher 344 rats: Implications for cytogenetic screening, *Mutation Res.*, **127**, 169-174.  
 Schlegel, R., J. T. MacGregor and R. B. Everson (1986) Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes, *Cancer Res.*, **46**, 3717-3721.  
 Sorsa, M., L. Pyy, S. Salomaa, L. Nylund and

J. W. Yager (1988) Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals, *Mutation Res.*, **204**, 465-479.  
 Stich, H. F. (1987) Micronucleated exfoliated cells as indicators for genotoxic damage and as markers in chemoprevention trials, *J. Nutr. Growth Cancer*, **4**, 9-18.  
 Tates, A. D., M. T. van Welie and J. S. Ploem (1990) The present state of the automated micronucleus test for lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.*, **58**, 813-825.  
 Thomson, E. J. and P. E. Perry (1988) The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy, *Mutagenesis*, **3**, 415-418.  
 Tice, R. R., C. A. Luke and M. D. Shelby (1987) Methyl isocyanate: An evaluation of *in vivo* cytogenetic activity, *Environ. Mutagen.*, **9**, 37-58.  
 Van Hummelen, P., C. Zoll, J. Paulussen, M. Kirsch-Volders and A. Jaylet (1989) The micronucleus test in *Xenopus*: a new and simple '*in vivo*' technique for detection of mutagens in fresh water, *Mutagenesis*, **4**, 12-16.  
 Vanderkerken, K., Ph. Vanparys, L. Verschaeve and M. Kirsch-Volders (1989) The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens, *Mutagenesis*, **4**, 6-11.  
 Yamamoto, K. I. and Y. Kikuchi (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, *Mutation Res.*, **71**, 127-131.

教育講演「環境変異原のヒトへの新しいリスク解析法」

<sup>32</sup>P-ポストラベル法による DNA 付加体の解析

国立がんセンター研究所 発がん研究部 若林敬二, 広瀬美砂子, 落合雅子

1. はじめに

ある化学物質が細胞内で DNA と共有結合するか否か, つまり DNA 付加体を生じるか否かを調べる事は, その化学物質の突然変異原性及び発がん性を知る上で有用である。放射性同位元素 (RI) で標識した化学物質を用いて DNA 付加体を検出することは, 最も一般的かつ容易な方法である。しかし, この方法は RI で標識された化学物質が入手可能な場合に限られ, またそのような化学物質は高価であるという欠点がある。非放射性の化学物質を用いて DNA 付加体を調べるには, GC-MS や HPLC-蛍光スペクトルにより検出する方法がある。また DNA 付加体に対する特異的な抗体を作成し, 免疫学的手法を用いた検出も行われている。近年, これ以外の方法として, <sup>32</sup>P-ポストラベル法が Randerath らにより開発された。この方法は RI で標識された化学物質を用いず, DNA 試料も少量で分析可能であり, さらには DNA 付加体の検出感度が高いことなどの利点がある。本稿では, この <sup>32</sup>P-ポストラベル法についてその方法を示し, また現時点での問題についても考察する。

2. <sup>32</sup>P-ポストラベル法の実際

<sup>32</sup>P-ポストラベル法は, 最初はアルキル化剤による DNA 修飾の検出法として開発された (Randerath *et al.*, 1981)。その後芳香族炭化水素化合物による DNA 付加体は, 弱塩基性イオン交換体を用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) により正常ヌクレオチドと分離できることがわかった

(Gupta *et al.*, 1982)。これにより効率よく DNA 付加体を検出することができ, 検出感度が上昇した。その後, いくつかの変法も開発されている。以下に簡略にその方法について述べ, 我々の実験結果も併せて紹介する。

(1) 方法の概略

Randerath らが最初に開発したスタンダード法を Fig. 1 に示す (Randerath *et al.*, 1982)。Fig. 2 に示す adduct 増感法 (Randerath *et al.*, 1985), nuclease P1 法 (Reddy and Randerath,

<sup>32</sup>P-Postlabeling Method

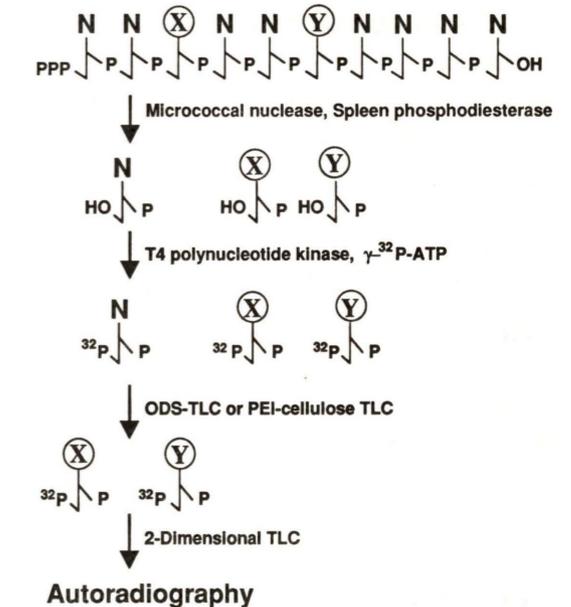


Fig. 1. <sup>32</sup>P-Postlabeling Method.

〒104 東京都中央区築地 5-1-1

Analysis of DNA adducts by <sup>32</sup>P-postlabeling method  
 Keiji Wakabayashi, Misako Hirose and Masako Ochiai  
 National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

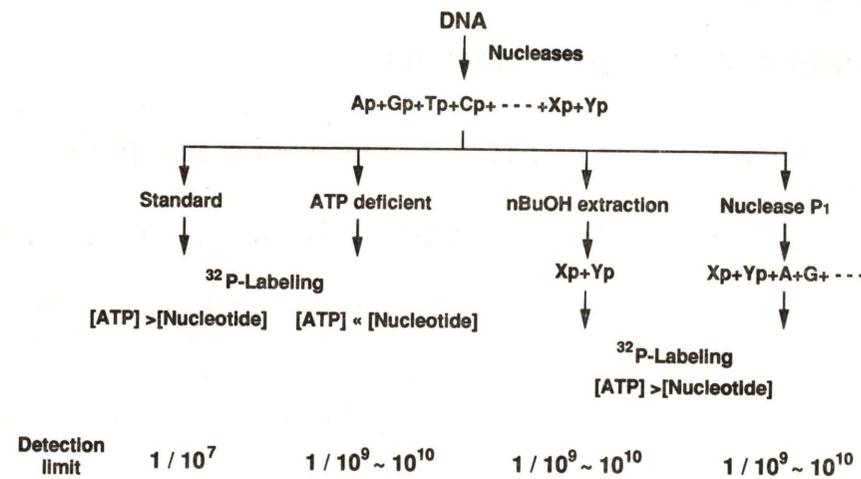


Fig. 2.  $^{32}\text{P}$ -Labeling.

1986), butanol 抽出法 (Gupta, 1985) はこれの変法であり, 原理的には 4 法とも同じである。スタンダード法は, 以下の 5 つの連続した過程から成る (Fig. 1)。

- ① 組織から抽出した DNA を micrococcal nuclease と spleen phosphodiesterase を用いて deoxyribonucleoside 3'-monophosphate にまで分解する。
- ② T4 polynucleotide kinase と  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP により  $^{32}\text{P}$ -リン酸基を nucleotide の 5' 側に導入し, 5'- $^{32}\text{P}$ -deoxynucleoside 3',5'-bisphosphate を得る。なお, この後, apyrase の添加により過剰の ATP を分解する。
- ③ ODS シート又は polyethyleneimine (PEI) cellulose シートを用いて, 正常ヌクレオチドを除去する。
- ④ TLC により, 付加体を二次元展開する。
- ⑤ オートラジオグラフィにより, 付加体を検出する。

上記の各段階についていくつかの変法があるので, 以下にそれらについて述べる。

#### (2) $^{32}\text{P}$ -標識

Fig. 2 に示すように, 4 種類の方法では標識に用いる DNA 分解物の量, 分解産物の処理方法, および使用する  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP の比活性が違い, 試験する化合物により用いる方法が異なってくる。

#### (i) スタンダード法

この方法は定量的であるが, 付加体の検出感度は  $10^7$  nucleotide 当たり 1 個程度と低く, 実際には *in vitro* で付加体形成を調べる場合や, 変異原・がん原物質を実験動物に大量に投与した場合の付加体検出にしか利用できない (Gupta *et al.*, 1982)。

#### (ii) Adduct 増感法

T4 polynucleotide kinase は,  $^{32}\text{P}$ -リン酸の受容分子となる deoxyribonucleoside 3'-monophosphate が ATP より圧倒的に多く存在すると, 正常 nucleotide よりも付加体を持つ nucleotide に対して親和性が強くなるという性質がある。これを利用して付加体の検出感度を上昇させたのが本法である。しかし, この方法単独では定量性がない為, 付加体の定量のためにはスタンダード法との併用が必要である。

#### (iii) Butanol 抽出法

この方法と, 次に述べる nuclease P1 法は, 付加体の検出感度が高く, 定量性がある方法である。これは DNA 分解産物から, 付加体 nucleotide を n-butanol を用いて特異的に抽出し, これを比活性の高い  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP でラベルするという原理からなる。実際には, 2-naphthylamine や 2-acetylaminofluorene など arylamine の付加体検出に用いられる。

#### (iv) Nuclease P1 法

Nuclease P1 は, 核酸分解酵素活性とは別に,

3' 脱リン酸化酵素活性も有する。付加体 nucleotide の多くは, この nuclease の脱リン酸化作用に抵抗性を持つので, 正常 nucleotide を選択的に nucleoside に分解する事ができる。Nucleoside は T4 polynucleotide kinase の基質にならないため付加体のみを特異的に検出できる。この方法は, 芳香族炭化水素化合物の付加体検出に用いられている。

#### (3) 正常 nucleotide の除去

付加体のみを特異的に解析するために,  $^{32}\text{P}$ -標識された nucleotide から, 量的に圧倒的に多い正常 nucleotide を除去しなければならない。Butanol 抽出法, および nuclease P1 法の場合も混入してくる正常 nucleotide が付加体よりも多いため, やはり除去を行う必要がある。この操作は, 薄層クロマトグラフィーを用いて行う。展開条件により正常 nucleotide のみを移動させ, 付加体を展開原点にとどめることができる。展開後, 原点の部分を取り取り, 付加体を解析する。展開に用いる薄層シートは付加体を形成した化学物質により使い分けられ, 1~2 環性の化合物の場合には ODS シート (Randerath *et al.*, 1984), 3 環性以上ものは PEI-cellulose シートを用いる (Gupta *et al.*, 1982; Lu *et al.*, 1986)。尚, ODS シートを用いた場合には, 付加体を ODS シートから PEI-cellulose シートに移す操作が必要である。

#### (4) 付加体の展開

付加体は二次元 TLC により解析する。展開液は 4.5 M ギ酸リチウム, 尿素 (pH 3.5) を縦方向に, 0.8 M 塩化リチウム, 0.5 M Tris-HCl, 8.5 M 尿素 (pH 8.0) を横方向の展開に使用する。解析する付加体により, これらの展開液を適当に水で希釈して使用する。展開後, オートラジオグラフィにより付加体を検出する。

$^{32}\text{P}$ -ポストラベル法では, 放射比活性の非常に強い  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP を用いるので, 被曝を極力避ける必要がある。我々は, アクリル板で遮へいした中で実験を行い, 鉛入の防護エプロンを着用している。更に, 実験者の皮膚への被曝量を減らす事も必要である。サンプルを TLC シートにスポットする際もフタがスライド式のアクリル板の箱を

用いている。正常 nucleotide を除去するまでは, TLC の展開もアクリル板で遮へいしている。

#### 3. $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の応用

2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) は, 加熱食品に含まれる変異原・がん原物質である。MeIQx の発がん実験で用いられた濃度である 400 ppm の MeIQx を含む飼料を 4 週間投与したラット肝臓の DNA 付加体を, Fig. 2 に示す 4 種類の  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法で解析した。付加体の分子種は, スタンダード法では 7 種類, adduct 増感法では 6 種類, butanol 抽出法及び nuclease P1 法ではそれぞれ 5 種類及び 4 種類であった (Fig. 3)。一方, 付加体レベルは, スタンダード法及び nuclease P1 法では  $10^7$  nucleotide 当たり約 50 個とほぼ同じであったが, butanol 抽出法では  $10^7$  nucleotide 当たり約 1 個と, スタンダード及び nuclease P1 法に比べ非常に低かった。スタンダード法及び nuclease P1 法の検出効率がほぼ同じなのに, オートラジオグラフィ上の分子種類が異なる原因としては, スタンダード法では DNA の mononucleotide への分解が完全に行われず, dinucleotide, trinucleotide に由来するスポットが検出されている可能性が考えられる。以上の如く, MeIQx の付加体検出には nuclease P1 法が最適であると考えられる。他の heterocyclic amine である IQ の付加体においても, 同様な結果が得られた。

#### 4. $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の問題点

ポストラベル法は, 化学物質による DNA 付加体の生成を比較的短時間で, 極めて高感度に検出できる方法であり, 環境化学物質のヒトへの曝露量を測定するための有効な手段であると期待されている。しかしながら, これまでの方法では検出された付加体の構造がわからないという大きな問題がある。また, メチル化やエチル化などのアルキル付加体も検出できない。更にポストラベル法における DNA 付加体量の検出効率がよく検討されていない。最近, これら問題点の解決方法がいくつか提案されている。以下, それらについて記す。

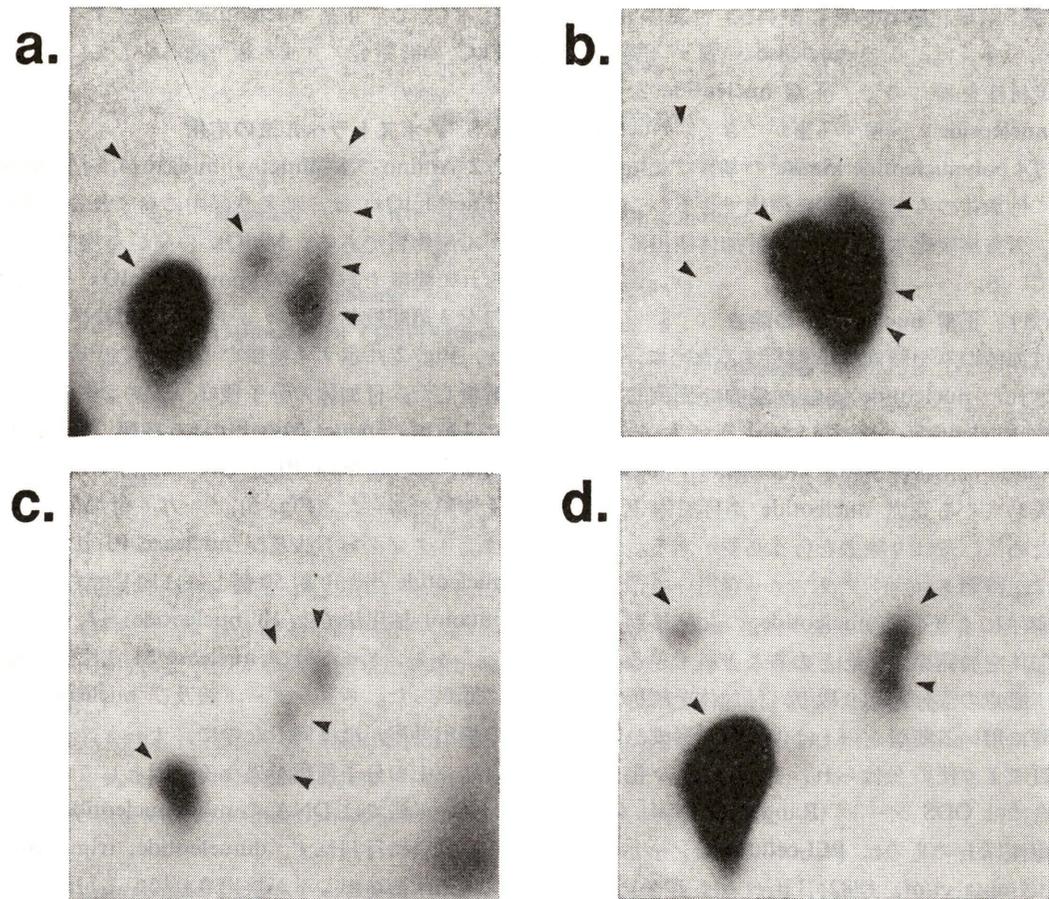


Fig. 3. MeIQx 投与により生成されるラット肝のDNA 付加体。  
MeIQx を 0.04% 含む飼料をラットに 4 週間投与した。a. スタンダード法, オートラジオグラフィ 22 時間, b. adduct 増感法, 1 時間, c. butanol 抽出法, 2 時間, d. nuclease P1 法, 1 時間。

付加体の構造解析には、目的とする化学物質と DNA との付加体をあらかじめ合成し、*in vivo* で生成した DNA 付加体と比較、検討する方法がある。即ち、既知の構造の DNA 付加体と *in vivo* で生成された DNA 付加体を TLC 及び HPLC で co-chromatography を行い、DNA 付加体の構造を決定することが可能である。

メチル基やエチル基などの小分子が付加した DNA 付加体の検出法が最近報告された。Wilson ら (1988) は HPLC とポストラベル法を組み合わせることにより、感度良く O<sup>6</sup>-methyldeoxyguanosine を検出している。これは DNA 分解産物を HPLC であらかじめ正常ヌクレオチドと O<sup>6</sup>-methyldeoxyguanosine 3'-monophosphate と

を分離した後、<sup>32</sup>P-標識を行う方法である。Shields (1990) らはこの方法を N<sup>7</sup>-methyldeoxyguanosine の検出に応用している。また、他の小分子の付加した DNA 付加体の検出にも有効と思われる。

ポストラベル法における DNA 付加体の検出効率は、<sup>3</sup>H あるいは <sup>14</sup>C で標識した化合物を用いて <sup>3</sup>H もしくは <sup>14</sup>C の放射活性より定量した DNA 付加体量と、ポストラベル法により求めた DNA 付加体量とを比較し、算出できる。例えば、<sup>3</sup>H で標識した 1'-hydroxy-2',3'-dehydroestrageole をマウスに投与し、肝臓に生成した DNA 付加体量を <sup>3</sup>H の放射活性及びポストラベル法により分析すると、<sup>3</sup>H の放射活性より算出した DNA 付加体量に対し、ポストラベル法での付加

Table 1. Tissue Distribution of Smoking-associated DNA Adducts

Subject	DNA adducts/10 <sup>8</sup> nucleotides					
	Heart	Lung	Bronchus	Aorta	Bladder	Liver
I	10	1.8	2.5	2.0	2.2	1.0
II	8.0	6.2	4.0	3.0	2.5	1.8

I: 29 yr, Female, 20 cigarettes/day

II: 55 yr, Male, 30 cigarettes/day

(E. Randerath *et al.*, 1989)

体検出効率は 60~80% であると報告されている (Fennell *et al.*, 1986)。また、<sup>3</sup>H-benzo[a]pyrene を培養細胞に取り込ませ求めたポストラベル法の検出効率は、約 70% であった (Jahnke, *et al.*, 1990)。更に <sup>14</sup>C-MeIQx をラットに投与し、肝臓における DNA 付加体量を nuclease P1 を用いたポストラベル法で分析するとその検出効率は 52% であることがわかった。以上の如く、ポストラベル法による DNA 付加体の検出効率は 52~80% であり、付加体量を定量する際に、これらの値を考慮に入れる必要がある。

### 5. 環境発がん物質へのヒト曝露量の測定

Randerath (1989) らは喫煙者の臓器 DNA から、非喫煙者では見られない DNA 付加体を検出している。6 種類の臓器における喫煙に由来する付加体の量を Table 1 に示す。I, II 両者ともに心臓で最も高い付加体レベルが検出された。また、鉄工場労働者の白血球 DNA から芳香族炭化水素化合物に由来する DNA 付加体が 10<sup>8</sup> ヌクレオチド当たり 0.2-10.0 個検出されている (Phillips, *et al.*, 1988)。しかし、喫煙者及び鉄工場労働者から検出された DNA 付加体の構造は明らかにされていない。

ポストラベル法を用いて、5 人のヒト肺の DNA 中の O<sup>6</sup>-methyldeoxyguanosine 及び N<sup>7</sup>-methyldeoxyguanosine の分析が試みられている (Shields *et al.*, 1990)。その結果、全試料から O<sup>6</sup>- 及び N<sup>7</sup>-methyldeoxyguanosine が検出され、それらの付加体量は 10<sup>7</sup> dGp 当たり、各々 1~11 個及び 14~72 個であった。環境中に微量に存在する発がん物質のみならず、抗がん剤を投与したがん患

者に生成する DNA 付加体の分析にも、ポストラベル法は応用されている。

### 6. おわりに

ポストラベル法は DNA 付加体を高感度に検出できること、また、少量の DNA で分析が可能であることにより、微量に存在する環境発がん物質の曝露により生成されるヒト DNA 中の付加体を検出するのに、非常に有用である。前述したような問題点を克服し、また、他の実験方法との組み合わせにより、更に応用範囲が広がるものと考えられる。

### 参考文献

- Fennell, T. R., U. Juhl, E. C. Miller and J. A. Miller (1986) Identification and quantitation of hepatic DNA adducts formed in B6C3F<sub>1</sub> mice from 1'-hydroxy-2',3'-dehydroestrageole: comparison of the adducts detected with the 1'-<sup>3</sup>H-labelled carcinogen and by <sup>32</sup>P-postlabelling, *Carcinogenesis*, **7**, 1881-1887.
- Gupta, R. C. (1985) Enhanced sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen: DNA adducts, *Cancer Res.*, **45**, 5656-5662.
- Gupta, R. C., M. V. Reddy and K. Randerath (1982) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts, *Carcinogenesis*, **3**, 1081-1092.
- 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.
- Lu, L.-J., R. M. Disher, M. V. Reddy and K. Randerath (1986) <sup>32</sup>P-Postlabeling assay in mice of transplacental DNA damage induced by the environmental carcinogens safrol, 4-aminobiphenyl and benzo[a]pyrene, *Cancer Res.*, **46**, 3046-3054.
- Phillips, D. H., K. Hemminki, A. Alhonen, A. Hewer and P. L. Grover (1988) Monitoring occupational exposure to carcinogens: detection by <sup>32</sup>P-postlabelling of aromatic DNA adducts in white blood cells from iron foundry workers, *Mutation. Res.*, **204**, 531-541.
- 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.
- Randerath, K., R. E. Haglund, D. H. Phillips and M. V. Reddy (1984) <sup>32</sup>P-Postlabeling analysis of

DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrol, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. I. Adult female CD-1 mice, *Carcinogenesis*, **5**, 1613-1622.

Randerath, E., H. P. Agrawal, J. A. Weaver, C. B. Bordelon and K. Randerath (1985) <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA adducts persisting for up to 42 weeks in the skin, epidermis and dermis of mice treated topically with 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene, *Carcinogenesis*, **6**, 1117-1126.

Randerath, E., R. H. Miller, D. Mittal, T. A. Avitts, H. A. Dunsford and K. Randerath (1989) Covalent DNA damage in tissues of cigarette smokers as determined by <sup>32</sup>P-postlabeling assay, *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 341-347.

Reddy, M. V. and K. Randerath (1986) Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts, *Carcinogenesis*, **7**, 1543-1551.

Shields, P. G., A. C. Povey, V. L. Wilson, A. Weston and C. C. Harris (1990) Combined high-performance liquid chromatography/<sup>32</sup>P-postlabeling assay of N<sup>7</sup>-methyldeoxyguanosine, *Cancer Res.*, **50**, 6580-6584.

Wilson, V. L., A. K. Basu, J. M. Essigmann, R. A. Smith and C. C. Harris (1988) O<sup>6</sup>-Alkyldeoxyguanosine detection by <sup>32</sup>P-postlabeling and nucleotide chromatographic analysis, *Cancer Res.*, **48**, 2156-2161.

環境変異原研究 13: 103-108 (1991)

教育講演「環境変異原のヒトへの新しいリスク解析法」

## 放射線被曝者における生物学的線量推定のための 4種の体細胞突然変異検出法の評価

放射線影響研究所 放射線生物学部 秋山實利, 梅木繁子, 楠洋一郎  
平井裕子, 久代淳一, 京泉誠之  
中村 典

### 1. 序

放射線被曝は、我々の健康に種々の悪影響を及ぼすことが最も良く知られているもののひとつである。広島・長崎における原爆被曝者の疫学調査は、放射線被曝によるリスクの評価に大変重要な情報を提供しているのであるが、他方線量推定の作業もリスク評価には大変重要なテーマである。多くの場合、なかんずく被曝期間が長期に及ぶような時には、被曝線量の物理学的な推定は大変困難である。

この点に関して、もしも生物学的線量推定が行なえれば大変有用である。従来、末梢血リンパ球を用いた染色体異常頻度は、被曝線量推定の良い生物学的指標として用いられてきた。ところがこの方法の短所は、異常染色体の計測に多大な労力と時間が必要とされることで、例えばチェルノブイリ原子力発電所事故の場合に必要なような大規模調査には適当ではない。最近、モノクローナル抗体とフローサイトメトリー技術の発展により、血液細胞を用いて迅速に突然変異細胞を検出できるようになってきた。この方法は生物学的線量推定に新しい道を開くものとして期待されている。

本稿では、我々が最近行ってきた原爆被曝者及び他の放射線被曝を受けた人達における体細胞突

然変異調査の結果並びに各技法に付随する問題点について述べたい。

### 2. 赤血球のグリコフォリン A 遺伝子座突然変異

グリコフォリン A (GPA) はヒト赤血球膜上に発現されている糖タンパクで、MN 式血液型の型決定分子である。各対立遺伝子産物に特異的なモノクローナル抗体がつくられており、各々を異なる蛍光色素で標識して MN ヘテロ由来の赤血球と反応させる。M 又は N 型対立遺伝子の発現のない突然変異細胞はフローサイトメトリー法によって同定できる (Langlois *et al.*, 1986)。原法は 2 本のレーザーをもつフローサイトメーターを用いるものであったが、我々の改良により 1 本のレーザー装備のフローサイトメーターでも実験が行なえるようになった (Kyoizumi *et al.*, 1989a)。

原爆被曝者に関する調査の結果では、突然変異細胞頻度 (Mf) は線量の増加と共に上昇することが明らかになった (Langlois *et al.*, 1987; Kyoizumi *et al.*, 1989a)。Langlois らの調査では 1965 年の線量体系 T65D が、また Kyoizumi らの調査では近年改訂された線量体系 DS86 が用いられたため、線量効果関係の回帰直線の勾配は後者が約 2 倍大きい。それは DS86 線量の方が概して T65D 線量よりも少ないことによるものである。同一被

〒732 広島市南区比治山公園 5-2

Evaluation of four somatic mutation assays as biological dosimeter in radiation exposed people  
Mitoshi Akiyama, Shigeko Umeki, Yoichiro Kusunoki, Yuko Hirai, Junichi Kushiro, Seishi Kyoizumi and Nori Nakamura

Department of Radiobiology, Radiation Effects Research Foundation, 5-2  
Hijiyama-Park, Minami-ku, Hiroshima 732, Japan

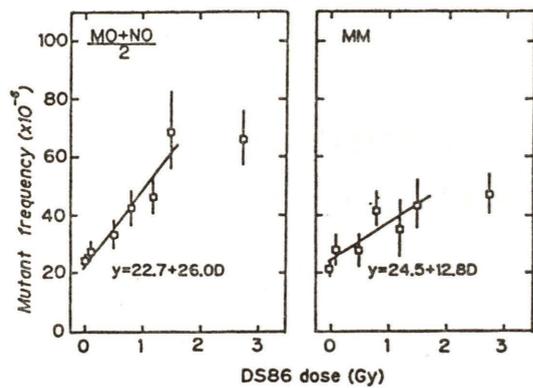


Fig. 1. 原爆被爆者における赤血球 GPA 突然変異の線量効果関係。ヘミ型変異体 NO と MO の平均頻度 (左図) 並びにホモ型変異体 MM の頻度 (右図) を示す。各点は 15 名以上の平均値であり縦棒は SE を示す。

爆者に関する原法と改良法の比較検討の結果は、両者の間に高度の統計学的に有意な相関を認めている (Kyoizumi *et al.*, 1989a)。現在までの所約 100 名の原爆被爆者について、単一ビーム装置のフローサイトメーター (FACStar) を用いた調査が行なわれている。NO 及び MO 型突然変異の線量効果関係は極めてよく似ており、誘発率は 1 グレイ当たり約  $2.5 \times 10^{-4}$  である (Fig. 1)。この値はヒトの正常 2 倍体細胞を用いて 6 チオグアニン耐性を指標とした *in vitro* 突然変異誘発実験の結果と大変良く似ている (Nakamura *et al.*, 1989 のまとめの表を参照)。

GPA 突然変異検出法に関しては、その校正のための *in vitro* 実験系がないのが実情であるが、上に述べた事実は、赤芽系前駆細胞に生じた GPA 突然変異が中立的であり、生涯を通じて残存するという考えを支持するものと考えられる。

GPA アッセイでは、NO 及び MO のヘミ接合型突然変異の他に、恐らくは体細胞組換えに起因すると思われる MM ホモ接合型突然変異も検出される (現在の所 NN 型変異細胞は再現性良く測定できない)。Fig. 1 には、ヘミ接合型変異細胞頻度と、ホモ接合型変異細胞頻度と合わせて示した。図から明らかなように、MM ホモ接合型突然変異の誘発率は、ヘミ接合型のその約 1/2 である。

### GPA アッセイの評価

GPA アッセイは、被爆後 40 年以上を経た現在でも、線量に依存した変異頻度の上昇を検出できる。従ってこの系は生物学的な生涯線量計としての資質を備えていると考えられる。また、いくつかの高発癌性遺伝性疾患患者において GPA 突然変異頻度が異常に上昇していることも最近明らかになった (Bigbee *et al.*, 1989; Langlois *et al.*, 1989; Kyoizumi *et al.*, 1989b)。従ってこの GPA アッセイはこのような患者の診断にも利用可能である。その他の長所としては、少量 (1 ml) の血液サンプルで十分なこと、及び低温保存されれば遠距離から郵送されたサンプルも測定できる点が挙げられる。

欠点としては、対象者が MN ヘテロの人に限られること (集団の約 50%)。また癌患者の調査結果では、化学療法終了後 3 カ月経過すると GPA 変異頻度が正常値に戻ってしまう (Langlois *et al.*, 1990)。このことは化学物質により誘発された変異の大半は造血系幹細胞に生じたものではなくてもっと分化のすすんだ赤芽系前駆細胞に生じたものであることを示唆しており、結果の評価に際して注意が必要である。

### 3. T リンパ球の T 細胞受容体遺伝子における突然変異

T 細胞受容体 (TCR) は、 $\alpha\beta$  又は  $\gamma\delta$  鎖のヘテロダイマーで CD3 抗原と呼ばれる複合体とコンプレックスを生じており、成熟 T リンパ球の表面マーカーを構成している (Clevers *et al.*, 1988)。B 細胞が成熟途中でイムノグロブリン (Ig) 遺伝子を再構成するのと全く同様に、TCR 遺伝子も T リンパ球が胸腺中で成熟分化する過程で再構成される (Kronenberg *et al.*, 1986)。異なる TCR 再構成は、T リンパ球の特異抗原に対する反応性を決定するものと考えられている。Ig 遺伝子におけるのと同様、TCR 遺伝子も 2 つの遺伝子のうちのどちらか一方のみが T 細胞で発現されている ("allelic exclusion" と呼ばれる現象)。従って、TCR 遺伝子は常染色体上に位置しているにもかかわらず機能的にはヘミ接合体の状態にある。

TCR 産物が細胞膜上に発現するためには、

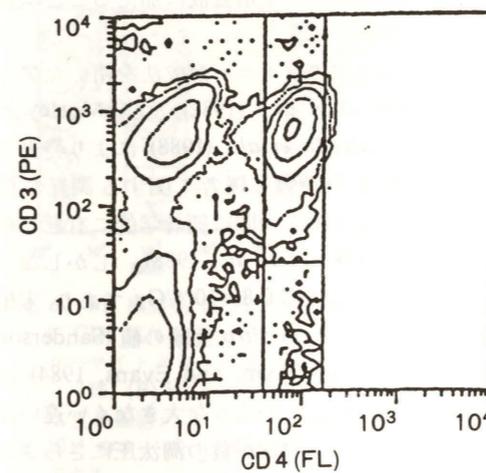


Fig. 2. PE 標識抗 CD3 抗体並びに FITC 標識抗 CD4 抗体を用いて染色したリンパ球のフローサイトグラム。四角に区切ったウィンドーの上側に CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> の正常細胞、下側に CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> の TCR 突然変異細胞が検出される。

CD3/TCR $\alpha\beta$  の完全な複合体がつくられる必要がある。もし TCR $\alpha$  又は  $\beta$  遺伝子に欠陥があると CD3 分子は細胞膜上に発現されないで細胞質内に蓄積することになる。従って、TCR 遺伝子の突然変異を直接調べる代りに CD3 分子の膜表面への発現の有無をマーカーとすることができる。

FITC 標識抗 CD4 抗体とピコエリスリン (PE) 標識抗 CD3 抗体を用いて単核球を染色し two-color 解析することにより、ヘルパー/インデューサー T 細胞のマーカーである CD4 陽性でありながら CD3 抗原を喪失している変異細胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>) が検出される (Fig. 2)。その頻度は、 $10^{-4}$  のオーダーである (Kyoizumi *et al.*, 1990)。突然変異細胞の解析の結果、TCR $\beta$  鎖の発現異常をもつものが TCR $\alpha$  鎖異常をもつものの約 3 倍高いことが明らかにされている (Kyoizumi *et al.*, 1990)。

現在までに得られた結果を要約すると、①突然変異頻度はドナーの年齢と正相関を示す。その勾配は 10 歳当たり  $0.3 \times 10^{-4}$  位である (Kyoizumi *et al.*, 1990)。②男性における頻度は女性よりも平均 40% 高い (投稿準備中) ③原爆被爆者 203 名について調査したが線量との相関は認められなかった (Fig. 3A, 3B)。④トロトラストは、第 2

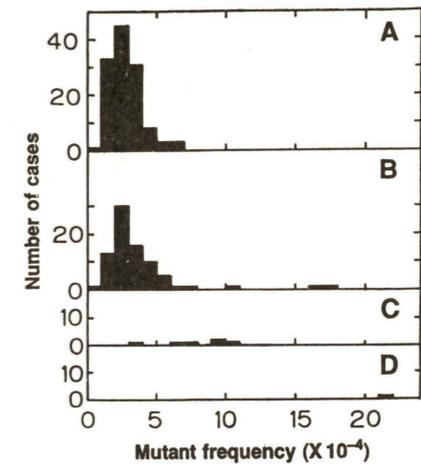


Fig. 3. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> 突然変異細胞頻度のヒストグラム。(A) 原爆被爆者の対象群 (推定被曝線量 0.5 ラド未満)、(B) 原爆被爆者の高線量被曝群 (推定被曝線量 150 ラド以上)、(C) トロトラスト患者、(D) チェルノブイリ原発事故の際の被曝者。

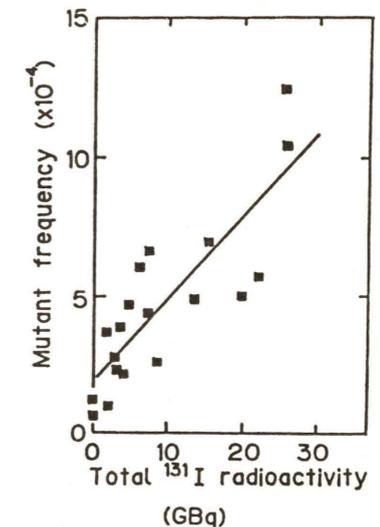


Fig. 4. 放射性ヨード 131 による治療を受けた患者における CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> 変異リンパ球頻度とヨード 131 全投与量との関係。

次大戦中に特に軍関係で使用された造影剤でトリウム 228 を含む。種々の器官に沈着するためアルファ線の被曝を受けることが後に判明。このようなトロトラスト症患者では突然変異頻度が高い (Fig. 3C)。⑤甲状腺の悪性疾患のため放射性ヨード 131 による治療を受けた人では、投与量に比例した突然変異頻度の上昇が認められた (Fig. 4)。

⑥チェルノブイリ原子力発電所事故の際に高い線量の放射線を被曝した1名(染色体異常頻度からの推定線量は3~4 Gy)では極めて高い変異頻度を示した(Fig. 3D)。

これら CD3<sup>+</sup> 細胞は培養実験の結果、増殖能力が劣っていることが明らかになった。従って恐らく体内においてもこれらの変異細胞は負の淘汰圧にさらされており長年存続することができないのであろうと考えられる。従って、この突然変異検出系は生物学的生涯線量としては不適格であるが、最近の被曝は検出できることを示唆している。放射性ヨードの最終投与と、リンパ球突然変異頻度測定との間の平均間隔は2.2±1.7年であるので、このような変異細胞のかなりの部分は誘発後2年位は体内に残存しているのではないかと考えられる。

#### TCR アッセイの評価

本法ではリンパ球を固定せず用いるので採血後数時間のうちに調査が完了する。更に、抗 CD3, 抗 CD4 抗体はどれも市販のものであるし、又ドナーに何の制限もない。Mf は 10<sup>-4</sup> オーダーであるので 1 ml の採血で十分信頼性の高い値が得られる。反面、このアッセイは生涯にわたる被曝のモニターとしては不相当である。TCR 突然変異リンパ球の喪失速度が明らかにされれば、過去何年間の集積線量まで検出できるかの推定が可能になると思われる。この点に関しては現在調査中である。

#### 4. 末梢血中リンパ球の HPRT 遺伝子座における突然変異検出法

ヒポキサンチン・フォスホリボシトランスフェラーゼ (HPRT) は、ヒポキサンチンやグアニンを核酸合成のためのプリンモノフォスフェートプールに取込むための酵素である。この遺伝子に突然変異を生じると、痛風あるいは Lesch-Nyhan 症候群とよばれる病気になることが知られているが、この機能は細胞の生存にとって必須のものではない。この遺伝子はX染色体上にあるので、細胞当たり機能しているのは1遺伝子でありその変化がただちに表現形としてあらわれる。HPRT 欠損細胞の正の選抜はグアニンの類似体

である6チオグアニンを培養液に加えることにより容易に行なわれる。

末梢血リンパ球のコロニー形成法を用いたアッセイが Albertini *et al.*, (1982) 及び Morley *et al.*, (1983); Hakoda *et al.*, (1988) により発表されている。47名の原爆被爆者に関する調査の結果、被曝線量と Mf との間に統計学的に有意な相関を認めた (Hakoda *et al.*, 1988)。しかしながら回帰直線の勾配は約 0.8×10<sup>-9</sup>/Gy であり、末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 実験の値 (Sanderson *et al.*, 1984; Vijayalaxmi and Evans, 1984) の 1/10 以下であった。このような大きく異なるのは恐らく突然変異リンパ球が負の淘汰圧にさらされている結果長年の間に Mf が減少してしまったためと考えられる。

#### リンパ球 HPRT アッセイの評価

このアッセイはリンパ球のコロニー形成法を用いる。従って良質のヒト T リンパ球増殖因子 (インターロイキン 2) を用いることが必須の条件である。組換え DNA 法によるヒトインターロイキン 2 が現在入手でき、それはリンパ球培養上澄を用いた場合と比べて再現性の点で優れる。フィーダー細胞を準備するため X 線又は γ 線装置が必要。Mf は 10<sup>-5</sup>~10<sup>-6</sup> と低いので少なくとも 10 ml の血液が必要である。また突然変異リンパ球には強い負の淘汰がかかっているようなので生涯線量の評価に利用することはできない。何百人もの人を対象とするには実際上不向きである。

#### 5. リンパ球の HLA-A 遺伝子座における突然変異検出法

体細胞組換えは、それ自身新しい塩基配列を生じるわけではないので、突然変異としては取扱われないことが多い。しかし、劣性ヘテロの遺伝子型の細胞においては、体細胞組換えの結果、劣性ホモの細胞が生じ、それまでマスクされていた劣性遺伝子の表現型が発現するという意味では立派な突然変異である。

Morley らのグループは、ヒトリンパ球を用いて体細胞組換えを DNA レベルで解明できるはじめての手法として HLA-A 遺伝子をマーカーとしたアッセイを開発した (Janatipour *et al.*, 1988)。

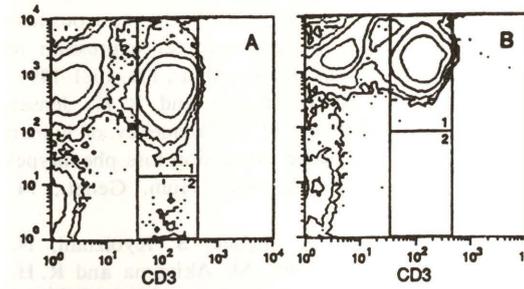


Fig. 5. PE 標識抗 HLA-A2 抗体並びに FITC 標識抗 CD3 抗体を用いてリンパ球を染色した場合のフローサイトグラム。(A) HLA-A2 ヘテロ由来のリンパ球、(B) HLA-A2 ホモ由来のリンパ球。(A) では変異細胞のウィンドー(四角の2の部分)に約 10<sup>-4</sup> のオーダーで細胞が検出されるが (B) では零である。

この方法は抗 HLA-A2 あるいは A3 モノクローナル抗体を用いて、補体存在下で HLA-A2 又は A3 抗原を有する細胞を選抜的に殺し、それらの発現を喪失した突然変異リンパ球を回収するというものである。ヒト *in vivo* の突然変異頻度は、10<sup>-5</sup> のオーダーと報告されている (Janatipour *et al.*, 1988; McCarron *et al.*, 1989)。

この補体依存性の細胞傷害法は大変厳しい実験条件が要求され、再現性の点で多くの問題があることが判明した。そこで最近我々は、HLA-A 遺伝子座に関する突然変異をフローサイトメトリーを用いて検出する方法を開発した。TCR 突然変異アッセイの場合と同様にして、抗 HLA-A2 (又は A24) モノクローナル抗体を PE 標識し、抗 CD3 抗体を FITC 標識したものをを用いて、HLA-A2 (又は A24) ヘテロドナー由来のリンパ球を染色する。フローサイトグラムは Fig. 5A に示した。PE からの蛍光強度ピークの値の 1/25 をカットオフ値として突然変異細胞のウィンドーを設定した。その結果は、Mf は 10<sup>-4</sup> のオーダーであることが判明した。他方リンパ球ドナーが HLA-A2 (又は A24) ホモの場合には、50 万個以上の単核球を調べても突然変異ウィンドー内に生じた event は零であった (Fig. 5B)。これらの結果は、このアッセイを用いて HLA-A2 又は A24 に関するヘテロのドナーの同定が可能であることを示す。実際、約 50 名について従来のポリクローナル抗血清を用いた HLA タイピングと、この

アッセイを用いた HLA-A2 又は A24 のホモ、ヘテロのタイピングとは完全に一致した。突然変異細胞の約 2/3 は Southern blot 法による変化が認められないものであった。残る約 1/3 は体細胞組換えの結果、選抜に用いなかった方の対立遺伝子に関してホモになっているものであった。この結果は先の Janatipour *et al.*, (1988) の結果と大変良く一致している。原爆被爆者に関する予備的調査の結果は、被曝線量と Mf との間に統計学的に有意な相関は認められていない。この HLA-A 遺伝子座における Mf はドナーの年齢と共に増加することが判明しているため、恐らく被曝後40年以上を経る間に加齢による影響によって放射線の影響が隠されてしまったのではないかと考えている。

#### リンパ球 HLA-A アッセイの評価

このアッセイは TCR アッセイと同様、1 ml の血液でよく、測定も迅速に行なえるという利点がある反面、ドナーが HLA-A2 又は A24 に関してヘテロでなくてはならないという制約がある。このようなヘテロの人は日本人集団の約 60% 位と推定されている。このアッセイは恐らく生涯線量計としては役立つが、体内における負の淘汰圧の強さ(排除される速度)によっては、TCR アッセイと同様、最近の被曝の推定には利用できる可能性がある。

#### 6. 結語

我々のこれまでの経験を総合すると、いかなる体細胞突然変異検出系と雖も、それが生物学的な生涯線量計として役立つか否かは、実際にそのアッセイを用いて放射線に被曝した人々を調査してみないと分からないということである。ドナーに制約のない、簡便なアッセイ法でしかも生涯の集積線量の評価を行なえるような系を開発することを夢見て、しばらくは試行錯誤を続けるしかないのが現状である。

#### 7. 謝辞

本調査遂行に当っては多くの方々から血液サンプルの提供を受けた。また種々の DNA プローブや抗体の提供を受けた。これらの方々の御協力に

厚く感謝する。また研究室で実際に援助してくれた免疫学研究室の多くの人達にもあわせて感謝する。本研究の一部は原子力安全研究協会からの研究費による助成を受けた。

### 参考文献

- Albertini, R. J., K. L. Castle and W. R. Borchering (1982) T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6617-6621.
- Bigbee, W. L., R. G. Langlois, M. Swift and R. H. Jensen (1989) Evidence for an elevated frequency of *in vivo* somatic cell mutations in ataxia telangiectasia, *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 402-408.
- Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman and C. Terhost (1988) The T cell receptor/CD3 complex: A dynamic protein ensemble, *Annu. Rev. Immunol.*, **6**, 629-662.
- Hakoda, M., M. Akiyama, S. Kyoizumi, K. Kobuke, A. A. Awa and M. Yamakido (1988) Measurement of *in vivo* HGPRT deficient mutant cell frequency using a modified method for cloning human peripheral blood T-lymphocytes, *Mutat. Res.*, **197**, 161-169.
- Janatipour, M., K. J. Trainor, R. Kutlaca, G. Bennett, J. Hay, D. R. Turner and A. A. Morley (1988) Mutations in human lymphocytes studied by an HLA selection system, *Mutat. Res.*, **198**, 221-226.
- Kronenberg, M., G. Siu, L. E. Hood and N. Shastri (1986) The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition, *Annu. Rev. Immunol.*, **4**, 529-591.
- Kyoizumi, S., N. Nakamura, M. Hakobe, A. A. Awa, M. A. Bean, R. H. Jensen and M. Akiyama (1989a) Detection of somatic mutations at the glycophorin A locus in erythrocytes of atomic bomb survivors using a single beam flow sorter, *Cancer Res.*, **49**, 581-588.
- Kyoizumi, S., N. Nakamura, H. Takebe, K. Tsumi, J. German and M. Akiyama (1989b) Frequency of variant erythrocytes at the glycophorin-A locus in two Bloom's syndrome patients, *Mutation Res.*, **214**, 215-222.

- Kyoizumi, S., M. Akiyama, Y. Hirai, Y. Kusunoki, K. Tanabe and S. Umeki (1990) Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4<sup>+</sup> T cells, *J. Exp. Med.*, **171**, 1981-1999.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee and R. H. Jensen (1986) Measurements of the frequency of human erythrocytes with gene expression loss phenotypes at the glycophorin A locus. *Hum. Genet.*, **74**, 353-362.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee, S. Kyoizumi, N. Nakamura, M. A. Bean, M. Akiyama and R. H. Jensen (1987) Evidence for increased somatic cell mutations at the glycophorin A locus in atomic bomb survivors, *Science*, **236**, 445-448.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee, R. H. Jensen and J. German (1989) Evidence for increased *in vivo* mutation and somatic recombination in Bloom's syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 670-674.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee and R. H. Jensen (1990) The glycophorin A assay for somatic cell mutations in humans. In: R. J. Mendelsohn, R. J. Albertini (eds.), "Mutation and the Environment Part C: Somatic and Heritable mutation, Adduction, and Epidemiology", New York, Wiley-Liss. pp. 47-56.
- McCarron, M. A., A. Kutlaca and A. A. Morley (1989) The HLA-A mutation assay: Improved technique and normal results, *Mutation Res.*, **225**, 189-193.
- Morley, A. A., K. J. Trainor, R. Seshadri and R. G. Ryall (1983) Measurement of *in vivo* mutations in human lymphocytes, *Nature*, **302**, 155-156.
- Nakamura, N., R. Spoto, R. C. Miller, T. Hiraoka and N. Takeichi (1989) X-ray-induced mutations in cultured human thyroid cells, *Radiat. Res.*, **119**, 123-133.
- Sanderson, B. J. S., J. L. Dempsey and A. A. Morley (1984) Mutations in human lymphocytes: Effects of X- and UV-irradiation, *Mutation Res.*, **140**, 223-227.
- Vijayalaxmi and H. J. Evans (1984) Measurement of spontaneous and X-irradiation-induced 6-thioguanine-resistant human blood lymphocytes using a T-cell cloning technique, *Mutation Res.*, **125**, 87-94.

### 「創薬基礎科学研究の推進について(勧告)」を採択

平成2年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る10月17日から19日まで、第110回総会を開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、その総会で採択された勧告等を中心に、同総会の議事内容等についてお知らせします。

#### 日本学術会議第110回総会報告

日本学術会議第110回総会(第14期・第6回)は、平成2年10月17-19日の3日間開催された。

1 総会第1日目の冒頭に、先に逝去された、時永淑会員(第3部)及び大谷茂盛会員(第5部)を追悼して黙禱を捧げた。続いて、会長からの経過報告、各部・委員会報告の後、内規改正、勧告、対外報告の3案件の提案説明が行われた。これらの案件については、同日の午後の各部会での審議を経た上で、第2日目の午前中に審議・採択された。2 今回総会で採択された事項は次のとおりである。

(1)日本学術会議の運営の細則に関する内規の一部改正  
本件は、①来春の第14期最後の総会が5月(通常は4月)開催になったことに伴い、「副会長世話担当研究連絡委員会の運営に関する総会決定」の適用期間を、1か月間延長するとともに、②第14期限りの措置として、地球圏-生物圏国際協同研究計画(IGBP)のフォローアップ組織として、地理学研究連絡委員会に「IGBP専門委員会」を設置するために、関係各部等の研究連絡委員会委員定数について必要な処理を行ったものである。

(2)創薬基礎科学研究の推進について(勧告)  
本件は、薬科学系の3研究連絡委員会と薬理学研究連絡委員会が従来からの検討結果を勧告案として取りまとめ、第7部提案として、今回総会に付議したものである(この勧告の詳細は、別掲参照)。この勧告は、同日午後直ちに内閣総理大臣に提出され、関係省庁に送付された。

(3)第6常置委員会報告-外国人研究者・大学院留学生受入れに関する問題点と改善の方策について  
本件は、第6常置委員会が、今期の重要課題の一つとして審議を重ねてきた結果を「対外報告」として取りまとめたものを、外部に発表することについて承認したものである(この報告の詳細は、別掲参照)。

3 以上の諸報告及び提案審議のほか、特に、近藤会長から、前回総会で討議された南アフリカ共和国科学者の我が国入国をめぐる諸問題については、その後、外務省と折衝した結果、ビザ発給手続きの合理化措置が講じられ、国際学術連合会議(ICSU)の理解が得られたとの報告があった。また、提案事項採決後行われた自由討議では、大学等高等教育関係予算拡充問題、遺伝子操作に関する法規制問題等について意見交換が行われた。

4 第2日目午後には、「特別委員会審議状況報告に基づく意見交換」が開催された(この意見交換の詳細は、別掲参照)。また、第3日目の午前中には各特別委員会、午後には各常置委員会がそれぞれ開催された。

#### 創薬基礎科学研究の推進について(勧告)

##### (勧告本文)

優れた医薬の創製すなわち創薬の研究は、空前の高齢化社会を目前にして、健やかな長寿を目指す健康社会実現のため、さらには国際的立場から地球上の全人類の福祉に貢献するため、我が国にとって大きな意味を持つものである。特に、多くの成人病、老年病、またエイズやいわゆる難病等についての的確な予防薬・治療薬の創製が待望されている。しかしながら、これらの疾患に対する優れた医薬の創製は世界的にみて、医薬創製のよりどころとなるべき基礎理論、研究技術の発展が十分でないため遅々として進んでいない。

とりわけ我が国は先進国の一角を占めているとはいえ、大学、企業、公的研究機関共に、ひとつの疾患の予防・治療に変革をもたらすほどの画期的医薬創製の実績に乏しく、国の内外から研究態勢の遅れが指摘されている。とはいえ、最近のバイオサイエンス分野の急速な展開と、我が国科学者のこの方面での活躍の実績をみるならば、学際的な創薬基礎科学研究の推進を図り、これによって人類の福祉向上に貢献することは、現下の我が国にとって緊要の課題である。

このため、早急に創薬基礎科学研究の推進組織を設け、これを核とした強力かつ広範な研究態勢の確立を図るべきである。これに当たっては、医薬の創製における倫理の尊重を基本理念とし、生体機構及び病態の解析研究とそれに基づいた独創的・画期的医薬の創製を指向する分子設計並びに薬効・安全性評価の基礎理論の樹立、さらに薬効・安全性の測定技術・ヒトの病態のシミュレーション技術等、各種の新技术の開発研究を特に重視すべきである。

この研究推進組織の設置には、関係省庁が関与すると共に、地方自治体、大学及び民間の参画を可能とし、また、関連科学各分野の学際的なネットワークを構築するなど多层次的な協力と交流による研究の推進を図るため、格段の効果的措置を講じ得る形態とすべきである。

日本学術会議は、創薬基礎科学研究の推進を図るため、上記の趣旨に基づいて必要な施策を速やかに講ずるよう勧告する。

## 第6常置委員会報告—外国人研究者・大学院留学生受入れに関する問題点と改善の方策について—(要旨)

(平成2年10月18日 第110回総会承認)

外国人研究者・大学院留学生の受入れを促進するうえで、言語、研究環境、外国人研究者の任用、大学院留学生の学位、外国人研究者・大学院留学生の選考が問題になる。

日本語能力は研究の対象とする学問分野や研究課題との関係が留意されねばならない。分野によっては、日本語能力は日常生活に必要なもので足り、研究のためには英語の能力が必須である。研究者の受入れに当たり、その研究に耐え得る日本語又は英語の能力を備えているかを十分に審査しておくことが、研究を果しあるものとするために必要である。

貧弱な研究設備のまま、また十分な研究費を持たないままで外国人研究者を受け入れる事は受け入れた外国人研究者を失望させるだけでなく、日本人研究者の研究を阻害する。また劣悪な居住環境や、事務局等の対応組織の不備も、外国人研究者の研究活動を妨げる。国は、研究環境を整備することに對して十分な予算措置を講ずべきである。

我が国の大学における外国人研究者の任用は、その道が開かれているとはいえ、まだ十分でない。外国人研究者の任用に關して広く情報を提供する機関の設置、あるいは大学等において外国人研究者を一定数受け入れる体制の確立が望まれる。

大学院留学生の博士学位の取得は、帰国後の処遇と関係して問題となっている。受入れ大学院において、博士学位の取得促進につき一層の改善努力が払われることが期待される。

外国人研究者の選考については、受入れ側が研究者の素質をよく理解し、公正な基準によって行うことが大切である。大学院留学生については、素質の多様化と学生数の急増に伴い多くの問題が生じており、その選考方法に對し抜本的改善が要望される。

## 解剖学研究連絡委員会報告—日本における解剖学の教育と研究(現状の考察と将来への展望)—(要旨)

(平成2年9月21日 第758回運営審議会承認)

自然科学の急速な発展に伴い、医学部・医科大学における教育・研究・診療のすべての分野に、大きな変化が生じた。すなわち研究手法の開発、研究機器の発達により、既存の学問領域の進歩に加えて、新たな学問分野が分化し、教育内容は多様化すると共に著しく増大した。さらに人口の増加と高齢化、経済の成長など種々の社会的要因の変化も複合されて、医学における教育と研究の重点と目標にも変化が生じた。それらは、これまで医学の基礎を形成して来た伝統的な講座に、とりわけ強い影響を与え、その在り方について検討し、改善をはかる必要性を生じさせた。

本報告は、このような状況を踏まえ、我が国における解剖学の教育と研究について、現状を考察し、今後の在り方に関する指針をまとめたものである。報告では、解剖学の定義と使命、医学教育と研究における解剖学、解剖学教室の構成、解剖学者の養成、医学部他教室及び社会との関係などの、現状と問題点について検討し、医学の変貌に對処すべき改善の方途を明らかにすると共に、将来に向けての展望が示唆された。

## 総会中の「特別委員会審議状況報告に基づく意見交換」

今回総会の第2日目の午後には、1時から4時間にわたって「特別委員会審議状況報告に基づく意見交換」が行われた。従来この時間帯には、その時々での学術上の重要課題を取り上げて、会員による「自由討議」が行われてきた。今回は、これに代わり、第14期も2年余を経過し、余すところ9か月足らずとなったこの機会に、今期の当初に決定された第14期活動計画において、「緊急に調査審議を行って第14期中に適切な形で報告・提言を取りまとめるべき課題」ごとに設置された各特別委員会から、今までの審議状況を報告してもらい、それに基づいて会員間の意見交換を行って、各特別委員会の今後の審議の参考に供することにしたものである。

1 まず最初に、医療技術と社会に関する特別委員会の水越治委員長(第7部)から、同委員会における「脳死をめぐる問題」に関する審議の経過を取りまとめた「中間まとめ」について報告がなされた後、「日本人の国民性に根ざした死の概念との関わり」、「臓器移植を必要とする患者と臓器提供者の需給関係の問題」、「死の認定基準のあり方」、「前期の学術会議における脳死問題に関する審議状況との関係」等について意見交換が行われた。

2 次に、農業・農村問題特別委員会の水間豊委員長(第6部)から、同委員会が今後取りまとめることを予定している「農業・農村のもつ今日的意義と課題(仮題)」の概要について報告がなされた後、「他の先進諸国の農業との比較の必要性」、「国内外の政治との関わり」、「世界の食糧問題に対する日本農業の果たすべき役割」、「他産業を絡めた農業・農村の振興策」等について意見交換が行われた。

3 最後に、人間活動と地球環境に関する特別委員会の吉野正敏委員長(第4部)から、同委員会が現在取りまとめている「人間活動と地球環境に関する日本学術会議の見解(案)」について報告がなされた後、「地球環境教育の重要性」、「国際学術協力事業等国際的対応のあり方」、「医学・保健問題との関わり」、「地球環境保全と経済成長との関係」、「南北問題との関わり」等について意見交換が行われた。

## 第15期日本学術会議会員選出のための登録学術団体の概況

本会議では、現在第15期(平成3年7月22日～平成6年7月21日)会員(定員210人)選出のための手続きが進められているが、先般6月末日を締切期限として、学術研究団体からの登録申請が受け付けられた。その後日本学術会議会員推薦管理会で審査が行われ、結果は次のとおりであった。

学術研究団体の登録申請の審査結果

申請団体数……………952団体

登録団体数……………915団体

\*日本学術会議会員推薦管理会が登録した915団体名は、日本学術会議月報平成2年12月号に掲載されるので、御参照願いたい。

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

## 日本学術会議だより

No.20

## 公開講演会成功裡に開催さる

平成3年2月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、例年どおり、平成2年度においても、主催の公開講演会を3回開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、その講演会に加えて、本会議の国際的活動や最近公表された「委員会報告」などについてお知らせします。

### 平成2年度日本学術会議主催公開講演会

本会議は、本会議の会員が、学術の成果について広く市民と語り合う機会として、時宜にかなったテーマを選定して、毎年、公開講演会を開催している。本年度は、次の3回の講演会を開催したが、いずれも成功裡に終了した。

#### I 公開講演会「高度技術と市民生活」

標記講演会は、去る平成2年10月13日(土)13時30分～17時に、兵庫県加東郡社町の社町福祉センターホールで、約250人の聴講者を得て開催された。各演題と講師は、①「高齢化社会と高度技術」原沢道美(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)であった。

#### II 公開講演会「資源エネルギーと地球環境に関する展望」

標記講演会は、去る平成2年10月30日(火)13時～17時に、本会議講堂で、約330人の聴講者を得て開催された。各演題と講師は、①「人間と環境」大島康行(第4部会員、早稲田大学教授)、②「エネルギーと環境」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」上之園観佐(第5部会員、摂南大学教授)であった。

#### III 公開講演会「人間は21世紀を生きられるか」

標記講演会は、去る平成3年2月19日(火)13時30分～17時に、本会議講堂で約200人の聴講者を得て開催された。各演題と講師は、①「科学・技術・政策」杉本大一郎(第4部会員、東京大学教授)、②「科学と人間—生存のための条件づくり」下山瑛二(第2部会員、大東文化大学教授)、③「人間の適応能力とリスク」土屋健三郎(第7部会員、産業医科大学長)であった。

いずれの講演会も、時期にあった、関心の呼ぶ企画であったため、外くの聴講者が来場する盛会となり、また、各講師の講演後の質疑応答では、聴講者から活発な質問や意見の開陳がなされ、まさに市民との対話の感があり、極めて有意義であった。

なお、これらの講演会については、後日、「日学双書」として、(財)日本学術協力財団から出版される予定である。

### 平成2年度二国間学術交流事業

本会議では、二国間学術交流事業として、毎年2つの代表団を外国に派遣し、各訪問国の科学者等と学術上の諸問題について意見交換を行って、相互理解の促進を図る事業を行っている。

この事業は、昭和58年度から実施されており、これまで、アメリカ、マレーシア、西ドイツ、インドネシア、スウェーデン、タイ、フランス、大韓民国、連合王国、シンガポール、チェコスロヴァキア、ポーランド、カナダ、イタリア、スイス及びインドの16か国に代表団を派遣してきた。

平成2年度には、①9月11日から22日まで、中華人民共和国へ、渡辺格副会長以下4名の会員等から成る代表団を、②9月17日から27日まで、オーストラリア及びニュー・ジールランドへ、大石泰彦副会長以下5名の会員等から成る代表団をそれぞれ派遣した。

中華人民共和国派遣代表団は、中国科学院、中国社会科学院、中国医学科学院、北京大学、西安交通大学、復旦大学など約20機関を訪問し、中華人民共和国の学術や今後の交流の推進策などについて会談、意見交換を行った。中華人民共和国側からは、すでに、日本の多くの大学、研究機関と交流を行っているが、さらに交流を拡大したいとの期待が表明され、両国間の今後のより積極的な交流・協力をめぐる活発な意見の交換が行われた。

オーストラリア及びニュー・ジールランド派遣代表団は、オーストラリアでは、オーストラリア科学アカデミー、オーストラリア国立大学、シドニー大学、連邦科学・産業研究機構など、ニュー・ジールランドでは、ニュー・ジールランド王立協会、マッセイ大学、ヴィクトリア大学、科学技術研究機構など、両国合わせて20を超える諸機関を訪問し、それぞれの国の学術、今後の交流の可能性などについて、会談、意見交換を行った。特に、両国では近年、国家、国民に実際に役立つ技術の発展を目指した科学技術の大きな改革が進められており、これら問題等について、熱心に意見の交換が行われた。

今回の成果は、代表団派遣時だけのものではなく、今後のわが国の学術の国際交流・協力の進展に大きく役立つものと期待される。

## 平成3年(1991年)度共同主催国際会議

本会議は、国際的な活活の一環として、毎年、日本で開催される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ている。平成3年(1991年)度には、次の6件の国際会議を開催する。

### ■第21回国際農業経済学会議

開催期間 平成3年8月22日～29日  
開催場所 京王プラザホテル(東京都新宿区)  
参加者数 国外550人、国内950人、計1,500人  
共催団体 日本農業経済学会外4学会

### ■国際医用物理・生体工学学会議(第16回国際医用生体工学学会議・第9回国際医学物理学会議)

開催期間 平成3年7月7日～12日  
開催場所 国立京都国際会館(京都市)  
参加者数 国外1,000人、国内1,500人、計2,500人  
共催団体 (社)日本エム・イー学会、日本医学物理学会

### ■国際純正・応用化学連合1991国際分析科学学会議

開催期間 平成3年8月25日～31日  
開催場所 日本コンベンションセンター(千葉県)  
参加者数 国外500人、国内1,000人、計1,500人  
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

開催期間 平成3年7月15日～19日  
開催場所 立命館大学、国立京都国際会館(京都市)  
参加者数 国外170人、国内300人、計470人  
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

開催期間 平成3年6月23日～29日  
開催場所 国立京都国際会館(京都市)  
参加者数 国外380人、国内170人、計550人  
共催団体 (社)日本物理学会

### ■第22回国際動物行動学会議

開催期間 平成3年8月22日～29日  
開催場所 大谷大学(京都市)  
参加者数 国外400人、国内400人、計800人  
共催団体 日本動物行動学会

## 経営学研究連絡委員会報告—経営学教育改善のために—(要旨)

(平成2年11月26日 第763回運営審議会承認)

企業環境の激変、就中技術革新、高度情報化、国際化等々の急進展に伴って、経営学教育は、大きく見直され、かつ新たな体系化と一層の内容の充実の必要性に迫られている。すなわち、学術的分野の広がり、国際化や情報化の急進展は、経営学の外延的拡大を要請し、また経営管理の高度化、複雑化および戦略的視点の重要性増加は、斯学の多面的な内容の充実強化を要求している。本報告は、かかる状況下において経営学教育の現状分析を行い、かつ(1)教育体系(とくにカリキュラム)の再編成と(2)教育方式の新たな在り方を探り、もって経営学に対する社会的ニーズへの即応と経営学教育の総合的な体系化への試みを展開したものである。とくに教育する側、される側両面での人材育成を強く念頭に置いて経営学教育改善の方途を示すとともに、大学院教育へのつながりを意識しながら将来への展望を示唆しようとしたものである。

## 統計学研究連絡委員会報告—統計学研究教育体制の整備のための具体的方策について(要旨)

(平成2年12月21日 第764回運営審議会承認)

現今、高度情報化の進展による情報資源の多激な蓄積にともない、統計的情報処理を適切に行える人材に対する社会的需要が著しく高まっている。現在米国では60を超える大学に統計学科が存在するのに対し、我が国では統計学関連の大学院専攻はただ一つあるのみである。最近の学術研究における、調査、実験、観測等の活動の急速な増大を考慮するとき、データ有効利用の学としての統計学の研究教育体制の不備は、我が国の学術研究の将来に対し、国際的に見て著しく不利な状況を生み出しつつある。

本報告では、統計学を一つの専門分野として狭く捉える従来の考え方を避け、本来学際的な性格を持つ統計学研究の実態に即して、諸科学との関連をより重視する統計科学の概念を確立し、広範な関連分野の研究者の協力により統計科学研究所あるいは専攻等を設立することの推進を提案する。この提案を具体化することにより、国際的にも先進的な統計学研究教育体制を実現することが可能になるものと期待される。

## 実験動物研究連絡委員会報告—動物実験を支援する人材育成について—(要旨)

(平成2年12月21日 第764回運営審議会承認)

医学、生物学領域において、動物を用いた実験研究が先導的な形で寄与し、社会に貢献してきたことの意義は大きい。遺伝子・分子・細胞の各レベルにおける研究成果を総合して個体の生物機能・生理現象を理解し、病的現象に適切な対応を計るために、個体レベルの研究、すなわち、動物実験による研究の必要性はますます増加し、多種類かつ高品質の動物が精細な計画・技術のもとで実験に供されるようになった。以上の観点から動物実験を取り囲む現状を詳しく検討した結果、動物実験の高度化・多様化に対応できる、専門的知識と技術を習得した技術者の数が著しく不足していることを強く認識するに至った。

本報告は、このような現状に対する改善の方向を明らかにするとともに、バイオサイエンス研究支援体制を一層整備するための方策として、特に動物実験技術者の教育機関の設立を中心に、技術の審査・認定制度の確立、技術者の採用制度の検討、身分・処遇保障等についての将来展望を示唆するものである。

## 日学双書の刊行案内

日本学術会議主催公開講演会の記録をもと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.10「くらしと学問の近未来」

〔定価〕1,000円(消費税込み、送料210円)

※問い合わせ先:

(財)日本学術協力財団(〒106 東京都港区西麻布3-24-2、交通安全教育センタービル内、TEL 03-3403-9788)

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

# 日本学術会議だより No.21

## 第14期最後の総会終わる

平成3年6月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る5月29日から31日まで第111回総会を開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、その総会で採択された勧告を中心に、同総会の議事内容等についてお知らせします。

## 日本学術会議第111回総会報告

日本学術会議第111回総会(第14期・第7回)は、平成3年5月29日～31日の3日間開催された。

総会冒頭に逝去された大谷茂盛、石原智男両会員の冥福を祈り黙禱を捧げた。会長からの経過報告の後各部・各委員会の報告があった。続いて規則の一部改正1件、国際対応委員会の設立等運営内規の改正1件、申し合わせ2件、勧告1件、要望1件、対外報告等3件、計9議案の提案があった。これらの議案については、同日午後の各部会での審議を経て、第2日目の午前に採決された。

なお、総会前日の午前には連合部会を開催し、これらの議案の説明、質疑を行った。また、総会に平行し、第1日目の夕方には第771回運営審議会が開催されて、これら議案についての各部の審議状況が報告された。

第2日目の午後には、「ポスト湾岸をめぐる諸問題」について自由討議が行われた。

第3日目の午前には各特別委員会が、午後には各常置委員会が開催された。

今回の総会では、「大学等における人文・社会科学系の研究基盤の整備について(勧告)」と「公文書館の拡充と公文書等の保存利用体制の確立について(要望)」が採択され、同日(30日)午後、内閣総理大臣に提出され、関係各省に送付された。

日本学術会議としての国際対応組織の問題は、前期からの懸案事項であったが、今期においてもこの問題は新たに増幅され、国際対応委員会を当分の間設立することが決まり、それに伴い運営内規の一部を改正することとなった。

対外報告としては、「人間活動と地球環境に関する日本学術会議の見解」を〔人間活動と地球環境に関する特別委員会〕が、「医療技術と社会に関する特別委員会報告—脳死をめぐる問題に関するまとめ—」についてを〔医療技術と社会に関する特別委員会〕がまとめ採択された。また、会長提案のバイオテクノロジー国際科学委員会及び国際微生物学連合への加盟も採択された。

「ポスト湾岸をめぐる諸問題」についての自由討議は、大石泰彦副会長の司会で、はじめに話題提供として第2部の西原道雄部長、第2常置委員会の星野安三郎委員長、平和及び国際摩擦に関する特別委員会の川田 侃委員長がそれぞれ部・委員会の審議状況を報告した。それに基づき、会員間での意見交換が行われた。

## 大学等における人文・社会科学系の研究基盤の整備について(勧告)

国家・社会の健全な発展は、人文・社会科学と自然科学のバランスのとれた学術研究の成果が常にその土壌となっている。ところが、戦後の我が国では、自然科学の急速な進展に比して、人文・社会科学がそれに対応できない状況にある。それは、大学等における人文・社会科学系の研究基盤が整備されないまま放置されていたことに起因する。その上、これからの我が国は、国内的には広く生涯教育を推進し、国際的には各国との研究交流や留学生の受け入れなどを一層積極的に行うことを要請されている。すでに日本学術会議は、第13期において「大学等における学術予算の増額について(要望)」などを要望しており、これを踏まえて第14期では、さきに、主として自然科学系の「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—(勧告)」の勧告をした。それに続いて、ここに人文・社会科学系の大学等における研究基盤を早急に改善し、整備するよう勧告する。

まず、人文・社会科学系の研究基盤を改善し、整備するためには、研究に関わる人的構成の強化を必要とする。したがって、なによりも研究者の増員が必要であり、それに関連して、特に若手研究者の養成と研究補助者の増員が求められる。今日、人文・社会科学も自然科学と同様に、研究分野が細分化されるとともに総合化も図られ、それに伴って新しい分野が開発され、それぞれの分野において総合的かつ多面的な研究方法が採られるようになったからである。

また、国内外でのフィールド・ワーク等の研究調査や外国人研究者の招へいなどがより活発に行われるためには、研究費の大幅な増額を必要とする。なお、国公立大学等における研究費の実験系と非実験系による区分は適正な基準により是正する必要がある。

さらに、人文・社会科学系の研究基盤の整備には、図書や資料の収集・保管など学術情報の充実が要求される。それを充たすには、それぞれの研究室における情報処理機器を整備・充実するとともに、図書館・情報センターなどの学術情報機関の拡充を図るべきである。その際、情報処理機器の購入と維持のために相対的に図書購入に当てる費用が圧迫されてはならず、図書費全体についても特段の増額が必要である。

以上のように人文・社会科学の人的・物的な研究基盤の速やかな整備が、国公立大学のみならず、すべての研究機関において今日切実に要望されている。なお、大学等における研究基盤の整備に役立つ民間からの寄付等の援助には、それに対する包括的かつ柔軟な免税措置等が講じられるよう配慮すべきである。

### 公文書館の拡充と公文書等の保存利用体制の確立について(要望)〔要旨〕

わが国の公文書等の保存体制は、公文書館法が公布・施行されて大きく前進したが、その体制はなお国際的にみて大きく立ち遅れた状況にある。公文書等はきわめて重要な学術情報であり、かつ、国民共有の文化的・歴史的資産として貴重であることから、その保存・利用体制を確立するために以下の措置を早急に講じられるよう要望する。

#### 1. 国立公文書館の拡充とその権限の強化

現在の国立公文書館はその設備・人員等がきわめて貧弱であり、また、権限が著しく弱小である。国の公文書等の保存利用体制の確立のために、まず国立公文書館の権限を強化し、その設備・人員を大幅に拡充整備する必要がある。

#### 2. 地域文書館の設立・整備のための国の支援の強化

公文書館法の公布以後、地方公共団体において公文書館を設立する動きがあるが、まだ、その動きは限られている。設立を促進し機能を強化するために、国の財政的援助を拡充すると共に、地方公共団体の自主性を尊重しつつ国の技術的な指導・助言を強化する必要がある。あわせて、公文書等の保存に関して、文書館の権限を強化する必要がある。

#### 3. 公文書館専門職員養成制度と資料学・文書館学研究体制の整備

公文書館専門職員の養成・確保は緊急な課題であり、わが国にふさわしい専門職養成制度を早急に確立すべきである。この確立のためには、資料学・文書館学の研究者を確保し研究を推進するための体制を整備する必要がある。

#### 4. 公文書館法の整備

以上のような措置を講じる上で、現在の公文書館法は、公文書館の設置義務とその権限、専門職員の資格と地位、地域文書館への国の支援などについて不十分な点が多くみられるので、これを早急に整備して、公文書等の保存利用体制の確立を推進する必要がある。

### 人間活動と地球環境に関する日本学術会議の見解〔要旨〕

日本学術会議は、人間活動と地球環境に関する問題に強い関心を持ち、特別委員会や多数の研究連絡委員会において学術情報を集め、問題を総括し、研究体制の検討等を行ってきた。これらを基礎として見解を表明する。

日本はその自然環境の多様性や、近年の人間活動の急速な進展により環境問題に対して厳しい見方が必要である。この関連の研究は従来必ずしも十分ではなかった。国際協力の下に多岐にわたる学問分野がこれまでの枠を拡大し、多分野の学協会が融合して活動し、新しい分野の研究活動の強力な推進を図るべきである。また、地球環境問題はグローバルな問題であるが、個々の人間の対応から出発する問題でもあるから教育や啓蒙活動が急務である。

わが国では多数の省庁が研究を行っているが、相互関係や全体を見渡した有機的・体系的な研究推進政策が必要である。日本学術会議はこれらのための助言、連絡、調整等にその組織と能力を生かして活動し努力する。

### 医療技術と社会に関する特別委員会報告 —脳死をめぐる問題に関するまとめ—

医療技術は不断に進歩するが、その進歩が著しければ著しい程、医療技術と人々のものの考え方や社会的な習慣との間に調和を欠く状況が生じている。脳死の取扱をめぐる問題はその一つである。今期の本特別委員会では「脳死は人の死か」についての直接的な審議は保留し、「もし脳死をもって人の死とすると、あるいは臓器移植を視点にいと、何か問題になり、それを如何に考えるか」などについて論議した。本報告はその結果を整理したものである。(原文のまま、以下項目のみ)

- 1 脳死患者の医療上の取扱
- 2 意思の個別的確認について
- 3 死亡時刻の考え方に関して
- 4 医療提供側の問題点
- 5 医療費の取扱について

### 日本の学術研究環境—研究者の意識調査から—(第3常置委員会)刊行される

第3常置委員会は、第13期の「学術研究動向」調査を踏まえ、21世紀に向けて我が国の学術研究の中心的存在として活躍を期待される30歳代から40歳代の若手研究者(約200人)を対照に、学術研究の基礎となる「研究環境」についてのアンケート調査(調査事項は、大別して「学術研究の組織・体制、研究者の養成・確保と国際化、研究費の調達・運用と研究設備、情報の収集・保存」)を行い、その結果を基礎に報告書を作成した。なお、本書は日学資料として刊行している。

### 日本学術会議主催公開講演会「日本の学術研究環境は21世紀に対応できるか」開催される

「日本の学術研究環境」の刊行を記念し、平成3年6月6日(木)13時30分～17時00分に日本学術会議講堂において開催された。近藤会長の開会のあいさつ後、澤登第2部会員の司会により、①「日本の学術研究環境—研究者の意識調査から—」(森第7部会員)②純粋基礎研究は大学しかやらない(有馬第4部会員)③私立大学の立場から(松本第2部会員)④「産業の立場から」(内田第5部会員)の講演の後、総合討論を経て、渡邊第7部会員(第3常置委員会委員長)の閉会のあいさつをもって盛況のうちに終了した。なお、本公開講演会の内容は、追って日学双書で刊行する予定である。

### 平成3年1月以降、委員会等別の対外報告

部	1件	特別委員会	4件
常置委員会	1件	研究連絡委員会	23件

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(3403)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 部局 職名	(和)
	(英)
所属機関 所在地	〒 電話 内線 ( ) FAX (和)
	(英)
自宅 住所	〒 電話 内線 ( ) FAX (和)
	(英)
会誌送付先 ① 所属機関 ② 自宅	

学 部	学部学校名	卒業年次	年
歴 大学院	課程学校名	修了年次	年
学 位		取 得 年	年
研究領域 (下記にあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)			
1. 変異原    2. 検出系    3. 毒 性    4. 発生異常    5. 汚 染 6. 疫 学    7. 遺 伝    8. が ん    9. 微生物    10. 高等動物 ⑤ 11. 高等植物    12. 食 品    13. 気体・粉じん    14. 医薬品    15. 農 薬 16. 代 謝    17. 分子機構    18. その他 ( )			
研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)			
加入学会名 (本学会以外の)			

推 薦 者 (日本環境変異原学会評議員)
氏 名 (署名) ㊟
入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

住所・所属等変更届

平成 年 月 日

日本環境変異原学会  
事務局 御中

下記変更がありましたのでお届け致します。

フリガナ	
氏名	印
旧所属	

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

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13巻 第1号 1991年

平成3年8月10日 印刷  
平成3年8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