

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol.14 No.1 1992

日本環境変異原学会 第20回大会 東京



受付 ↑

大会会場



受賞講演



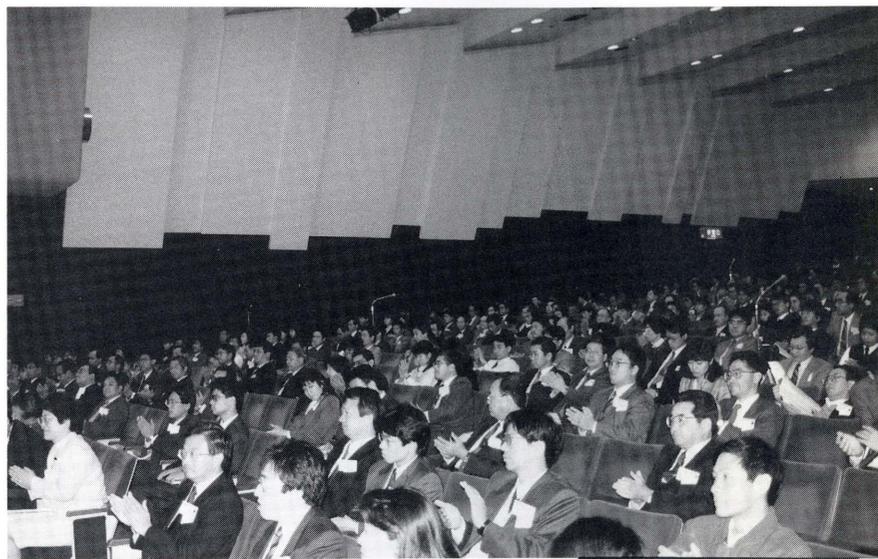
ポスターセッション

第20回大会
記念講演 ↓

懇親会 ↓



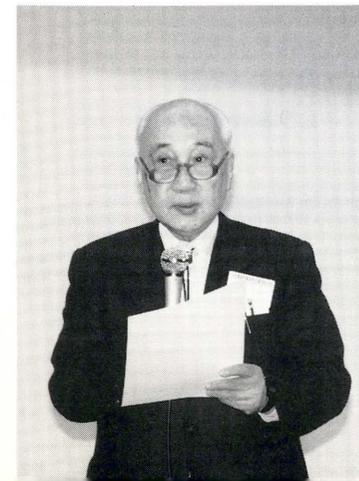
組織委員長挨拶



特別講演 ↓



近藤宗平名誉会員
挨拶 ↓



懇親会



環境変異原研究

第 14 卷 第 1 号 1992年

目 次

日本環境変異原学会第 20 回大会

特別記念講演論文

がん細胞に見られる多重遺伝子変化, がん化の多段階, 発がん要因の
多様性—発がん要因のリスクを考えるために 杉村 隆…………… 1

特別講演論文 I

変異原研究の現状と将来 早津 彦哉…………… 5

特別講演論文 II

Bioactivation of Pro-mutagens by Oxidation and Glutathione Conjugation
F. Peter Guengerich…………… 9

平成 3 年度学会奨励賞受賞者論文

食品・医薬品由来の変異原物質の分離・同定とその生成機構 菊川 清見…………… 25

シンポジウム「変異がん原性物質の代謝的活性化機構」

ニトロピレンの代謝的活性化機構 —腸内菌の役割の重要性—
大西克成, 木内武美, 片岡佳子, 宮西幸一, 植島基雄…………… 33

がん原性芳香族アミンを活性化するチトクローム P450
出川邪邦, 橋本嘉幸…………… 41

変異・がん原性物質を活性化する第 I 相酵素
鎌滝哲也, 小森雅之, 北村龍司, 内田泰輔, 福田博子, 松岡秀仁,
馬場 博, 井上裕章, 吉川邦衛…………… 49

変異・がん原性物質を活性化する第 II 相酵素 山添 康…………… 57

ワークショップ「いわゆる Non-mutagenic Carcinogen をめぐる諸問題」

医薬品における非変異・がん原性物質調査の立場から 津志本 元…………… 63
変異原性試験実施の立場から
——ラット肝複製 DNA 合成 (RDS) 試験の推奨——

宇野芳文, 岩瀬裕美子, 吉川邦衛…………… 75
変異原性物質の代謝研究の立場から

奥田晴宏, 小倉健一郎, 平塚 明, 渡部 列…………… 85

活性酸素研究の立場から 葛西 宏…………… 93

発がん性試験実施の立場から 黒川 雄二…………… 99

日本学会議だより (No. 24~25) …………… 105

付記

日本環境変異原学会 会 則…………… 109

“ 役員名簿…………… 110

“ 評議員名簿…………… 111

“ 入会申し込み書…………… 112

“ 住所・所属等変更届…………… 114

第 20 回大会特別記念講演論文

がん細胞に見られる多重遺伝子変化, がん化の多段階,
発がん要因の多様性—発がん要因の
リスクを考えるために

国立がんセンター 名誉総長 杉 村 隆

1. 環境変異原物質の認識と日本環境変異原学会
の二十年

日本環境変異原学会が誕生したのは昭和 47 年, 1972 年のことである。第一回目の研究会が東京で, 田島弥太郎先生の主宰の下に行われた。当時環境変異原物質を検出するには, 便宜的に大腸菌が用いられていた。トリプトファン要求性の WP-2 であるが, トリプトファンを合成できる復帰突然変異の発生によって変異原物質が検出出来る。

その頃は, in vitro で細菌に変異原性がある化学物質は, 次世代の子供に遺伝的異常を起こすということが簡単に主張されていた時代であった。ところが, 放射線影響研究所の J. V. Neel 博士の広範な研究, カナダの A. B. Miller 博士の研究などにより, 原爆の被曝や化学物質による子孫への遺伝的異常を証明することがなかなか困難であることがわかった。そのことが広く学会で認識されるようになったのが昭和 50 年代半ばである。

環境変異原に関する学問が進歩しないと, あるいは進歩している学問を学んでいないと, いたずらに変異原物質について恐怖感のみを強調したり, また反対にその存在を軽視しすぎたりする。

一方, in vivo でヒトの体細胞に, 環境変異原によって遺伝子変化が起こることは, リンパ球を培養して見られる染色体異常や, 赤血球膜上に見られるグリコホリンという糖蛋白質の欠損等によ

り証明された。考えてみれば, 地球上の人口が数十億にすぎないのに, 人間の体細胞は数十兆個(地球数万個分の人口に相当する)あることを考えてみれば, 子孫に認められない遺伝子変化が, 体細胞では認められるのは当然のことである。そしてこの体細胞の遺伝子変化が, がん化に関係する遺伝子に起こると, 正常細胞からがん細胞が発生する。

昭和 50 年代 (1975-1985) は, B. N. Ames 博士の Salmonella typhimurium, 特に薬剤耐性因子 (R-因子) pKM101 をプラスミドとして導入した Salmonella typhimurium 98 と 100 が主に用いられた。ヒスチジン要求性から, 非要求性の復帰突然変異を生ずる。98 はフレームシフト型変異原物質, 100 は塩基置換型変異原物質を検出する。多くの著明ながん原物質が, ラットの肝の S9 分画 (ミクロゾームと上清成分) の添加により代謝活性化を受けて, 変異原物質として検出されるようになった。すなわち, アフラトキシン B₁ のようなカビ毒, ベンツ (α) ピレンのような物質の燃焼により発生する芳香族炭化水素化合物, ジメチルアミノアゾベンゼンやアセチルアミノフルオレンのような合成物質, 体内でも発生するジメチルニトロソアミン, 植物性のピロリジジナルカロイド等の発がん物質に変異原性が証明された。さらに変異原性を指標として, ワラビの中の未知の発がん物質であるプタキロサイ

〒104 東京都中央区築地 5-1-1
Multiple genetic changes in cancer, multiple step carcinogenic process and multiple carcinogenic factors:
their significance in risk estimation on carcinogenic factors
Takashi Sugimura, President Emeritus
National Cancer Center, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

ド (アクライド A) が同定された。肉、魚等を加熱すると出来る Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP 等のヘテロサイクリックアミン型のがん原物質も発見されてきた。環境変異原物質の中には、確かに発がん物質があるという理解が世界的に通用するようになった。これと共に、フラボノイドのように変異原性はあっても、がん原性のない例も多数認識されて来た。さらに変異原性を検出し難くても、がん原性がある腫瘍プロモーター型の物質も認められて来た。

日本環境変異原学会は、この二十年間に大きな発展をとげた。唯一、一寸注意すべき点は、学問的のみならず社会的にも寄与していると自信過剰になり、ジャーナリズムに登場したがる風潮があったことであろう。

2. がん細胞に見られる多重遺伝子変化と、がん化過程の多段階

目を転じて、人間のがん細胞中に、がん原性ウイルスの発がん遺伝子 (v-onc) とホモロジーのある発がん遺伝子 (c-onc) が、ヒトのゲノム中に続々と発見されてきた。NIH3T3 細胞 (マウス胎児由来の繊維芽細胞) にヒトのがん細胞の DNA をトランスフェクトして、細胞のがん形質への転換を見ることにより、がん化に関与する遺伝子が、多数クローニングされるようになった。さらに、がん細胞に見られる Loss of heterozygosity (ヘテロ対立遺伝子喪失, LOH) や、遺伝性網膜芽細胞腫の研究から、がん抑制遺伝子が発見された。がん抑制遺伝子の機能低下又は喪失を意味する遺伝子変化は、がん化にポジティブに働くことがわかった。

研究はさらに発展して、人間のがん細胞には複数の遺伝子変化があることが明らかになった。二、三の例を示してみると、膵がんには Ki-ras の変異、変異した Ki-ras 遺伝子の増幅、c-myc 遺伝子の増幅、p53 がん抑制遺伝子の変化があり (寺田博士ら)、肺小細胞がんには、染色体 3 番短腕、13 番目長腕、17 番目短腕の LOH がある (横田博士ら)。13 番目の変化は RB 遺伝子、17 番目の変化は p53 遺伝子の変化を意味する。LOH は

一対の対立遺伝子の一つの喪失だが、がん化に関連しては、残る一つの遺伝子の DNA 塩基配列の変化の存在が意味がある。肺小細胞がんは、しばしば N-myc 遺伝子の増幅を認めるので、7 個の遺伝子変化があることになる。Vogelstein 博士、中村博士らは、大腸がん発生に関連して Ki-ras 遺伝子、p53 遺伝子、MCC (mutated in colorectal cancer), DCC (deleted in colorectal cancer), APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子の変化があることを詳細に報告した。これらのがん細胞の遺伝子変化により細胞が増殖し易い性質を持つようになる。従って遺伝子変化の数の多い細胞ほど増殖も早く、さらには浸潤や、がん細胞の転移能という性質にも関係する。

一つのがん細胞の塊は一つの細胞から由来している。細胞が遺伝子変化を蓄積しながら少しずつ増殖に都合の良い状況 (growth advantage) が出来てゆくからである。実際に、細胞がモノクローナル増殖 (単一細胞由来増殖) をしていることを広橋博士らは実験的に証明した。B 型肝炎ウイルス (HBV, DNA ウイルス) のゲノムの肝細胞ゲノムへの組み込みは、一個一個の肝細胞の染色体上のどの場所にでも起こるが、HBV 感染者の肝がんの DNA は、それぞれのがん塊により一定の場所のみに組み込みがある。あるがん塊が実際に一個の肝細胞由来であることがわかる。肝細胞には、ras 系の遺伝子変化は少ないが、染色体 4 番目長腕、16 番目長腕、17 番目短腕の LOH が悪性になるほど増加している。また食道がん、乳がんにおいては、11 番目染色体の INT2-HST1-EXP1-EXP2/PRAD1 をカバーする DNA 部分の染色体増幅があることがある。EXP2/PRAD1 は細胞周期に関与するサイクリン D と考えられる (寺田博士)。このような多数の遺伝子変化の中には、比較的がん化の過程の早期に起こるものと、後期に起こるものとがある。大ざっぱに言えば、ras 遺伝子群の点突然変異は比較的早く、遺伝子増幅は後期に起こると考えられている。遺伝子不安定性 (genomic instability) を起こす遺伝子変化が起こると、次々と遺伝子変化が誘発されることと考えられている。

3. 多様な環境変異原物質と発がん要因とその評価

一方このようながん遺伝子、がん抑制遺伝子の変化を起こす要因は何であろうか? 大別して体内で生ずるもの (Autobiotics) と体外より体内に取り込まれるもの (Xenobiotics) がある。Autobiotics としては、酸化的代謝に伴い発生する活性酸素と、一酸化窒素合成酵素 (NO synthase; NOS) により L-アルギニンから生じる NO がある。NO はメチル化シトシンに脱アミノ反応を起こしチミンを生じるので、CG 対が TA 対に変化する。また、NOS により生じた NO は、生体内のアミンと反応して、がん原性のニトロソアミンを形成する。酸化反応で DNA strand 上に 8-OH-deoxyguanosine が生ずるが、DNA の前駆体 pool の中でも 8-OH-deoxyguanosine-三リン酸が生じて、新しく合成された DNA 鎖に取り込まれ、点突然変異が起こる。Mut T という大腸菌のミューテーター遺伝子は 8-OH-guanosine-三リン酸を一リン酸に分解する酵素の欠損であることが関口博士らにより報告されている。

Xenobiotics としては、先に述べたように、天然物にそのまま含まれているものとして、カビ毒やアルカロイドがある。ものが燃焼すると生ずる芳香族炭化水素、ニトロ芳香族炭化水素がある。蛋白質やアミノ酸を加熱すると、アミノ- α -カルボリンや Trp-P-1, Glu-P-1 などが生成される。またクレアチニン、糖、アミノ酸を含む肉や魚を加熱すると、IQ などのヘテロサイクリックアミンが生成される。勿論、煙草のタールには数多くの変異原物質、がん原物質がある。これらの物質は、呼吸器、消化器、皮膚を通じて体に入る。その他に、紫外線や自然の放射線もある。

さらに大切なことに、腫瘍プロモーターという物質があり、また腫瘍プロモーション的に働く条件がある。腫瘍プロモーターとしてはマウスの実験的皮膚がん発生に関して、ホルボールエステル (TPA) 等がよく知られている。プロテインキナーゼ C を活性化することも知られている。かび、海藻等にあるインドールアルカロイドのテロオジジン等も、TPA と同じ性質を持った新プロモーターである。クロイソ海綿より得られるプロテインホ

スファターゼ阻害剤のオカダ酸も、腫瘍プロモーターとして作用する。しかし TPA 等の腫瘍プロモーターにより、ヒトのがんが発生したという確証は一つも報告されていない。

その代わりに、組織や細胞膜に傷害を与える物質や条件が、ヒトのがん化に関係している。高食塩摂取による胃炎では、胃粘膜上皮の再生に伴う細胞分裂があり、これが胃がん発生に関係する。また高脂肪摂取による胆汁酸分泌上昇は、大腸がんの発生促進に寄与している。B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルス (RNA ウイルス) が感染した肝は、肝細胞の死と、それを補うための肝細胞の細胞分裂が続く。このように、本来は起こらないですんだ細胞分裂により、遺伝子変化の蓄積が起こる。B 型肝炎ウイルスの場合は、ウイルスゲノムがヒトの肝細胞のゲノムに組み込まれる。この組み込みが、がん化に関係していることは当然期待されたが、積極的にそれを支持する報告もない。

このように各種の物質、要因、条件があって正常細胞ががん化する。どの一つをとって見ても、それだけではヒトの発がんを説明出来る量は、環境中はない。しかし実際には、多数の要因がそれぞれ微量で作用しているため、そもそもこれらの要因を、それぞれ単一物質として危険度評価をすることに問題があることがわかる。

がん細胞が発生した近傍の細胞には、前がん細胞がある。ある数の遺伝子変化がすでに起こっている細胞である。これらの細胞は、あと少数の細胞の変化が起これば、がん細胞になるので、二重がんや三重がんという風に、一つのがんが治っても、新しい二度目、三度目のがんが出来るのが実際に临床上多くなって来た。

環境変異原物質のほかに、抗変異原性物質や、腫瘍プロモーターに拮抗する物質もあるので、実際には、より複雑な話となる。結論的に、環境変異原物質が問題となった時には、その物がなければ一番良い。しかし、なくすことにより、個人的にも社会的にも、不便や経済的負担が多くなるならば個人としても、社会としても、その存在を認めるように諦めた方が良い場合もあると思われる。

4. 今後の日本環境変異原学会に望むこと

単に既存のスクリーニング法で変異原物質の存在を報告するだけでは不十分で、それが何を意味するのかを考える必要がある。既存の方法によるスクリーニングやガイドラインに基づいた仕事を重視せずに、新しい独創的な研究を展開することが

大切である。トランスジェニックマウスの研究、さらに沢山の正常遺伝子の中に混在する異常遺伝子を定量的に検出する方法の展開等が望まれる。日本環境変異原学会の縮小化をさげ、新局面に対応する変容を強く望む。

環境変異原研究 14: 5-8 (1992)

第 20 回大会特別講演論文 I

変異原研究の現状と将来

岡山大学 薬学部 早津彦哉

1991 年秋の年会で、上のようなタイトルで話をするように主催者から依頼された。私は変異原研究に入ってから大きな仕事をしたわけでもなく、またこの分野すべてについての知識を持っているわけでもない。かたよりや、至らない点が多くあると思うが、以下に現在の時点での私の考えを述べる。

1. 変異原研究の意義

環境変異原の研究は環境中の変異原を対象としているのだが、それだけでは不十分で、実験室にしか見当たらないような化学薬品による変異の研究も含む。従って、ここでは「環境」という制限を外して、変異原一般の研究について考えてみたい。「発がん物質は変異原物質である」という Ames の発表は、がん研究と変異原研究を強く結びつけることになり、変異原研究が人間の健康のために寄与するという考えの基盤を作った (Ames *et al.*, 1973)。今日、がん研究が進むにつれて、発がんの過程で変異が複数回起こっている例が見つかってきた (Fearon and Vogelstein, 1990; Hollstein *et al.*, 1991; Harris, 1991)。環境の因子によってこのような多重変異がもたらされるのか、あるいはたまたま自然突然変異が追加的に起こったためなのか (Loeb, 1991) という問題もある。しかし、最近発がん抑制遺伝子の一つ p53 遺伝子についてヒト肝がん組織中でアフラトキシン B1 によると思われる G-T の突然変異が見つかった (Ozturk *et al.*, 1991)。また、ヒト皮膚がん組織では紫外線によると思われる 2 連続

ピリミジン CC-TT の変異が見つかっている (Brash *et al.*, 1991)。これらのことは、環境因子による変異がヒト発がんに本当にかかわっているという強い証拠である (Vogelstein and Kinzler, 1992)。

変異の研究は、このようにがん制圧という目的からも、益々重要であると考えられる。一方、環境変異原が持ちうる作用の一つに、子孫への遺伝毒性があり、それには生殖細胞に及ぼす変異作用が問題となる (Ashby, 1992)。生殖細胞の変異は、一面では生物の進化に寄与してきたと言えるが、多くの環境変異原に人間が曝されるようになった現代社会で、これら変異原の遺伝影響が現われてくる恐れがある。しかし、これがわかるのはもっと年月を経た今後のことと思われる。

2. 変異原の探索

もうこれだけ沢山の変異原が見つかってしまっているのだから、これ以上はないのではないか、こう考える人は多いだろう。しかし私は、見つからないものがまだまだあるように思う。ジアルキルアミンと亜硝酸からニトロサミンが生成し、それに発がん性がある (Magee and Barnes, 1956) ことや、食べ物を焼くことによって発がん性のヘテロサイクリックアミンが生成することが発見され (Sugimura *et al.*, 1977)、大きなインパクトをもたらしたことは皆が知っている。人間の発がん原因として食物由来のものが大きな部分を占めていると考えられるが、これらのすでに知られている変異原性発がん物質だけが全原因ではないかも

〒700 岡山市津島中 1-1-1

Perspectives in the Studies of Environmental Mutagens

Hikoya Hayatsu

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

しれない。そこで、食べ物、飲み物、それもわが国だけでなく広い世界の各地のものにまで目を向ければ、新しい変異原の探索がいろいろとできるだろう。従来の探索研究では、変異原性をマスクする因子、例えば脂肪酸 (Hayatsu *et al.*, 1988)、の存在のため活性が見逃されていた場合がありうる。

わが国では法律の定めによって、医薬品、化粧品など化学物質は、世に出る前に必ず変異原性が調べられる。この中から新しいタイプの変異原物質が見つかる可能性もある。

環境の水域や大気を汚染する化学物質の中に変異原性を持つものが多数ある。これらの中に未知のものが潜んでいるかもしれない。例えば、淀川の水域には強い変異原性を持つ構造未知の多環化合物が常時存在する (Sakamoto and Hayatsu, 1990)。

3. Assay 法の発展

Ames 法をはじめとする種々の *in vitro* 変異原試験法が確立され、また *in vivo* の試験法も数多くできている (早津, 1990)。染色体異常や小核形成を指標とする *in vivo* テストは、遺伝子に直接損傷を与えない物質でも陽性になることがあるという問題を含みつつも、「genotoxicity」の assay 法として確立した感がある (日本環境変異原学会, 1988; 林, 1991)。従来法では検出できなかった遺伝子損傷性を検出する、といった新しいタイプの assay 法はさらに多く工夫されると思われる。また、これらの assay 法の国際的標準実験法を立案する努力も続けてなされるであろう (例えば、Organizing Committee of CSGMT/JEMS-MMS, 1992)。

変異原 assay にまつわる大きな問題の一つに、発がん性予測に役立つかどうかがある。これについては議論が続いており、今後の課題である (Gentile and Ashby, 1990; Ashby and Morrod, 1991)。

4. 変異原の検出, 定量

ヘテロサイクリックアミン, アフラトキシン, ベンゾ (a) ピレンなどの既知変異原が、環境中

どこにどれだけ存在するかを知ることは大切である。そこでこれらの特定物質の検出, 定量の方法が工夫され発展してきた (Hayatsu, 1991)。私自身の研究で言えば、銅フタロシアニンスルホン酸が持つ多環性化合物との親和性を利用して、多環構造を持つ変異原を選択的に吸着するブルーコットンやブルーレーヨンを開発した (Hayatsu *et al.*, 1983)。この方法は現在ヘテロサイクリックアミンの検出をはじめ多方面で利用されている (Hayatsu, 1990, 1992; 早津, 1992)。技術開発に強いという特徴のある日本の科学が、この方面でさらに伸びる可能性は大いにある。

また一方で、人体が変異原にどれだけ曝露されたかを評価する方法の一つに、生体内変異原—高分子のアダクト測定がある。代表的な方法となった ³²P ポストラベル法 (Randerath *et al.*, 1981) はわが国では未だ普及度が低い、新しい情報も得られる利点を備えた方法であり、非放射性標識法への展開も含んで、さらに発展が期待される。

5. 変異原の働き方: メカニズム研究

アメリカ環境変異原学会の機関誌が「Environmental and Molecular Mutagenesis」と名付けられているのも、基礎的なメカニズム研究が重要なことの反映である。今後、徹視的なレベルでのメカニズムの研究が益々必要になると思われる。

5-1. 代謝活性化 変異原の大部分は代謝活性化されてから DNA と反応する (Singer and Grunberger, 1983)。各々の変異原についての代謝経路—活性化だけでなく不活性化、排泄も含めて—の解明がさらに進むであろう。その中から新しい型の代謝活性化が見つかる可能性もある。

5-2. DNA 損傷反応と損傷の性質 これは DNA 化学/生化学の問題でもある。DNA をめぐるテクノロジーの最近の進歩と相まって、変異原の DNA への攻撃の様子を調べる研究が発展してきた。変異原物質の作用で生じた細胞内の二次的産物が DNA 損傷性の本体である場合も、その変異誘導機構が解明されねばならない。DNA のメチル化で最も多く生成する N⁷-メチルグアニンよりも、少ししか生じない O⁶-メチルグアニンの

方が生物への影響が重大であるという事実は、こういった徹視的研究の重要性を示している。

5-3. 修復 放射線やアルキル化剤による DNA 損傷が、細胞内でいかに取り除かれ修復されるかの研究は、生物学の基礎的研究の一つでもあった (Friedberg, 1985)。環境変異原の研究においても、これから見つかるかもしれない変異原も含めて、それらによる損傷修復を生物がどのように行なうかを調べることは重要である。その好い例は、8-ヒドロキシングアニン (8OH-G) についてである。活性酸素によって攻撃されると DNA 中のグアニンが 8OH-G になることが 1983 年に発見されて以来 (Kasai and Nishimura, 1983) 世界的に 8OH-G に関する研究が盛んに行なわれている。ごく最近になって 8OH-G を DNA から切り出す酵素がヒト細胞中に存在することがわかった (Chung *et al.*, 1991)。

6. 変異原性の修飾について

変異原の活性を減らしたり増したりする「修飾」の研究は、変異原の侵襲に対する防御、変異原発生の阻止などを目的としている (早津, 1991)。修飾はメカニズム研究の一部分とも考えられ、「なぜ修飾が起こるか」を明らかにすることが大切である。

私達の研究室ではヘミンなどのポルフィリン誘導体が多環性変異原物質の活性を抑制することを見いだした (Arimoto *et al.*, 1980)。この研究はクロロフィルの *in vivo* での変異原抑制作用を見いだすことにつながり (Negishi *et al.*, 1989)、生理的ポルフィリン化合物は多環性変異原と複合体を形成することによって変異原性の抑制をするという性質が明らかになった (Hayatsu *et al.*, 1988; Newmark, 1984)。これらポルフィリン化合物は食べ物に含まれているのでヒトが日常摂取している。食べ物の中には変異原物質や発がん物質もあるが、このような防御物質もある (Hayatsu *et al.*, 1992)。このような保護作用の期待されるものを食べ物の中からもっと色々見つけていって、「Preventive Diet」のメニューを作ることを目指したらよいと思う。

一方、これらの研究から派生する修飾因子自体

の性質解明も必要となろう。これは、代謝活性化研究で、活性化酵素自身を調べてゆくことと似ている。また、「修飾」の中には、変異原物質同志の間の相互作用も含まれる。

7. 結び

環境変異原の研究の中で、何といっても重要なのは、未だ知られていなかったか、知られていてもその重要性が認識されていなかったような変異原性因子を見出すことであろう。また、上に述べた各テーマはそれぞれ大きく発展する種を持っている。これからも、影響力のある新しい発見が続々と出現することが期待される。

参考文献

- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki and F. D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285.
- Arimoto, S., Y. Ohara, T. Namba, T. Negishi and H. Hayatsu (1980) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments, Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 662-668.
- Ashby, J. and R. S. Morrod (1991) Detection of human carcinogens, Nature, 352, 185-186.
- Ashby, J. (1992) "Carcinogens are mutagens": 1992, EMS Newsletter, March 1992, pp. 8-9.
- Brash, D. E., J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin and J. Ponten (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10124-10128.
- Chung, M. H., H. S. Kim, E. Ohtsuka, H. Kasai, F. Yamamoto and S. Nishimura (1991) An endonuclease activity in human polymorphonuclear neutrophils that removes 8-hydroxyguanine residues from DNA, Biochem. Biophys. Res. Commun., 178, 1422-1478.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis, Cell, 61, 759-767.
- Friedberg, E. C. (1985) DNA Repair, pp. 1-614, Freeman, New York.
- Gentile, J. M. and J. Ashby (1990) Are short-term genetic tests useful for predicting carcinogenicity? A panel discussion revisited, Environ. Mol. Mutag., 16, 324-327.

- Harris, C. C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s, *Cancer Res. (Suppl.)*, **51**, 5023s-5044s.
- 林 真 (1991) 小核試験, pp. 1-100, サイエンス社.
- Hayatsu, H., T. Oka, A. Wakata, Y. Ohara, T. Hayatsu, H. Kobayashi and S. Arimoto (1983) Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine, *Mutation Res.*, **119**, 233-238.
- Hayatsu, H., S. Arimoto and T. Negishi (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Res.*, **202**, 429-446.
- Hayatsu, H. (1990) Blue cotton—Broad possibility in assessing mutagens/carcinogens in the environment, In: G. Obe (Ed.), *Advances in Mutagenesis Res.*, Vol. 1, Springer, Berlin, pp. 1-26.
- 早津彦哉 (編集) (1990) 変異原物質試験法, pp. 1-78, 広川書店.
- Hayatsu, H. (ed.) (1991), *Mutagens in Food: Detection and Prevention*, pp. 1-286, CRC Press, Boca Raton.
- 早津彦哉 (1991) 「複合作用」について考える, *環境変異原研究*, **13**, 85-88.
- Hayatsu, H. (1992) Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulfonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens, *J. Chromatography*, **597**, 37-56.
- Hayatsu, H., T. Negishi and S. Arimoto (1992) Dietary inhibitors against mutagenesis and carcinogenesis, In: G. Bronzetti, H. Hayatsu, S. De Flora, M. D. Waters and D. M. Shankel (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*, Plenum, New York, in press.
- 早津彦哉 (1992) ブルーコットン, ブルーレーヨンの変異原研究への利用に関する文献, 変異原性試験, **1**, 印刷中.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991) p53 mutations in human cancers, *Science*, **253**, 49-53.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1983) Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen, *Nucleic Acids Res. Symp. Series*, **12**, 165-167.
- Loeb, L. A. (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis, *Cancer Res.*, **51**, 3075-3079.
- Magee, P. N. and J. M. Barnes (1956) The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine, *Brit. J. Cancer*, **10**, 114-122.
- 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.
- Newmark, H. L. (1984) A hypothesis for dietary components as blocking agents for chemical carcinogenesis: plant phenolics and pyrrole pigments, *Nutrition and Cancer*, **6**, 58-70.
- 日本環境変異原学会, 哺乳動物試験分科会 (編集) (1988) 化学物質による染色体異常アトラス, pp. 1-198, 朝倉書店.
- Organizing Committee of CSGMT/JEMS, MMS (ed.) (1992) Micronucleus test with rodent peripheral blood reticulocytes by acridine orange supervital staining, *Mutation Res.*, **278**, 81-214.
- Ozturk, M. *et al.* (1991) p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure, *Lancet*, **338**, 1356-1359.
- Randerath, K., M. V. Reddy and R. C. Gupta (1981) ³²P-labelling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6126-6129.
- Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo River system, Kyoto-Osaka, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 521-528.
- Singer, B. and D. Grunberger (1983) *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, pp. 1-347, Plenum, New York.
- Sugimura, T., T. Kawachi, M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Okamoto, K. Shudo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, Y. Iitaka and A. Itai (1977) Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products, *Proc. Jpn. Acad.*, **52**, 58-61.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1992) Carcinogens leave fingerprints, *Nature*, **355**, 209-210.

環境変異原研究 **14**: 9-24 (1992)

第 20 回大会特別講演論文 II

Bioactivation of Pro-mutagens by Oxidation and Glutathione Conjugation

Vanderbilt University School of Medicine F. Peter Guengerich

1. Introduction

Chemical carcinogenesis provides an excellent model for cancer research, in that administration of a single pure compound can produce tumors (Heidelberger, 1975). The understanding of mechanisms of chemical carcinogenesis is extremely important because of issues related to the assessment of risks of chemicals encountered in the environment. Most chemical carcinogens are not active in themselves but usually require transformation to electrophilic species capable of covalently binding to proteins, RNA, and DNA. DNA is thought to be the most critical target because alkylation can give rise to heritable mutations. In the past such DNA alkylation and mutation were only thought to be related to the initiation phase of multi-stage carcinogenesis. However, it now seems clear that some mutational and other genetic events may be involved in the latter stages of cancer, e.g., inactivation of tumor suppressor genes (Hollstein *et al.*, 1991). Therefore, understanding the events involved in the activation of chemicals and mutation is extremely relevant in the fabric of modern cancer research. There are a number of different ways in which enzymes can activate chemicals to mutagenic and carcinogenic forms (Miller and Miller, 1981)—this review will focus on oxidation by cytochrome P-450 (P-450) enzymes (Fig. 1) and on glutathione (GSH) conjugate formation.

2. Approaches to the Characterization of Roles of P-450 Enzymes

Obviously a great deal has been learned

from studies on the metabolism of chemical carcinogens in experimental animal models, but ultimately this knowledge has to be put into the context of human medicine. In 1978 our laboratory began a program of characterization of human P-450 enzymes (Wang *et al.*, 1979; Wang *et al.*, 1980). In the 1980s, a number of P-450 enzymes were purified on the basis of their abilities to catalyze the oxidation of specific drug substrates (Distlerath *et al.*, 1985; Guengerich *et al.*, 1986; Shimada *et al.*, 1986). These enzymes have been characterized with the use of biochemical and molecular genetic approaches, in this (Guengerich, 1989; Guengerich *et al.*, 1991a) and other laboratories (e.g., Gonzalez, 1989; Komori *et al.*, 1988). A major focus of these studies has been the elucidation of the catalytic selectivities of the enzymes towards drugs, steroids, and carcinogens. Although the studies with drug and steroid substrates may seem irrelevant to the scope of this research on mutagens, the work has resulted not only in the purification of most of the relevant enzymes but also in the development of useful non-invasive markers that can be used to estimate the levels of distinct P-450 enzymes in different individuals.

The work on catalytic specificity has been facilitated by the availability of a convenient assay of genotoxicity, the so-called "umu test" developed by Nakamura and his associates (Oda *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1987). This assay utilizes the induction of the SOS response by alkylation of DNA in *Salmonella typhimurium* to activate the regulatory region of the *umuC* gene, which is fused to a *lacZ*

Department of Biochemistry and Center in Molecular Toxicology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee 37232-0146, U. S. A.

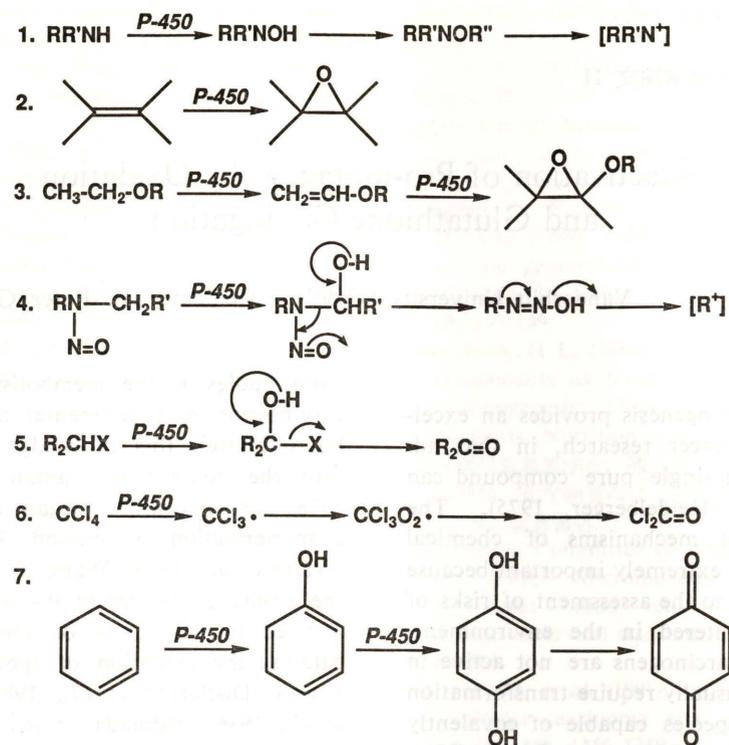


Fig. 1. Same P-450-catalyzed reactions by which chemical carcinogens are activated (Guengerich and Shimada, 1991).

structural gene in the plasmid pSK1002. Thus, DNA damage can be monitored colorimetrically, using short incubation periods. While this assay has historically not been as effective for some of the smaller alkylating agents (Shimada *et al.*, 1989a), we have now found that the overexpression of acetyl transfer activity in the bacterium considerably increases the sensitivity for measuring the activation of nitrosamines (Yamazaki *et al.*, 1992). After first obtaining results with this system we have usually repeated our work and measured either specific DNA adducts [e.g. (Shimada and Guengerich, 1989)] or actual metabolites [e.g. (Butler *et al.*, 1989; Guengerich *et al.*, 1991b)].

With the isolation of purified human liver enzymes there are a number of approaches that can now be utilized to examine the issue of catalytic specificity of P-450s. These have been discussed in detail elsewhere (Guengerich and Shimada, 1991), along with the advantages and disadvantages of each, and are listed in Table 1. Suffice it to say that the first three

approaches are most useful in assessing the overall contribution that a particular P-450 makes to the catalytic activity under consideration, and the latter two approaches are most useful in distinguishing among closely related P-450s (Guengerich and Shimada, 1991; Gonzalez *et al.*, 1991). Indeed, techniques of cDNA expression have been required to address issues of catalytic specificity towards drugs oxidized by proteins in the human P-450 2C family (Brian *et al.*, 1989), although the approach by itself has not been sufficient to resolve the issue of (*S*)-mephenytoin 4'-hydroxylation (Srivastava *et al.*, 1991). As pointed out elsewhere (Guengerich and Shimada, 1991), the most reliable conclusions about catalytic specificity have been reached when the battery of approaches listed in Table 1 has been applied, and reliance on only a single approach carries a considerable element of risk. Some of the approaches listed are applicable to *in vivo* studies, with modification, and can be highly useful. This battery of approaches has been widely ap-

Table 1. Approaches to Elucidation of Catalytic Specificities of P-450s^{a)}

1. Attenuation of activity by selective chemical inhibitors (in microsomes)
2. Immunoinhibition of activity with specific antibodies (in microsomes)
3. Correlation of catalytic activity with a marker activity or immunochemically-determined amount of a P-450 (in microsomes)
4. Measurement of catalytic activities of purified P-450 enzymes
5. Measurement of catalytic activities of P-450 enzymes expressed from cDNAs in heterologous vectors

^{a)} For further discussion see (Guengerich and Shimada, 1991).

plied now in the case of the P-450 enzymes and is, in principle, applicable to other enzymes as well—it has not been applied much at all in the case of the so-called "Phase II" conjugating enzymes.

3. Variation of Enzyme Activities in Humans

There is considerable evidence that modulation of enzyme activities related to the metabolism of carcinogens can have dramatic effects on tumor development in experimental animals (Guengerich, 1988b; Nebert, 1989), and there is considerable variation in the levels of these enzymes in humans. For instance, levels of most of the P-450s under consideration here vary by 10-1000 fold among individuals (Guengerich and Turvy, 1991). This variation is also seen in *in vivo* parameters of drug metabolism (Mahgoub *et al.*, 1989; Küpfer and Preisig, 1983; Schellens *et al.*, 1988).

The sources of this variation are both genetic and environmental (Vesell, 1984). The best documented cases of genetic polymorphism in the P-450s involve the debrisoquine 4-hydroxylase, P-450 2D6 (Smith *et al.*,

1978; Gonzalez *et al.*, 1988), and the (*S*)-mephenytoin 4'-hydroxylase, a P-450 2C enzyme (Wilkinson *et al.*, 1989; Umbenhauer *et al.*, 1987). Genetic polymorphism has also been postulated in the cases of P-450 3A5 (Wrighton *et al.*, 1990), 1A1 (Kellerman *et al.*, 1973), and 1A2 (Kadlubar *et al.*, 1990), although it is not clear that the defect is at the level of the structural gene in any of these cases. Environmental factors also contribute dramatically to the variation in levels of many P-450s—the levels of P-450 1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 2C10, 2E1, and 3A4 have been shown to be inducible in humans (Morel *et al.*, 1990; Guengerich and Shimada, 1991) and several other P-450s probably are. Several of the human P-450s can also be inhibited *in vivo*, either in a reversible or irreversible manner (Murray and Reidy, 1990). Some of the inhibitors are found in commonly used foods (Guengerich and Kim, 1990; Conney, 1982) and drugs (Guengerich, 1988a; Guengerich, 1990).

Drugs are of potentially great use in the measurement of levels of P-450s involved in the activation and detoxication of carcinogens because they are metabolized by the

same enzymes, and drugs can be safely administered to people in order to carry out such "non-invasive assays." Thus, drugs can serve as surrogate substrates in this regard. Several examples of the use of such markers will be presented. Of course, it is still a great challenge to associate any patterns of enzyme levels with parameters such as DNA adduct burden or cancer itself, but rational approaches are being developed (e.g., Guengerich and Shimada, 1991; Guengerich, 1991).

4. Roles of Individual Human P-450s in the Activation of Chemical Carcinogens

P-450 1A1

P-450 1A1 has long been known to be involved in the oxidation of benzo(a)pyrene and other polycyclic hydrocarbons through studies with experimental animals (Conney, 1982; Nebert, 1989) and human tissues (Robie-Suh *et al.*, 1980; Fujino *et al.*, 1982).

The enzyme appears to be present only at very low levels in most human liver samples (Küpfer and Preisig, 1983; Omiecinski *et al.*, 1990). However, it seems to be an important enzyme involved in the oxidation of benzo(a)pyrene to its 7,8-oxide in human liver (Shimada *et al.*, 1989b).

The contribution of P-450 1A1 to the activation of polycyclic hydrocarbons is probably much greater in extrahepatic tissues (Fujino *et al.*, 1982). Recently we have been able to purify P-450 1A1 to homogeneity from human lung microsomes (Shimada *et al.*, 1992). The enzyme appears to have the expected catalytic properties, although considerable loss of catalytic activity was experienced in the final step of purification (Shimada *et al.*, 1992).

P-450 1A2

Human P-450 1A2 appears to be expressed almost exclusively in the liver (Guengerich,

1989; Shimada *et al.*, 1992). The enzyme was originally purified on the basis of its ability to catalyze phenacetin *O*-deethylation (Distlerath *et al.*, 1985) and was subsequently shown to activate many arylamines (Table 2) (Shimada *et al.*, 1989a; Butler *et al.*, 1989). The enzyme is strongly inhibited by 7,8-benzoflavone (α -naphthoflavone) in *in vitro* experiments (Butler *et al.*, 1989; Shimada *et al.*, 1989a). Caffeine 3-demethylation is catalyzed by this enzyme and this assay provides a useful non-invasive measurement of the enzyme (Butler *et al.*, 1989). P-450 1A2 is known to be inducible by cigarette smoking or consumption of charbroiled meat or cruciferous vegetables (Pantuck *et al.*, 1974; Conney, 1982). In addition, P-450 1A2 appears to be a major human liver enzyme involved in the activation of components of cigarette smoke condensate (Shimada and Guengerich, 1991).

P-450 2A6

P-450 2A6 has been characterized by cDNA cloning (Yamano *et al.*, 1990) and also purified from human liver (Yun *et al.*, 1991). It appears to be the major enzyme involved in the 7-hydroxylation of coumarin (Yamano *et al.*, 1990; Yun *et al.*, 1991a) and this activity can be used in *in vitro* phenotyping assays. The purified enzyme can activate some carcinogens, including aflatoxin B₁ and *N*-nitrosodiethylamine (Crespi *et al.*, 1991; Yun *et al.*, 1991), but the highest level of P-450 2A6 found in a human liver sample was still only 1% of the total P-450 and the enzyme does not contribute substantially to aflatoxin B₁ bioactivation (Yun *et al.*, 1991). It apparently can make a small contribution to the activation of 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) and *N*-nitrosodiethylamine in those livers in which high levels are found (Yun *et al.*, 1992; Ishizaki *et al.*, 1991).

Table 2. Chemical Carcinogens Activated by Human P-450 1A2^{a)}

2-Acetylaminofluorene
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine (PhIP)
2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline (DiMeIQx)
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoline (MeIQ)
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline (MeIQx)
2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoline (IQ)
2-Amino-6-methyldipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazole (Glu P-1)
2-Aminoanthracene
2-Aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazole (Glu P-2)
2-Aminofluorene
2-Aminonaphthalene
3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3- <i>b</i>]indole (Trp P-2)
4-Aminobiphenyl
4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)

^{a)} See (Guengerich and Shimada, 1991; Smith *et al.*, 1992) and references therein.

Table 3. Chemical Carcinogens Activated by Human P-450 2E1^{a)}

Acrylonitrile
Benzene
Carbon tetrachloride
Chloroform
Ethyl bromide
Ethyl carbamate (urethan)
<i>N</i> -Nitrosodimethylamine
<i>N</i> -Nitrosodiethylamine
<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -butylamine
<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -benzylamine
Styrene
Trichloroethylene
Vinyl bromide
Vinyl chloride
Vinyl carbamate

^{a)} See (Guengerich *et al.*, 1991b; Guengerich and Shimada, 1991) and references therein.

P-450 2E1

P-450 2E1 was isolated from human liver on the basis of its immunochemical similarity to rat P-450 2E1 (Wrighton *et al.*, 1987; Guengerich *et al.*, 1991b). It appears to be inducible by ethanol in humans (Perrot *et al.*, 1989). Human P-450 2E1 catalyzes the activation of a number of carcinogens which have only their small size in common (Table 3) (Guengerich *et al.*, 1991b). Other small halogenated hydrocarbons are also oxidized to electrophiles by this enzyme (e.g., ethylene dibromide, methylene dichloride) but these reactions should probably be considered detoxications because they direct substrate away from the GSH conjugating reactions, which are more directly related to genotoxicity (*vide infra*). Characteristic inhibitors of P-450 2E1 include 4-methylpyrazole and diethylthiocarbamate; disulfiram, the oxidized form of the latter, can be used *in vivo* in humans (Guengerich *et al.*, 1991b). We have found that 6-hydroxylation of the drug chlorzoxazone is a very useful marker of this enzyme *in vitro* and are working to develop its *in vivo* use as a non-invasive assay for P-450 2E1 in humans (Peter *et al.*, 1990).

P-450 3A4

There are actually four closely related P-450 genes in this family, but P-450 3A7 is only expressed in fetal liver (Komoari *et al.*, 1988), P-450 3A3 is not appreciably expressed in liver (Bork *et al.*, 1989), and P-450 3A5 is only expressed in 25% of the population (Wrighton *et al.*, 1989)—when P-450 3A5 is present the level is usually considerably less than that of P-450 3A4 and P-450 3A5 is generally not as effective as P-450 3A4 in activating carcinogens (Wrighton *et al.*, 1990). A list of carcinogens activated by P-450 3A4 appears in Table 4. The enzyme plays an important role in the oxidation of some polycyclic hydrocarbon dihydrodiols because of the low level of P-450 1A1 in human liver (Shimada *et al.*, 1989b). In the oxidation of aflatoxin B₁ and the pyrrolizidine alkaloid senecionine, P-450 3A4 is the most important enzyme involved in the activation reaction (to form the 8,9-oxide or dehydro compound, respectively) but also catalyzes the formation of detoxication most arylamines are activated by P-450 1A2 (Table 2) some [e.g., 6-amino-chrysene and 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline)] are most effectively *N*-oxygenated by

P-450 3A4 (Shimada *et al.*, 1989a; Yun *et al.*, 1992). P-450 3A4 appears to be induced by barbiturates, rifampicin, and dexamethasone (Watkins *et al.*, 1985; Morel *et al.*, 1990). Inhibitors include the antibiotic troleandomycin and the progestogenic oral contraceptive gestodene, which are effective *in vivo* and also useful in *in vitro* investigations (Delaforge *et al.*, 1988; Guengerich, 1990). It is also of interest that the ulcer drug cimetidine (Knodell *et al.*, 1991) and components of grapefruit juice [possibly naringenin (Guengerich and Kim, 1990)] are also inhibitory to P-450 3A4.

There are several non-invasive assays of use in the estimation of relative levels of P-450 3A4 in human liver. Nifedipine oxidation, the reaction first used in the isolation of P-450 3A4 (Guengerich *et al.*, 1986), is one possibility, although the pharmacokinetics can be complex. Erythromycin *N*-demethylation utilizes the expiration of CO₂ in the breath but requires the intravenous administration of radioisotopes (Watkins *et al.*, 1989). Lidocaine *N*-ethylation (Oellerich *et al.*, 1990; Bargetzi *et al.*, 1989; Imaoka *et al.*, 1990) suffers from the pharmacological activity of the drug. Dapsone *N*-hydroxylation has recently been developed as a safe and useful method (Fleming *et al.*, 1991). Since P-450 3A4 converts cortisol to its 6 β -hydroxy product (Ged *et al.*, 1989; Brian *et al.*, 1990), measurement of the ratio of the two compounds in urine provides a useful assay without administration of any drugs (Ged *et al.*, 1989; Park, 1981).

The level of P-450 3A4 varies at least 40-fold when measured in human liver microsomes (Guengerich, 1988a; Bork *et al.*, 1989) and by at least one order of magnitude when *in vivo* parameters are measured (Schellens *et al.*, 1988). This level of variation is similar to that seen with other human P-450s, P-450 3A4 can constitute as much as 60% of the total P-450 in human liver microsomes (Guengerich, 1990). Thus, even in some situations where other P-450s have intrinsically high catalytic activities their overall roles can be minor in comparison to that of P-450 3A4 (Guengerich and Shimada, 1991).

5. Activation of Chemical Carcinogens by GSH Conjugation

In general, conjugation with GSH is a protective mechanism and represents a major route of detoxication. In some cases reactive electrophiles are actually generated via GSH conjugation (Monks *et al.*, 1990a). For instance, GSH conjugation is involved in the activation of bromobenzene to toxic forms (Monks *et al.*, 1990b). Polyhalogenated olefins are conjugated with GSH and processed to cysteine derivatives, which undergo β -elimination (Anders *et al.*, 1988). If a halogen substituent other than fluorine is present, these undergo elimination to yield halo-substituted thioketenes, which are genotoxic (Vamvakas *et al.*, 1989). Specific DNA adducts have not been characterized.

1,2-Dihaloalkanes

Another case of GSH-dependent activation involves these *vic*-haloalkanes (Fig. 2). Our laboratory became interested in this subject with the reports of Rannug (Rannug *et al.*, 1978; Rannug and Beije, 1979; Rannug, 1980) and van Bladeren *et al.* (1980) that the bacterial mutagenicity of these compounds was dependent upon rat liver cytosol and GSH. We demonstrated that radioactivity from ethylene dibromide became bound to DNA under such conditions (Guengerich *et al.*, 1980). Subsequently it was shown that radio-label from GSH was bound to DNA to the same extent as label from formed *in vitro* and *in vivo* was demonstrated to be *S*-[2-(*N*⁷-guanyl)ethyl]-GSH (Ozawa and Guengerich, 1983; Koga *et al.*, 1986). Evidence has been provided that anchimeric assistance is a critical factor in the reaction of the half-mustard to generate this adduct (Inskeep and Guengerich, 1984) and that the episulfonium ion is an obligatory intermediate (Peterson *et al.*, 1988).

More recently we considered the formation of minor DNA adducts (Fig. 3). All adducts identified to date appear to be derived from the half-mustard *S*-(2-bromoethyl)GSH and contain the GSH moiety. *S*-[2-(*N*¹-adenyl)ethyl]GSH is formed to the extent of 1–2% (Kim *et al.*, 1990) and *S*-[2-(*N*²-guanyl)ethyl]GSH and *S*-[2-(*O*⁸-guanyl)ethyl]GSH are found at levels of 0.1–0.2% of the total DNA

Table 4. Chemical Carcinogens Activated by Human P-450 3A4^{a)}

Aflatoxin B₁

Aflatoxin G₁

6-Aminochrysene

7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyrene

9,10-Dihydroxy-9,10-dihydrobenzo[*b*]fluoranthene

3,4-Dihydroxy-3,4-dihydro-7,12-dimethylbenzo[*a*]anthracene

4,4'-Methylene-bis(2-chloroaniline) (MOCA)

1-Nitropyrene

Senecionine

Sterigmatocystin

Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate

^{a)} See (Guengerich and Shimada, 1991; Raney *et al.*, 1992; Yun *et al.*, 1992) and references therein.

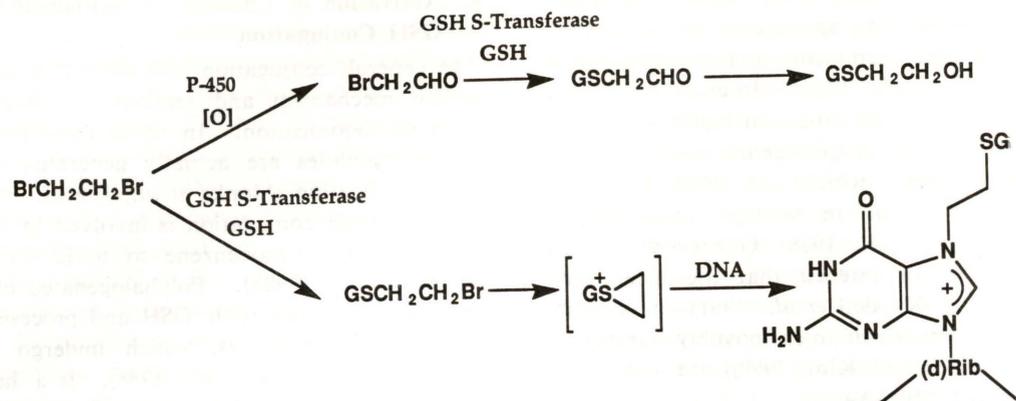


Fig. 2. Metabolism of ethylene dibromide by oxidation and GSH conjugation.

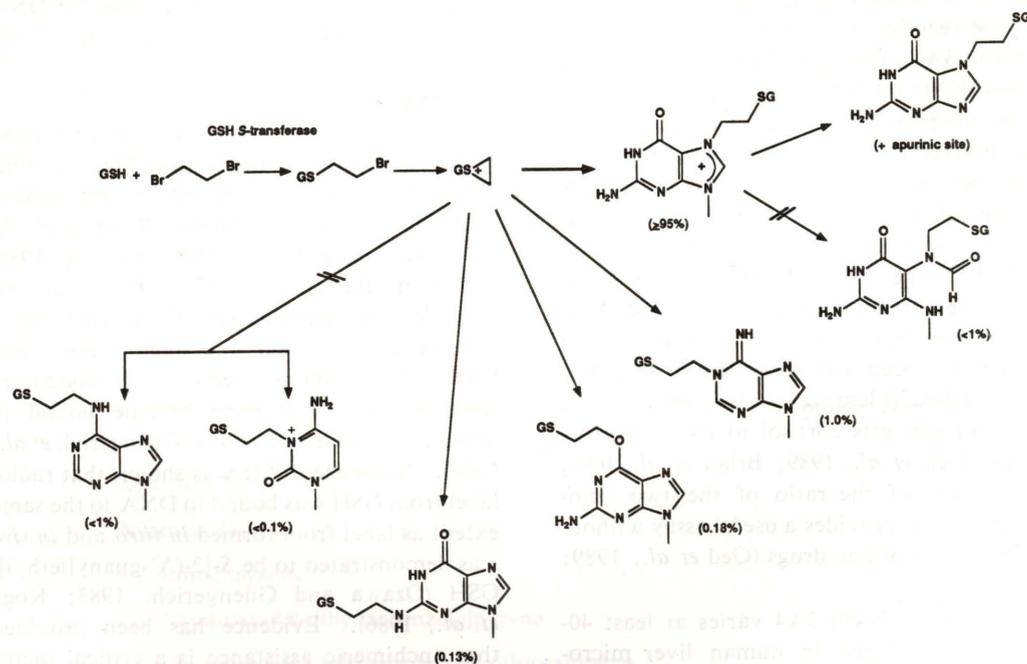


Fig. 3. Scheme showing formation of DNA adducts from ethylene dibromide and those not detectable at certain limits. The percentages refer to the fraction of adducts formed in calf thymus DNA (Cmarik *et al.*, 1991).

adducts (Cmarik *et al.*, 1991). Evidence has been presented that none of these minor adducts appears to be responsible for the major mutations seen (Kim *et al.*, 1990; Cmarik *et al.*, 1991). Standards of several other potential adducts were prepared and not found at the levels indicated—these adducts include *S*-[2-(*N*³-cytosinyl)ethyl]GSH and the imidazole ring-opened form of *S*-[2-(*N*⁷-guanyl)-

ethyl]GSH (Humphreys *et al.*, 1990; Cmarik *et al.*, 1991). Half-mustards containing derivatives of GSH and cysteine also form *N*⁷-guanyl adducts and are mutagenic (Humphreys *et al.*, 1990). A number of these half-mustards were prepared and added to *Salmonella typhimurium* TA100 cells—the ratio of base pair revertants to *N*⁷-guanyl adducts varied considerably for these mustard derivatives

(Humphreys *et al.*, 1990). The glutathionyl half-mustard gave the highest ratio of mutants to adducts; thus we concluded that the interaction of the glutathionyl moiety of the DNA adduct with DNA or the polymerase is somehow important in causing mispairing.

Bacteriophage M13mp18 DNA was treated with the half-mustard analog *S*-[2-(chloroethyl)-GSH and the mutants showing phenotypic changes in the *lacZ* gene were isolated (Cmarik *et al.*, 1991). Analysis of the nucleotide sequences of the 50 induced mutants indicated that the major mutation (70%) was a GC to AT transition. As expected from work with *S. typhimurium* tester strains (Rannug, 1980), only base pair mutations were observed and frameshifts were not. Only one GC to TA transversion was found; such a mutation would have been expected to predominate if apurinic sites made a large contribution to mutations (Loeb, 1989). Comparison of the mutation spectrum with the spectrum of adducts cleaved by piperidine treatment (Fig. 4) indicates that i) all guanine residues are

alkylated to some extent, ii) some regions are alkylated but yield no mutations, iii) some regions (particular runs of guanyl residues) are heavily alkylated and also produce many mutations, and iv) some regions are lightly alkylated but produce many mutations. Thus, the results suggest that the sequence context of DNA modification may be very important in causing mutations. Further studies with modified oligonucleotides corresponding to these regions should be useful in understanding these phenomena.

Several possibilities may be considered regarding the basis of the mutants. One possibility is that pairing of *S*-[2-(*N*⁷-guanyl)ethyl]-GSH moiety with a thymidine moiety is thermodynamically favorable (to explain the G to A transition). However, results with the modified oligomer d[CATGCCT] bearing the adduct at the central position do not provide evidence for such a hypothesis (Oida *et al.*, 1991). Although the presence of the *N*⁷-guanyl lesion considerably disrupts pairing to a deoxycytidyl residue, this is still the

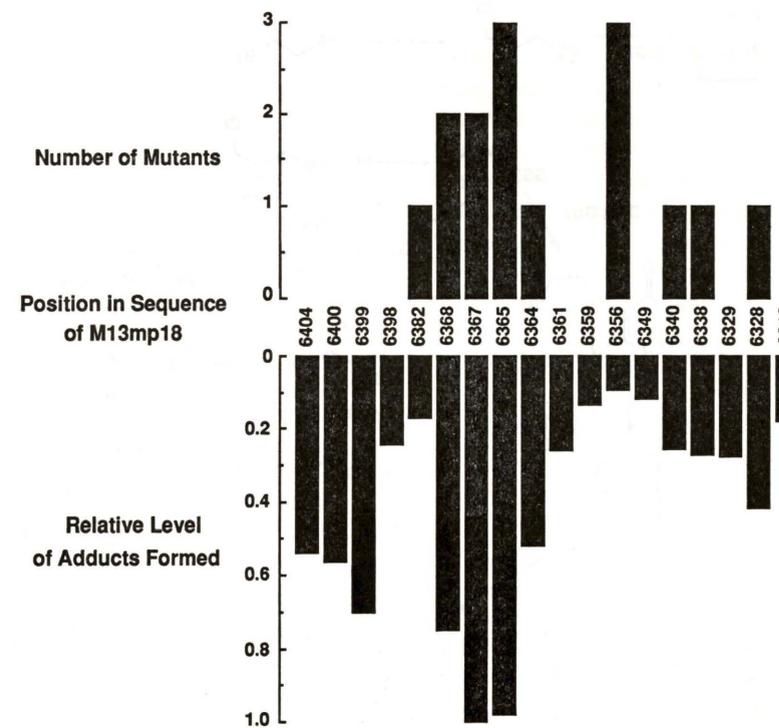


Fig. 4. Correlation of *S*-[2-(chloroethyl)GSH-induced mutations with levels of *N*⁷-guanyl adduct formation in bacteriophage M13mp18. Only guanines known to be phenotypically detectable are shown (Cmarik *et al.*, 1991).

preferred base for pairing. Further, the glutathionyl moiety appears to be in the major groove, with enough space so as not to be in close contact with the atoms in the DNA chain. There does not seem to be a considerable distortion of the gross structure of the oligomer (Oida *et al.*, 1991).

It is conceivable that a minor DNA adduct may be responsible for the mutations, instead of the predominant *S*-[2-(*N*⁷-guanyl)ethyl]GSH lesion. However, considerations regarding the mutant frequency in both revertant (Humphreys *et al.*, 1990) and forward (Cmarik *et al.*, 1991) mutation systems argue against this possibility. Another point to consider is that the sequence of the oligomer used in most of the physical studies to date, d[CATGCCT], is not actually known to cause mutations (in that it has not been examined) and may not be a good model. Further studies will be required to examine these possibilities. At this time we feel that the most plausible explanation for our results is

that the mutations must be understood in the context of interactions of the atoms of the modification, especially the glutathionyl portion, with the polymerase enzyme and the incoming nucleotide (Cmarik *et al.*, 1991).

GSH-dependent Activation of Other Compounds

The paradigm presented for ethylene dibromide may be useful in understanding other GSH-dependent bioactivation reactions. For instance, there is some evidence for similar events involved in the formation of some DNA adducts from the anti-cancer drug cisplatin (Eastman, 1987). Recently we characterized three DNA adducts formed *in vitro* from the pesticide 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP) and GSH (Fig. 5) (Humphreys *et al.*, 1991). The major adducts are the two diastereomeric alcohols, and adjacent guanyl residues are cross-linked as shown (Humphreys *et al.*, 1991). All of the chemistry can be explained in terms of episulfonium

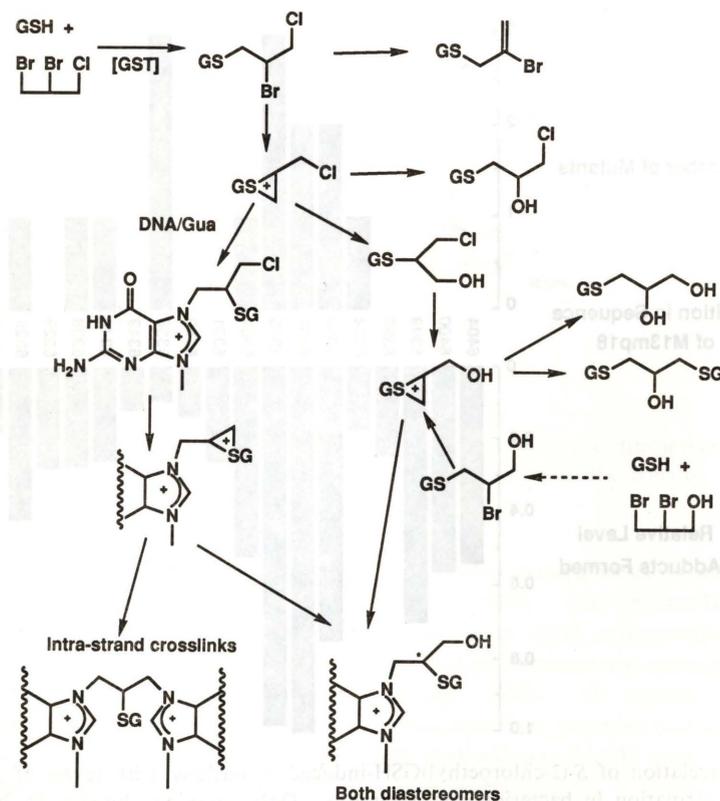


Fig. 5. GSH-dependent activation of DBCP (Humphreys *et al.*, 1991).

ion intermediates, with attack of nucleophiles at the unsubstituted methylene in every case (Fig. 5). However, only a trace of one of the products could be found *in vivo*, so the significance of these adducts to the toxic effects of DBCP is still unclear (Humphreys *et al.*, 1991; Soderlung *et al.*, 1988).

Another case in which GSH conjugation may be involved in bioactivation is with the dihalomethanes, which are of particular interest because of issues of risk assessment of methylene dichloride. The pathways of metabolism are shown in Fig. 6. Oxidation by P-450 [2E1 (Reitz *et al.*, 1989; Guengerich *et al.*, 1991b)] forms CO while GSH conjugation yields HCHO (Kubic and Anders, 1978; Ahmed and Anders, 1976). The GSH conjugation pathway has been suggested to be more closely linked to the tumors seen in mice because both tumor induction and (*in vitro*) HCHO formation show lack of saturability with CH_2Cl_2 dose (Andersen *et al.*, 1987; Reitz *et al.*, 1989). Studies of the *in vitro* mutagenicity of dihalomethanes have yielded a variety of different results (van Bladeren *et al.*, 1980; Jongen *et al.*, 1978; Osterman-Golkar *et al.*, 1983); to date no adducts have been identified. Heck and his associates have suggested that the formaldehyde produced in this process may be sufficient to crosslink protein and DNA to produce the observed tumors (Heck *et al.*, 1990). Further studies on the role of GSH in dihalomethane genotoxicity are in progress in this laboratory.

6. Summary

Most chemical carcinogens are not direct-acting mutagens and require activation to electrophilic products capable of binding to DNA. Oxidation by cytochrome P-450 (P-450) enzymes is a common mode of bioactivation for many of these chemicals. Several approaches have been used to delineate the catalytic specificity of individual human P-450 enzymes in the oxidation of pro-mutagens, including their purification from human liver. In human liver P-450s 1A2, 2E1, and 3A4 appear to have major roles in the activation of many of the most notorious pro-mutagens. P-450 1A1 is prob-

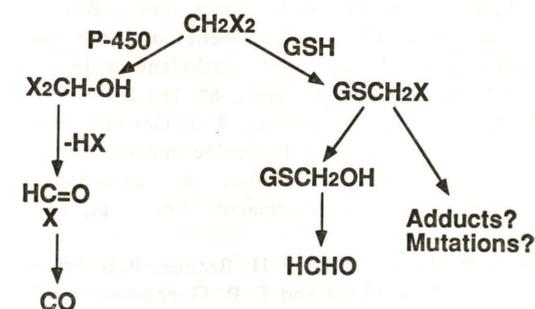


Fig. 6. Metabolism of methylene dihalides (Kubic and Anders, 1978; Ahmed and Anders, 1976).

ably also important in extrahepatic tissues. Other studies on the catalytic selectivity of P-450s for oxidation of drugs and steroids have led to the development of non-invasive assays that can be used to assess the levels of individual P-450s in humans, the inducibility of these P-450s, and their relevance to cancer risk. Generally conjugation of chemicals with glutathione (GSH) is a detoxication process but in some cases results in activation of pro-mutagens. Ethylene dibromide has been studied as an example. Several lines of evidence suggest that the major DNA adduct, *S*-[2-(*N*⁷-guanyl)ethyl]GSH, is responsible for most of the mutations seen in prokaryotic systems. Further studies are directed towards understanding the exact chemical basis of base pair mutations induced by this DNA adduct. GSH conjugation also appears to be important in the activation of 1,2-dibromo-3-chloropropane and methylene dihalides.

7. Acknowledgment

This work was supported in part by United States Public Health Service grants CA44353 and ES 00267.

References

- Ahmed, A. E. and M. W. Anders (1976) Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic halide, I, *In vitro* studies, *Drug Metab. Dispos.*, **4**, 357-361.
- Anders, M. W., L. Lash, W. Dekant, A. A. Elfarra and D. R. Dohn (1988) Biosynthesis and biotransformation of glutathione *S*-conjugates to toxic metabolites, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **18**, 311-341.
- Andersen, M. E., H. J. Clewell, III, M. L. Gargas,

- F. A. Smith and R. H. Reitz (1987) Physiologically based pharmacokinetics and the risk assessment process for methylene chloride, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **87**, 185-205.
- Bargetzi, M. J., T. Aoyama, F. J. Gonzalez and U. A. Meyer (1989) Lidocaine metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450III_{A4}, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **46**, 521-527.
- Bork, R. W., T. Muto, P. H. Beaune, P. K. Srivastava, R. S. Lloyd and F. P. Guengerich (1989) Characterization of mRNA species related to human liver cytochrome P-450 nifedipine oxidase and the regulation of catalytic activity, *J. Biol. Chem.*, **264**, 910-919.
- Brian, W. R., M.-A. Sari, M. Iwasaki, T. Shimada, L. S. Kaminsky and F. P. Guengerich (1990) Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 III_{A4} expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, **29**, 11280-11292.
- Brian, W. R., P. K. Srivastava, D. R. Umbenhauer, R. S. Lloyd and F. P. Guengerich (1989) Expression of a human liver cytochrome P-450 protein with tolbutamide hydroxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, **28**, 4993-4999.
- Butler, M. A., M. Iwasaki, F. P. Guengerich and F. F. Kadlubar (1989) Human cytochrome P-450_{PA} (P-450IA₂), the phenacetin *O*-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and *N*-oxidation of carcinogenic arylamines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7696-7700.
- Cmarik, J. L., W. G. Humphreys, K. L. Bruner, R. S. Lloyd, C. Tibbetts and F. P. Guengerich (1991) Mutation spectrum and sequence alkylation selectivity resulting from modification of bacteriophage M13mp18 with *S*-(2-chloroethyl)-glutathione, Evidence for a role of *S*-[2-(*N*⁷-guanyl)ethyl]glutathione as a mutagenic lesion formed from ethylene dibromide, *J. Biol. Chem.*, **267**, in press.
- Conney, A. H. (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons, G.H.A. Clowes memorial lecture, *Cancer Res.*, **42**, 4875-4917.
- Crespi, C. L., B. W. Penman, D. T. Steimel, H. V. Gelboin and F. J. Gonzalez (1991) The development of a human cell line stably expressing human CYP3A₄, role in the metabolic activation of aflatoxin B₁ and comparison to CYP1A₂ and CYP2A₃, *Carcinogenesis*, **12**, 355-359.
- Delaforge, M., E. Sartori and D. Mansuy (1988) *In vivo* and *in vitro* effects of a new macrolide antibiotic roxithromycin on rat liver cytochrome P-450, comparison with troleandomycin and erythromycin, *Chem. Biol. Interactions*, **68**, 179-188.
- Distlerath, L. M., P. E. B. Reilly, M. V. Martin, G. G. Davis, G. R. Wilkinson and F. P. Guengerich (1985) Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin *O*-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9057-9067.
- Eastman, A. (1987) Glutathione-mediated activation of anticancer platinum(IV) complexes, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 4177-4178.
- Fleming, C. M., R. A. Branch, G. R. Wilkinson and F. P. Guengerich (1991) Human liver microsomal *N*-hydroxylation of dapsona by cytochrome P-450 3A₄, *Mol. Pharmacol.*, **41**, in press.
- Fujino, T., S. S. Park, D. West and H. V. Gelboin (1982) Phenotyping of cytochromes P-450 in human tissues with monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3682-3686.
- Ged, C., J. M. Rouillon, L. Pichard, J. Combalbert, N. Bressot, P. Bories, H. Michel, P. Beaune and P. Maurel (1989) The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III_A induction, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 373-387.
- Gonzalez, F. J. (1989) The molecular biology of cytochrome P450s, *Pharmacol. Rev.*, **40**, 243-288.
- Gonzalez, F. J., C. L. Crespi and H. V. Gelboin (1991) cDNA-expressed human cytochrome P450s, a new age of molecular toxicology and human risk assessment, *Mutation Res.*, **247**, 113-127.
- Gonzalez, F. J., R. C. Skoda, S. Kimura, M. Umeno, U. M. Zanger, D. W. Nebert, H. V. Gelboin, J. P. Hardwick and U. A. Meyer (1988) Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism, *Nature*, **331**, 442-446.
- Guengerich, F. P. (1988a) Oxidation of 17 α -ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450, *Mol. Pharmacol.*, **33**, 500-508.
- Guengerich, F. P. (1988b) Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy, *Cancer Res.*, **48**, 2946-2954.
- Guengerich, F. P. (1989) Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **29**, 241-264.
- Guengerich, F. P. (1990) Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P-450 III_{A4} by gestodene, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 363-371.
- Guengerich, F. P. (1991) Inter-individual variation in biotransformation of carcinogens, basis and relevance, In: *Monitoring People Exposed to Carcinogens*, Analytical, Epidemiological, and Ethical Issues, F. Koschier, P. Skipper, and J. D. Groopman (Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 27-51.
- Guengerich, F. P. and C. G. Turvy (1991) Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 1189-1194.
- Guengerich, F. P. and D.-H. Kim (1990) *In vitro* inhibition of dihydropyridine oxidation and aflatoxin B₁ activation in human liver microsomes by naringenin and other flavonoids, *Carcinogenesis*, **11**, 2275-2279.
- Guengerich, F. P. and T. Shimada (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 391-407.
- Guengerich, F. P., D.-H. Kim and M. Iwasaki (1991b) Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of several low molecular weight cancer suspects, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 168-179.
- Guengerich, F. P., M. V. Martin, P. H. Beaune, P. Kremers, T. Wolff and D. J. Waxman (1986) Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5051-5060.
- Guengerich, F. P., W. M. Crawford, Jr., J. Y. Domoradzki, T. L. Macdonald and P. G. Watanabe (1980) *In vitro* activation of 1,2-dichloroethane by microsomal and cytosolic enzymes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 303-317.
- Guengerich, F. P., W. R. Brian, M.-A. Sari and J. T. Ross (1991a) Expression of mammalian cytochrome P-450 enzymes using yeast-based vectors, *Methods Enzymol.*, in press.
- Heck, H. d'A., M. Casanova and T. B. Starr (1990) Formaldehyde toxicity—new understanding, *Crit. Rev. Toxicol.*, **20**, 397-426.
- Heidelberger, C. (1975) Chemical carcinogenesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 79-121.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991) p⁵³ mutations in human cancers, *Science*, **253**, 49-53.
- Humphreys, W. G., D.-H. Kim, J. L. Cmarik, T. Shimada and F. P. Guengerich (1990) Comparison of the DNA alkylating properties and mutagenic responses caused by a series of *S*-(2-haloethyl)-substituted cysteine and glutathione derivatives, *Biochemistry*, **29**, 10342-10350.
- Humphreys, W. G., D.-H. Kim and F. P. Guengerich (1991) Isolation and characterization of *N*⁷-guanyl adducts derived from 1,2-dibromo-3-chloropropane, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 445-453.
- Imaoka, S., K. Enomoto, Y. Oda, A. Asada, M. Fujimori, T. Shimada, S. Fujita, F. P. Guengerich and Y. Funae (1990) Lidocaine metabolism by human cytochrome P-450s purified from hepatic microsomes, comparison of those with rat hepatic cytochrome P-450s, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255**, 1385-1391.
- Inskeep, P. B. and F. P. Guengerich (1984) Glutathione-mediated binding of dibromoalkanes to DNA, specificity of rat glutathione *S*-transferases and dibromoalkane structure, *Carcinogenesis*, **5**, 805-808.
- Ishizaki, H., J. S. H. Yoo, F. P. Guengerich and C. S. Yang (1991) The metabolism of *N*-nitrosodiethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) by human and rat liver microsomal cytochromes P-450, *FASEB J.*, **5**, A1516.
- Jongen, W. M. F., G. M. Alink and J. H. Koeman (1978) Mutagenic effect of dichloromethane on *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.*, **56**, 245-248.
- Kadlubar, F. F., G. Talaska, M. A. Butler, C. H. Teitel, J. P. Massengill and N. P. Lang (1990) Determination of carcinogenic arylamine *N*-oxidation phenotype in humans by analysis of caffeine urinary metabolites, In: *Mutation and the Environment, Part B, Metabolism, Testing Methods, and Chromosomes*, M. L. Mendelsohn and R. J. Albertini (Eds.) Wiley-Liss, Inc., New York. pp. 107-114.
- Kellermann, G., M. Luyten-Kellermann and C. R. Shaw (1973) Genetic variation of aryl hydrocarbon hydroxylase in human lymphocytes, *Am. J. Hum. Genet.*, **25**, 327-331.
- Kim, D.-H., W. G. Humphreys and F. P. Guengerich (1990) Characterization of *S*-[2-(*N*¹-adenyl)ethyl]glutathione formed in DNA and RNA from 1,2-dibromoethane, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 587-594.
- Knodell, R. G., D. Browne, G. P. Gwodz, W. R. Brian and F. P. Guengerich (1991) Differential inhibition of human liver cytochromes P-450 by cimetidine, *Gastroenterology*, in press.
- Koga, N., P. B. Inskeep, T. M. Harris and F. P. Guengerich (1986) *S*-[2-(*N*⁷-Guanyl)ethyl]glutathione, the major DNA adduct formed from 1,2-dibromoethane, *Biochemistry*, **25**, 2192-2198.
- Komori, M., T. Hashizume, H. Ohi, T. Miura, M. Kitada, K. Nagashima and T. Kamataki

- (1988) Cytochrome P-450 in human liver microsomes, high-performance liquid chromatographic isolation of three forms and their characterization, *J. Biochem. (Tokyo)*, **104**, 912-916.
- Kubic, V. L. and M. W. Anders (1978) Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide-III, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2349-2355.
- Küpfer, A. and R. Preisig (1983) Inherited defects of hepatic drug metabolism, *Semin. Liver Dis.*, **3**, 341-354.
- Loeb, L. A. (1989) Endogenous carcinogenesis, molecular oncology into the twenty-first century—presidential address, *Cancer Res.*, **49**, 5489-5496.
- Mahgoub, A., J. R. Idle, L. G. Dring, R. Lancaster and R. L. Smith (1989) Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man, *Lancet*, 584-586.
- Miller, E. C. and J. A. Miller (1981) Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules, *Cancer*, **47**, 2327-2345.
- Miranda, C. L., R. L. Reed, F. P. Guengerich and D. R. Buhler (1991) Role of cytochrome P450III_{A4} in the metabolism of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in human liver, *Carcinogenesis*, **12**, 515-519.
- Monks, T. J., M. W. Anders, W. Dekant, J. L. Stevens, S. S. Lau and P. J. van Bladeren (1990a) Glutathione conjugate mediated toxicities, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 1-19.
- Monks, T. J., R. J. Highet and S. S. Lau (1990b) Oxidative cyclization, 1,4-benzothiazine formation and dimerization of 2-bromo-3-(glutathione-S-yl)hydroquinone, *Mol. Pharmacol.*, **38**, 121-127.
- Morel, F., P. H. Beaune, D. Ratanasavanh, J.-P. Flinois, C.-S. Yang, F. P. Guengerich and A. Guillouzo (1990) Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes, *Eur. J. Biochem.*, **191**, 437-444.
- Murray, M. and G. F. Reidy (1990) Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents, *Pharmacol. Rev.*, **42**, 85-101.
- Nakamura, S., Y. Oda, T. Shimada, I. Oki and K. Sugimoto (1987) SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, examination with 151 chemicals, *Mutation Res.*, **192**, 239-246.
- Nebert, D. W. (1989) The *Ah* locus, genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **20**, 153-174.
- Oda, Y., 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.
- Oellerich, M., M. Burdelski, H. U. Lautz, M. Schulz, F. W. Schmidt and H. Herrmann (1990) Lidocaine metabolite formation as a measure of liver function in patients with cirrhosis, *Therapeutic Drug Monitoring*, **12**, 219-226.
- Oida, T., W. G. Humphreys and F. P. Guengerich (1991) Preparation and characterization of oligonucleotides containing S-[2-(N⁷-guanyl)ethyl]glutathione, *Biochemistry*, **30**, 10513-10522.
- Omiecinski, C. J., C. A. Redlich and P. Costa (1990) Induction and developmental expression of cytochrome P450IA1 messenger RNA in rat and human tissues, detection by the polymerase chain reaction, *Cancer Res.*, **50**, 4315-4321.
- Osterman-Golkar, S., S. Hussain, S. Walles, B. Anderstam and K. Sigvardsson (1983) Chemical reactivity and mutagenicity of some dihalomethanes, *Chem.-Biol. Interactions*, **46**, 121-130.
- Ozawa, N. and F. P. Guengerich (1983) Evidence for formation of an S-[2-(N⁷-guanyl)ethyl]glutathione adduct in glutathione-mediated binding of 1,2-dibromoethane to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5266-5270.
- Pantuck, E. J., K.-C. Hsiao, A. Maggio, K. Nakamura, R. Kuntzman and A. H. Conney (1974) Effect of cigarette smoking on phenacetin metabolism, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **15**, 9-17.
- Park, B. K. (1981) Assessment of urinary 6 β -hydroxycortisol as an *in vivo* index of mixed function oxidase activity, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **12**, 97-102.
- Perrot, N., B. Nalpas, C. S. Yang and P. Beaune (1989) Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver, by ethanol and drug intake, *Eur. J. Clin. Invest.*, **19**, 549-555.
- Peter, R., R. G. Böcker, P. H. Beaune, M. Iwasaki, F. P. Guengerich and C.-S. Yang (1990) Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450 IIE1, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 566-573.
- Peterson, L. A., T. M. Harris and F. P. Guengerich (1988) Evidence for an episulfonium ion intermediate in the formation of S-[2-(N⁷-guanyl)ethyl]glutathione in DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3284-3291.
- Raney, K. D., T. Shimada, D.-H. Kim, J. D. Groopman, T. M. Harris and F. P. Guengerich (1992) Oxidation of aflatoxin B₁ and related dihydrofurans by human liver microsomes and the role of alfafatoxin Q₁ as a detoxication product, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, in press.
- Rannug, U. (1980) Genotoxic effects of 1,2-dibromoethane and 1,2-dichloroethane, *Mutation Res.*, **76**, 269-295.
- Rannug, U. and B. Beije (1979) The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *Salmonella typhimurium*, II, Activation by the isolated perfused rat liver, *Chem.-Biol. Interactions*, **24**, 265-285.
- Rannug, U., A. Sundvall and C. Ramel (1978) The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *Salmonella typhimurium*, I, Activation through conjugation with glutathione *in vitro*, *Chem.-Biol. Interactions*, **20**, 1-16.
- Reitz, R. H., A. Mendrala and F. P. Guengerich (1989) *In vitro* metabolism of methylene chloride in human and animal tissues, use in physiologically-based pharmacokinetic models, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **97**, 230-246.
- Robie-Suh, K., R. C. Robinson, H. V. Gelboin and F. P. Guengerich (1980) Aryl hydrocarbon hydroxylase is inhibited by antibody to cytochrome P-450 hydroxylase, *Science*, **208**, 1031-1033.
- Schellens, J. H. M., P. A. Soons and D. D. Breimer (1988) Lack of bimodality in nifedipine plasma kinetics in a large population of healthy subjects, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2507-2510.
- Shimada, T. and F. P. Guengerich (1989) Evidence for cytochrome P-450_{NF}, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 462-465.
- Shimada, T. and F. P. Guengerich (1991) Activation of amino- α -carboline, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, and a copper phthalocyanine cellulose extract of cigarette smoke condensate by cytochrome P-450 enzymes in rat and human liver microsomes, *Cancer Res.*, **51**, 5284-5291.
- Shimada, T., C.-H. Yun, H. Yamazaki, J.-C. Gautier, P. H. Beaune and F. P. Guengerich (1992) Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1, *Mol. Pharmacol.*, **41**, in press.
- Shimada, T., K. S. Misono and F. P. Guengerich (1986) Human liver microsomal cytochrome P-450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism, Purification and characterization of two similar forms involved in the reaction, *J. Biol. Chem.*, **261**, 909-921.
- Shimada, T., M. Iwasaki, M. V. Martin and F. P. Guengerich (1989a) Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by *umu* gene response in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, *Cancer Res.*, **49**, 3218-3228.
- Shimada, T., M. V. Martin, D. Pruess-Schwartz, L. J. Marnett and F. P. Guengerich (1989b) Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Res.*, **49**, 6304-6312.
- Smith, R. L., J. R. Idle, A. A. Mahgoub, T. P. Sloan and R. Lancaster (1978) Genetically determined defects of oxidation at carbon centres of drugs, *Lancet*, 943-944.
- Smith, T. J., Z. Guo, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, G. D. Stoner and C. S. Yang (1992) Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human lung and liver microsomes and cytochromes P-450 expressed in hepatoma cells, *Cancer Res.*, **52**, in press.
- Søderlung, E. J., G. Brunborg, J. G. Omichinski, J. Holme, J. E. Dahl, S. D. Nelson and E. Dybing (1988) Testicular necrosis and DNA damage caused by selectively deuterated and methylated analogs of 1,2-dibromo-3-chloropropane in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **91**, 358-370.
- Srivastava, P. K., C.-H. Yun, P. H. Beaune, C. Ged and F. P. Guengerich (1991) Separation of human liver tolbutamine hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes, *Mol. Pharmacol.*, **40**, 69-79.
- Umbenhauer, D. R., M. V. Martin, R. S. Lloyd and F. P. Guengerich (1987) Cloning and sequence determination of a complementary DNA related to human liver microsomal cytochrome P-450 S-mephenytoin 4-hydroxylase, *Biochemistry*, **26**, 1094-1099.
- Vamvakas, S., W. Dekant and M. W. Anders (1989) Mutagenicity of benzyl S-haloalkyl and S-haloalkenyl sulfides in the Ames-Test, *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 935-939.
- van Bladeren, P. J., D. D. Breimer, G. M. T. Rotteveel-Smijts and G. R. Mohn (1980) Mutagenic activation of dibromomethane and diiodomethane by mammalian microsomes and glutathione S-transferases, *Mutation Res.*, **74**, 341-346.
- Vesell, E. S. (1984) New directions in pharmacogenetics, *Fed. Proc.*, **43**, 2319-2325.
- Wang, P., F. P. Guengerich and R. A. Neal (1979) Purification of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and epoxide hydratase from human liver microsomes, *Fed. Proc.*, **38**, 320.
- Wang, P., P. S. Mason and F. P. Guengerich (1980) Purification of human liver cytochrome P-450 and comparison to the enzyme isolated from

食品・医薬品由来の変異原物質の 分離・同定とその生成機構

東京薬科大学 第一衛生化学教室 菊川 清 見

rat liver, Arch. Biochem. Biophys., **199**, 206-219.

Watkins, P. B., S. A. Murray, L. G. Winkelman, D. M. Heuman, S. A. Wrighton and P. S. Guzelian (1989) Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochrome P-450, studies in rats and patients, J. Clin. Invest., **83**, 688-697.

Watkins, P. B., S. A. Wrighton, P. Maurel, E. G. Schuetz, G. Mendez-Picon, G. A. Parker and P. S. Guzelian (1985) Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 6310-6314.

Wilkinson, G. R., F. P. Guengerich and R. A. Branch (1989) Genetic polymorphism of S-mephenytoin hydroxylation, Pharmacol. Ther., **43**, 53-76.

Wrighton, S. A., B. J. Ring, P. B. Watkins and M. Vandenbranden (1989) Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P-450 III family, Mol. Pharmacol., **86**, 97-105.

Wrighton, S. A., P. E. Thomas, D. E. Ryan and W. Levin (1987) Purification and characterization of ethanol-inducible human hepatic cytochrome P-450HLj, Arch. Biochem. Biophys., **258**, 292-297.

Wrighton, S. A., W. R. Brian, M. A. Sari, M. Iwasaki, F. P. Guengerich, J. L. Raucy, D. T. Molowa and M. Vandenbranden (1990) Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLP3), Mol. Pharmacol., **38**, 207-213.

Yamano, S., J. Tatsuno and F. J. Gonzalez (1990) The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes, Biochemistry, **29**, 1322-1329.

Yamazaki, H., Y. Oda, Y. Funae, S. Imaoka, Y. Inui, F. P. Guengerich and T. Shimada (1992) Participation of rat liver cytochrome P450 2E1 in the activation of N-nitrosodimethylamine and N-diethylnitrosamine to products genotoxic in *Salmonella typhimurium* NM2009, Carcinogenesis, **13**, in press.

Yun, C-H., T. Shimada and F. P. Guengerich (1991) Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. Mol. Pharmacol., **40**, 679-685.

Yun, C-H., T. Shimada and F. P. Guengerich (1992) Contributions of human liver cytochrome P-450 enzymes to the N-oxidation of 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline), Carcinogenesis, **13**, in press.

1. はじめに

癌の発生には多くの要因が関与しているが、Fig. 1 に示すように喫煙とともに食物が大きな要因となっていると考えられている。食物に存在する変異・発癌物質は次の5つに分類することができる。すなわち、(1) 天然の有害植物性食品に含まれている変異・発癌物質、(2) かびが生えてその二次代謝産物(マイコトキシン)に変異・発癌性がある場合、(3) 意図的に添加される食品添加物に変異・発癌性がある場合、(4) 食物を加熱調理・加工することによって変異・発癌物質が生成する場合、(5) 食物の成分が口腔の細菌によって生じる亜硝酸と反応して変異・発癌物質を生成する場合、である。これらの中で発癌性の強さではマイコトキシン、日常の食生活において摂取される可能性の高さでは加熱調理・加工によるものと亜硝酸によるものが最も注目されている。

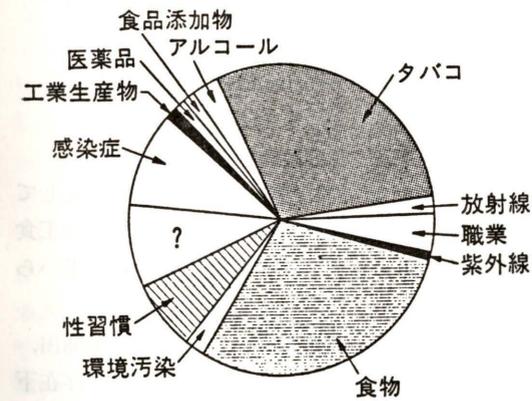


Fig. 1. ヒトのがんの原因と関連のある因子.

本稿では筆者らの研究を中心に、加熱調理・加工による変異原の生成、亜硝酸との反応による食品・経口医薬品由来の変異原物質の生成について述べる。

2. 加熱調理・加工によって生成する変異原物質

加熱調理・加工した食品にはヘテロサイクリックアミン変異原物質が生成することがわかっており (Sugimura & Sato, 1983; 菊川 & 加藤, 1991), これらを Table 1 にまとめて記した。これらの変異原物質は代謝的に活性化されたのち、フレームシフト型の *Salmonella typhimurium* TA98 に対して S9 mix 存在下強い活性を示す。また、これらの多くは動物実験において発癌性を示すこともわかっている。個々の物質の発癌性を示す量に比べれば食品中に存在する量は少ないようであるが、これらの物質の存在が多様であり、他の因子の影響もありうることを考えると、ヒトの発癌におよぼす影響は大きいと考えざるをえない。

筆者らは以下 3-5 節に述べるように、加工食品を Blue cotton を用いてスクリーニングし (菊川ら, 1985), いくつかの加熱加工食品にヘテロサイクリックアミン変異原物質が存在することを明らかにした。

3. かつお節, だしの素およびさば節の加熱変異原物質の生成とその生成機構

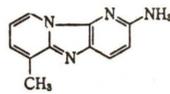
わが国独特の調味料である、かつお節およびその関連製品は Fig. 2 に示すような工程で製造さ

〒192-03 八王子市堀之内 1432-1
Isolation, identification and formation mechanism of mutagens in foods and drugs—
Kiyomi Kikugawa
Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan.

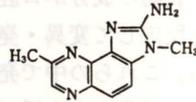
Table 1. 加熱食品に検出されたヘテロサイクリックアミン変異原物質

ヘテロサイクリックアミン	前駆物質	検出された食品	ヘテロサイクリックアミン	前駆物質	検出された食品
Trp-P-1	トリプトファン	焼丸干イワシ, 焼牛肉, 卵油, 焼サケ	IQ	クレアチン, フロリンの混合物	焼牛肉, 焼丸干いわし, 焼サケ, 焼タマゴ, 揚げ牛肉, 揚げタラ, 卵油, 焼豚肉
Trp-P-2	トリプトファン	焼丸干イワシ, 卵油, 焼牛肉, 焼サケ	MeIQ		焼牛肉, 焼丸干イワシ, 焼サケ, 揚げタラ, コーヒー煎豆, 焼豚肉
Glu-P-1	グルタミン酸	ソース, 卵油, 焼サケ	IQx		揚げソーセージ
Glu-P-2	グルタミン酸	焼スルメ, ソース, 焼サケ	MeIQx (8-MeIQx)	クレアチニン, グリシン, グルコースの混合物	焼牛肉, カツオ節, サバ節, 加熱カツオ, 揚げタラ, 焼豚肉, 焼サケ
Phe-P-1	フェニルアラニン		4-MeIQx		焼豚肉
Orn-P-1	オルニチン		4,8-DiMeIQx	クレアチニン, アラニン, フルクトースの混合物	焼牛肉, カツオ節, サバ節, 加熱カツオ, 揚げタラ, 揚げソーセージ, 焼豚肉
Lys-P-1	リジン		7,8-DiMeIQx	クレアチニン, グリシン, グルコースの混合物	
AαC		焼牛肉, 焼トリ肉, 焼シイタケ, 焼タマネギ, 卵油, 加熱大豆グロブリン	PhIP	クレアチニン, フェニルアラニン, グルコースの混合物	焼牛肉, 揚げタラ, 揚げソーセージ, 焼豚肉
MeAαC		焼牛肉, 焼トリ肉, 焼シイタケ, 卵油, 加熱大豆グロブリン	DMIP		揚げソーセージ, 焼牛肉
3-Amino-norharman		加熱カゼイン	TMIP		揚げソーセージ
Benzo(f)-quinoline		加熱大豆粕			
Phenan-thridine		加熱大豆粕			

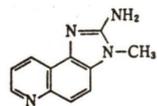
Glu-P-1



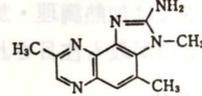
MeIQx (8-MeIQx)



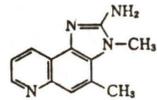
IQ



4,8-DiMeIQx



MeIQ



れる。なまのかつおを三枚におろし、熱湯で煮る(煮熟)といわゆる“生り節”とエキスになる。生り節を桜の木などを燃して100°C前後で加熱しながら毎日数時間、約10日間にわたっていぶす操作を繰り返し(ばい乾)行ったのち、タールを除いてかびを付け(かび付け)たものが“かつお節”である。ばい乾とかび付けは風味と脱水の目的で行われる。ばい乾工程までのものを薄く削った“かつお削り節”, かつお節を削った“かつお節削り節”, 両者を混ぜ合わせた“だしの素”は家庭の調味料として広く使用されている。また、煮熟工

程で生じるエキス分は濃縮したのち、ばい乾して“粒状”および“フレーク状”の製品として加工食品の味付けやレストランの調理の味付けに用いられている。

これらかつお節関連製品について、熱湯抽出、Blue cotton 精製を行ったのち、S9 mix 存在下 *S. typhimurium* TA98 株に対する変異原性を調べたところ、なまのかつお、生り節を除いてすべての製品が陽性であった(Kikugawa *et al.*, 1985)。すなわち、かつお節 20-90, かつお削り節 40-100, かつお節削り節 70-140, 粒状 200-500, フレーク

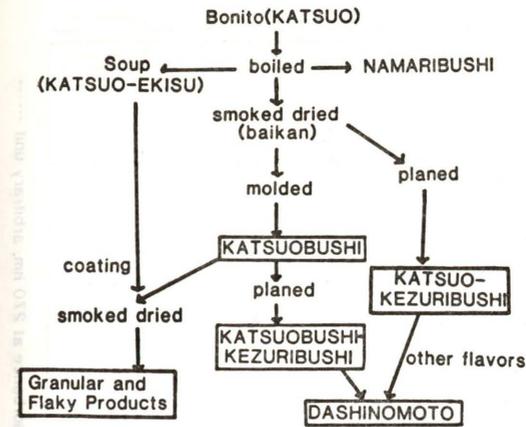


Fig. 2. Process for preparation of smoked, dried bonito products. Products in squares showed significant mutagenicity.

200-400, だしの素 0-130 His⁺ revertants/g を示し、ばい乾工程を経たすべての製品に活性が認められた(Kikugawa *et al.*, 1986a)。変異原生成の原因と考えられるばい乾工程は、煙によるくん蒸と加熱・脱水に分けて考えることができるが、煙から付着する変異原物質 Benzo[a]pyrene の含量はこれら製品の変異原活性を説明するに十分な量ではなく、加熱・脱水が変異原生成に寄与していることが示唆された。

かつお節関連製品の変異原物質を熱湯抽出、Blue cotton, TLC および HPLC を駆使して精製し、2種のヘテロサイクリックアミン MeIQx および 4,8-DiMeIQx を同定した(Kikugawa *et al.*, 1986b)。MeIQx, 4,8-DiMeIQx の含量はそれぞれ 2-3 ng/g およびその 1/3 であった。日本人の一日かつお節関連製品の平均摂取量(約1g)から計算すると MeIQx の一日摂取量は 2-3 ng となる。

かつお節と同様に加熱・脱水をともなう高温のばい乾工程を経て製造される“さば節”にもかつお節と同様 MeIQx および 4,8-DiMeIQx が生成していることがわかった(Kato *et al.*, 1986)。MeIQx の含量は 0.8 ng/g, 4,8-DiMeIQx はその 1/10 であった。しかし、加熱・脱水をともなわない低温のばい乾工程を経て製造されるスモークサーモン、ソーセージなどにはこれらの変異原物質は生成しない。

かつおをホットプレート上で100°Cで加熱・脱

水した場合とオートクレーブ中脱水しないように同一の温度で加熱した場合の変異原生成について比較した。その結果、ホットプレートの加熱では重量の減少と共に変異原活性が上昇したが、脱水を伴わないオートクレーブ上の加熱では変異原は生成せず、水分や水分活性が低い状態での加熱がこれら変異原の生成に寄与していることがわかった(Kikugawa & Kato, 1987a)。低水分・低水分活性が加熱によるこれら変異原の生成に寄与していることは MeIQx の別の生成系、すなわち Creatine-glucose-amino acids の系でも確かめられた。

通常の調理条件に近いホットプレート上の加熱・脱水条件(220°C, 15分)で、各種の魚肉を加熱したところ、変異原活性の強さは、かつお、まぐろ、さば、さけ、かじき、いわし、あじ、たら、いかの順で、かつおには 1200, いわしには 150 His⁺ revertants/5g の変異原性が見られ、かつおは変異原を最も生成しやすい魚であることがわかった(Kikugawa & Kato, 1987b)。その原因はクレアチンの含量とは関係なく別の要因が考えられる。かつおをこの条件で加熱・脱水した場合、HPLC の分析で主な変異原画分はもちろん MeIQx および 4,8-DiMeIQx であったが、直火で焦がして加熱・脱水した場合には同程度の変異原活性を生じるものの、これらの変異原とは別の画分(IQ, MeIQ, Glu-P-2 など)の活性の方が強く、加熱加工・調理の方法によっても生成する変異原が異なることもわかった。かつお節の製造のばい乾工程における加熱・脱水条件が MeIQx および 4,8-DiMeIQx の生成に適していることになる。

4. 卵の油の変異原物質

“卵の油”とは卵の黄身を高温で加熱することによって作られる油で、滋養強壮効果をもった、いわゆる健康食品として、2,3のメーカーから市販されている。筆者らは市販の卵の油に強い変異原活性を認め、その本体をつきとめた(Kato *et al.*, 1990)。卵の油を酸性水溶液抽出し、アルカリ性でクロロホルムに転溶すると、S9 mix 存在下、*S. typhimurium* TA98 株に対して容量依存的に上昇する変異原活性が得られた。変異原活性は15000-

20000 His⁺ revertants/g であった。さらに透析、Blue cotton 精製、Sephadex LH-20 カラム、数回の HPLC によって精製し、これら変異原の一部が Glu-P-1 および IQ であることをつきとめた。Glu-P-1 および IQ の量はそれぞれ 22 および 5 ng/g と推定された。山本ら (1989) も実験室で調製した卵の黒焼きに、これらとは異なるヘテロサイクリックアミン変異原の生成を認めている。

5. コーヒー煎り豆の加熱変異原物質とその存在形態

コーヒーに発癌性があることが疑われて久しいが、塩基置換型の *S. typhimurium* TA100 株に対して変異原性を示すメチルグリオキサールおよびその活性を増強する過酸化水素が存在することが明らかにされている (Fujita *et al.*, 1985)。筆者らは市販の熱風ばい煎り豆、炭火焼コーヒー煎り豆、実験的に 400°C に高温加熱した熱風ばい煎り豆に、MeIQ をはじめ少なくとも 6 種のヘテロサイクリックアミン変異原物質が存在し、これらはコーヒー中の繊維分に強固に吸着していることを見いだした。

コーヒー煎り豆を熱湯抽出したのち、Blue cotton 精製しても再現性のある結果は得られなかったが、MeOH-NH₃ 抽出、酸性抽出、アルカリ性 CHCl₃ 抽出したのち、Blue cotton 精製すると、S9 mix 存在下で *S. typhimurium* TA98 株に対して容量依存的に増加する変異原活性が認められた (Kikugawa *et al.*, 1989a; 高橋ら, 1989)。“熱風ばい煎り豆” 120, “炭火焼コーヒー煎り豆” 217, “高温加熱コーヒー豆” 2919 His⁺ revertants/10 g 豆の活性が得られ、コーヒー豆の加熱温度が高い程、変異原性が強いことを示している。さらに Fig. 3 に示すように HPLC によって粗分画すると、A と B の 2 つの画分に分けられた。フラクション A の画分の変異原は繰り返し行った HPLC により単離精製し、MeIQ と同定した。MeIQ の含量は、熱風ばい煎り 0.6, 炭火焼 0.32, 高温加熱 1.5 ng/10 g 豆であった。フラクション B の変異原は少なくとも 5 つのヘテロサイクリックアミン様変異原物質を含み (Kato *et al.*,

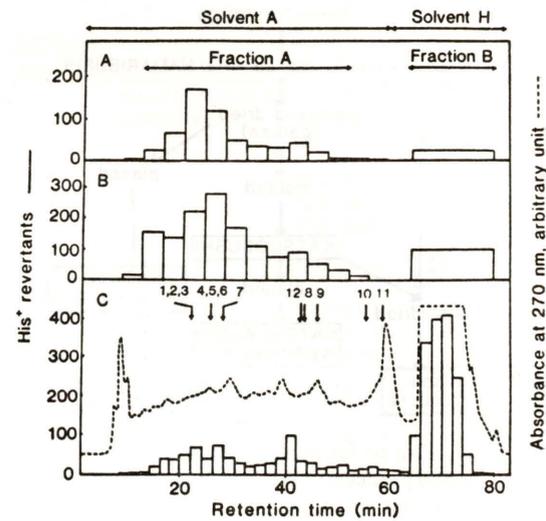


Fig. 3. HPLC of the Mutagens in Roasted Coffee Beans: Hot Air-roasted (A), Charcoal-roasted (B) and High Temperature-roasted (C).

Roasted coffee beans were extracted with methyl alcohol/ammonium hydroxide (100:1) and subsequently extracted into the acidic solution and into the chloroform after alkalization and finally purified by blue cotton adsorption. The mutagens in 50 g of hot air-roasted coffee beans (A), 100 g of charcoal-roasted coffee beans (B) and 10 g of high temperature-roasted coffee beans (C) were separated by HPLC on a YMC S-343 ODS column using solvents A (0.01 M triethyl-ammonium bicarbonate (pH 7.3)/methyl alcohol (3:2)) and H (methanol). The mutagenicity of each fraction was assayed with *Salmonella typhimurium* TA98 with S9 mix. Ultraviolet absorbing-peaks were detected at 270 nm. Authentic heterocyclic amine mutagens are 1, IQ; 2, MeIQx; 3, Glu-P-2; 4, 7,8-DiMeIQx; 5, 4, 8-DiMeIQx; 6, MeIQ; 7, Glu-P-1; 8, AaC; 9, Trp-P-2; 10, Trp-P-1; and 11, MeAaC.

1989), 既知のヘテロサイクリックアミンとは異なることがわかったが同定にはいたらなかった。

これらの変異原物質はコーヒー煎り豆や熱湯抽出液中の微細な繊維分、すなわち水不溶性のヘミセルロースに強固に吸着しており、飲用時の熱湯抽出では容易に溶出されない (Kato *et al.*, 1991a)。食物繊維がヘテロサイクリックアミン変異原を吸着することは以前からわかっていたが、コーヒー煎り豆の繊維も極めてよい吸着性をも

ち、煎り豆の変異原のみならず他のヘテロサイクリックアミンをも効率よく吸着する。煎り豆の熱湯抽出液中には Glu-P-1 をはじめヘテロサイクリックアミンを不活性化成分も存在し、その成分は高分子のポリフェノール類が酸化されて生成したキノン系化合物であった。コーヒーにはこのようにヘテロサイクリックアミン変異原が存在するものの、これらを吸着・分解除去する成分も含まれており、他の食品から由来する変異原をも除去する可能性もあることが示された。

6. 亜硝酸と反応して生成する変異原物質

野菜などに含まれている硝酸塩は摂取したのち、口腔細菌の還元酵素によって亜硝酸に変換される。魚類などの食物には第二級アミンが含まれており、胃内の酸性条件下容易に亜硝酸と反応して、変異・発癌性ニトロソアミン類を生成することが知られている。ニトロソアミン類は一般に吸収されたのち、代謝的に活性化されてアルキルカチオンとなって DNA に反応し、様々な臓器に癌を発生させることが動物実験で明らかになっている。

疫学的調査によると、日本のように硝酸塩の摂取量の多い国では胃癌による死亡率が高く、その原因となるような、吸収・代謝を前提としない直接変異原物質の生成について、検討がなされてきた (Wakabayashi *et al.*, 1989)。その結果、そら豆、白菜に含まれるインドール化合物はニトロソ体を、しょう油やチーズに含まれるチラミンはジアゾチラミン (Ochiai *et al.*, 1984) を、食品添加物ソルビン酸はジニトロピロール誘導体を、香辛料ピペリンはニトロピペロナルを生成し、生成物はいずれも直接変異原性を示し胃癌との関連をうかがわせる。米飯も直接変異原物質を生成することが報告されている。亜硝酸との反応によって直接変異原を生成する食品成分や経口医薬品の探索は重要な課題と考えられる。

筆者らは以下 7—9 節に述べるように、フェノール性の食品成分・経口医薬品、および芳香族アミノ化合物は亜硝酸との反応により直接変異原を生成すること、さらに一部の生成物についてその変異原性発現機構を明らかにした。

7. くん製品中のフェノール、経口医薬品バメタン・エチレフィリンと亜硝酸の反応により生成する直接変異原物質

筆者らはくん製品中に存在するフェノールと亜硝酸の反応について検討した結果 (Kikugawa & Kato, 1988), 直接変異原性を示すジアゾキノンの生成を認めた。フェノールを pH 3 で 1 当量の亜硝酸と反応させると、ニトロソフェノールを高収率で生成するが、さらに過剰の亜硝酸と反応させるとパラおよびオルトジアゾキノンを生成した (Fig. 4)。パラジアゾキノンは *S. typhimurium* TA98 および TA100 株に対して S9 mix 非存在下で変異原性を示し、その活性は 85 His⁺ revertants/2 μmol であった。Ohshima ら (1989a; 1989b) はパラおよびオルトジアゾキノンは動物細胞を用いた SOS Test においても変異原性を示すこと、さらにラット腺胃の不定期 DNA 合成を誘導することを報告している。

冠拡張剤バメタンおよび昇圧剤エチレフィリンは長期にわたって経口的に服用される医薬品で食物と同様に消化管を経由する。バメタンを 1 当量の亜硝酸と反応させると N-ニトロソバメタンを生成し、4 当量の亜硝酸と反応させると N-ニトロソジアゾバメタンを生成し、後者は *S. typhimurium* TA98 株に対して 9200, TA100 株に対して 8060 His⁺ revertants/μmol の強い直接変異原性を示した (Kikugawa *et al.*, 1987)。N-ニトロソジアゾバメタンの生成は亜硝酸の量がバメタンに対して過剰の場合に限られる。この化合物はラット腺胃の不定期 DNA 合成を誘導することもわかっている (Furihata *et al.*, 1988)。エチレフィリンも全く同様に亜硝酸と反応して、直接変異原

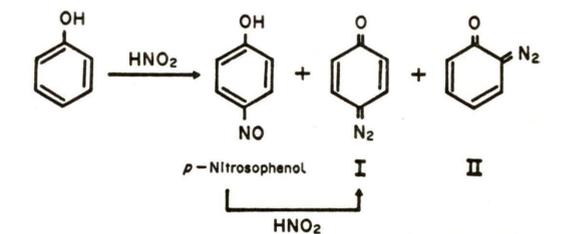


Fig. 4. Reaction of phenol with nitrite to produce *p*-nitrosophenol, *p*-diazoquinone (I) and *o*-diazoquinone (II).

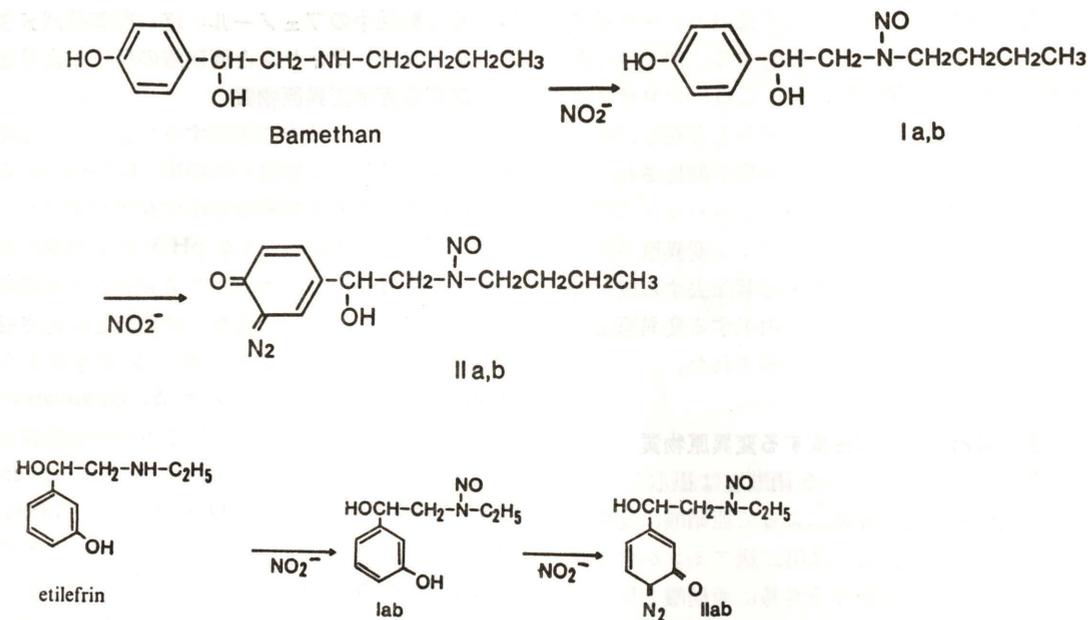


Fig. 5. Reaction of bamethan and etilefrin with nitrite.

性を有する N-ニトロソジアゾエチレフィリンを生成した (Kikugawa *et al.*, 1989b)。N-ニトロソジアゾエチレフィリンの活性は *S. typhimurium* TA98, TA100 株に対して 300 His⁺ revertants/0.1 μmol であった (Fig. 5)。

チラミン、バメタン、エチレフィリンは共通の構造すなわちアミノエチル置換基をもったフェノール構造をしており、同様の構造をもつ経口冠拡張剤のオクトパミン、デノパミン、ノルフェネフィリン、フェニレフィリンも亜硝酸との反応によって直接変異原が生成する可能性がある。アセトアミノフェンと亜硝酸の反応によっても直接変異原性ジアゾキノン体が生成することが明らかにされている (Ohta *et al.*, 1988)。

8. 芳香族アミンと亜硝酸の反応によって生成する直接変異原物質

芳香族アミンは代謝的活性化をうけて変異・発癌性を示す物質として知られているが、亜硝酸と反応して直接変異原物質に転換することが明らかになった (Kato *et al.*, 1991b)。芳香族アミンと亜硝酸の pH 3 によって変異原物質が生成するが、芳香族アミンの種類によって構造の異なる変異原物質を生成する。アニリンはベンゼンジアゾニ

ウム塩、フェノールを経て変異原性ジアゾキノン、2-アミノフルオレンは強変異原性フルオレン-2-ジアゾニウム塩を、1-アミノアントラセン、1-アミノピレンは変異原性のニトロ置換体を生成する。いずれにせよ、芳香族アミン類は亜硝酸と反応することにより、直接変異原物質に変換する。

9. ジアゾキノンの直接変異原発現機構

ジアゾキノンの直接変異原性発現機構を明らかにする目的で、これらの DNA に対する反応性を検討した (Kikugawa *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1992)。パラおよびオルトジアゾキノン pH 7 で ϕX174RFI DNA (super coil), λDNA (double strand), M13ss DNA (single strand) に反応させると、DNA 鎖の切断が起きた。鎖切断はエタノール、酸化防止剤 BHA およびスピントラップ剤 DMPO で阻害された。また、プリンヌクレオチドと反応させると、8 位にパラヒドロキシル基の付加体を生じた。この反応系にエタノール、BHA、DMPO を添加すると付加体の生成は抑えられた。ピリミジンヌクレオチドと反応させるとピリミジン塩基の分解が起こった。

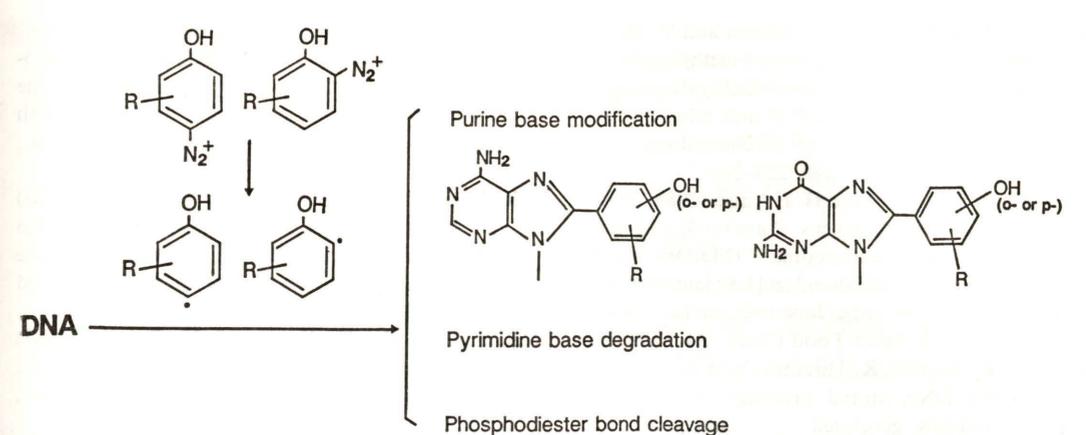


Fig. 6. Reaction of DNA with p- and o-diazoquinones.

パラおよびオルトジアゾキノン BHA、エタノールだけでインキュベートすると、いずれの場合もフェノールを高収率で生成した。このことは、ジアゾ基が脱離してパラおよびオルトヒドロキシルフェニルラジカルとなって存在し、このラジカルが DNA およびヌクレオチドに反応していることを示唆している。これらジアゾキノン体をスピントラップ剤 DMPO および PBN とインキュベートするとパラおよびオルトヒドロキシルフェニルラジカルの付加体得られ、これらラジカルの存在が証明された。パラおよびオルトジアゾキノン Fig. 6 に示すようにヒドロキシルフェニル炭素ラジカルとなって DNA 鎖の切断やヌクレオチドとの反応をすることが明らかになった。

ジアゾキノン体の変異原発現機構は、変異原性を示す化合物のなかで炭素ラジカルを経て DNA に障害を与えることが示されている数少ない反応の一つである。しかし、このことは変異原発現および DNA 障害における炭素ラジカルの重要性を示唆するものである。活性酸素同様、炭素ラジカルの DNA 障害に対する寄与についてより多くの検討が望まれる。

10. あとがき

加熱調理・加工、亜硝酸との反応による食品・経口医薬品からの変異原物質はヒトの食生活において摂取される頻度の高い変異原である。筆者らのこれらの変異原の生成に関する研究について紹介したが、食物による癌の原因を解明するには、

さらに多くの食物中の変異・発癌物質の存在形態およびそれらの効果についての検討が必要と思われる。

11. 謝辞

本研究において、適切な助言をいただいた岡山大学・薬学部 早津彦哉教授、国立衛試 武田 寧大阪支所長、協力いただいた東京薬科大学 加藤哲太博士、平本一幸博士、および高橋伸也、小島一弘、落合理恵、中原享美、稲葉隆宏、栗田健太郎、原 一茂、清田衣之里、松岡浩子、古林肖介、青野裕美、今井知子、田口久美子、鳥井真美、松崎幸枝、森田幸子、高谷貞勝、横関 淳、小林敦子、後藤久美子、白鳥八重子、高橋暁子、伊井豊和、青山秀子、国村和子、鯉淵康全、佐久間功、山田哲史、佐藤理加、田所奈津代、江原史恵、筒井美奈、齊藤夏子の諸氏に深く感謝いたします。また、本研究は文部省科学研究費補助金、厚生省がん研究助成金によった。併せて謝意を表します。

参考文献

- Fujita, Y., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1985) Implication of hydrogen peroxide in the mutagenicity of coffee, *Mutation Res.*, **144**, 227-230.
- Furihata, C., A. Yamakoshi, T. Matsushima, T. Kato and K. Kikugawa (1988) Possible tumour-initiating and -promoting activities of 3-diazo-N-nitrosobamethan in rat stomach mucosa, *Mutagenesis*, **3**, 299-301.

- Kato, T., K. Kikugawa, M. Asanoma and Y. Sakabe (1990) Occurrence of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1) and other heterocyclic amine mutagens in oil of charred egg yolk (ranyu), *Mutation Res.*, **240**, 259-266.
- Kato, T., K. Kikugawa and H. Hayatsu (1986) Occurrence of the mutagens 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx) in some Japanese smoked, dried fish products, *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 810-814.
- Kato, T., K. Kojima, K. Hiramoto and K. Kikugawa (1992) DNA strand breakage by hydroxyphenyl radicals generated from mutagenic diazoquinone compounds, *Mutation Res.*, in press.
- Kato, T., S. Takahashi and K. Kikugawa (1989) Generation of heterocyclic amine-like mutagens during the roasting of coffee beans, *Eiseikagaku*, **35**, 370-376.
- Kato, T., S. Takahashi and K. Kikugawa (1991a) Loss of heterocyclic amine mutagens by insoluble hemicellulose fiber and high-molecular-weight soluble polyphenolics of coffee, *Mutation Res.*, **169-178**, 246.
- Kato, T., N. Tadokoro, M. Tsutsui and K. Kikugawa (1991b) Transformation of arylamines into direct-acting mutagens by reaction with nitrite, *Mutation Res.*, **249**, 243-254.
- 菊川清見, 加藤哲太 (1991) 現代の環境問題 12. 食品汚染—加熱, 調理におけるがん変異原物質—, *公衆衛生*, **55**, 183-187.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1987a) Effect of water content on the generation of mutagenicity in heated fish meats, *Eiseikagaku*, **33**, 62-65.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1987b) Formation of mutagens, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx), in heated fish meats, *Mutation Res.*, **179**, 5-14.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1988) Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite, *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 209-214.
- 菊川清見, 加藤哲太, 早津彦哉 (1985) 青綿吸着法を利用した加工食品中の変異原性物質の検索, *食衛誌*, **26**, 432-436.
- Kikugawa, K., T. Kato and H. Hayatsu (1985) Mutagenicity of smoked, dried bonito products, *Mutation Res.*, **158**, 35-44.
- Kikugawa, K., T. Kato and H. Hayatsu (1986a) Formation of mutagenic substances during smoking-and-drying (baikan) of bonitom eat, *Eiseikagaku*, **32**, 379-383.
- Kikugawa, K., T. Kato and H. Hayatsu (1986b) The presence of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in smoked dry bonito (Katsuobushi), *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 99-102.
- Kikugawa, K., T. Kato and K. Kojima (1992) Substitution of p- and o-hydroxyphenyl radicals at the 8-position of purine nucleosides by reaction with mutagenic p- and o-diazoquinones, *Mutation Res.*, in press.
- Kikugawa, K., T. Kato and S. Takahashi (1989a) Possible presence of 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f]quinoline and other heterocyclic amine-like mutagens in roasted coffee beans, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 881-886.
- Kikugawa, K., T. Kato and Y. Takeda (1987) Formation of a highly mutagenic diazo compound from the bamethan-nitrite reaction, *Mutation Res.*, **177**, 35-43.
- Kikugawa, K., T. Kato and Y. Takeda (1989b) Formation of a direct mutagen, diazo-N-nitrosoetilefrin, by interaction of etilefrin with nitrite, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1600-1603.
- 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, *Gann*, **75**, 1-3.
- Ohshima, H., M. Friesen, C. Malaveille, I. Brouet, A. Hautefeuille and H. Bartsch (1989a) Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: Identification of simple phenolic precursors and phenyldiazonium ions as reactive products, *Food Chem. Toxicol.*, **27**, 193-203.
- Ohshima, H., C. Furihata, T. Matsushima and H. Bartsch (1989b) Evidence of potential tumour-initiating and tumour-promoting activities of Hickory smoke condensate when given alone or with nitrite to rats, *Food Chem. Toxicol.*, **27**, 511-516.
- Ohta T., H. Oribe, T. Kameyama, Y. Goto and S. Takitani (1988) Formation of a diazoquinone-type mutagen from acetaminophen treated with nitrite under acidic conditions, *Mutation Res.*, **209**, 95-98.
- Sugimura, T. and S. Sato (1983) Mutagens-carcinogens in foods, *Cancer Res. (Suppl.)*, **43**, 2415-2421.
- 高橋伸也, 加藤哲太, 菊川清見 (1989) コーヒー煎り豆における 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ) の生成とその含量, *環境変異原研究*, **11**, 47-52.
- Wakabayashi, K., M. Nagao and T. Sugimura (1989) Mutagens and carcinogens produced by the reaction of environmental aromatic compounds with nitrite, *Cancer Surv.*, **18**, 385-399.
- 山本正利, 石川雅章, 増井俊夫, 糠谷東雄, 辻 邦郎, 小菅卓夫 (1989) 卵黄油中の変異原・ガン原物質の分析, *食衛誌*, **30**, 146-151.

シンポジウム「変異・がん原性物質の代謝的活性化機構」

ニトロピレンの代謝的活性化機構

—腸内菌の役割の重要性—

徳島大学医学部 大西克成, 木内武美, 片岡佳子,
宮西幸一, 植島基雄

1. はじめに

化学物質は生体内に入ると通常肝臓において酸化, 還元, 加水分解などの反応によって活性化され (第一相反応), 一部は高分子物質に結合するが, 残りは抱合反応によって各種の抱合体となり解毒される (第二相反応)。そしてある程度以上大きな分子量の解毒抱合体は胆汁中に排泄されるが, それ以後の加水分解や還元反応を第三相反応と呼んでいる。ここでは環境変異・癌原物質である 1-nitropyrene (1-NP) の第一・二相反応について述べ, 更に第三相反応において 1-NP の代謝産物が再活性化することを示し, 最後に毒物・薬物代謝や新薬開発において腸内常在細菌の役割が重要であることについて述べる。

2. 1-NP の代謝的活性化

1-NP の Ames 試験における変異原性はネズミチフス菌 TA98 株 (-) S9 で 467 ± 25 His⁺ 復帰変異集落数/nmol であるが, ニトロ還元酵素欠失変異株である TA98NR 株では 87 ± 52 His⁺ 復帰変異集落数/nmol である (Tokiwa and Ohnishi, 1986)。従って, 1-NP は細菌では還元されて 1-nitrosopyrene, N-hydroxy-1-aminopyrene と活性化されて, DNA に結合するものと考えられた。この還元的代謝経路で生じる DNA 付加体は N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene である (Howard *et al.*, 1983)。動物体内でも同じように

1-NP は還元的に代謝活性化されるものと信じられていた。実際に 1-NP を経口投与したラットの糞便には 1-aminopyrene, 1-amino-3-hydroxypyrene, 1-amino-6-hydroxypyrene, 1-amino-8-hydroxypyrene, 更に時間がたつと 1-acetyl amino-3/6/8-hydroxypyrene が増加するが, 胆汁中のグルクロン酸抱合体を調べると, 早期には 1-nitro-3/6/8-hydroxypyrene と 1-nitro-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene (1-NP 4,5-dihydrodiol) が多く排出されていることが判った。無菌ラットに 1-NP を投与すると尿中および糞便中には還元体が検出されないことから, われわれは, 通常動物で還元されて生じるアミノ体は腸管内で腸内菌によって生成されるのであり, 1-NP はラット肝臓内では還元されず, 酸化されることによって活性化するのではないかと考えた (Kinouchi *et al.*, 1986)。

3. DNA 付加体の解析

肝臓で 1-NP が還元されずに酸化されるのならば, 肝臓 DNA の付加体を ³²P-ポストラベル法で調べればその活性化体が明らかになるものと考えた。1-NP の酸化体として 4,5-epoxy-4,5-dihydro-1-NP (1-NP 4,5-oxide) と 1-NP 9,10-oxide とを合成し, それぞれ *in vitro* で子牛胸腺 DNA と保温すると, 1-NP の還元によって生じる付加体である N-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene

〒770 徳島市蔵本町 3-18-15

Mechanisms of metabolic activation of nitropyrene: The role of intestinal bacteria in the activation
Yoshinari Ohnishi, Takemi Kinouchi, Keiko Kataoka, Koichi Miyanishi and Motoo Uejima
Department of Bacteriology, School of Medicine, The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho,
Tokushima-shi 770, Japan

は生じずに、新たな付加体が生成された。1-NP を B6C3F1 マウスに投与した後、肝臓 DNA を抽出して付加体を TLC で調べると大部分は上記 *in vitro* で生じた付加体と同じ挙動を示し、還元付加体は 4% 以下であった。更に、これらの付加体は、1-NP oxides をマウスに投与したときの肝 DNA 付加体と同じであった (木内ら, 1990; Smith *et al.*, 1990)。以上のことから、1-NP は投与動物の肝臓で主として酸化代謝活性化されることが明らかになった。

4. ヒトおよび各種動物肝臓における 1-NP の酸化代謝活性化と不活性化

ヒト肝臓ミクロソーム画分の 1-NP (Fig. 1 の

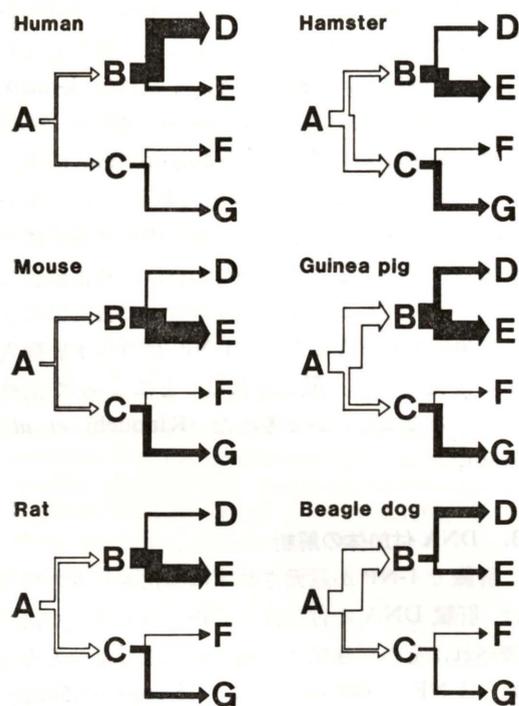


Fig. 1. 1-nitropyrene (1-NP) の酸化代謝活性化と代謝的不活性化の種差 (Kataoka *et al.*, 1991 より一部改変)。

矢印の太さは酵素活性の強さを示し、白矢印は epoxide 生成活性、黒矢印は epoxide hydrolase または glutathione S-transferase 活性を示す。A, 1-NP; B, 1-NP 4,5-oxide; C, 1-NP 9,10-oxide; D, 1-NP 4,5-dihydrodiol; E, 1-NP 4,5-oxide のグルタチオン抱合体; F, 1-NP 9,10-dihydrodiol; G, 1-NP 9,10-oxide のグルタチオン抱合体。

A) の酸化代謝活性化酵素の活性は、1-NP 4,5-oxide (Fig. 1 の B) 産生活性で調べると 5.9 ± 5.4 , 1-NP 9,10-oxide (Fig. 1 の C) 産生活性だと 2.4 ± 2.1 pmol/min/mg protein で ICR マウスに似て低く、Wistar ラット, Syrian golden ハムスター, Hartley モルモット, イヌの順に高かった (Kataoka *et al.*, 1991) (Fig. 1 の A→B, A→C 活性)。

生じた活性化体である 1-NP oxides はそれぞれミクロソーム画分の epoxide hydrolase によって加水分解されて 1-NP dihydrodiols になる (Fig. 1 の B→D, C→F) か、サイトソール画分の glutathione S-transferase によってグルタチオン抱合体となる (Fig. 1 の B→E, C→G)。epoxide hydrolase によって生じる dihydrodiol としては 1-NP 4,5-dihydrodiol (Fig. 1 の D) の方が 1-NP 9,10-dihydrodiol (Fig. 1 の F) よりも断然多く、ヒトでは 130 倍、マウスやラットでも 24 倍も多かった。1-NP 4,5-oxide の加水分解活性はヒトが最大で、 19.5 ± 12.3 nmol/min/mg protein であり、イヌ, モルモット, ハムスター, ラット, マウスの順に低かった (Kataoka *et al.*, 1991)。ラットでは、生じた dihydrodiol の大部分はグルクロン酸抱合体に、少量は硫酸抱合体になって胆汁中に排出される (Ohnishi *et al.*, 1986)。イヌでは硫酸抱合体が主となり、グルクロン酸抱合体が少ない (Dong *et al.*, 未発表)。

一方、肝サイトソール画分によるグルタチオン抱合体生成活性であるが、1-NP 4,5-oxide の抱合体生成活性 (Fig. 1 の B→E 活性) の方が 1-NP 9,10-oxide の抱合体生成活性 (Fig. 1 の C→G 活性) より 2.5~4.4 倍高かった。前者の活性ではヒトとイヌの場合が極端に低く、ヒトで 1.16 ± 0.41 nmol/min/mg protein であり、次にハムスターが 14.4 ± 0.49 nmol/min/mg で、モルモット, ラット, マウスの順に高かった (Kataoka *et al.*, 1991)。*in vivo* においては *in vitro* と違って、ラット胆汁中の 1-NP 9,10-oxide のグルタチオン抱合体代謝産物の方が 1-NP 4,5-oxide の抱合体より多い (Kinouchi *et al.*, 1990) のは、グルクロン酸抱合体としては大部分 1-NP 4,5-oxide の抱合体であり、1-NP 9,10-oxide のグルクロン酸抱

合体が生成されず、基質量に差があるためと考えられる。

以上をまとめると、ヒト肝における 1-NP の活性化は弱く、マウスに似ており、不活性化の形式はイヌに似ていた。また、マウスの不活性化形式は他の齧歯類に似ており、イヌの活性化形式はモルモットに似ていた。いずれにしろ、ヒトの 1-NP 代謝経路の酵素活性と同じ動物はおらず、種差が観察された。

5. ラット胆汁中の 1-NP 代謝産物

^3H ラベルの 1-NP をラットに経口投与すると 48 時間で 55% は胆汁中に抱合体として排出されるが、グルクロン酸抱合体, 硫酸抱合体, グルタチオン抱合体とその代謝産物の比率は 10:1:7 であった (Ohnishi *et al.*, 1986; Kinouchi *et al.*, 1990)。

胆汁中のグルタチオン抱合体の一部はすでにシステイニルグリシン抱合体とシステイン抱合体に代謝されており、時間とともに増加し、1-NP 投与後 0-6 時間で両者は 3.9%, 24-48 時間で 9.4% であった。ちなみに三抱合体全体で投与量の 18.4-22.8% であった (Kinouchi *et al.*, 1990)。これらことから胆汁中にはグルタチオン抱合体を分解する γ -glutamyltransferase (GGT) とシステイニルグリシン抱合体を分解する aminopeptidase とが存在していることが推定された。実際に胆汁は両酵素活性を保持していることを明らかにした。更に、正常ラット胆汁中の GGT 活性が顕著に高いことを示した。従って、グルタチオン抱合体を、胆汁が混在している正常ラット小腸内容物の S9 画分と *in vitro* で保温すると全てシステイン抱合体に変換した。しかし、それ以上には分解しなかった (Kinouchi *et al.*, 1990)。

6. 第三相反応におけるシステイン抱合体の活性化

前述のように *in vitro* における小腸内容物による 1-NP oxide のシステイン抱合体の分解活性は観察されなかったが、盲腸や大腸内容物によっては非常によく分解された。そこで各種細菌、腸粘膜細胞, 胆汁, 脾液のシステイン抱合体分解活性

を調べたところ、嫌気性菌の活性が比較的強く、特に *Eubacterium limosum* と *Peptostreptococcus magnus* とが非常に強い活性を示した (Kinouchi *et al.*, 1990)。

Ames 試験による 1-NP oxide のグルタチオン抱合体の変異原性は、未抱合体の 1/150 であったが、システイン抱合体の変異原性はグルタチオン抱合体の 10 倍の強さであった。システイン抱合体の変異原性を測定するときに *Eubacterium limosum* の S9 画分を加えたり、*Peptostreptococcus magnus* から精製した cysteine conjugate β -lyase (β -lyase) (Kataoka *et al.*, 未発表) を加えると更に変異原性が増加した。つまりシステイン抱合体は β -lyase によって分解されて、再活性化されることが判った (Ohnishi *et al.*, 1990; 木内ら, 1990)。

In vitro でのシステイン抱合体の DNA への結合を調べると、 β -lyase が共存していると増加し、また、還元酵素である xanthine oxidase が共存していてもよく結合するが、更に両酵素を共存させるとシステイン抱合体は非常によく DNA に結合した。このときに β -lyase の阻害剤である aminooxyacetic acid や xanthine oxidase の阻害剤である allopurinol を加えると、DNA への結合は減少した。つまり、システイン抱合体は腸内菌が保有する β -lyase や還元酵素によって再活性化される可能性があることが明らかになった (木内ら, 1990)。

システイン抱合体が腸内菌によって再活性化されるかどうかを調べるためには、腸内菌が減少した動物で、腸粘膜細胞 DNA の付加体の減少・消失を明らかにすればよい。まず、腸内菌数を減少させる方法としては、前述の無菌動物を使う方法があるが、入手や飼育が簡単でなく、また高価でもある。もっと簡単には抗生物質を投与する方法がある。つまり、bacitracin, neomycin, streptomycin 各 200 mg/kg body weight を 5 日間、1 日 2 回、午前 7 時と午後 7 時に胃内にゾンデで投与すると、マウスの下部腸管内容物の生菌数は、嫌気培養したときに、無処理で 10^{10} cfu/g であったのが、 10^8 cfu/g に減少した。このとき、下部腸管内容物の β -glucuronidase, nitroreduc-

tase, β -lyase の酵素活性も 1/10 以下に減少した (木内ら, 1990)。次に, 1-NP 4,5-oxide と 9,10-oxide のグルタチオン抱合体を合成し, 最終回の抗生物質投与 4 時間後に, 抱合体をマウス胃内に投与し, 48 時間後に屠殺して, 下部腸管粘膜細胞の DNA を抽出し, ^{32}P -ポストラベル法で DNA 付加体を調べた。抗生物質を投与しないマウス下部腸管粘膜細胞で, 抗生物質処理マウスの下部腸管粘膜細胞 DNA に見られない 3 種の DNA 付加体を観察した (Kinouchi *et al.*, 未発表)。グルタチオン抱合体は胆汁中の酵素でシステイン抱合体にまで分解されるので, これらの DNA 付加体は, システイン抱合体が腸内菌によって分解されて生じたか, 腸内菌によって分解された産物が腸粘膜細胞内で活性化されて生じたものと考えられた。

7. 1-NP 代謝における腸内菌の役割

上述のように腸内菌がシステイン抱合体の活性化に関与していることが明らかになったが, それだけでなく, 代謝産物の再吸収にも関係してい

た。 ^3H でラベルした 1-NP oxide のグルタチオン抱合体をマウスに経口投与し, 血中の放射能を測定すると, 3 時間後に最高の血中濃度になったが, 抗生物質処理マウスの場合には血中濃度があまり上昇しなかった (Kinouchi *et al.*, 未発表)。このように腸内菌減少のためにシステイン抱合体以後の代謝が進まないと, 腸管での再吸収も影響される様であった。また, 腸管での再吸収が低下したので, 尿中への放射能の排泄も, 対照の 20% に比べ, 抗生物質処理マウスでは 2% 以下であった (Kinouchi *et al.*, 未発表)。

8. 1-NP の代謝経路

ラット・マウスでの 1-NP の生体内代謝についてまとめると (Fig. 2), 経口投与した 1-NP は, 上部腸管で吸収され, 一部は下部腸管に行き, 還元されて 1-aminopyrene (1-AP) になって吸収される。また, 一部の 1-NP および 1-AP はそのまま糞便中に排泄される。吸収された 1-NP は門脈を通過して肝臓に行き, ここで monooxygenase によって酸化されて epoxide になり, 一部は高分

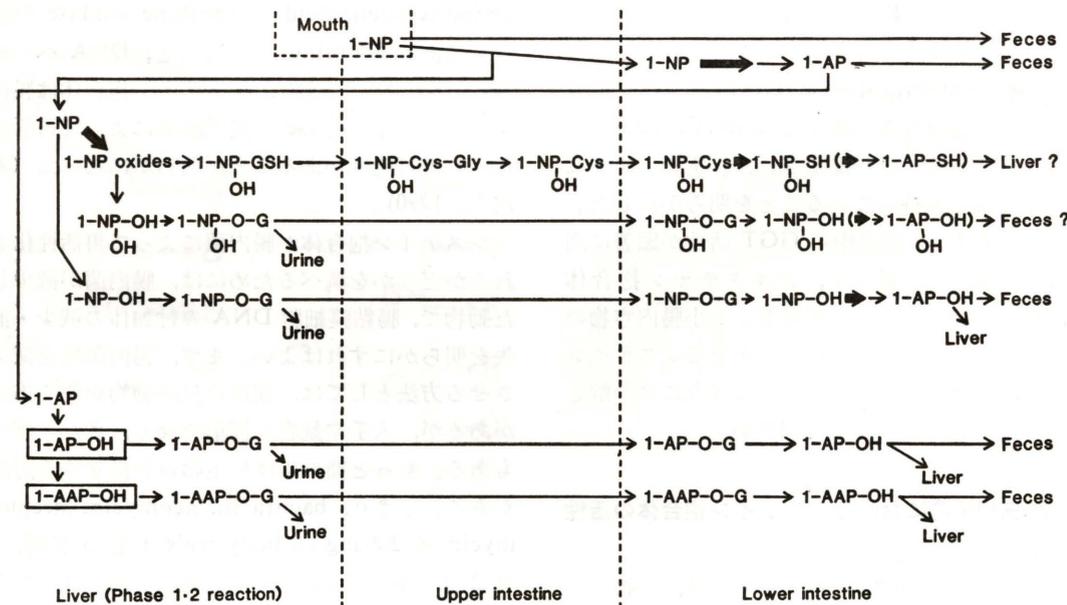


Fig. 2. 経口投与した 1-NP のラット・マウス体内での代謝経路。
太矢印は活性化反応を示す。□ 内の一部は腸管で再吸収されて, 腸肝循環したものを示す。() 内は推定の反応であり, 以後の代謝経路は不明である。AP, aminopyrene; AAP, acetylaminopyrene; -G, グルクロン酸抱合体と一部硫酸抱合体; -GSH, グルタチオン抱合体。

子物質に結合するが, 残りは dihydrodiol になるか, グルタチオン抱合体になる。また, 1-NP は直接水酸化体になり, グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体とになる。dihydrodiol もグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体とになる。グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体とは一部尿中に排泄され, 残りは胆汁中に排泄され, 下部腸管で, 脱抱合され, ニトロ基は還元されてアミノ基になり, 一部は糞便中に排泄され, 一部は再吸収される (腸肝循環)。再吸収されたアミノ体は肝臓で一部アセチル化される。アミノ体とアセチルアミノ体とはさらにグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体になり, 一部尿中に排泄され, 一部は胆汁中に排出され, 下部腸管で脱抱合されて糞便中に排泄されるか再吸収される。この腸肝循環を繰り返すことによって, 全てのグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体とは体外に排泄されるものと考えられる。

一方, グルタチオン抱合体は前述のように, 上部腸管で胆汁によってシステイン抱合体にまで分解され, 下部腸管で腸内菌の β -lyase によってチオール化合物になると共に, ニトロ基は還元されるのではないかと考えられるが, これ以後の代謝についてはまだ解明されていない。

以上のように, 腸内菌は抱合体の加水分解と還元反応とを行っており, 代謝産物の腸肝循環に関与している。

9. 薬物代謝における腸内菌の役割

薬物代謝に腸内菌が関与していることを証明する実験方法として抗生物質を投与することについ

ては前述した。しかし, 12 時間毎に胃内投与というのは確実ではあるが面倒であるので, 飲料水中に抗生物質を溶かして投与する方法を検討した (Table 1)。抗生物質の種類は前述と同じ bacitracin, neomycin, streptomycin で, それぞれを 0.5 mg/ml の濃度で三剤一緒に飲料水 (無菌水) に入れた薬液, および 1, 2.5, 5 mg/ml の薬液を作り, Wistar ラットに自由に飲ませた。毎日 7 日間糞便中の生菌数を調べると, 薬物濃度に比例して生菌数は減少し, 10^{10} cfu/g feces の嫌気性菌 (糞便中の細菌の 99-99.9% は嫌気性菌である) が, 2.5 mg/ml 投与群では 2 日後に 100 cfu/g 以下に減少した。5 mg/ml 投与群では, 薬液が苦いためかラットが飲まないため生菌数は減少せず, さらに体重, 摂餌量も減少し, 実験群としては使用できなかった。2-2.5 mg/ml 薬液を 2-3 日間投与すれば腸内菌を抑えることができるものと考えている (Ohnishi *et al.*, 未発表)。

薬物投与によって生じる副作用が動物種によって出現したり, しなかったりする場合がある。この原因として解毒抱合体の分子量の違いによる場合がある (加藤, 1983) が, その他に, 第三相反応で作用しているのか, 直接作用しているのかは判らないが, 腸内菌の差による場合が考えられる。

前記の薬液を 7 日間飲ませたラットに, 非ステロイド系抗炎症剤である diclofenac sodium (Voltaren) を 20 mg/kg body weight 胃内に投与し, 薬液を飲ませ続けて 72 時間後に解剖して, 腸管内の生菌数を測定すると共に, 副作用である

Table 1. 抗生物質 7 日間投与ラットに diclofenac sodium を 3 日間投与した時の生菌数と回腸潰瘍形成 (Ohnishi *et al.*, 未発表)

飲料水中の 抗生物質濃度 (mg/ml)	生菌数 (cfu/g)				潰瘍形成率
	回腸部		盲腸-大腸部		
	好気培養	嫌気培養	好気培養	嫌気培養	
0	6.0±2.2 ×10 ⁸	8.3±3.3 ×10 ⁸	8.4±2.3 ×10 ⁸	1.1±0.6 ×10 ¹⁰	4/5 (80%)
0.5	4.6±3.4 ×10 ⁸	4.1±1.2 ×10 ⁷	9.9±4.2 ×10 ⁸	2.2±0.6 ×10 ⁸	0/2
1.0	5.8±5.8 ×10 ⁸	6.0±6.4 ×10 ⁸	2.0±2.0 ×10 ⁸	1.4±1.7 ×10 ⁴	
2.5	<100	<100	<100	<100	0/2

小腸(回腸)潰瘍を調べた(Table 1)。抗生物質無投与群では5頭中4頭(80%)に潰瘍が生じていたが、0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.5 mg/mlの抗生物質投与群では回腸潰瘍は形成されなかった。2.5 mg/mlの抗生物質投与群では回腸内容物の生菌数が100 cfu/g以下になっていたため、生菌数減少が副作用消失の原因と考えられた。しかし、0.5 mg/ml投与群では回腸内容物の生菌数が 8.3×10^8 cfu/gから 4.1×10^7 cfu/gにしか減少していないのに潰瘍形成が観察されなかったため、潰瘍形成に関与する細菌としてはこれらの抗生物質に特に感受性の特定の菌種によるのではないかと考えられた(Ohnishi *et al.*, 未発表)。このdiclofenac sodiumの場合は、第三相反応で腸内菌が働いているのではなく、この薬物が小腸で作用するときに、腸内菌が関与しているものと推定された。

また、別の開発中の非ステロイド系抗炎症剤では、サルでは潰瘍が発生しないが、ラットでは発生するのでこの場合も抗生物質を投与したところ、小腸潰瘍が形成されなくなった。勿論、無菌ラットではこの抗炎症剤を投与しても小腸潰瘍は形成されなかった。しかし、無菌ラットに*Eubacterium limosum*や*Escherichia coli*(大腸菌)を腸内に定着させたノトバイオート gnotobiot には、潰瘍が出現した。これらのノトバイオートに抗生物質を前処理しておき、生菌数を抑えると潰瘍は形成されなかった。一方、*Bifidobacterium adolescentis*や*Lactobacillus acidophilus*のノトバイオートにこの新しい抗炎症剤を投与しても小腸潰瘍は出現しなかった。さらに、通常ラットに*Bifidobacterium*や*Lactobacillus*の菌液や*Bifidobacterium breve*と*Streptococcus thermophilus*が入ったヨーグルト(ビフィール)を2日前から飲料水の代わりに飲ませて抗炎症剤を投与したときにも潰瘍形成が抑えられた。腸内菌を抑えなかったときや腸内改良菌を投与しなかったときに潰瘍が形成されるわけであるが、そのときの小腸内容物中の細菌は正常ラットの優勢菌である*Lactobacillus*ではなく、*Escherichia coli*, *Proteus*, *Bacteroides*が増加しており、菌相が変化していた(Ohnishi *et al.*, 未発表)。

以上のように、薬物やその代謝産物が生体毒性

を発現する場合、腸内菌が関与していることがあり、前述の抗生物質処理実験を加えることによって、代謝経路、毒性発現機構がより一層明らかになることがあるので、少なくとも急性毒性試験に抗生物質処理群を加えることは必要なことと考えている。特に、ある動物種だけに生じる副作用のために諦めていた新薬の開発が可能が高い方に展開して行く場合がある。

10. おわりに

大気、自動車排ガス、コークス、紅茶、焼鳥などに存在している変異原である1-NPの生体内代謝について述べてきた。1-NPのAmes試験における変異原性はethyl methanesulfonateの20,000倍、1,8-dinitropyreneの1/400である。1-NPの発癌性は弱いので、発癌物質という点ではそれほど重要とは考えられないが、ニトロアレーンの代表的モデル物質としての研究成果をまとめた。特に、第三相反応の重要性について述べた。また、腸内菌関与の研究手法として抗生物質が使われてきたが、いまだにneomycin単独投与で腸内菌を抑えたという論文が出ているので、抗生物質処理方法についても、改良を加えた。ちなみに、neomycinは嫌気性菌には無効であり、腸内にいる細菌の99-99.9%は嫌気性菌であるので、腸内菌を抑えるのにアミノ配糖体の抗生物質だけを使うのは意味がない。最後に、薬物動態における腸内菌の重要性について解説を加えた。

11. 謝辞

ここに述べた筆者らの研究の一部は、文部省科学研究費補助金、厚生省がん研究助成金の援助を受けた。

参考文献

- Howard, P. C., R. H. Heflich, F. E. Evans and F. A. Beland (1983) Formation of DNA adducts *in vitro* and in *Salmonella typhimurium* upon metabolic reduction of the environmental mutagen 1-nitropyrene, *Cancer Res.*, **43**, 2052-2058.
- Kataoka, K., T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1991) Species differences in metabolic activation and inactivation of 1-nitropyrene in the liver, *Cancer Res.*, **51**, 3919-3924.

加藤隆一(1983)薬物代謝酵素と薬物の薬効・毒性、薬物代謝の比較生化学(加藤隆一、鎌滝哲也編)、清至書院、pp. 3-20.

Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Biliary excretion of glutathione conjugates of 4,5-epoxy-4,5-dihydro-1-nitropyrene and 9,10-epoxy-9,10-dihydro-1-nitropyrene in rats administered 1-nitropyrene orally and their further metabolism in the intestinal tract, *Carcinogenesis*, **11**, 1381-1387.

Kinouchi, T., 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.

木内武美、片岡佳子、宮西幸一、大西克成(1990)腸肝循環による変異原物質の活性化・不活性化、環境変異原研究, **12**, 291-303.

Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, E. K. Fifer and F. A. Beland (1986) Metabolism of mutagenic 1-nitropyrene in rats, In: N. Ishinishi, A. Koizumi, R. O. McClellan and W. Stöber (Eds.), Car-

cinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 171-183.

Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifuji, K. Miyanishi, T. Kanoh and M. Fukuda (1990) Metabolism of 1-nitropyrene oxides and effect of nitrogen dioxide on arene activations, 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.

Smith, B. A., R. H. Heflich, Y. Ohnishi, A. Ohuchida, T. Kinouchi, J. R. Thorton-Manning and F. A. Beland (1990) DNA adduct formation by 1-nitropyrene 4,5- and 9,10-oxide, In: P. C. Howard, S. S. Hecht and F. A. Beland (Eds.), Nitroarenes: Occurrence, Metabolism, and Biological Impact, Plenum Press, New York, pp. 181-187.

Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60.

がん原性芳香族アミンを活性化する チトクローム P450

東北大学薬学部 出川雅邦, 橋本嘉幸

1. はじめに

環境中から見いだされるがん原性化合物のほとんどは、がん原性前駆体であり、生体内で cytochrome P-450 (以下 P450 と略す) を中心とする薬物代謝酵素で代謝されてはじめて発がん性を発揮する。また、その発がん性にはしばしば動物種差、性差および臓器差が見られる。

P450 には、基質特異性を異にする種々のアイソザイムが存在し、それらは細胞の小胞体 (ミクロソーム画分) に多量に存在している。また、P450 は、薬物や異物の投与で誘導されるが、その誘導性には動物種差、性差および臓器差が見られ

る (Gonzalez, 1990; Okey, 1990; Ryan & Levin, 1990)。従って、ヒトを含めた動物の発がん感受性を理解するためには、各動物臓器における P450 アイソザイムの分布および誘導パターンを把握することが重要である。

がん原性化合物の活性化に関わる P450 アイソザイムの検索には、精製酵素 (あるいはミクロソーム画分) を用い、生成する活性代謝物を直接化学的に定量する方法や生成する活性代謝物の生物活性 (変異原性) を指標に間接的に定量する方法が用いられている。両法にはそれぞれ長所短所があるが、少なくとも主要な活性代謝物が限られてい

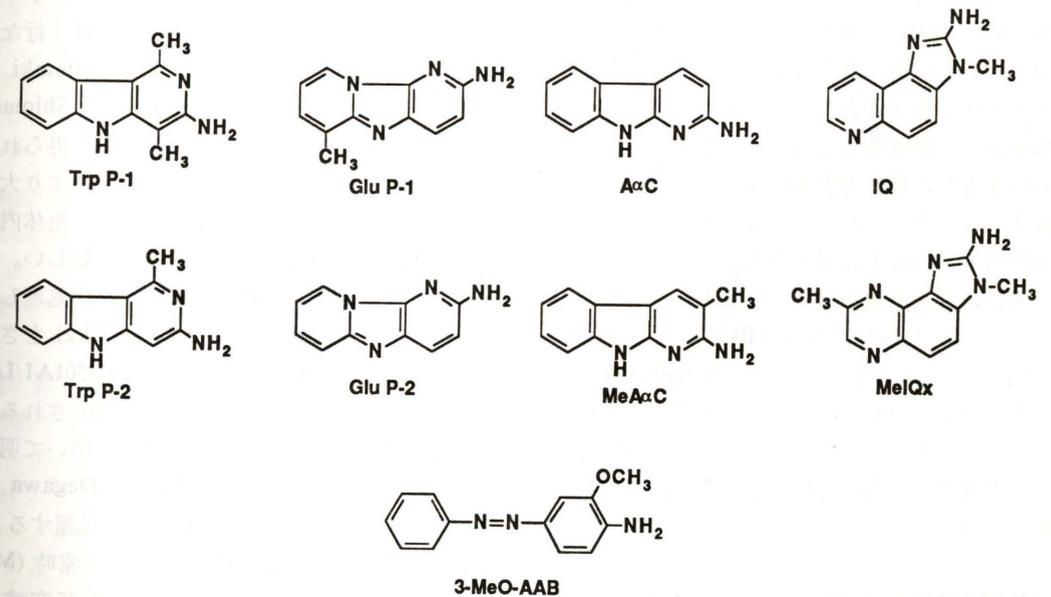


Fig. 1. Chemical Structures of Primary Carcinogenic Aromatic amines used.

〒980 仙台市青葉区荒巻字青葉

Cytochrome P450 that catalyzes bioactivation of carcinogenic aromatic amines—

Masakuni Degawa and Yoshiyuki Hashimoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Aoba, Aramaki-aza, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

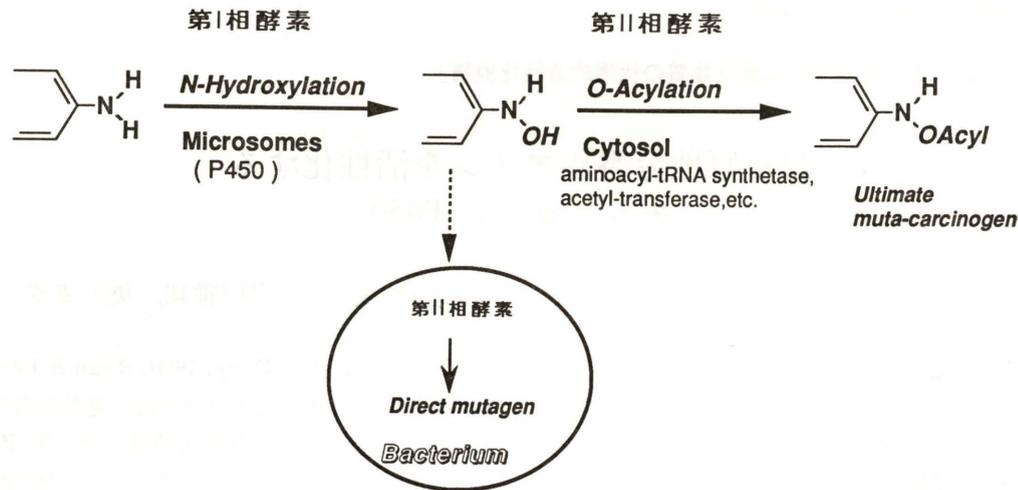


Fig. 2. Carcinogenic and Mutagenic Activation of Primary Carcinogenic Aromatic Amines.

るがん原性芳香族第1級アミンのような化合物や生成する活性代謝物が極めて化学的に不安定な化合物のような場合には、通常化学的測定法より検出感度の高い生物学的測定法がしばしば用いられる。

本稿では、生物学的(変異原性)試験法を利用したがん原性芳香族アミンの代謝的活性化(N-水酸化)酵素(P450アイソザイム)の簡易検索法を紹介し、さらに種々動物臓器におけるP450アイソザイムの多様性と発がん感受性との関連性について筆者らの研究成果を中心に考察する。なお、用いた主ながん原性芳香族アミンの化学構造式をFig. 1に示した。これらはいずれも第1級アミン構造を持ち、Fig. 2に示した代謝的活性化経路で発がん性、変異原性を発現することが知られている。また、この種の化合物はP450アイソザイム(ミクロソーム画分酵素)により変異原性をもつN-水酸化体に変換される。通常、芳香族第1級アミンのN-水酸化体は、微生物内のアシル化酵素により究極的変異原活性体に変換され、直接の変異原性を発揮する。

2. 代謝的活性化に関わるP450アイソザイムの簡易検索法

がん原性化合物や薬物など外来化合物を代謝する代表的なP450アイソザイムとして、phenobarbital (PB), 3-methylcholanthrene (MC) および

ethanol でそれぞれ誘導される P450IIB1/IIB2, P450IA1/IA2 および P450IIE1 が知られている。精製した各 P450 アイソザイムを用いた再構成系での実験より、芳香族アミンの活性化(N-水酸化)は、P450IA2 で、また多環式芳香族炭化水素類の活性化(エポキシド化)は P450IA1 で、ジアルキルニトロサミンの活性化(アルキル側鎖の α 水酸化)は P450IIE1 で、それぞれ効率良く行なわれることが明らかとされている (Kamatani *et al.*, 1983; Shimada & Nakamura, 1987; Shimada *et al.*, 1989)。しかしながら、再構成系で得られる酵素活性は、用いる再構成成分の相違により大きく変動することが知られ、この結果から生体内における各酵素の活性を想定することは難しい。

最近我々は、MC (0.11 mmol/kg) を前処理したラットに四塩化炭素 (CCl_4 , 5.2 mmol/kg) をさらに投与すると、MC で誘導された P450IA1/IA2 のうち P450IA2 が選択的に分解(傷害)されることを酵素学的および免疫化学的手法を用いて明らかにした (Degawa *et al.*, 1987b; Degawa *et al.*, 1988a)。また、 CCl_4 をこのように処理すると、肝ミクロソーム中の総 P450 含量は、平常時 (MC 未処理時) の場合よりも減少し、通常存在する P450 アイソザイムもまた CCl_4 処理により分解されることが示された。すなわち、MC 処理後さらに CCl_4 を投与することにより、P450IA1 にのみ富んだミクロソームを調製することができる。

Table 1. Mutagenic Activation of Carcinogenic Aromatic Amines and B(a)P by Hepatic Microsomes with Different P450 Isozymes

Substrates	Microsomal P450 activity (ratio to the controls)				
	Treatment : None (control)	Source of hepatic microsomes			P450IA2 ^a
		PB (P450IIB1/IIB2)	MC (P450IA1/IA2)	MC+CCl ₄ (P450IA1)	
Trp P-1 (2 nmol)	1.0 (1900) ^b	0.4	11.1	6.3	14.7
Trp P-2 (2 nmol)	1.0 (3100)	0.7	80.6	54.8	96.8
Glu P-1 (2 nmol)	1.0 (2000)	0.5	22.0	3.5	34.9
Glu P-2 (100 nmol)	1.0 (610)	0.6	24.5	10.0	31.9
IQ (2 nmol)	1.0 (6600)	0.5	13.0	3.6	18.9
MeIQ (2 nmol)	1.0 (19000)	0.4	13.7	4.1	15.4
A α C (100 nmol)	1.0 (1200)	0.6	14.2	13.3	15.4
MeA α C (100 nmol)	1.0 (1900)	0.6	3.8	3.6	3.8
B(a)P (100 nmol)	1.0 (230)	1.6	4.8	9.1	0.4

^aActivities were calculated by the formula as follows, and were compared to the corresponding control.

P450IA2 activity = $(N-N')/(P-P') \times (1/CN)$; N and N', number of revertant colonies/mg protein of microsomes from MC-treated and (MC+CCl₄)-treated rat livers, respectively; CN, revertant colonies/nmol P-450 of control microsomes

^bValues (number of revertant colonies/nmol of P-450) shown represent the means obtained on triplicate samples.

そこで、MC 単独あるいは MC と CCl_4 (MC/ CCl_4) を組み合わせ投与した各ラットより肝ミクロソームを調製し、これらミクロソームのがん原性芳香族アミン代謝活性化能を Ames 試験を利用して比較検討した (Table 1)。なお、ミクロソームの代謝活性は単位 P450 当たりで生成する変異コロニー数で表した。用いた芳香族アミンは、いずれも MC 単独投与群で、一方 benz(a)pyrene (B(a)P) は MC/ CCl_4 組み合わせ投与群で、それぞれ最も効率良く活性化された。また、芳香族アミンのうち Trp P-2, A α C および MeA α C は、MC/ CCl_4 組み合わせ投与群でも高率に活性化された。各ミクロソーム中の P450IA1 および P450IA2 量を考慮すると、芳香族アミンはいずれも P450IA2 で、また B(a)P は P450IA1 でそれぞれ最も効率良く活性化されることがわかる。なお、Trp P-2, A α C や MeA α C は P450IA2, P450IA1 のいずれでも効率良く代謝活性化される。

これらの結果は、既に報告されている P450 再構成系での結果とよく一致した (Degawa *et al.*, 1988a)。したがって、MC 単独および MC/ CCl_4 組み合わせ投与したラットの肝ミクロソームを酵素源とする本法は、P450IA1/IA2 アイソザイムで活性化されるがん原性化合物の簡易検索法として

極めて有用である。

3. がん原性芳香族アミンによる P450IA2 アイソザイムの誘導

外来化合物の代謝に関わる P450 アイソザイムの多くは、一般に外来化合物の投与で誘導され、また誘導された酵素は投与された化合物の代謝を行なうことが知られている。しかしながら、芳香族アミンによる P450 誘導についての研究はほとんど行なわれていなかった。

筆者らは、がん原性芳香族アミンの多くがラットやマウスの肝臓を主な標的臓器とすること、またこの種の化合物の活性化酵素である P450IA2 は通常標的臓器の肝に選択的に発現していること、さらに P450IA2 には誘導性が見られることなどの点に着目し、がん原性芳香族アミンによる P450 誘導およびその臓器特異性を検索した (Degawa *et al.*, 1987a; Degawa *et al.*, 1987c; Degawa *et al.*, 1989)。

加熱食品成分から見い出される種々がん原性芳香族アミン (Trp P-1, Trp P-2, Glu P-1, Glu P-2, A α C, MeA α C, IQ あるいは MeIQ) をラットに単回投与し、その 24 時間後に肝、腎、肺および小腸を摘出した。各臓器から得たミクロソ-

Table 2. Enzymatical Analysis for Carcinogenic Aromatic Amine-induced Microsomal P450 Isozymes in Rat Liver

Treatment	Microsomal P-450 activity (No. revertant colonies / nmol P450)		Substrate specificity A/B
	Substrates		
	Trp P-2 [A] (P450IA1/IA2)	Glu P-1 [B] (P450IA2)	
None (control)	3200	2800	1.1
Trp P-1	14000 (4.4) ^a	11300 (4.0)	1.2
Trp P-2	19400 (6.1)	15700 (5.6)	1.2
Glu P-1	20700 (6.5)	16200 (5.8)	1.3
Glu P-2	19100 (6.0)	19300 (6.9)	1.0
AαC	30200 (9.4)	26100 (9.3)	1.2
MeAαC	34700 (10.8)	27900 (10.0)	1.2
IQ	17500 (5.5)	15100 (5.4)	1.2
MeIQx	8100 (2.5)	10000 (3.6)	0.8
3-MeO-AAB	52500 (16.4)	68700 (24.5)	0.8
MC	57900 (18.0)	22000 (7.9)	2.6

^a Ratio to the corresponding controls.

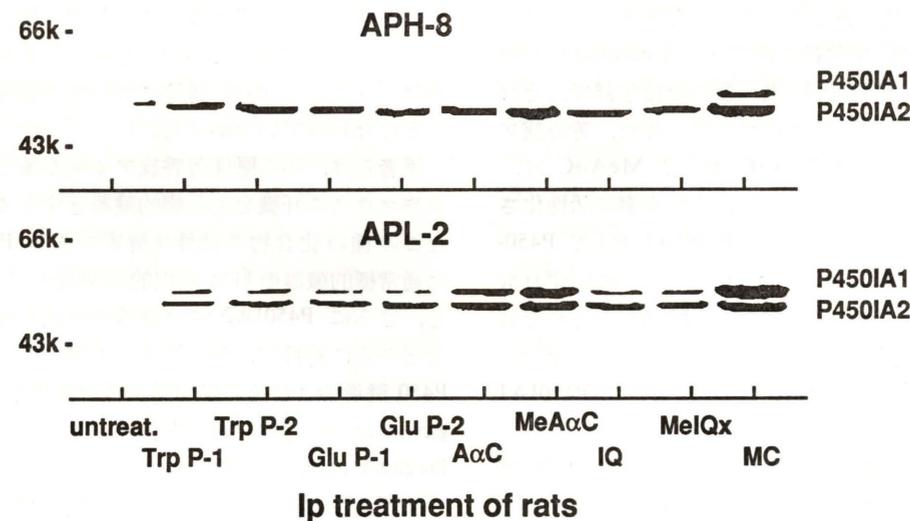
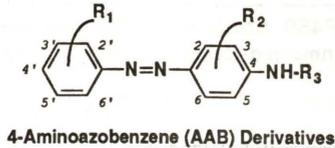


Fig. 3. Western Blott Analysis of Hepatic Microsomal P450IA1/IA2 Isozymes Induced by Carcinogenic Heterocyclic Aromatic Amines in Rats. APH-8 and APL-2 are monoclonal antibodies established against P450IA2 and P450IA1, respectively. Each antibody shows cross-reactivity to P450IA1/IA2.

Table 3. Induction of Microsomal P450IA2 by 4-Aminoazobenzene (AAB) Derivatives with Different Hepatocarcinogenicities to Rats



Chemicals	Carcinogenicity	Induction of microsomal P450IA2	
		Activity for Glu P-1- mutagenesis	Reactivity with anti-P450IA2 MoAb
None (control)		1.0 (3500) ^a	1.0 (0.10) ^b
AAB	-	1.0	1.3
2-methoxy-AAB	-	15.6	8.8
4'-methoxy-AAB	+	1.3	2.2
3,2'-dimethoxy-AAB	+	17.2	15.5
3,2'-dimethyl-AAB (OAT)	+	17.8	13.2
3-methoxy-AAB	++	15.5	15.5
4-methylamino-azobenzene (MAB)	++	9.5	7.8
4-dimethylamino-azobenzene (DAB)	++	4.5	5.5
3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-Me-DAB)	+++	5.2	3.3

^aNo. revertant colonies/nmol P-450.

^bAbsorbance (at 414 nm) obtained by ELISA.

ムを酵素源として、芳香族アミン (Trp P-2 と Glu P-1) 代謝活性化能を測定する (Table 2) とともに抗ラット P450IA1/IA2 抗体を用いて各マイクロソーム中の P450IA1/IA2 量 (Fig. 3) を比較検討した。

その結果、がん原性芳香族アミンにはそれ自身を含むいずれの芳香族アミンをも活性化する P450IA2 を肝選択的に誘導する性質があること、またこれらががん原性芳香族アミンは、多環式芳香族炭化水素を代表とするこれまでの P450IA フェミリー酵素誘導剤とは異なり、P450IA1 よりも P450IA2 をより高率に誘導する性質があることが明らかになった (Degawa *et al.*, 1989)。

そこで次に、酵素誘導活性とがん原活性との関連性を、がん原性と化学構造との関連性が良く調べられている 4-aminoazobenzene (AAB) 誘導体を用いて検索した (Degawa *et al.*, 1986)。酵素学および免疫化学的解析の結果、がん原性を有するいずれの AAB 誘導体にも P450IA2 誘導能

が確認されたが、その誘導活性は必ずしもがん原活性とは相関しないことが明らかになった (Table 3)。なお、非がん原性化合物の 2-methoxy-4-aminoazobenzene (2-MeO-AAB) にも強がん原性化合物の 3-methoxy-4-aminoazobenzene (3-MeO-AAB) と同様に高い酵素誘導活性が認められた。

次いで、ラットの肝に強い P450IA2 誘導活性を示す 3-MeO-AAB および MeAαC を誘導剤に選択し、活性化酵素誘導におけるラット、マウス、ハムスターおよびモルモット間での動物種差を検索した (Degawa *et al.*, 1990)。3-MeO-AAB はラットに選択的に、また MeAαC はラットをはじめマウス、ハムスターにも誘導効果を示したが、これら化合物はいずれもモルモットには誘導効果を示さなかった (Table 4)。

活性化酵素誘導におけるこのような顕著な種差は、代表的な P450IA1/IA2 誘導剤である MC 投与時には見られない。また、がん原性芳香族アミ

Table 4. Species-Difference in Induction of Hepatic Microsomal P450 Isozyme(s) with 3-MeO-AAB and MeA α C

Species	Chemical-treatment	P450 content (nmol/mg protein)	Microsomal P450 activities : Ratio to the corresponding controls			
			Substrates			
			Trp P-2 (2 nmol)	Glu P-1 (2 nmol)	Glu P-2 (2 nmol)	MeA α C (100 nmol)
Rat	None (control)	0.58	1.0 (3200) ^a	1.0 (3000)	1.0 (1500)	1.0 (4000)
	3-MeO-AAB	0.63	14.3	13.6	10.0	1.5
	MeA α C	0.55	10.1	7.8	7.8	1.3
Mouse	None (control)	0.62	1.0 (47000)	1.0 (6100)	1.0 (3200)	1.0 (800)
	3-MeO-AAB	0.55	1.1	1.0	0.8	1.0
	MeA α C	0.57	2.5	2.5	1.9	2.0
Hamster	None (control)	1.00	1.0 (48000)	1.0 (4700)	1.0 (2400)	1.0 (1800)
	3-MeO-AAB	0.76	1.0	0.9	0.9	0.9
	MeA α C	1.05	2.8	4.5	4.9	4.3
Guinea pig	None (control)	0.91	1.0 (38000)	1.0 (6900)	1.0 (900)	1.0 (4700)
	3-MeO-AAB	0.97	0.8	0.9	1.1	0.8
	MeA α C	0.74	1.0	0.6	1.0	0.9

^aNo. revertant colonies/nmol P450.

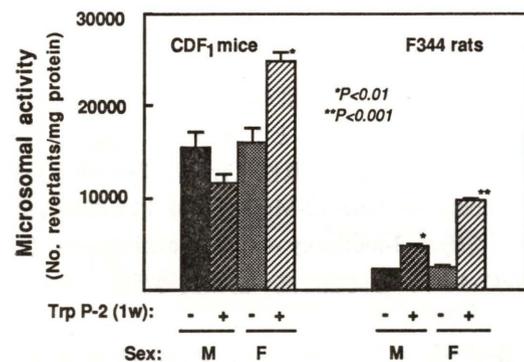


Fig. 4. Species and Sex-Differences in Induction of Hepatic Microsomal enzyme responsible for Trp P-2 Mutagenesis by Dietary Trp P-2.

ンや MC で誘導される酵素の基質特異性 (活性) にも動物種差が見られ、同種のアイソザイムの性質も動物種間で著しく異なっていることが明らかになった。

4. P450 アイソザイムの多様性と発がん感受性

前述したように、がん原性芳香族アミン類には肝選択的な芳香族アミン活性化酵素 (P450IA2) 誘

導能があり、またその誘導性や誘導酵素の基質特異性 (活性) には動物種差が認められる。そこで、平常時およびがん原性化合物投与時における各動物臓器の活性化酵素活性がその臓器の発がん感受性を支配する要因となるのではないかと推定し、既にかん原性に種差、性差が報告されている発がん実験系を用いて発がん感受性と活性化酵素活性との関連性を追究した (Hashimoto *et al.*, 1982; Degawa *et al.*, 1984; Degawa *et al.*, 1985; Degawa *et al.*, 1987a)。以下にその代表例として Trp P-2 発がんにおける種差、性差の解析結果を紹介する (Fig. 4)。

Trp P-2 はラットよりもマウスに対し強いがん原性を示し、また雄マウスよりも雌マウスに強いがん原性を示すことが知られている (Sugimura, 1985)。

平常時、マウスの Trp P-2 に対する活性化酵素活性はラットの活性より数倍高く、また平常時の雌雄マウス間には有意な活性の相違は認められない。Trp P-2 を発がん実験時と同様に餌に混ぜ 1-4 週間与えると、発がん高感受性の雌マウスでは

雄マウスより高率に活性化酵素の誘導が見られ、その活性は対応する雄の活性の 2 倍以上となった。また、発がん低感受性のラットでは活性化酵素の誘導は見られたものの、その活性は対応する雄マウスの活性の 1/2 以下に過ぎなかった。なお、いずれの動物においても、肝以外の臓器 (肺、腎、小腸など) には活性化酵素の誘導は認められなかった。これらの結果は、少なくとも発がん初期過程における各動物臓器の活性化酵素活性がその動物臓器の発がん感受性を支配する要因となることを示している。

また、雌マウスにおける活性化酵素誘導はテストステロン投与により抑制されること、また去勢により雄マウスでも雌と同様に活性化酵素の誘導が起こることより、この酵素誘導は男性ホルモンにより負に制御されていることが明らかになった (Hashimoto *et al.*, 1982; Degawa *et al.*, 1988b)。

5. おわりに

加熱食品中から検出されるがん原性芳香族アミンを中心とした代謝活性化 (N-水酸化) に関わるラット P450 アイソザイムの簡易検索法を紹介した。また、がん原性芳香族アミンによる P450 誘導や誘導される酵素の基質特異性 (活性) には動物種差、性差および臓器差が見られ、こうした P450 アイソザイムの多様性が各動物臓器の発がん感受性支配要因になることを記した。また最近、ヒトにおいても P450 遺伝子の多型と発がん感受性との関連性などが報告され (Kawajiri *et al.*, 1990; Kawajiri & Fujii-Kuriyama, 1991)、今後の進展が注目されている。

ヒトがん発生の主因として環境がん原性化合物が挙げられ、それら化合物の検索や同定はヒトがんの予防を考える上で極めて重要である。しかしながら、がん原性化合物による発がんの動物種差、性差あるいは臓器差の解析は未だ十分には行なわれておらず、ヒトに対する危険性を的確に評価しうるがん原性試験法は確立されていない。

今までに検出されたほとんどのがん原性化合物が活性化されてはじめて発がん性を発現することや本稿で示した発がん感受性と活性化酵素活性の相関性を考えると、ヒトと実験動物の薬物代謝酵

素 (P450 や抱合酵素) の基質特異性 (活性) や誘導性の異同の解明が、がん原性試験法の開発に新たな進展をもたらすものと思われる。最近、ヒトや実験動物のある種の P450 アイソザイムについては、その構造や機能の解析が遺伝子工学的手法を用いて作製した P450 アイソザイム発現細胞を利用して進められつつあり、がん原性化合物の活性化に関わるヒト P450 アイソザイムと実験動物における酵素との異同が徐々に明らかにされて行くものと期待される。また、薬物代謝酵素の発現、誘導は、がん原性化合物を含む外来化合物ほかホルモンなどの内分泌系成分により制御されており、各動物個体 (臓器、細胞) レベルでの薬物代謝酵素の解析もまた不可欠である。今後これらの薬物代謝酵素研究が益々発展していくことを期待して止まない。

参考文献

- Degawa, M., M. Kojima and Y. Hashimoto (1984) Species difference between rats and mice in activities of enzymes activating aromatic amines: Effect of dietary 3-methoxy-4-aminoazobenzene, *Gann*, **75**, 966-975.
- Degawa, M., M. Kojima, T. Hishinuma and Y. Hashimoto (1985) Sex-dependent induction of hepatic enzyme(s) for mutagenic activation of a tryptophan pyrolysate component, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, by feeding in mice, *Cancer Res.*, **45**, 96-102.
- Degawa, M., M. Kojima, Y. Sato and Y. Hashimoto (1986) Induction of a high spin form of cytochrome P-448 in rat liver microsomes by 4-aminoazobenzene derivatives, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 3565-3570.
- Degawa, M., T. Hishinuma, H. Yoshida and Y. Hashimoto (1987a) Species, sex and organ differences in induction of a cytochrome P-450 isozyme responsible for carcinogen activation: Effects of dietary hepatocarcinogenic tryptophan pyrolysate components in mice and rats, *Carcinogenesis*, **8**, 1913-1918.
- Degawa, M., A. Ohta, M. Namiki, T. Masuko and Y. Hashimoto (1987b) *In vivo* selection of a low spin form of cytochrome P-448 from 3-methylcholanthrene-induced rat cytochrome P-450 isozymes by carbon tetrachloride, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3315-3317.
- Degawa, M., H. Yamada, T. Hishinuma, T. Masuko and Y. Hashimoto (1987c) Organ selective induction of cytochrome P-448 isozymes in the rat

by 2-methoxy-4-aminoazobenzene and 3-methylcholanthrene, *J. Biochem.*, **101**, 1437-1445.

Degawa, M., H. Ueno, S. Miura, A. Ohta and M. Namiki (1988a) A simple method for assessment of rat: cytochrome P-448 isozyme(s) responsible for the mutagenic activation of carcinogenic chemicals, *Mutation Res.*, **203**, 333-338.

Degawa, M., C. Yamaya and Y. Hashimoto, (1988b) Hepatic cytochrome P-450 isozyme(s) induced by dietary carcinogenic aromatic amines preferentially in female mice of DBA/2 and other strains, *Carcinogenesis*, **9**, 567-571.

Degawa, M., S. Tanimura, T. Agatsuma and Y. Hashimoto (1989) Hepatocarcinogenic heterocyclic aromatic amines that induce cytochrome P-448 isozymes, mainly cytochrome P-448H (P450IA2), responsible for mutagenic activation of the carcinogens in rat liver, *Carcinogenesis*, **10**, 1119-1122.

Degawa, M., T. Agatsuma and Y. Hashimoto (1990) Species difference among experimental rodents in the activity and induction of cytochrome P-450 isozymes for mutagenic activation of carcinogenic aromatic amines, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 1253-1258.

Gonzalez, F. J. (1990) Molecular genetics of the P-450 superfamily, *Pharmac. Ther.*, **45**, 1-38.

Hashimoto, Y., M. Degawa, M. Kojima and T. Hishinuma (1982) Induction of carcinogen activation enzyme(s) by feeding of a carcinogenic tryptophan pyrrolisate correlates to sex difference in carcinogenesis of the mouse, *Gann*, **73**, 508-510.

Kamatani, T., K. Maeda, Y. Yamazoe, N. Matsu-

da, K. Ishii and R. Kato, (1983) A high spin form of cytochrome P-450 highly purified from PCB-treated rats: Catalytic characterization and immunochemical quantitation in liver microsomes, *Mol. Pharmacol.*, **24**, 146-155.

Kawajiri, K., K. Nakachi, K. Imai, S.-I. Hayashi and J. Watanabe (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene, *FEBS Lett.*, **263**, 131-133.

Kawajiri, K. and Y. Fujii-kuriyama (1991) P450 and Human cancer, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1325-1335.

Okey, A. B. (1990). Enzyme induction in the cytochrome P-450 system, *Pharmac. Ther.*, **45**, 241-298.

Ryan, D. E. and W. Levin (1990) Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450, *Pharmac. Ther.*, **45**, 153-239.

Shimada, T. and S. Nakamura (1987) Cytochrome P-450-mediated activation of procarcinogens and promutagens to DNA-damaging products by measuring expression of *umu* gene in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 1979-1987.

Shimada, T., M. Iwasaki, M. V. Martin and F. P. Guengerich (1989) Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by *umu* gene response in *Salmonella typhimurium* 1535/pSK1002, *Cancer Res.*, **49**, 3218-3228.

Sugimura, T. (1985) Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process, *Mutation Res.*, **150**, 33-41.

変異・がん原性物質を活性化する第 I 相酵素

北海道大学薬学部代謝分析学講座 鎌滝哲也¹, 小森雅之¹, 北村龍司¹,
内田泰輔¹, 福田博子¹, 松岡秀仁¹
三菱化成安全性研究所 馬場 博², 井上裕章², 吉川邦衛²

1. はじめに

発癌の初発段階 (イニシエーション) は, DNA の損傷である。化学発癌においては, 化学物質それ自身が DNA の損傷を起こすことは稀である。一般には体内に摂取された化学物質は種々の酵素によって代謝され, 生成した活性代謝物が DNA に結合し損傷する。したがって, 活性代謝物の生成に関与する酵素の性質と量は発癌のイニシエーションの鍵を握ると考えられる。活性代謝物の生成に関与する酵素にはチトクローム P-450 をはじめとして数種の酵素が知られており, 特に近年ではこれらの酵素の遺伝子が単離されつつある。これらの遺伝子を活用して変異原試験系に導入する試みも盛んになりつつある。そこで, 本稿では変異/癌原物質の代謝的活性化に関与する第 I 相酵素につき特にチトクローム P-450, プロスタグランジン H 合成酵素, それにエポキシドヒドロラーゼに絞って最近の研究の概略を紹介したあと, 筆者らの研究室で行ってきた新しい変異原物質スクリーニング法について, ことに遺伝子を活用した方法の開発について述べる。

2. 活性代謝物の生成に関与する酵素系

(1) チトクローム P-450

この酵素は化学発癌物質の活性化に中心的な役

割を担う酵素である。肝ミクロゾームに多量に存在し癌原物質の主として酸化的活性化を触媒する。本酵素には多数の分子種があり, その内限られたいくつもの分子種だけが癌原物質の活性化を行うことが証明されている。チトクローム P-450 によって活性化される癌原物質の数は多く, アフラトキシン B₁ などのマイコトキシンをはじめ, Trp-P-2(3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]-indole) などのヘテロサイクリックアミン, ベンツピレン (B(a)P) や 7,12-ジメチルベンツアントラセン (DMBA) など多環芳香族炭化水素等々多岐に亘っている。興味あることに, 各々の変異原物質が動物とヒトでは必ずしも同じチトクローム P-450 分子種で活性化されるのではないことが明らかにされている。肝臓に常在するチトクローム P-450 の分子種も動物種によって異なっており, このことが動物実験の結果からヒトにおける発癌性を予測するのを極めて困難にしている。ヒトの酵素を用いた変異原試験が求められる所以である。ヒトや実験動物のチトクローム P-450 の cDNA が次々とクローニングされ, 動物とヒトの間の遺伝子配列やアミノ酸配列が比較されている。他方, 得られた cDNA を適当な発現ベクターに組み込み, 酵素蛋白を人工的に作り出し, これを変異原物質のスクリーニングに積極的に用

1) 〒060 札幌市北区北 12 条西 6 丁目

2) 〒227 横浜市緑区鴨志田町 1000

Phase I Enzymes Responsible for the Activation of Promutagens and Procarcinogens

Tetsuya Kamatani¹, Masayuki Komori¹, Ryuji Kitamura¹, Taisuke Uchida¹, Hiroko Fukuta¹, Hidehito Matsuoka¹, Hiroshi Baba², Hiroaki Inoue² and Kunie Yoshikawa²

¹Division of Drug Metabolism, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Nishi-6-chome, Kita-12-jo, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

²Toxicology Laboratory, Life Science Research Center, Research Center, Mitsubishi Kasei Corporation, 1000 Kamoshida-cho, Midori-ku, Yokohama 227, Japan

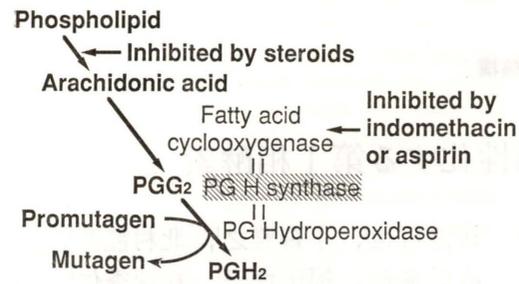


Fig. 1. プロスタグランジン H 合成酵素による代謝的活性化。

いる試みも近年盛んに行われている。変異原試験への利用を目的にチトクローム P-450 は酵母、昆虫の培養細胞、哺乳動物の培養細胞、そして後でやや詳しく紹介するようにショウジョウバエにも発現され、その意義も次第に判明してきている。

(2) プロスタグランジン H 合成酵素

本酵素が化学発癌物質を活性化することが見出されたのはチトクローム P-450 にくらべて比較的最近のことである。もともと発癌物質の活性化酵素として発見されたのではなく、オーストラリアにおいて病理解剖の結果の解析からこの酵素の重要性が認識されるようになった。すなわち、風邪薬に含まれるアセトアミノフェンなどが、腎髄質に存在する本酵素によって活性化され腎壊死を引き起こすことが見つかると、この結果をもとに癌原物質の活性化にも関与することが証明された。

Fig. 1 に示すようにプロスタグランジン H 合成酵素はアラキドン酸からプロスタグランジン G₂ が生成したあと、プロスタグランジン G₂ からプロスタグランジン H₂ が生成するところで関与する。脂肪酸合成酵素とプロスタグランジンヒドロペルオキシダーゼの両方の性質を持ち、前者はインドメタシンやアスピリンによって阻害されるから、本酵素による代謝的活性化が否かを知るにはこれらの阻害剤が用いられる。

この酵素によって活性化される癌原物質の種類は多く、ベンジジンを代表例として 3-アミノ-1,2,4-トリアゾール、ベンツピレン-7,8-ジオール、芳香族アミンなど多数ある。

この酵素の発癌との関わりについての研究は、肝以外の臓器での代謝的活性化に焦点が集まって

いる。チトクローム P-450 がほとんどあるいはわずかに存在しない膀胱、前立腺、腎髄質それに肺における代謝的活性化にプロスタグランジン H 合成酵素が深く関与していると言えそうである。

(3) エポキシドヒドロラーゼ

ベンツピレンの 4,5-エポキシド (いわゆる K-領域エポキシド) が究極発癌物質と考えられていた時は、エポキシドヒドロラーゼはこの究極発癌物質を分解して不活性化してくれる正義の味方 (善玉) と考えられていた。しかし、ベンツピレンが 7,8-エポキシドとなり、次いで 7,8-ジヒドロジオールを経て 7,8-ジヒドロジオール 9,10-エポキシド (いわゆる Bay-領域エポキシド) が本当の主角を果たす究極発癌物質と判明するや否や、エポキシドヒドロラーゼは悪玉のボスにのし上がったようである。この酵素についての研究が進み、少なくともミクロゾーム画分と可溶性画分に各々 2 つの種類が存在することが分かってきた。これらのほとんどが精製純化され、cDNA のクローニングも終わっており、複数の分子種の存在は確実である。この酵素についての興味ある性質も最近報告されている。すなわち、1 つはミクロゾーム型のエポキシドヒドロラーゼはヘパトーマ細胞に発現しており、さらに肝癌の発生段階において初期に発現していることである。この発現については色々な点で興味をそそられる。研究の発展が楽しみである。第 2 は、可溶性画分のエポキシドヒドロラーゼで、この酵素は non-mutagenic carcinogen として知られるクロフィブレート (ペルオキシゾームの増殖を起こすことでも知られる) によって誘導増加を起こすことである。そのメカニズムの詳細は不明だが、多分酸化ストレス (oxidative stress) によるものであろうと考えられている。

3. チトクローム P-450 の遺伝子の変異原試験への応用: ビーグル犬の P-450IA1 を例に

近年様々な酵素蛋白の cDNA クローニングが行われ、遺伝子構造の解析から、酵素の活性部位の同定など従来不可能であったことが次々と実現されている。さらに最近では酵素蛋白の発現調節機構など一歩高いレベルに迄進んできている。チトクローム P-450 についても例外でなく、既に

Table 1. 酵母に発現したイヌ P-450IA1 による変異原物質の活性化

Promutagen ¹⁾	AH22/pDC-1	AH22/pAAH5
IQ	6.54 ²⁾	0.05
MeIQ	7.81	0.62
AFB ₁	0.21	0.48
B(a)P	0.49	N.D. ³⁾
Glu-P-1	2.36	0.53
Trp-P-2	1.92	0.53

1) Concentration was 0.01mM.

2) *umu* gene expression (units/min/mg protein)

3) Not detectable

数々の分子種の cDNA がクローニングされ、得られた cDNA をプローブに用いて新たな研究が展開されてきている。

遺伝子のクローニングの技術は、これ迄に精製純化されたことのない蛋白の性質までも明示してくれることがある。その 1 例として筆者らは精製が困難で遂にあきらめた (Ohta *et al.*, 1989, 1990) ビーグル犬の P-450IA1 の cDNA クローニング (Uchida *et al.*, 1990) に成功し、その毒性学的意義を明らかにすることができたので以下に紹介する。

(1) ビーグル犬 P-450IA1 の cDNA クローニング

ビーグル犬に PCB (カネクロル, KC-500) を 400 mg/kg 投与し、5 日後に屠殺した肝臓のミクロゾームから、P-450IA1 を精製することを試みた。この酵素が不安定なためか、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上均一に迄精製することが遂にできなかった。そこで、同じ PCB を投与したビーグル犬の肝から mRNA を調製し、ウサギの P-450IA1 の断片をプローブとしてビーグル犬の P-450IA1 の cDNA を得ることに成功した。なお、P-450IA1 はベンツピレンや DMBA などの多環芳香族炭化水素の活性化酵素として知られているもので、ラットにおける P-448-L (低スピン型の P-448, Levin らの P-450c) と同一である。得られた cDNA クローン (Dahl と命名) の塩基の長さは 2394bp、翻訳領域全長 (524 アミノ酸) をコードしていた。その塩基配列とアミノ酸配列を他の動物種の P-450IA1 (例えばマウスの P₁-450) や P-450IA2 (マウスの P₂-450) と比較したとこ

ろ、マウスやラットの cDNA 塩基配列と 79%、ウサギの pHDahl と 81%、ヒトの hP₁-450 と 84% の相同性を示し、各種物種とほぼ同じ距離にあることが分かった。

(2) ビーグル犬 P-450IA1 (Dahl) の酵母における発現と変異原試験への応用

Dahl の cDNA の 5'- および 3'- 非翻訳領域をなるべくそぎとり、残った cDNA 断片を酵母の発現プラスミドである pAAH5 に導入した。Dahl を導入した pAAH5 プラスミドを pDC-1 と命名した。pDC-1 で酵母 (AH22 株) を形質転換した。形質転換酵母 AH22/pDC-1 は Dahl cDNA に由来する mRNA を発現し、ラット P-450IA1 抗体と交叉反応性を示す蛋白も合成されていた。また、この酵母のミクロゾームは一酸化炭素差スペクトルで 450nm 付近に大きなピークを示し、導入した Dahl が酵母の菌体内でビーグル犬の P-450IA1 を発現していることが確認された。

ビーグル犬の P-450IA1 (Dahl) を発現している酵母のミクロゾームを用いて変異原試験を行えばこのチトクローム P-450 がどの変異原物質を効率よく活性化するかを知ることができる。いくつかの変異原物質を用いて試験を行った結果を Table 1 に示した。IQ(2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline), MeIQ(2-amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoline), Glu-P-1(2-amino-6-methylidipyrido[1, 2-a:3', 2'-d]imidazole), Trp-P-2 はこの酵素で効率よく活性化されたが、B(a)P は余り活性化されなかった。B(a)P はラットの P-450IA1 では高い効率で活性化されることが知

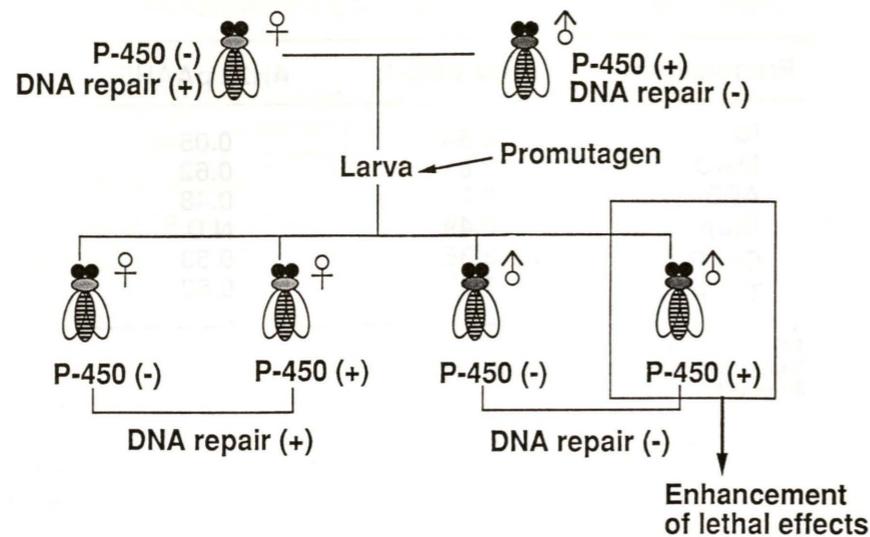


Fig. 2. トランスジェニックショウジョウバエを用いた DNA 修復試験の概要。

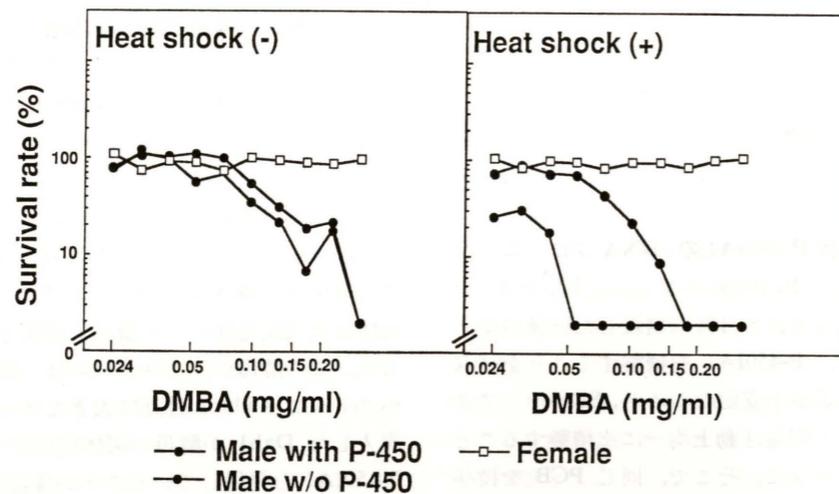


Fig. 3. トランスジェニックショウジョウバエを用いた DMBA の変異試験 (DNA 修復試験)

られており、明確な種差が見られた (Fukuta *et al.*, 1992)。

(3) ビーグル犬 P-450IA1 (Dahl) のショウジョウバエにおける発現と変異原試験への応用

肝S-9 やマイクロゾームそして精製酵素を用いた研究には限界がある。それはアッセイ系に加えた酵素系によって生成する活性代謝物は試験菌体の外にあり、変異原性を示すには菌体の膜を通過して菌体内の DNA に到達しなくてはならないからである。活性代謝物は化学的に反応性が高いか

ら、菌体の外膜を通過する時にほとんど膜成分と結合してしまい、残りのほんの一部しか菌体の DNA に到達しないことが容易に想像できる。他方、菌体の突然変異よりも動物の遺伝子障害性が見られれば、その方がより説得力のあるデータとなる。

これらの2つの要求を満たすために Dahl 遺伝子を導入したトランスジェニックショウジョウバエの作出を企画し、成功した (Komori *et al.*, 1992)。Dahl cDNA の発現はヒートショック

Table 2. トランスジェニックショウジョウバエにおける種々の変異原物質による致死突然変異

Promutagen	P-450 ⁺ ♂ / P-450 ⁻ ♂ ratio at LC70		Enhanced mortality
	HS(-)	HS(+)	
DMBA	0.73	0	++++
B[a]P	0.90	0.43	++
Trp-P-2	0.73	0.37	++
2-AAF	0.83	0.57	+
AFB ₁	0.80	0.83	±

ロモーターによって調節され、かつ Fig. 2 に示すように雄のショウジョウバエのみに DNA の修復ができないように設計されている。したがって、ヒートショックを与えなかった群や P-450IA1 (Dahl) を発現しない雄、さらに雌のショウジョウバエ (修復可能を待つ) のいずれも対照群として用いることができる。変異原物質をショウジョウバエの幼虫 (ウジ) に摂取させると、ショウジョウバエの体内に発現している P-450IA1 (Dahl) によって活性化され、活性代謝物が直ちにショウジョウバエの体内の DNA など生体高分子に結合して突然変異 (致死) を起こすことが期待された。

DMBA をトランスジェニックショウジョウバエの幼虫に摂取させたときの致死突然変異発生率を Fig. 3 に示した。ショウジョウバエ (幼虫) にヒートショックをかけた時の結果を Fig. 3 の右側に示してある。雌のショウジョウバエでは遺伝子の修復ができるために P-450IA1 (Dahl) の発現のあるなしにかかわらず DMBA によって致死突然変異は認められなかった。P-450IA1 が発現していない雄においても DMBA による致死突然変異は観察されたが、P-450IA2 を発現している雄のショウジョウバエでは明らかに低い濃度の DMBA で致死突然変異を示した。他方、ショウジョウバエにヒートショックをかけない時には P-450IA1 (Dahl) が誘導されず、P-450IA1 (Dahl) を発現しない雄との差がなくなることが予想され

た。実験の結果は予想通りであった (Fig. 3 左)。

トランスジェニックショウジョウバエが他の変異原物質に対しても変異原活性化能をもち、致死突然変異を示すかどうかは興味あるところである。変異原物質の活性化にはチトクローム P-450 のみならず種々の第 II 相酵素も関与することが知られており、それらの酵素がショウジョウバエにどの程度発現しているか。さらには不活性化酵素がどの程度存在しているかも興味を持たれる。種々の変異原物質を用いて行った結果を Table 2 に示す。今回樹立されたトランスジェニックショウジョウバエは DMBA の活性化のみならず、B(a)P や Trp-P-2 にもヒートショックを与えなかった雄と比べて高い変異原性を示したが、2-アセチルアミノフルオレンやアフラトキシン B₁ には余り感受性を示さなかった。2-アセチルアミノフルオレンの活性化には N-アセチルトランスフェラーゼ (又は O-アセチルトランスフェラーゼ) が関与するとされており、ショウジョウバエにはアセチルトランスフェラーゼが欠失しているが、又はこの物質に対して反応性のないアセチルトランスフェラーゼが存在することが示唆された。アフラトキシン B₁ は P-450IA1 (Dahl) で余り活性化されないことが既に判明しており (Table 1), その為に有意な結果が得られなかったものと考えられる。今後、NADPH-チトクローム P-450 還元酵素や第 II 相酵素を導入したトランスジェ

Table 3. カニクイザル肝ミクロゾームによる変異原活性化のキネティクス

Substrate	Treatment	Kinetic parameters		
		Km (μM^{-1})	Vmax (units / min / nmol P-450*)	Vmax/Km
IQ	Non	4.02	169	42
	PCB	2.08	148	71
MeIQ	Non	0.89	119	134
	PCB	0.70	142	203
AFB ₁	Non	0.19	188	1017
	PCB	0.40	140	350
Glu-P-1	Non	32.1	37	1
	PCB	3.39	15	4
Trp-P-2	Non	1.58	46	29
	PCB	0.36	219	604

*: β -galactosidase units per min per nmol of total cytochrome P-450

ニックショウジョウバエを作出し、それらの交配によって多数の酵素、とりわけヒトの酵素を持つトランスジェニックショウジョウバエが樹立されれば、その価値ははかり知れないものとなるであろう。

4. 変異原物質活性化反応のキネティクスと発癌リスクの予測

我々の癌の80あるいは90%以上が環境中に存在する化学発癌物質によるとされる。それでは変異原試験や発癌試験で明らかになってきた変異原物質や癌原物質の全てがヒトの発癌の原因となっているのだろうか。環境中に存在する極く微量の癌原物質を我々の体は全て効率よく活性化できるのであるか。ここにルーチンの変異原試験ではほとんど注目されていない重要な問題が残されているように思われる。

その問題を解決する方法の1つを試みたので紹介する。極めて微量の癌原物質が体内に入ってきたときに、チトクローム P-450 を初めとする活性化酵素がこれらを活性化するには、酵素の基質(癌原物質)に対する親和性が高くなければならない。これは癌原物質の濃度を変え、突然変異コロンニ数を反応速度と見なし、Lineweaver-Burk

プロットをとって Km を求めれば得られる。Km が小さければ小さい程、酵素の変異原物質に対する親和性が高いことになる。同じ Lineweaver-Burk プロットの縦軸と交わった点の逆数は変異原物質が無限量存在する時の最大の反応速度(Vmax)である。すなわち、酵素がフル回転したときどれ位の能力があるかを示す。2つの変異原物質があって比較した時に、同じ親和性(Km)ならば最大速度(Vmax)の大きい方が、同じ最大速度(Vmax)ならば親和性(Km)の強い方が優先的に活性化されることになる。従って Vmax/Km の比をとり、この値が大きい物質程生体内で効率よく活性化され低濃度でも遺伝子の損傷を起こし易いことを示す。活性化酵素系から見るとこのような手法で発癌リスクを推定できると考えられる。

カニクイザルを用いた実験例を Table 3 に示した。この場合、PCB をサルに投与した時に P-450IA が増加し、ヘテロサイクリックアミンの活性化能が増大することが予想されたので、無処置サルと PCB 投与サルの肝ミクロゾームで比較した。無処置サルにおける Vmax/Km 値はアフラトキシン B₁ において最も高く、次いで MeIQ であり、Glu-P-1 では最も低値を示した。一方、

PCB 前処置サルの肝ミクロゾームを用いた時の Vmax/Km 値は Trp-P-2 で最も高く、次いでアフラトキシン B₁, MeIQ の順であった。PCB 前処置によって全てのヘテロサイクリックアミンの Vmax/Km 値は増大したが、アフラトキシン B₁ では逆に減少した。未だ例数が少ないので結論は出せないが、ヒトの肝ミクロゾームを用いた実験では Vmax/Km の値は IQ で 519~807, MeIQ で 1782~3374 ととび抜けて高く、IQ や MeIQ はヒトにおいて発癌リスクが高いことが示唆された。

参考文献

- Fukuta, H., H. Ohi, T. Uchida, M. Komori, M. Kitada and T. Kamataki (1992) Toxicological significance of dog liver cytochrome P-450: Examination with the enzyme expressed in *Saccharomyces cerevisiae* using recombinant expression plamid, *Mutation Res. in press.*
Komori, M., R. Kitamura, H. Fukuta, H. Inoue, H. Baba, K. Yoshikawa and T. Kamataki (1992)

Transgenic *Drosophila* Carrying mammalian P-450IA1: Increased preadult mortality by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Submitted for publication.*

- Ohta, K., M. Motoya, M. Komori, T. Miura, M. Kitada and T. Kamataki (1989) A novel form of cytochrome P-450 in beagle dogs: P-450-D3 is a low spin form of cytochrome P-450 but with catalytic and structural properties similar to PCB P-448-H(P-450d), *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 91-96.
Ohta, K., M. Motoya, M. Komori, T. Miura, M. Kitada and T. Kamataki (1990) Interspecies homology of cytochrome P-450: Purification and toxicological significance of a high spin form of cytochrome P-450 (P-450-D2) from liver microsomes of polychlorinated biphenyl (PCB)-treated beagle dogs, *J. Biopharm. Sci.*, **1**, 59-71.
Uchida, T., M. Komori, M. Kitada and T. Kamataki (1990) Isolation of cDNAs coding for three different forms of liver microsomal cytochrome P-450 from polychlorinated biphenyl-treated beagle dogs, *Mol. Pharmacol.*, **38**, 644-651.

変異・がん原性物質を活性化する第 II 相酵素

慶應義塾大学医学部 薬理学教室 山 添 康

1. はじめに

生体内に取り込まれた物質には細胞内の酵素系により構造の一部が変換を受けたのちはじめに変異・がん原性を示すものが少なくない。このような変換を行う代謝的活性化の反応には様々な酵素が関与し、ここで述べるいわゆる“第 II 相酵素群”も活性化と不活性化の両方に深く関与している。第 II 相酵素については既に“抱合反応による活性化と不活性化”のタイトルで一昨年の本誌に幾つかの例を紹介した。今回は変異原性試験に最も一般的に用いられているサルモネラ変異原性試験における第 II 相酵素による活性化の重要性と性質について我々がおこなってきた実験の結果を中心に紹介する。

2. 変異・がん原性物質を活性化する第 II 相酵素

2.1 サルモネラ変異原性試験における活性化系 Ames らによって開発されたサルモネラ菌を用

いる変異原性試験では被検物質が菌体外活性化を必要としない場合を除いて“S9 mix”と呼ばれる活性化系を菌と共存させて被検物質を(直接)変異原に変換させている(Fig. 1)。多くの場合ラット肝の 9000 **xg** 上清(S9)と NADPH および NADPH 生成系が S9mix として用いられており、しかも PCB (ポリ塩化ビフェニル)あるいは β -ナフトフラボンとフェノバルビタールで前処置をしたラットから調製した 9000 **xg** 上清が通常この目的に使用されている。実験動物やヒトの肝臓には薬物の酸化・還元を行う CYP (Cytochrome P-450) 等の酵素と共にグルクロニルトランスフェラーゼやアセチルトランスフェラーゼなどの抱合酵素が含まれている。これらトランスフェラーゼは CYP と異なり NADPH を補酵素とせず、反応にはそれぞれ特定の補酵素を必要としている。当初 Ames らが記述した方法には ATP が NADPH と共に添加されているが (Ames *et al.*, 1975), この系での ATP から各補酵素への

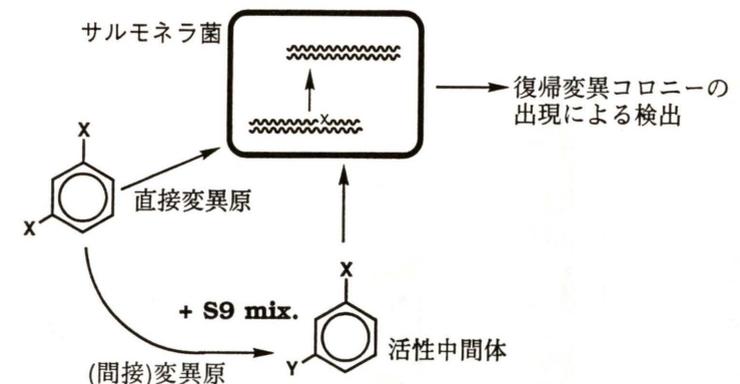


Fig. 1. サルモネラ変異原性試験における変異原の検出と S9mix の役割。

〒160 東京都新宿区信濃町 35

Role of intrabacterial conjugation on the mutagenic activation of chemicals

Yasushi Yamazoe

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

変換効率は低く、ATP 添加が補酵素の供給原としてこの試験系で機能しているかは疑わしい。我々も ATP の添加を幾つかの化合物について調べたことがあるが変異原性は ATP 添加によって余り影響されなかった。これらのことから現在サルモネラ変異原性試験系には ATP を添加していない場合も多い (Maron and Ames, 1983)。またトランスフェラーゼを実際に扱ってみるとすぐに気が付くことであるが、アセチルトランスフェラーゼやスルホトランスフェラーゼなどは細胞を分画するとかなり不安定となり、例えば肝臓のホモジネートの調製に用いる 1.15% 塩化カリウム溶液で細胞を分画すると容易にこれら酵素の活性は低下する。また -80°C に酵素溶液を凍結保存後、解凍して調べると失活していることも多い (失活はジチオスレイトールやグリセロールの添加でかなり防ぐことができる場合もある)。このためサルモネラ変異原性試験における S9 は可溶性酵素源としてほとんど機能せず、S9 をマイクロゾーム (105,000 *xg* 沈降画分) の簡便処方として用いているのが実情と考えられる。

2.2 サルモネラ菌体内酵素による活性化

Glu-P-1 や IQ などのヘテロサイクリックアミンはサルモネラ菌に対して S9mix の存在下で強い変異原性を示す。Glu-P-1 は CYP によって N-ヒドロキシ-Glu-P-1 に変換されたのち変異原性を示し、合成した N-ヒドロキシ-Glu-P-1 と TA98

株を接触させると活性化系の非存在下でも変異原性を示す (Ishii *et al.*, 1981; Saito *et al.*, 1983)。一方 *in vitro* では N-ヒドロキシ-Glu-P-1 と DNA を混ぜても反応はゆっくりとしか進行せず、共有結合量は低い。しかしながらこの系に肝の可溶性画分とアセチル CoA あるいは 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) を添加するとこの反応は著しく促進される。この促進はいずれも酵素的 O-エステル化によって反応性に富むアセトキシン体およびスルフェートが生成したこと由来している (Shinohara *et al.*, 1986; Yamazoe *et al.*, 1989)。このようなことからアリアルアミンの DNA 修飾にはこれらトランスフェラーゼによる O-エステル化が非常に重要とされているが、サルモネラ試験におけるデータとは明らかに不一致が認められる。このような変異原性試験と DNA 共有結合試験でのエンドポイントの違いは 1981年頃すでに気付かれていたがその原因は不明であった (Wirth and Thorgeirsson, 1981)。丁度この頃ジネトロピレン抵抗性菌株の TA98_{1,8-DNP6} を開発した Rosenkranz ら (McCoy *et al.*, 1982) によってこの菌がニトロ還元酵素だけでなくエステル化酵素をも欠損していることが指摘された。また Nagao ら (Nagao *et al.*, 1983) によって Trp-P-2 による復帰変異コロニーの誘導は TA98 と TA98_{1,8-DNP6} で変わらないが、Glu-P-1 では大きく異なり、TA98_{1,8-DNP6} では弱いことが

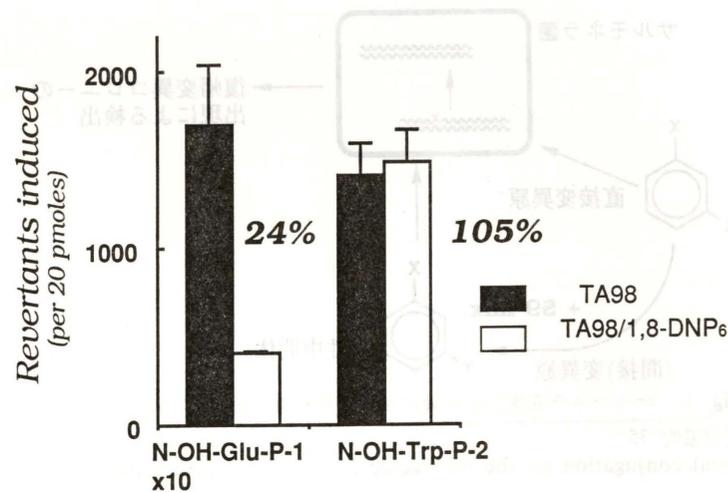


Fig. 2. N-ヒドロキシ-Glu-P-1 と N-ヒドロキシ Trp-P-2 の TA98 および TA98_{1,8-DNP6} に対する変異原性。

報告された (Fig. 2)。その頃我々は N-ヒドロキシ-Trp-P-2 や N-ヒドロキシ-Glu-P-1 がラットの肝可溶性画分によって O-アセチル化および O-プロピル化によって活性化されることを見出していたので (Yamazoe *et al.*, 1982)、この菌の 105,000 *xg* 上清による N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の活性化を DNA 共有結合を指標として測定した。その結果アセチル CoA の存在下で N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の活性化に両株間で顕著な違いが認められた (Fig. 3)。これらの結果からサルモネラ菌体には N-ヒドロキシアリアルアミンの O-アセチル化を行う酵素が存在し、TA98_{1,8-DNP6} はこの

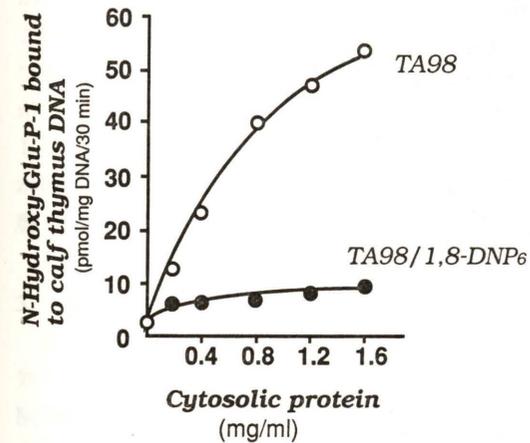


Fig. 3. サルモネラ可溶性画分による N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の活性化。

酵素を欠損していることが明らかとなった (Saito *et al.*, 1983, 1985)。DNA との反応には酵素的活性化を必要とするニトロアレンが N-ヒドロキシアリアルアミンと同様サルモネラ菌に直接変異原性を示す理由はニトロ基の還元と共にこの酵素的アセチル化機構の存在による (Djurić *et al.*, 1985)。渡辺らによってこの酵素の遺伝子が単離され、この遺伝子を過剰発現した YG 株はアリアルアミンに高い感受性を持つ菌株として利用されている (Watanabe *et al.*, 1987)。このようなデータは哺乳動物の場合と同様に変異原性試験系におけるアリアルアミンの活性化が O-エステル化によって行われ、サルモネラ菌体内においてはアセチルトランスフェラーゼがアリアルアミンの変異原性発現に重要であることを示している。しかしながら哺乳動物とサルモネラ菌のアセチルトランスフェラーゼの性質と基質特異性の違いから両系での結果に差を生じる場合も知られている。N-ヒドロキシ-2-アミノフルオレンの活性化を *in vitro* で DNA への共有結合を指標として測定したデータを Fig. 4 に示した。N-ヒドロキシ-2-アミノフルオレンの結合にはアセチル CoA を必要とし、可溶性画分のみを含む系ではほとんど結合しないがラット肝および TA98 株ではアセチル CoA の存在下で効率よく結合する。しかし TA98_{1,8-DNP6} ではわずかししか反応が起こらない。このようなデー

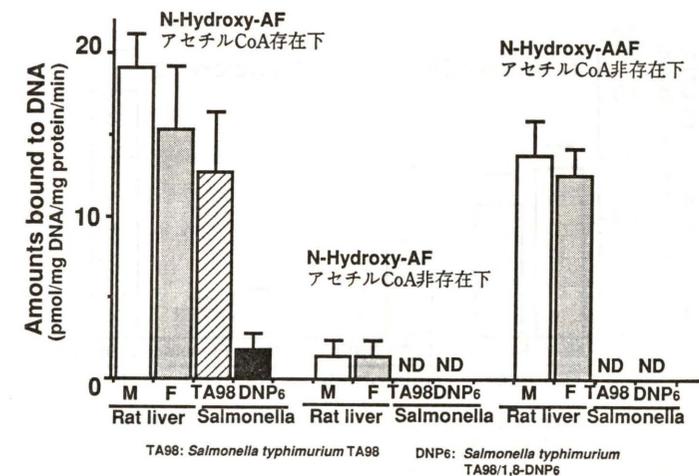


Fig. 4. N-ヒドロキシ-2-アミノフルオレンおよび N-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンの DNA 共有結合に対するラット肝及びサルモネラ可溶性画分の影響。

タは N-ヒドロキシ-Glu-P-1 についての結果とよく一致している。しかしながら N-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンを用いてアセチル CoA の非存在下で結合量を調べると大きな違いが認められ、ラット肝では DNA への結合が検出されるのに対してサルモネラ菌では TA98 株と TA98_{1,8-DNP6} のいずれでも認められない。この違いは N,O-アセチル転移活性の有無によって起る。すなわちラットやハムスターのアセチルト

ランスフェラーゼは Fig. 5 に示すような窒素原子上のアセチル基を酸素原子に転移させる活性を持つが、サルモネラの精製酵素はアセチル CoA のみを補酵素として用い、N-ヒドロキシアリルアセタミド (アリールヒドロキサム酸) をアセチル供与体利用できないので N-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンを活性種のアセトキシン体に変換できない。このように哺乳動物とサルモネラ系ではアセチル供与体要求性に違いがある。一方基

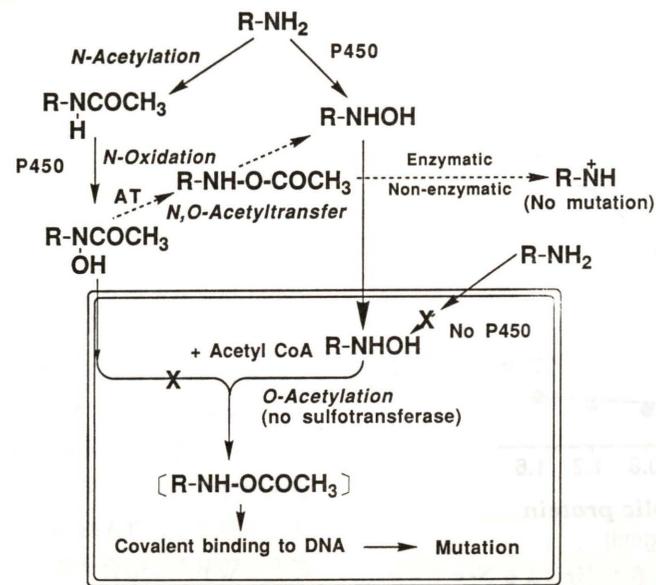


Fig. 5. サルモネラ試験系におけるアリールアミンの代謝活性化の経路。AT; アセチルトランスフェラーゼ, P450; チトクローム P450.

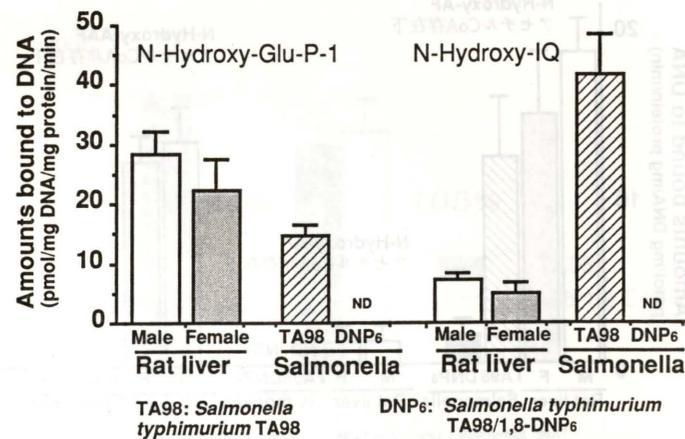


Fig. 6. N-ヒドロキシ-Glu-P-1 および N-ヒドロキシ-IQ の DNA 共有結合に対するラット肝およびサルモネラ可溶性画分の影響。この実験はアセチル CoA の存在下で行った。

質特異性に違いのみられる場合もある。Fig. 6 に示すように N-ヒドロキシ-Glu-P-1 の DNA への共有結合はラット肝と TA98 株では余り差がなく、ラットがやや高い活性を示す。しかしながら N-ヒドロキシ-IQ についてみると TA98 株から調製した可溶性画分を含む系で高い値が認められ、ラット肝の可溶性画分を含む系では TA98 株の 1/5 程度しか結合しない。この差はおそらくラット肝とサルモネラ菌のアセチルトランスフェラーゼの基質特異性の違いを反映しているものと考えられる。IQ はサルモネラ菌に非常に強い変異原活性を示すが哺乳動物細胞系に対する作用が比較的弱い。この原因の少なくともその一部はこの違いに起因するものと考えられる。ここではアセチルトランスフェラーゼのみを取り上げたが、サルモネラ菌体成分が活性化を促進する例として、以前にも紹介したが chloro-2,4-dinitrobenzene の変異原性に対するグルタチオン濃度の影響が知られている (Kerklaan *et al.*, 1987)。

3. おわりに

変異原性試験の目的はヒトに対する作用を予知・予測するためであり、今回紹介したような試験系による違いを少なくするにはヒトとよく似た活性系の存在下で変異原性試験を行う必要がある。最近我々が開発したハムスターのアセチルトランスフェラーゼを発現したサルモネラ試験菌株は N,O-アセチルトランスフェラー活性が付加されており、N-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレン等にも高い感受性を示す。今後高い検出感度を持つサルモネラ試験系に異種細胞の酵素遺伝子を導入することによってヒトに近い代謝活性化系を付加した試験株が数多く開発できればサルモネラ変異原性試験の有用性をさらに高めることが可能と考えられる。

参考文献

Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, **31**, 347-364.
Djurić, Z., E. K. Fifer and F. A. Beland (1985) Acetyl coenzyme A-dependent binding of

carcinogenic and mutagenic ditropyrenes to DNA, *Carcinogenesis*, **6**, 941-944.

Ishii, K., Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato (1981) Metabolic activation of glutamic acid pyrolysis products, 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole and 2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole, by purified cytochrome P-450, *Chem.-Biol. Interact.*, **38**, 1-13.

Kerklaan, P. R. M., S. Bouter, J. M. te Koppele, N. P. E. Vermeulen, P. J. van Bladeren and G. R. Mohn (1987) Mutagenicity of halogenated and other substituted dinitrobenzenes in *Salmonella typhimurium* TA 100 and derivatives deficient in glutathione (TA 100/GSH⁻) and nitroreductase (TA 100 NR), *Mutation Res.*, **176**, 171-178.

Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, **113**, 173-215.

McCoy, E. C., G. D. McCoy and H. S. Rosenkranz (1982) Esterification of arylhydroxylamines: Evidence for a specific gene product in mutagenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1362-1367.

Nagao, M., Y. Fujita, K. Wakabayashi and T. Sugimura (1983) Ultimate forms of mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines produced by pyrolysis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 626-631.

Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki and R. Kato (1985) Metabolic activation of mutagenic N-hydroxyarylamines by O-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA 98, *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**, 286-295.

Saito, K., Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato (1983) Mechanism of activation of proximate mutagens in Ames' tester strains: The acetyl CoA-dependent enzyme in *Salmonella typhimurium* TA 98 deficient in TA 98/1,8-DNP₆ catalyzes DNA binding as the cause of mutagenicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 141-147.

Saito, K., Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato (1983) Syntheses of hydroxyamino, nitroso and nitro derivatives of Trp-P-2 and Glu-P-1, amino acid pyrolysate mutagens and their direct mutagenicities toward *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 98 NR, *Carcinogenesis*, **4**, 1547-1550.

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

Watanabe, M., T. Nohmi and M. J. Ishidate

(1987) New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 974-979.

Wirth, P. J. and S. S. Thorgeirsson (1981) Mechanism of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene mutagenicity in the *Salmonella* test system Role of N-O-acyltransferase and sulfotransferase from rat liver, *Mol. Pharmacol.*, **19**, 337-334.

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

Yamazoe, Y., M. Shimada, T. Kamataki and R. Kato (1982) Covalent binding of N-hydroxy-Trp-P-2 to DNA by cytosolic proline-dependent system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 165-172.

医薬品における非変異・がん原性物質調査の立場から

大塚製薬株式会社 徳島研究所 津志本 元

1. はじめに

マウスの皮膚化学発がん過程が Initiation-promotion という過程に大別されることが1940年代に示されて以来、齧歯類で発現される各臓器の腫瘍は、Initiation-promotion さらに -progression と言う過程をへて成立する事が示されている。Initiation は細胞の DNA の損傷、突然変異、染色体異常と言った不可逆の過程であり、Promotion は細胞の増殖を主にする可逆的過程であると考えられている。さらに現在、Progression は遺伝的障害と細胞増殖が相まって腫瘍の悪性化に進行する過程であると想定され、研究が行われている。

これらの多段階にわたる長期の発がん過程がヒトにも適用されると考えられている (Harris, 1991)。さて、医薬品の開発においても、現在、マウスとラットの2種の齧歯類を用いて、がん原性試験が行われており、がん原性試験を実施する理由として、その医薬品の臨床投与期間が長期にわたることが大きな理由であり、他に、薬理作用や変異原性の結果が採用されている (日本製薬工業協会, 1991)。医薬品の開発においては、一般に特別な Life saving な領域の化合物を除いては、変異原性 (広い意味での変異原性—遺伝毒性—) 試験で陽性結果を示したものは開発されない傾向にあるが、長期のがん原性試験で陽性結果を示すものも少なくはない。

これらはいわゆる Non-genotoxic carcinogen (non-mutagenic carcinogen, epigenetic carcinogen とも称される) として考えられており、10年

以前から関心がもたれていたが、近年、米国NTPのもとに数多くの化合物の齧歯類でのがん原性試験で、その数が急増した。Non-genotoxic carcinogen が関心と呼ぶのは、その数が増えている事と、従来の短期の変異原性試験では予想できないこと、その発現が多様であるが、その安全性を一定の基準で行いたいこと、他方、Non-genotoxic な作用をもつ化合物によって、その研究が進展した細胞増殖や細胞社会における分子の反応様式に関する研究が急速に進んでいること、また、Carcinogenesis の可逆的な一過程に作用する化合物であると考えられるので、発がん過程を修飾でき、がんの進行への Chemoprevention を考える上での応用への希望をつなぐ事等によるのであろう。今後、ヒトの高年齢化に伴い、急増するであろうがんの進行を防止することは大切になっている。勿論、非可逆的 event をおこす mutagen をとり除くことは一次的に重要であろう。

今回、ヒトが使用してきた医薬品を中心にした化合物について、いわゆる Non-genotoxic carcinogen の代表例を示して、変異原性試験結果、がん原性試験結果、細胞に対する作用、ヒトに対する影響について議論を進めたい。医薬品として、フェノバルビタール、エチニルエストラジオール、メタピリレン、塩素系殺虫剤として、DDT、食品添加物としてナトリウムサッカリンに付いて詳述する。

2. フェノバルビタール

抗癲癇、鎮静、催眠薬として、古くから使用さ

〒771-01 徳島市川内町加賀須野 463-10

From standpoint of the research of non-mutagenic carcinogens of drugs—

Gen Tsushimoto

Tokushima Res. Inst. Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 463-10 Kagasuno, Kawauchi-cho, Tokushima-shi 771-01, Japan

れており、通常、ヒトに 30~200 mg/日、1~4回/日で分服されている医薬である（日本医薬情報センター、1990）。変異原性試験は「化合物の安全性のための国際プログラム (IPCS)」で多種の試験が行われて、その結果が 1985 年に発表されている (Ashby *et al.*, 1985)。Table 1 に示すように、*in vitro* 染色体異常試験で陽性を示す以外、他の試験系で明確な陽性結果は得られていない。*in vitro* 染色体異常試験の結果は構造異常の頻度が 10% と弱く、また陽性を示す濃度が高濃度である。高濃度で現れる弱陽性の反応は、2 次的な要因 (浸透圧) に因ると言う議論がある。Ames 法においても、変異誘発が陰性対照の 2 倍とはいかないが、用量依存性のある上昇が認められている (McGregor and Prentice, 1985)。しかし、これらの反応は *in vivo* では起こりにくく、一般に使用される用量では非遺伝毒性 (非変異) 物質だと考えられる。

次のがん原性試験の結果を示す。フェノバルビタールは、その単独投与で肝腫瘍を誘発し、イニシエーターを用いた二段階発がん試験では、肝腫

瘍と甲状腺腫瘍を誘発する。Table 2 に CF-1 マウスに対する試験結果を引用する (Thorpe and Walker, 1973)。

CF-1 マウスに対して、0.05% 混餌投与で 2 年後に肝の良性及び悪性の腫瘍が発生した。この CF-1 マウスは C3H マウスと同じく肝腫瘍の自然発生率が高い系統であり、この実験でも Control の発生率は 20% (雄)、23% (雌) と高い。フェノバルビタールのマウスの系統による効果の現れ方の差について Becker ら (1982) の報告について Table 3 を参考に示す。C3H, B6C3, C57-BL の三系統で 0.05% のフェノバルビタール投与による肝がん誘導を調べたものであるが C3H, B6C3 への 12 か月の投与により、使用全個体 (16 匹/群) に腫瘍を誘導するが、C57BL にはまったく効かない。C3H, B6C3 はフェノバルビタールのない条件でも、自然発生的に、それぞれ 61%, 29% の腫瘍を誘導したので、仮想的に二段階発がんモデルを適用するならば、フェノバルビタールの肝がんへの促進効果として C3H には 39%, B6C3 には 71% の寄与が想定され、系統差のあ

Table 1. フェノバルビタールの変異原性試験結果

遺伝的傷害の検出点	試験名 (材料)	結果
DNA damage	UDS(Rat hepatocyte, HeLa cell)	-
Gene mutation	Ames法	- (+)
	Mammalian cell	- (+)
	Drosophila	-
Chromosome aberration	<i>in vitro</i> (Rat liver)	-
	<i>in vitro</i> (Chinese hamster liver)	+*
	<i>In vitro</i> (Chinese hamster ovary)	+*
	<i>In vitro</i> (Chinese hamster lung)	±*
	<i>in vivo</i> Micronucleus test (Mouse)	-

* +になっているのは活性が非常に弱いか、高濃度でのみ+。(+)は数が少ないが陽性と報告があることを示す。

(Ashby *et al.* 1985, McGregor and Prentice 1985, IARC 1987)

Table 2. フェノバルビタール等のマウス単独投与でのがん原性試験の例

実施施設・機関: Sell Research Limited, UK,
 系統: CF-1 (試験始齢: 4 weeks old)
 用量段階: 500ppm Na-Phenobarbitone (混餌投与), 供試匹数: 30 匹/群
 投与期間: 110週

Incidence of hepatic tumors in mice fed Phenobarbitone, DDT or γ -BHC for up to 110wk

COMPOUND (dose-ppm)	No of animals	Animals with liver tumors			
		Adenoma* (type a)	Carcinoma* (type b)	TOTAL	With 2nd deposits in lung
♂					
Control (0)	45	20	4	24 %	0
Phenobarbitone (500)	30	53	27	80 %	0
DDT (100)	30	47	30	77 %	0
γ -BHC (400)	29	38	55	93 %	10
♀					
Control (0)	44	23	0	23 %	0
Phenobarbitone (500)	28	43	32	75 %	0
DDT (100)	30	47	40	87 %	3
γ -BHC (400)	29	34	34	69 %	3

Thorpe, E. and Walker, A. I. T. (1973)

出版社の許可を得て表の一部を掲載(Reprinted with permission from Fd Cosmet.

Toxicol. 11 (1973) 433-442, Pergamon Press PLC.). * は Gangolli, S. D. *et al.* (1987)の解釈による。

ることをうかがわせる。事実、発がんプロモーター作用に系統差のあることが示されている (Lee *et al.*, 1989)。

F334 ラットに対する試験においては、フェノバルビタールを用いて前がん Foci (GGT 陽性 foci) の発現率と用いたラットの週齢を調べた実験が有るが、老齢ラットの方が前がん病変が出易い (Ward, 1983)。マウスを用いた場合にも同様の報告がある。二段階発がん試験による発がんプロモーター作用検討試験においては、マウスを用いた場合 DMN 投与後、ラットでは DMN, DEN,

AAF 投与後に、フェノバルビタールの連続投与により肝腫瘍を誘発することが認められている。Table 4 に AAF 投与後に、フェノバルビタールを投与した CD ラットの結果を引用する (Perrino *et al.*, 1980)。この実験においてフェノバルビタールの肝発がんプロモーター作用が示されている。この発がんプロモーター作用はしきい値のある反応を示すことが示されている (Pitot, H. C., 1987)。また甲状腺腫瘍がフェノバルビタールで促進されることが、N-bis(2-hydroxypropyl)-nitrosoamine や NMU 投与後のラットで知られ

Table 3. 種々の系統のマウスに対するフェノバルビタールの肝発がん作用
Incidence of primary hepatic carcinoma in phenobarbital(0.05%) treated-different male mice

Strain	treatment	hepatic tumor	number/mouse
C3H	+ (12 m)	100%	10
	- (12 m)	61%	1-4
B6C3	+ (12 m)	100%	3-8
	- (12 m)	29%	1-2
C57BL	+ (18 m)	0%	0
	- (18 m)	0%	0

Becker, F. F. (1982)

出版社の許可を得て表の一部を掲載(Reprinted with permission from Cancer Res. 42, (1982) 3918-3923 American Association for Cancer Research Inc.)

Table 4. フェノバルビタールの発がんプロモーター作用検討試験

実施施設・機関: Argonne National Laboratory, Illinois
動物種・系統: ラット CD (male) (6 w)
用量段階: 0.02% AAF for 14 days followed a control diet for 7 day,
Phenobarbital 0, 0.002, 0.01, 0.05, 0.25% (混餌投与)
供試匹数: 252匹/群
投与期間: 568-610 days

Total incidence of hepatic tumors					
Group	%of die- tray pheno- barbital	Elapsed time (days)	Rats ex- amined	Rat with tumors	%of rat with tu- mores
1	0	610	206	25	12
2	0.002	610	208	28	13
3	0.01	610	208	60	29
4	0.05	568	180	99	55
5	0.25	610	192	88	45

Peraino C. et al. (1980)

出版社の許可を得て表の一部を掲載(Reprinted with permission from Cancer Res. 35, (1980) 3268-3273 American Association for Cancer Research Inc.)

ている (Hiasa *et al.*, 1985; Diwan *et al.*, 1985)。この時のフェノバルビタールの作用は酵素誘導作用に伴い Tyroxine の代謝の亢進のため、末梢 Thyroxine が低下し、その Feed back として TSH の分泌が促進され、TSH の刺激による甲状腺腫瘍の上昇として説明されている (MaClain *et al.*, 1988)。

フェノバルビタールの細胞に対する生理・生化学的な研究も多くあり、がんに関係すると考えられるものは次の3つに大別される。

- 1) 肝臓の P450 を中心とする酵素誘導に関するもの
- 2) DNA 合成に対する影響に関するもの
- 3) 細胞間連絡 (Cellular communication) に対する影響に関するもの

フェノバルビタールの酵素誘導に関する研究は非常に多くあり (Conny 1982), 化合物の経口投与により肝臓で、その細胞の DNA の P450IIB という領域からの転写, 蛋白質合成が誘導されることが良く知られている (Nebert *et al.*, 1987)。

酵素誘導化合物と発がん Promotion の相関に関しても関心がもたれているが、酵素誘導化合物が、即、発がんプロモーターと言ふことは言えない。薬物代謝酵素誘導化合物には肝発がんプロモーターであるものが多いが、それは化合物が膜の蛋白質や脂質に強く結合することにより酵素、脂質過酸化、フリーラジカルの誘導が occur、さらに細胞分裂の trigger になりうると考えられるからであるが、薬物代謝酵素誘導化合物と発がんプロモーターの因果関係は明確でない (Stevenson, 1990)。多くの化合物に薬物代謝酵素誘導能が知られている。ある種の食餌によっても薬物代謝酵素誘導が occur。例えば、発がんを抑制していると考えられるブロッコリーや芽キャベツでも薬物代謝酵素の誘導が occur の事が報告されている (Vang *et al.*, 1991; Pantuck *et al.*, 1979)。また薬物代謝酵素誘導化合物を発がんイニシエーターの投与より前期に投与しているとイニシエーターが代謝(分解)除毒されてその活性が減弱されると考えられ、イニシエーターの投与時や、それより後期に投与すると化合物の代謝活性化が亢進し、イニ

シエーター活性が増強されることが知られている (Conny, 1982)。従って薬物代謝酵素の誘導剤は、その投与時期によりイニシエーターの活性の増減に影響するので、全般的にみれば被験物質の発がんプロモーター性の検索の的確な指標には現在のところなりにくいと考えられる。今後、化合物の滑面小胞体の増生作用や細胞死と細胞分裂との関係により評価が明確になるであろうと思われる。また、P450 を中心とする薬物の酸化的代謝能には種差があり、マウスの方がヒトより 50 倍も強いとの報告もある (Parke *et al.*, 1990) ので薬物による第一相誘導酵素の種差をも含めて、現在、研究が行われている。

次にフェノバルビタールによって細胞の正常(複製又は S 期) DNA 合成が亢進することが in vivo 投与の肝細胞においても、初代培養肝細胞においても知られている (Büsser and Lutz)。Cellular communication に関する報告においては V-79 や肝細胞を用いた metabolic cooperation 阻害実験において、フェノバルビタールが細胞間 communication を阻害することが認められている (Jones *et al.*, 1985; Klaunig *et al.*, 1990)。Klaunig 等はマウスとラットの初代培養肝細胞を用いてフェノバルビタール等の肝がん誘発の各動物系統間の感受性と肝細胞間 communication 阻害の程度が相関することを認めており、発がんプロモーションに於ける Cellular communication の重要性を、改めて提示している (Klaunig and Ruch, 1987)。

フェノバルビタールの発がんプロモーター活性に関してヒトへの影響及び Risk についてふれる。フェノバルビタールは临床上、長期間使用されており、疫学調査がデンマーク、イギリス、アメリカでなされている。1989年にまとめられた報告ではヒトへの肝がんの誘発は認められていない (Olson J. H. *et al.*, 1989)。ヒトへの使用量は 1日 0.6~4 mg/kg であり、齧歯類への肝がん誘発量は 75~100 mg/kg/day である。IARC は、ヒトに対して possible carcinogen (2B) に位置づけている (IARC, 1987)。臨床的にはフェノバルビタールは催眠、鎮静、抗痙攣剤として WHO の基本薬に指定されており、現在も用いられている。

Table 5. エチニルエストラジオールの変異原性試験結果

遺伝的傷害の検出点	試験名 (材料)	結果
DNA damage	Rec-assay	-
	UDS(Rat hepatocyte)	-
Gene mutation	Ames法	-
	Mammalian cell	-
Chromosome aberration	in vitro (Chinese hamster lung)	-
	in vitro (Chinese hamster ovary)	-
	in vitro (Chinese hamster Don)	+*

* +になっているのは数的異常の誘発。

(Wheeler et al. 1986, IARC 1987)

フェノバルビタールについて他にも総説があるので参考にされたい (McClain, 1990)。

3. エチニルエストラジオール

エチニルエストラジオールは合成エストロゲンとして経口避妊薬や抗がん剤に使用されている。経口避妊薬としては最大1日40 μ gとされている。前立腺がんのためには一回0.05~1mgで一日3回の投与がなされている (日本医薬情報センター, 1990) 変異原性試験結果をTable 5に示す (IARC, 1987)。In vitro 染色体異常試験で数的異常を誘発することが知られている (Wheeler et al., 1986)。がん原性に関しては、単独投与でラットの肝臓、下垂体、乳腺に、マウスでは下垂体、乳腺、子宮、子宮頸部に腫瘍を誘導することが報告されている (IARC, 1979)。

併用投与として、DEN 投与ラットにエチニルエストラジオールを投与することにより肝がんの誘発が認められている (Yager, 1984)。エチニルエストラジオールの発がん作用には、そのホルモン作用が大きく影響している。エストロゲンが視床下部のドーパミンの遊離を阻害し、それにより下垂体のプロラクチンの産生が高まる。高濃度のプロラクチンの連続的な刺激が乳腺や下垂体の細胞増殖を引き起こすと考えられている (Neu-

mann, 1991)。また Kumar ら (1990) は、エストロゲンの一種である 17 β -エストラジオールでの実験において、生後直後のラットに NMU を投与して ras-oncogene を活性化させた個体に 17 β -エストラジオールを投与することにより乳腺腫瘍を誘導することを報告している。

実験動物の内分泌の誘導と制御には種差が存在するので、齧歯類の結果をヒトの腫瘍の発生に外挿することは困難だが、エストロゲンによる高プロラクチン血症と発がんプロモーションに関して今後の研究がまたれる。

4. メタピリレン

メタピリレンは抗ヒスタミン剤として開発されたが、現在は使用されていない。Table 6 に示す様に大方の変異原性試験結果は陰性である (Mirsalis, 1987)。しかし最近の報告では変異原性があるとも言われている (Rosenkrantz and Klopman, 1990; Casciano et al., 1991)。メタピリレンは肝がんを誘発し、それには種差がある。ラットの誘発物質であるが、モルモットとハムスターには誘発がみられない (Lijinsky et al., 1980, 1983)。メタピリレンの特徴的な細胞への影響はミトコンドリアの数を増加させることと、肝細胞の S 期 DNA 合成を亢進させることである

Table 6. メタピリレンの変異原性試験結果

遺伝的傷害の検出点	試験名 (材料)	結果
DNA damage	UDS(in vitro Rat hepatocyte-Autoradiography)	-
	(in vitro Rat hepatocyte-Sintillation)	(+)
	UDS(in vivo Rat, Mouse liver-Autora)	-
	構造活性相関	+
Gene mutation	Ames法	-
	Mammalian cell (CHO/HGPRT)	-
	Mammalian cell (Mouse cell L5178Y/TK ⁻)	-(+)
Chromosome aberration	in vitro (L5178Y)	+

(Mirsalis 1987, Rosenkrantz and Klopman 1990, Casciano et al. 1991)

(Steinmetz et al., 1988)。

5. DDT

DDT は発見されてから一世紀以上にもなり、非常に多用された殺虫剤である。そのものの生体組織への高い蓄積、残留性のために使用が禁止

された。DDT の変異原性試験結果を Table 7 に示す (Tsushimoto, 1983; IARC, 1988)。DDT の代謝物が変異原性を示すというデータがあったり (Planche et al., 1979)、DDT がショウジョウバエの spot test で変異原性を示すという報告 (井上裕章ら, 1987) もあるが、多くの変異原性試

Table 7. DDT の変異原性試験結果

遺伝的傷害の検出点	試験名 (材料)	結果
DNA damage	UDS-assay (Rat liver, Human lymph.)	-
	Drosophila	-
Gene mutation	Ames法	-
	Mammalian cell (V79)	-
	Drosophila (eye, wing)	±
Chromosome aberration	in vitro (Chinese hamster lung)	±
	in vivo (Rat, Mouse)	±
	in vivo Micronucleus test (Mouse)	-

(IARC 1987, Fujikawa 1988, Tsushimoto et al. 1983)

験の結果は陰性である。

がん原性に関してはマウスでは肝腫瘍、リンパ腫、肺腫瘍を、ラットでは肝腫瘍を誘発することが知られている。しかし、ハムスターには肝腫瘍の発生は認められない (IARC, 1974)。発がんプロモーション活性を調べる試験においては、DDT が 2AAF 投与ラットの肝がんを促進させることが知られている (Peraino *et al.*, 1975)。

DDT の生理学的作用については報告が多い。DDT は細胞膜にある Ca-Mg ATPase を阻害することが報告されている (Matsumura and Ghiasuddin, 1979)。またエストロゲン作用を持つことが知られている (McLachlan, J. A. *et al.*, 1984)。肝の薬物代謝酵素誘導においてフェノバルビタール型の P450 を誘導することが示されている (Flodström *et al.*, 1990)。

細胞間コミュニケーション阻害作用については V-79 細胞を用いた Metabolic cooperation 阻害試験や初代培養肝細胞間の色素移行阻害試験で示されている (Tsushimoto *et al.*, 1983; Klaunig *et al.*, 1990)。電子顕微鏡観察で DDT 投与のラット肝細胞表面の Gap-junction の単位面積当たりの数が減少することが認められている (Sugie *et al.*, 1987)。また肝細胞の DNA 合成を亢進さ

せることが報告されている (Büsser *et al.*, 1987)。

DDT の蓄積、残留性は特に脂肪組織に高いことが記載されている (IARC, 1974)。疫学調査では DDT 単独では報告はないが、塩素系農薬に関するヒトでの調査では肺がんに関する報告がみられるが、肝がんに対しては明確なものはみられていない (Blair *et al.*, 1983; IARC, 1986)。IARC は、ヒトにたいして、2B と評価している (IARC, 1987)。

6. ナトリウムサッカリン

人工甘味料として 100 年前に発見され、現在も、使用されている。医療用として糖尿病患者への使用が行われている。Table 8 に示すように、染色体異常試験では高濃度・高投与量での試験系で陽性結果を示す以外、他の変異原性結果は陰性である (IARC, 1986)。がん原性試験の結果について Elluwin and Cohen (1990) の総説を参考にすが、ナトリウムサッカリンのラット二世代投与試験により膀胱がんが発生することがわかっている。マウスやハムスターには発生は認められない、またサルの実験でも腫瘍の発生は認められていない。発がんプロモーター検討試験では、ラットに MNU, FANT や BBN の前投与後にナトリウム

Table 8. ナトリウムサッカリンの変異原性試験結果

遺伝的傷害の検出点	試験名 (材料)	結果
Gene mutation	Ames法	-
	Mammalian cell (L5178Y/TK ⁻)	- (+)
Chromosome aberration	in vitro (Human lymphocyte)	+*
	in vitro (Chinese hamster lung)	+*
	in vivo (Hamster)	-
	in vivo (Mouse)	-
	in vivo Micronucleus test (Mouse)	-
	Dominant lethal test (Mouse)	±

* + になっているのは高濃度でのみ+。

IARC (1987)

Table 9. Non-genotoxic carcinogen の細胞への作用機構

細胞への作用機構	化合物名
細胞間連絡の阻害	フェノバルビタール, DDT, エチニルエストラジオール (サッカリン)
細胞増殖の亢進	フェノバルビタール, エチニルエストラジオール, メタピリレン, DDT
細胞死と再生	ナトリウムサッカリン

サッカリンの連続投与で膀胱がんの発生がみられている (Elluwin and Cohen, 1990)。サッカリンの各種塩の発がんに対する影響が推測されており、Na, K, Ca, free の各種サッカリンの中で Na 塩のみが膀胱上皮の細胞の増殖を増進させることが報告されている (Hasegawa and Cohen, 1986)。ナトリウムサッカリンが膀胱内で結晶状構造をとり、それが上皮細胞を Cytotoxic に刺激し、成長因子の作用も加わって増殖がおこるのであるという仮説がだされている (Cohen *et al.*, 1991)。

アルカリ尿も膀胱の発がん促進因子である (Elluwin and Cohen, 1990)。なお高濃度のサッカリンで細胞間コミュニケーション阻害がおこるとい報告がある (Trosko *et al.*, 1980; Umeda *et al.*, 1980)。ナトリウムサッカリンを含む甘味料を対象とした疫学調査において、膀胱発がんに否定的な結果が報告されている (Elluwin and Cohen, 1990)。日本人のナトリウムサッカリンの一日摂取量は 10.4 mg/50 kg 体重であり (食品添加物公定書解説書, 1987)、ラットへの発がん量がナトリウムサッカリンだけの混餌飼料で 5~7.5% であることを考慮すると、その開きは 6000 倍~10000 倍にもなる。

以上、各化合物に付いて述べたように、これらの non-genotoxic carcinogen と考えられる化合物の作用機構は化合物の直接的、または二次的に誘導されるホルモン等により、細胞間連絡の阻

害、細胞増殖の亢進、細胞死と再生等によると考えられるが (Table 9)、発がん作用に種差、系統差、性差、臓器特異性、齢等の影響が顕著に認められるので、今後、外挿のためには、これらの指標について、*In vitro* 試験—種々の齧歯類の各臓器の細胞—ヒトの細胞での相関を求めようとする研究が大切であろう。

現時点では齧歯類で *In vivo* 表現される様式を中心にして Category 別に Case by case の評価がいと考えられる。

7. 謝 辞

この Review は製薬協医薬品評価委員会基礎部会第 3 分科会で集められた資料を基本にし、加筆した。議論をいただき、また資料の提供をいただきました白井敏仁 (万有製薬)、青木豊彦 (エーザイ)、久田 茂 (帝国臓器製薬)、阿瀬善也 (小野薬品)、藤井登志之 (藤沢薬品工業)、湯浅啓史 (田辺製薬)、米良幸典 (ゼリア新薬工業) の方々に感謝いたします。

参 考 文 献

- Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B. H. Margolin, B. E. Matter and M. D. Shelby (1985) In: J. Ashby *et al.* (eds.) Evaluation of short-term tests for Carcinogens, Report of the IPCS on in vitro assays, Progress in mutation research Vol. 5, Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam, pp. 117-174.
- Becker, F. F. (1982) Morphological classification of mouse liver tumors based on biological char-

- acteristics, *Cancer Res.*, **42**, 3918-3923.
- Blair, A., D. J. Grauman, J. H. Lubin and J. F. Fraumeni, Jr. (1983) Lung cancer and other causes of death among licenced pesticide applications, *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**, 31-37.
- Büsser, M-T. and W. K. Lutz (1987) Stimulation of DNA synthesis in rats and mouse liver by various tumor promoters, *Carcinogenesis*, **8**, 1433-1437.
- Casciano, D. A., G. Talaska and D. Clive (1991) The potent hepatocarcinogen methapyrilene induces mutations in L5178Y mouse lymphoma cells in the apparent absence of DNA adduct formation, *Mutation Res.* **263**, 127-132.
- Cohen, S. M., M. Cano, R. A. Earle, S. D. Carson and E. M. Garland (1991) A proposed role for silicates and protein in the proliferative effects of saccharin on the male rat urothelium, *Carcinogenesis*, **12**, 1551-1555.
- Conny, A. H. (1982) Induction of microsomal enzyme by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Res.*, **42**, 4875-4917.
- Diwan, B. A., A. E. Palmer, M. Ohshimura and J. M. Rice (1985) N-nitroso-N-methylurea initiation in multiple tissue for organ-specific tumors in rat by phenobarbital, *J. Natl. Cancer Inst.*, **75**, 1099-1105.
- Ellwein, L. B. and S. M. Cohen (1990) The health risk of saccharin revised, *Critical Rev. Toxicol.*, **20**, 311-326.
- 藤川和男 (1988) ショウジョウバエによる環境変異原検出系に関する研究, *環境変異原研究*, **10**, 15-25.
- Flodström, S., H. Hemming, L. Wärngård and U. G. Ahlberg (1990) Promotion of altered hepatic foci development in rat liver, cytochrome P450 enzyme induction and inhibition of cell-cell communication by DDT and some structurally related organohalogen pesticides, *Carcinogenesis*, **11**, 1413-1417.
- Furuya, K., H. Mori and G. M. Williams (1983) An enhancing effect of antihistaminic drug methapyrilene on rat liver carcinogenesis by previously administered N-2-fluorenylacetylamide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **70**, 49-56.
- Gangolli, S. D., B. G. Lake and J. G. Evans (1987) The histopathology and biochemistry of phenobarbitone-induced liver nodules in C3H mice, *Mouse liver tumors*, *Arch. Toxicol. Suppl.*, **10**, 95-107.
- Harris, C. C. (1991) Chemical and physical carcinogens: Advances and perspectives for the 1990s, *Cancer Res.*, **51**, 5023s-5044s.
- Hasegawa, R. and S. M. Cohen (1986) The effect of different salts of saccharin on the rat urinary bladder, *Cancer Lett.*, **30**, 261-268.
- Hiasa, Y., Y. Kitahori, N. Konishi, T. Shimoyama and J.-C. Lin. (1985) Sex differential and dose dependence of phenobarbital-promoting activity in N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-initiated thyroid tumorigenesis in rats, *Cancer Res.*, **45**, 4087-4090.
- IARC Monographs (1974) **5**, 83-124.
- IARC Monographs (1979) **21**, 233-255.
- IARC Monographs (1980) **22**, 111-170.
- IARC Monographs on cancer (1987) Genetic and related effects, *Suppl. 6*, IARC, Lyon, pp. 212-215.
- IARC Monographs on cancer (1987) Genetic and related effects, *Suppl. 6*, IARC, Lyon, pp. 293-295.
- IARC Monographs on cancer (1987) Genetic and related effects, *Suppl. 6*, IARC, Lyon, pp. 488-493.
- IARC Monographs (1987) *Suppl. 7* Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs, Volumes 1 to 42.
- 井上裕章, 梁 治子, 藤川和男 (1987) ショウジョウバエにおける DDT の殺虫作用と変異原性, *環境変異原研究* **9**, No. 2 (第16回日本環境変異原学会要旨集), 138.
- Jone, C. M., L. M. Erickson, J. E. Trosko, M. L. Netzloff and C. C. Chang (1985) Inhibition of metabolic cooperation by the anticonvulsants, diphenylhydantoin and phenobarbital, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, **5**, 379-391.
- Klaunig, J. E. and R. T. Ruch (1987) Strain and species effects on the inhibition of hepatocyte intercellular communication by liver tumor promoter, *Cancer Lett.*, **36**, 161-168.
- Klaunig, J. E., R. T. Ruch, C. M. Weghorst and J. A. Hampton (1990) Role of inhibition of intercellular communication in hepatic tumor promotion, *In Vitro Toxicol.*, **3**, 91-107.
- Kumar, R., S. Sukumar and M. Barbacid (1990) Activation of *ras* oncogenes preceding the onset of neoplasia, *Science*, **248**, 1101-1104.
- Lee, G.-H., K. Nomura and T. Kitagawa (1989) Comparative study of diethylnitrosamine-initiated two-stage hepatocarcinogenesis in C3H, C57BL and BALB mice promoted by various hepatopromoters, *Carcinogenesis*, **10**, 2227-2230.
- Lijinsky, W., M. D. Reuber and B. N. Blackwell (1980) Liver tumors induced in rats by oral administration of the antihistaminic methapyrilene hydrochloride, *Science*, **209**, 817-819.
- Lijinsky, W., G. Knutsen and M. D. Reuber (1983) Failure of methapyrilene to induce tumors in hamsters or guinea pigs, *J. Toxicol. Environ. Health*, **12**, 653-657.
- McClain, R. M., R. C. Posch, T. Bosakowski and J. M. Armstrong (1988) Study on the mode of action for thyroid gland tumor promotion in rats by phenobarbital, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **94**, 254-265.
- McClain, R. M. (1990) Mouse liver tumors and microsomal enzyme-inducing drugs: Experimental and clinical perspectives with phenobarbital, In: *Mouse liver carcinogenesis; Mechanisms and species comparisons*, Alan R. Liss Inc. New York, pp. 345-365.
- Matsumura, F. and S. M. Ghiasuddin (1979) Characteristics of DDT sensitive Ca-ATPase in the axonic membrane, In: T. Narahashi (ed.) *Neurotoxicology of insecticides and pheromons*, Plenum press, New York, pp. 245-257.
- McGregor, D. B. and R. D. Prentice (1985) Phenobarbital: its mutagenicity and toxicity in the Ames's Salmonella test, In: J. Ashby et al. (eds.) *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens*, Report of the IPCS on in vitro assays, Progress in mutation research Vol. 5, Elsevier Scientific Publisher, Amsterdam, pp. 741-743.
- McLachlan, J. A., K. S. Korach, R. R. Newbold and G. H. Degen (1984) Diethylstilbestrol and other estrogens in environment, *Fundament. Appl. Toxicol.*, **4**, 686-691.
- Mirsalis, J. C. (1987) Genotoxicity, toxicity and carcinogenicity of the antihistamine methapyrilene, *Mutation Res.*, **185**, 309-317.
- Nebert, D. W., M. Adesnik, M. J. Coon, R. W. Estarook, F. J. Gonzalez, F. P. Guengerich, I. C. Gunsalus, E. F. Johnson, B. Kemper, W. Lewin, I. R. Phillips, R. Sato and M. R. Waterman (1987) The P450 gene superfamily: Recommended nomenclature, *DNA*, **6**, 1-11.
- Neumann, F. (1991) Early indicators for carcinogenesis in sex-hormon sensitive organs, *Mutation Res.*, **248**, 341-356.
- 日本医薬情報センター (1990) *日本医薬品集*, 薬事時報社.
- 日本製薬工業協会 (1991) *癌原性試験に対する調査結果報告書*.
- Olsen, J. H., J. D. Boice, Jr., J. P. A. Jensen and J. F. Fraumeni, Jr. (1989) Cancer among epileptic patients exposed to anticonvulsant drug, *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 803-808.
- Pantuck, E. J., C. B. Pantuck, W. A. Garl, B. H. Min, L. W. Wattenberg, K. E. Anderson, A. Kappas and A. H. Conny (1979) Stimulatory effect on brussels sprouts and cabbage on human drug metabolism, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **25**, 88-95.
- Parke, D. V. and C. Loannides (1990) Role of cytochromes P-450 in mouse liver tumor promotion, In: *Mouse liver carcinogenesis; Mechanisms and species comparisons* Alan R. Liss Inc., New York, pp. 215-230.
- Peraino, C., F. Michael, E. Staffeld and J. P. Christopher (1975) Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin and dichlorodiphenyl trichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in rat, *Cancer Res.* **35**, 2884-2890.
- Peraino, C., E. F. Staffeldt, D. A. Haugen, L. S. Lombard, F. L. Stevens and R. J. Michael Fry (1980) Effects of varying the dietary concentration of phenobarbital on its enhancements of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis, *Cancer Res.*, **40**, 3268-3273.
- Pitot, H. C., T. L. Goldsworthy, S. Moran, W. Kennan, H. P. Glauert, R. Maronpot and H. A. Campbell (1987) A method to quantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose response relationships to altered hepatic foci, *Carcinogenesis*, **8**, 1491-1499.
- Planche, G., A. Croisy, L. Tomatis and Bartsh (1979) Metabolic and mutagenic studies on DDT and 15 derivatives. Detection of 1,1-bis(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethan and 1,1-bis(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethyl acetate (kelthan acetate) as mutagens in Salmonella typhimurium and of 1,1-bis(p-chlorophenyl) ethylene oxide, a likely metabolite, as an alkylating agent, *Chem. Biol. Inter.*, **25**, 157-175.
- Rosenkranz, H. S. and G. Klopman (1990) Methapyrilene: DNA as a possible target, *Mutation Res.*, **245**, 239-243.
- 食品添加物公定書 解説書 第5版 (1987) 石館守三, 谷村顕雄監修, 広川書店, pp. D-367-D-373.
- Steinmetz, K. L., C. K. Tyson, E. F. Meierhenry, J. W. Spalding and J. C. Mirsalis (1988) Examination of genotoxicity, toxicity and morphologic alterations in hepatocytes following in vivo or in vitro exposure to methapyrilene, *Carcinogenesis*, **9**, 959-963.
- Stevenson, D. E. (1990) Organochlorine insecticides and mouse liver tumors: An analysis of responses and mechanisms, In: *Mouse liver carcinogenesis: Mechanisms and species comparisons* Alan R. Liss Inc., New York, pp. 367-383.
- Sugie, S., H. Mori and M. Takahashi (1987) Effect of in vivo exposure to liver tumor promoters phenobarbital or DDT on the gap junctions of rat hepatocytes: A quantitative freeze-fracture analysis, *Carcinogenesis*, **8**, 45-51.
- Thorpe, E. and A. I. T. Walker (1973) The toxicology of dieldrin (HEOD). II Comparative long-term oral toxicity studies in mice with dieldrin, DDT, phenobarbitone, β -BHC and γ -BHC, *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **11**, 433-442.
- Trosko, J. E., B. Dawson, L. P. Yotti and C. C.

Chang (1980) Saccharin may act as a tumor promoter by inhibiting metabolic cooperation between cells, *Nature*, **285**, 109-110.

Tsuda, H., M. Asamoto, T. Ogiso, T. Inoue, N. Ito and M. Nagano (1988) Dose-dependent induction of liver and thyroid neoplastic lesion by short-term administration of 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline combined with partial hepatectomy followed by phenobarbital or low dose 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene promotion, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 691-697.

Tsushima, G., J. E. Trosko, C. C. Chang and F. Matsumura (1983) Cytotoxic, mutagenic and cell-cell communication inhibitory properties of DDT, lindane and chlordane on Chinese hamster cells in vitro, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 721-730.

Umeda, M., K. Noda and T. Ono (1980) Inhibition of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by various chemicals including tumor promoters,

Gann, **71**, 614-620.

Vang, O., H. Jensen and H. Atrup (1991) Induction of cytochrome P-450 I A1, I A2, II B1, II B2 and II E1 by broccoli in rat liver and colon, *Chem. Biol. Interactions*, **78**, 85-96.

Ward, J. M. (1983) Increased susceptibility of liver of aged F344/Ncr rats to the effects of phenobarbital on the incidence, morphology and histochemistry of hepatocellular foci and neoplasms, *J. Natl. Cancer Inst.*, **71**, 815-823.

Wheeler, W. J., L. M. Chcherry, T. Downs and T. C. Hsu (1986) Mitotic inhibition and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in Chinese hamster cells in vitro, *Mutation Res.*, **171**, 31-41.

Yager, J. D., H. Campbell, D. S. Longnecker, B. D. Roebuck and M. C. Benoit (1984) Enhancement of hepatocarcinogenesis in female rats by ethinyl estradiol and mestranol but not estradiol, *Cancer Res.*, **44**, 3862-3869.

ワークショップ「いわゆる Non-mutagenic Carcinogen をめぐる諸問題」

変異原性試験実施の立場から

——ラット肝複製 DNA 合成 (RDS) 試験の推奨——

三菱化成(株)総合研究所 宇野芳文, 岩瀬裕美子, 吉川邦衛

1. はじめに

変異原性試験結果が陰性であるにもかかわらず、がん原性を誘発する、いわゆる非変異・がん原性物質は既知のがん原性物質のうち、30~40%の割合を占めている。このため、未知のがん原性物質の良いスクリーニング法であるべき変異原性試験に対する信頼性が現在大きく揺らいでいる。

企業における変異原性試験の実施目的としては、現在2つの事柄があげられる。つまり、新規化学物質の開発初期段階で、そのがん原性の有無を早期に予測する必要があるためと、この試験が新規化学物質の申請に際して各省庁で制定されているためである。上述の目的のうち前者は、がん原性予測に対する非変異・がん原性物質の問題と、偽陽性の問題とがからみ、その実施意義は今や、極めて希薄となっている。

しかし現状では、筆者らを含め各企業の変異原性試験の担当者は、単なる制定試験であるための理由からその実施が強いられ、しかもその実験結果からがん原性の予測を行わなければならないという矛盾に追い込まれている。

変異原性試験法が制定された当初、変異・がん原性物質の多くは、それらの化学構造から活性代謝物の構造が推定できるので、DNA に対する化学修飾が容易に推測され、またその一部が実験的にも証明されてきた。しかし、近年相次いで明らかにされてきた多くの非変異・がん原性物質の場合、それらの化学構造から同様な推測は極めて困

難である。

したがって、がん原性物質中の発がんイニシエーション活性のみを検出することに主眼をおいてきた既存の変異原性試験法では、すべてのがん原性物質を検出することに自ずと限界がある。この事実を無視して試験を続行してきた結果が、今日の非変異・がん原性物質の出現を大幅に許したものと考えている。

既存の変異原性試験がもつがん原性予測における能力の限界を示すとともに、がん原性物質中の発がんプロモーション活性部分に注目した試験法が新たに必要となることを本稿では述べたい。

2. Ames 試験におけるがん原性物質の陽性検出率の低下

変異原性試験の実験結果ががん原性物質を確実に陽性に、また非がん原性物質を正確に陰性にしてきたかどうか、ここで改めて明確にする必要がある。

現在まで報告された Ames 試験の代表的な例を載せる (Table 1)。Ames 試験は 1975 年頃、がん原性物質が陽性となる陽性検出率、また非がん原性物質が陰性となる陰性検出率は、それぞれ 90% 前後を示していた (McCann *et al.*, 1975; Sugimura *et al.*, 1976; Purchase *et al.*, 1976)。

最近になって、Ames 試験の陰性検出率はそのままの値で保持されているが、陽性検出率は大幅に下がり、50% 前後であることが報告された

〒227横浜市緑区鴨志田町 1000 番地
From standpoint of mutagenicity test performance: Recommendation of in vivo—in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using rat livers—
Yoshifumi Uno, Yumiko Iwase and Kunie Yoshikawa
Toxicology Laboratory, Life Science Sector, Research Center, Mitsubishi Kasei Co., 1000 Kamoshida-cho, Midori-ku, Yokohama 227, Japan

Table 1. Positive sensitivity and negative specificity to carcinogens and noncarcinogens on Ames test (SAL)

Author	Positive Sensitivity (%)	Negative Specificity (%)
McCann (1975)	90 (157/175)	87 (94/108)
Sugimura (1978)	85 (136/160)	74 (60/81)
Purchase (1978)	91 (53/58)	97 (60/62)
Tennant (1987)	45 (20/44)	86 (25/29)
Zeiger (1990)	52 (12/23)	100 (18/18)

(Tennant *et al.*, 1987; Zeiger *et al.*, 1990)。この原因は明らかに使用した検体の相違による。

すなわち、高い陽性検出率を誇った検体の内訳は多環状芳香族炭化水素、*N*-ニトロソ化合物類、芳香族アミン類などの強いがん原性物質、つまり雌雄や種差の区別なくがん原性を誘発するものが多く含まれていた。

一方、低い陽性検出率のそれは、含ハロゲン有機化合物類、ペルオキシゾーム増殖物質などの弱いがん原性物質、つまり雌雄や種差に依存して、がん原性を誘発するものが多く含まれていた。例えば、含ハロゲン有機化合物類に多くみられるようなマウス肝のみを標的臓器とするがん原性物質や、ペルオキシゾーム増殖を伴うがん原性物質は、Ames 試験では陽性として検出できない。恐らく、これらの Ames 試験陰性のがん原性物質の多くは、生体内で直接または間接に活性酸素を発生させるものであることが推定されている。

上述の Ames 試験における、1975 年当時と最近のがん原性物質の陽性検出率の大差は、両者で使用した検体もつがん原性の特徴に基づいていた。この検体選択時における偏りは、故意によるものではなく、上述した含ハロゲン有機化合物類やペルオキシゾーム増殖物質のがん原性は、1975 年以前には NTP など未だ明確にされておらず、Ames 試験における適切な陽性検体とはみなされていなかったことによる。

がん原性物質の Ames 試験における陽性検出率の低下を補うために、その後 *in vitro* 染色体異常試験やマウス小核試験が行われてきた。確かに

この両試験は、Ames 試験陰性のがん原性物質の一部を陽性としてきた。しかし、同時に多くの非がん原性物質までを陽性とするのが明らかとなり、変異原性試験における非変異・がん原性物質の問題とは別の偽陽性の問題、つまり陰性検出率の低下の問題が生じる結果となった。

3. *In vitro* 染色体異常試験とマウス小核試験における非がん原性物質の陰性検出率の低下

染色体異常試験およびマウス小核試験は、今まで Ames 試験陰性のがん原性物質を陽性とするのみに主眼をおき、非がん原性物質がこれらの両試験でどのような結果を与えるのか、十分に把握されないまま各省庁の制定試験にされたいきさつがある。

ある試験が、がん原性物質の短期検出試験として適切か否かは、がん原性物質の陽性検出率と非がん原性物質の陰性検出率を常に見極め、その総合検出力から冷静にその試験のもつ信頼性が評価されるべきであった。

がん原性物質と非がん原性物質を使用し、上述した概念のもとで、Ames 試験、染色体異常試験 (Tennant *et al.*, 1987; Zeiger *et al.*, 1990) およびマウス小核試験 (Mavournin *et al.*, 1990) の信頼性が評価されたものを示す (Fig. 1)。これらの試験における総合検出力は、Ames 試験で 70%、染色体異常試験で 60% およびマウス小核試験で 56% であった。

この総合検出力が 50% に近い試験法は、がん原性物質の短期検出法として、何ら価値をもたな

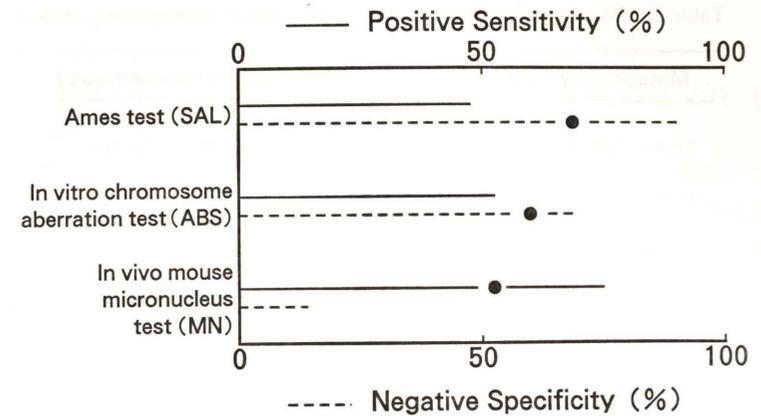


Fig. 1. Positive sensitivity and negative specificity to carcinogens and noncarcinogens on mutagenicity tests. (●) indicates concordance.

いものと等しい。つまり、Ames 試験のみが分かるように、その資格をもつものと判断できる。

一方、染色体異常試験とマウス小核試験における陰性検出率の低さは、各企業の新規化学物質の探索初期段階において、深刻な問題を投げかけている。特に、染色体異常試験の偽陽性の多さが原因となって、変異原性試験と化学合成との担当者間で不信感が生じ、新規化学物質の染色体異常が陽性と判定されても、その開発推進の是非が両者の間で的確に判断できない状況にある。

さらに、Ames 試験の実施労力に比べて、上述の両試験は数倍もの手間と期間を要する。そこに何の両試験の実施目的が存在するのであろう。

Ames 試験でさえ偽陽性は確かに存在するが、この割合は他の試験に比べて圧倒的に低い (Table 1 and Fig. 1)。

上述した偽陽性が多く排泄される試験法の存在は、非変異・がん原性物質の問題を正しく理解する上で、混乱を招くだけである。したがって、筆者らは、Ames 試験陰性のがん原性物質を非変異・がん原性物質として、以後取り扱うことにした。

4. 非変異・がん原性物質の出現

Tennant や Zeiger は、67 種類のがん原性物質を使用し、Ames 試験で陽性とならない非変異・がん原性物質の数が半分まで占めることを問題とした。しかし、著者らはそこで使用された 67 種類

のがん原性物質の数があまりにも少ないものと考えた。

つまり、この少ない検体数が非変異・がん原性物質の占める領域に偏り、上述した問題が拡大解釈されている恐れはないかと疑問がもたれた。そこで既知のがん原性物質の数を改めて調査し、非変異・がん原性物質の正確な割合を掌握する必要があった。

まず、ゲッ歯類のみに明確ながん原性が誘発されるものを対象に調査した。すなわち、CPDB (Gold *et al.*, 1991) から 533 種類、NTP (Ashby and Tennant, 1991) から 162 種類、IARC (Wilbourn *et al.*, 1986; Marselos and Vainio, 1991) から 116 種類および EPA (Nesnow *et al.*, 1986) から 252 種類の計 700 種類のゲッ歯類におけるがん原性物質が選択できた (重複したものを除く)。

つぎに、これに対する変異原性試験の結果を調査した (Ashby and Tennant, 1991; Ishidate *et al.*, 1988; Mavournin *et al.*, 1990; McCann *et al.*, 1975; Purchase *et al.*, 1976; Sugimura *et al.*, 1976; Tennant *et al.*, 1987; Zeiger *et al.*, 1990)。その結果を Table 2 に示す。

700 種類のがん原性物質のすべてについて、変異原性試験が行われているわけではなく、表中にはその実施例数を分母で表してある。これによると、非変異・がん原性物質の割合は、Ames 試験を対象としたとき 44% を占めていた。

Table 2. Number of non-mutagenic carcinogens on mutagenicity tests

Mutagenicity Test	Carcinogens (700 chemicals)
Ames (SAL)	156/357 (44%)
In vitro chromosome aberration (ABS)	57/179 (32%)
Mouse micronucleus (MN)	19/76 (25%)
Ames plus ABS	46/178 (26%)

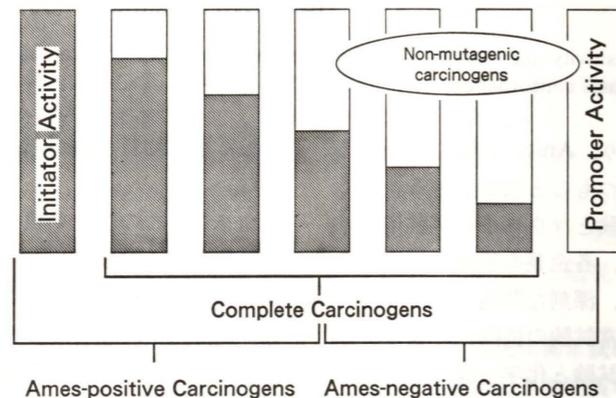


Fig. 2. Distribution of carcinogens in considering non-mutagenic carcinogens.

Tennant や Zeiger らが 114 検体の内、67 種類のがん原性物質で指摘した非変異・がん原性物質の割合は、Ames 試験で 50% 前後であったが、著者らの 357 種類のがん原性物質を用いた調査でも、この数値は 44% とほぼ同程度の割合であった (Table 2)。したがって、Ames 試験では既知がん原性物質の半分しか陽性として検出できないとした彼らの指摘は、正しいものと判断された。

参考までに、染色体異常試験が対象のとき、非変異・がん原性物質の割合は 32%、またマウス小核試験のそれは 25% であった。さらに、Ames 試験と染色体異常試験の両方で陰性を示す非変異・がん原性物質の割合は 26% であった (Table 2)。

以上の数値は Ames 試験単独のものとは比べるといずれも低い、これらの試験におけるがん原性予測の信頼性が、すでに述べたように問題となっていることを忘れてはならない。

5. 非変異・がん原性物質における発がんプロモーション活性の問題

非変異・がん原性物質の出現に際し、これをどのように検出するかが、大問題となっている。これを解決するために、著者らは環境中における各種がん原性物質の分布状況を以下のように想定している (Fig. 2)。

環境中のがん原性物質には、発がんイニシエーション活性を 100% もつものから、発がんプロモーション活性を 100% もつものまで、さらにその間に両者の活性を色々な割合でもつ完全がん原性物質を入れ、多種多様なものが存在する。環境中のがん原性物質の分布状況は、Fig. 2 の中央に示した発がんイニシエーション活性と発がんプロモーション活性とを半々にもつがん原性物質を頂点とした正規分布を描くものと思われる。

したがって、発がんイニシエーション活性の占める割合が多いがん原性物質ほど、Ames 試験で陽性となる。しかし、発がんプロモーション活性

の占める割合が多いがん原性物質は、Ames 試験で陰性となるものと考えられる。

以上の想定から、既知のがん原性物質の内、半分が Ames 試験で陰性となることが納得できる。つまり、Ames 試験で陰性を示す非変異・がん原性物質は、発がんプロモーション活性が大部分を占めるがん原性物質であろう。

以上の背景から、がん原性の未知な化学物質の場合、まず Ames 試験で発がんイニシエーション活性を調べそれが陰性のとき、つぎに発がんプロモーション活性を調べる何らかの試験法が必要となる。

今まで、数多くの化学物質が発がんプロモーターとして知られている (Rao *et al.*, 1989)。しかしこの中には、明らかに Ames 試験陽性でしかもがん原性をもつものが含まれる。この理由は、Fig. 2 の完全がん原性物質における発がんプロモーション活性部分が、各種の発がんプロモーター検出試験で検知されたためであろう。

したがって、既知の発がんプロモーターは、それが動物に単独投与されたとき、がん原性をもつものと、がん原性をもたないものと厳密に区別して取り扱う必要がある。著者らの想定では、発がんプロモーション活性を 100% もつものは、すべてがん原性物質の範ちゅうに入れてはならない (Fig. 2)。その約半分をがん原性物質としたのは、上述の理由による。

非変異・がん原性物質を検出するために必要な発がんプロモーション検出試験は、純粋な発がんプロモーションのみを検出することなく、がん原性をもつ発がんプロモーターのみが、うまく検出される試験法が望ましい。

すなわち、ある試験法が非変異・がん原性物質の検出に有効か否かは、その試験のスクリーニング・データにおいて、がん原性をもつ発がんプロモーターと、非がん原性の発がんプロモーターとが、そこで正しく識別されているかどうかによる。

しかしながら、紙数の関係でこの種の試験法の背景にある細かい機構を今、ここで具体的に説明することができない。少なくとも、非変異・がん原性物質のうち、生体内で活性酸素を発生するのは、がん原性をもつ発がんプロモーターと考え

られる。

6. ラット肝複製 DNA 合成 (RDS) 試験の改良とその成果

本試験の基盤となる実験は、すでに *in vivo-in vitro* の UDS (不定期 DNA 合成) 試験で確立され、RDS (複製 DNA 合成) はその付随的なもの、つまり UDS の頻度を算出する際の目安として取り扱われてきたにすぎない。

この RDS の誘発を発がんプロモーターの検出法に利用しようとした理由は、細胞分裂の促進に注目したからである。すなわち、この RDS のもつ細胞分裂の促進こそ、発がんプロモーターがもつ組織・臓器への普遍的な生物学的反応として、今日理解されている (Trosko and Chang, 1989; Clayson *et al.*, 1989)。

また、RDS 誘発の指標を肝においた理由は、化学物質による発がん実験の場合、少なくともその 50% ないしはそれ以上の化学物質が、肝を標的臓器とするためである。

約 2 年間にわたる本 RDS 試験の基礎実験が終了した結果、9 週齢のラットを使用すること、検体の投与量として最大耐量と 1/2 最大耐量を使用すること、1% の RDS 誘発値を越える検体を陽性とする、などを明らかにした (宇野ら, 1991)。

本 RDS 試験の成果が問われる最大の要点は、まず Ames 試験陰性の肝がん原性物質を陽性として検出できるかどうか、つぎに偽陽性で問題となっている非がん原性物質を陰性とするかどうか、さらに非がん原性の発がんプロモーター、つまり単独処理ではがん原性を誘発しないものを、陰性にするかどうかであった。

Ames 試験で陰性を示すラットの肝がん原性物質の内、国際的にも問題となっている 15 種類のものを選び、その内 12 種類が陽性として検出された (Table 3)。その結果、陽性検出率は 80% であった。ここで使用した数種のものには染色体異常試験やマウスの小核試験で陽性が知られている。しかし、これらの両試験の陽性検出率はいずれも 50% 以下であり、本 RDS 試験の 80% と比較するとかなり低かった。

Table 3. Results of RDS test using rat livers

Non-mutagenic hepatocarcinogen	Mutagenicity			RDS test	Liver tumor	
	SAL	ABS	MN		R	M
Carbon tetrachloride	-	-	-	+	+	+
Clofibrate	-	+	NT	+	+	NT
Di (2-ethylhexyl) phthalate	-	-	NT	+	+	+
Diethylstilbestrol	-	+	+	+	+	-
17 α -Ethinylestradiol	-	-	NT	+	+	-
Methyl carbamate	-	-	NT	+	+	-
Phenobarbital sodium	-	+	+	+	+	+
Polybrominated biphenyls	-	-	NT	+	+	+
Safrole	-	+	-	+	+	+
Simfibrate	-	-	NT	+	+	+
Tannic acid	-	+	NT	+*	+	+
Thioacetamide	-	-	+	+	+	+
11-Aminoundecanoic acid	-	-	NT	-	+	-
Chlorendic acid	-	\pm	NT	-	+	+
D,L-Ethionine	-	-	+	-	+	+

(SAL) Ames test; (ABS) In vitro chromosome aberration test;
(MN) In vivo mouse micronucleus test; (R) Rat; (M) Mouse;
(NT) Not tested; (*) s.c. injection

本 RDS 試験で陽性を示した検体の中には、ペルオキシゾーム増殖物質である clofibrate, DEHP や simfibrate, 薬物代謝酵素の誘導剤である phenobarbital sodium, さらにエストロゲンの diethylstilbestrol や 17 α -ethinylestradiol などがあり, これらはいずれも生体内において複雑な経過を経てがん原性を誘発することが知られている。これらがいずれも, 短期試験の本法で検出されたことは, 特筆すべきであろう。

NTP などで確認された 21 種類の非がん原性物質の内, 17 種類のものが陰性と判定され (Table 4), その結果陰性検出率は 81% となり, 上述

の陽性検出率との平均から総合検出力は 81% となった。この数値は, 他の変異原性試験のそれと比較すると (Fig. 1), 極めて高い総合検出力を示している。

肝に対する非がん原性の発がんプロモーターとして知られている butylated hydroxytoluene (Peraino *et al.*, 1977; Maehara and Williams, 1984; Lindenschmidt *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1990) は, 本 RDS 試験では陽性結果を示したが, lithocholic acid (Hiasa *et al.*, 1971; Cameron *et al.*, 1982) は陰性結果であった (Table 4)。非がん原性の肝発がんプロモーターが RDS

Table 4. Results of RDS test using rat livers

Noncarcinogen	Mutagenicity			RDS test
	SAL	ABS	MN	
Anthranilic acid	-	NT	NT	-
L-Ascorbic acid	-	-	-	-
Caprolactam	-	-	-	-
2-Chloroethanol	+	+	NT	-
2,5-Diaminotoluene \cdot H ₂ SO ₄	+	NT	NT	-
2,6-Diaminotoluene	+	+	NT	-
Flutolanil	-	-	NT	-
Halothane	-	NT	NT	-
8-Hydroxyquinoline	+	+	NT	-
Lithocholic acid	-	+	NT	-
D-Mannitol	-	-	NT	-
Methoxychlor	-	-	NT	-
4-Nitroanthranilic acid	+	NT	NT	-
4-Nitro-o-phenylenediamine	+	+	-	-
Phenol	-	+	NT	-
p-Phenylenediamine \cdot 2HCl	+	+	-	-
Sulfisoxazole	-	-	NT	-
Benzoin	-	-	-	+
Butylated hydroxytoluene	-	-	NT	+
3-Chloro-p-toluidine	-	NT	NT	+
D,L-Menthol	-	-	NT	+

(SAL) Ames test; (ABS) In vitro chromosome aberration test;
(MN) In vivo mouse micronucleus test; (NT) Not tested.

を誘発するか否かは, 今後この種の検体を多く調べ, 慎重に判断したい。

ラット肝 RDS 試験は, Fig. 2 に示したがん原性物質の中のプロモーター活性を, 細胞分裂の促進という指標で検出しているものと, 著者らは理解している。しかし, 発がんイニシエーターによる DNA 複製合成をともなう DNA 修復を想定したとき, 2 次的な RDS の誘発が十分に考えられる。この場合, RDS の誘発は, 結果として UDS を間接的にみている可能性を秘める。しかしながら, Ames 試験陽性のがん原性物質による

本 RDS 試験は, ほとんど未だ実施されていないので, これ以上の考察を避けたい。

今後, 以上の解決すべき問題を踏まえながら, 本 RDS 試験におけるラット肝以外の組織・臓器やマウス肝を対象にした非変異・がん原性物質のスクリーニング・データが, 多く蓄積されなければならない。

なお, 当社の開発初期段階において, Ames 試験, 染色体異常試験とマウス小核試験の GLP 3 点セットでいずれも陰性を示した新規化学物質の内, ラットまたはマウスで肝がんを誘発したすべ

てのものは、後に本 RDS 試験で陽性として検出されている。

7. おわりに

非変異・がん原性物質の問題の提起は本学会の中からではなく、変異原性試験に最初から批判的な動物発がん試験グループからなされた。にもかかわらず、残念ながらこれまで本学会はこの問題に対して組織的な取り組みをすることがなかったため学会の存続の意義に対してさえ、大きな疑問が投げかけられてきたのである。この間、本学会の大部分を構成する企業の変異原性試験担当者の多くは、本学会活動に虚しさを覚え、学会の将来に大きな不安をもったに違いない。

一方、各企業の研究者は本学会において、企業秘密を必要以上に守ろうとし、企業における非変異・がん原性物質の問題が公表されることもなく、公的研究機関からの一方的な研究情報の収集に専念してきた。この受動的な態度が今まで非変異・がん原性物質に対する対策を遅らせた一つの原因でもある。

本 RDS 試験が非変異・がん原性物質の問題すべてを解決するとは考えていない。つまり、その解決のための一つの糸口を提供したにすぎない。この非変異・がん原性物質の大問題を一機関で説明し、その対応法までをすべて確立することは困難である。したがって、この問題の解決のために本学会員である大学、諸研究機関、企業などの諸先生方からの御協力を広くお願いするため、本学会の評議員会において「非変異・がん原性物質への対策研究会」(世話人: 吉川邦衛) の設立を認可していただいた。

非変異・がん原性物質の問題解決のために、特に企業間の壁を払い、上述の研究会への御協力をお願いする次第である。この問題が解決されたとき、最大の恩恵を受けるのは企業側であり、この事が本学会の繁栄に結びつくことを忘れてはならない。

8. 謝辞

長年本学会の底流にあった非変異・がん原性物質の問題を正確に把握し、この問題の解決のため

に初めてワークショップを企画していただき、また「非変異・がん原性物質への対策研究会」の設立に御尽力いただいた、第 20 回日本環境変異原学会の組織会長である東京薬科大学、渡部 烈教授の見識に深甚なる敬意と感謝を申し上げる。

なお同教授より、この研究会の活動の基本方針として、上述の問題を今世紀末までに本学会の総力をあげてほぼ解決し、新たな試験法の提案を本学会を通じて行うこと、ならびに学問の進歩とともに不適切と判断せざるを得ない制度化されている既存の変異原性試験法については、事実にも併せてその理由を添え、改棄の是非に関する提案も併せて本学会で行うことと指示をいただいている。

非変異・がん原性物質や偽陽性の問題から、変異原性試験を単に批判だけする動物発がんグループの人々が大勢いる。この中で、活性酸素の生成という観点から、この問題の解決を自ら試みられ、変異原性試験の不備を常に温かく御助言くださっている国立衛生試験所の黒川雄二毒性部長に感謝を申し上げる。

最後に、発がんプロモーターの指導的立場であり、本ワークショップ座長をお引受け下さった、横浜市立大学医学部の梅田 誠教授および国立がんセンター研究所の藤木博太が予防研究部長に感謝を申し上げる。

参考文献

- Ashby, J. and R. W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, *Mutation Res.*, **257**, 229-306.
- Cameron, R. G., K. Imaida, H. Tsuda and N. Ito (1982) Promotive effects of steroids and bile acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine, *Cancer Res.*, **42**, 2426-2428.
- Clayson, D. B., E. A. Nera and E. Lok (1989) The potential for the use of cell proliferation studies in carcinogen risk assessment, *Regulatory toxicology and pharmacology*, **9**, 284-295.
- Gold, L. S., T. H. Slone, N. B. Manley and L. Bernstein (1991) Target organs in chronic bioassays of 533 chemical carcinogens, *Environ. Health Perspect.*, **93**, 233-246.
- Hiasa, Y., Y. Konishi, Y. Kamamoto, T. Watanabe and N. Ito (1971) Effect of lithocholic acid on DL-ethionine carcinogenesis in rat liver, *Gann*, **62**,

239-245.

- Ishidate, M. Jr., M. C. Harnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, *Mutation Res.*, **195**, 151-213.
- Lindenschmidt, R. C., A. F. Trayka, M. E. Goad and H. P. Witschi (1986) The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice, *Toxicology*, **38**, 151-160.
- Maeura, Y. and G. M. Williams (1984) Enhancing effects of butylated hydroxytoluene on the development of liver altered foci and neoplasms induced by N-2-fluorenylacetylamide in rats, *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 191-198.
- Marselos, M. and H. Vainio (1991) Carcinogenic properties of pharmaceutical agents evaluated in the IARC Monographs programme, *Carcinogenesis*, **12**, 1751-1766.
- 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.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135-5139.
- Nesnow, S., M. Argus, H. Bergman, K. Chu, C. Frith, T. Helmes, R. McGaughy, V. Ray, T. J. Slaga, R. Tennant and E. Weisburger (1986) Chemical carcinogens, a review and analysis of the literature of selected chemicals and the establishment of the Gene-Tox Carcinogen Data Base, a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **185**, 1-195.
- Peraino, C., R. J. Fry, E. Staffeldt and J. P. Christopher (1977) Enhancing effects of phenobarbitone and butylated hydroxytoluene on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat, *Fd Cosmet. Toxicol.*, **15**, 93-96.
- Purchase, I. F. H., E. Longstaff, J. Ashby, J. A.

Styles, D. Anderson, P. A. Lefevre and F. R. Westwood (1976) Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use, *Nature (Lond.)*, **264**, 624-627.

- Rao, V. R., Y-T. Woo, D. Y. Iai, J. C. Arcos (1989) Database on promoters of chemical carcinogenesis, *J. Envir. Sci. Hlth.*, **C7**, v-xxxvi, 145-386.
- Sugimura, T., S. Sato, M. Nagao, T. Yahagi, T. Matsushima, Y. Seino, M. Takeuchi and T. Kawachi (1976) Overlapping of carcinogens and mutagens, In: Magee, P. N., S. Takayama, T. Sugimura and T. Matsushima (eds), *Fundamentals of Cancer Prevention*, Baltimore: University Park Press, pp. 191-215.
- Tennant, R. W., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger, J. K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, B. Anderson, R. Minor (1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays, *Science*, **236**, 933-941.
- Trosko, J. E. and C. C. Chang (1989) Stem cell theory of carcinogenesis, *Toxicology Letters*, **49**, 283-295.
- 宇野芳文, 高沢博修, 宮川 誠, 井上由起, 村田妙子, 吉川邦衛 (1991) in vivo-in vitro ラット肝 RDS (複製 DNA 合成) 試験を用いる非変異・肝がん原性物質の早期検出 (第 2 報), 第 20 回日本環境変異原学会 (東京) 講演要旨集, p. 183.
- Wilbourn, J., L. Haroun, E. Heseltine, J. Kaldor, C. Partensky and H. Vainio (1986) Response of experimental animals to human carcinogenesis: an analysis based upon the IARC Monographs programme, *Carcinogenesis*, **7**, 1853-1863.
- Williams, G. M., C. X. Wang and M. J. Iatropoulos (1990) Toxicity studies of butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies, *Fd Chem. Toxic.*, **28**, 799-806.
- Zeiger, E., J. K. Haseman, M. D. Shelby, B. H. Margolin and R. W. Tennant (1990) Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **16** (Suppl. 18), 1-14.

変異原性物質の代謝研究の立場から

東京薬科大学 第二衛生化学教室 奥田晴宏, 小倉健一郎,
平塚 明, 渡部 烈

1. はじめに

発がん性物質の短期試験法の中でも、その高い感受性、簡便性、あるいは短い試験期間などの利点から最も汎用されている Ames 試験法は、あるグループの発がん性物質の検出が出来ないことが指摘されて久しい。そして現在では、このグループがかなりの数に昇っており、ゆらぎ始めた Ames 試験法に対する信頼性の回復は可能か否かを試験法において使用される代謝活性化の面から論究してみたい。なお、ここでは“non-mutagenic carcinogen”を Ames 試験 (S9mix 系共存下, *S. typhimurium* TA 株に対する His⁺ 復帰変異試験) によって陰性を示す発がん性物質の意味に限定して取り扱わせていただきたい。本稿では、筆者らの研究室で行われたスルホトランスフェラーゼ (ST) による活性化機構に関する研究を通じて、代謝活性化の観点から Ames 試験法の問題点を論述するとともにその改善策に関して提言する。

2. Ames 試験と代謝活性化

変異・発がん性物質の殆ど全ては生体内に取り込まれたのち、「薬物代謝酵素」と呼ばれる一群の酵素により代謝活性化を受け、化学的に反応性に富む代謝物に変換され、DNA 塩基を共有結合的に修飾する。細胞が DNA の修復あるいは複製を行う間に、DNA の修飾は DNA 損傷として遺伝子上に固定化され、細胞の変異が生じる。代謝活

性化には、発がん性物質の化学構造とその発がん性物質を摂取した動物中に存在する薬物代謝酵素に応じて多様な機構が存在するが、活性酸素関与の機構を除けば、第 I 相反応 (アレーンやオレフィン類のエポキシドへの酸化やニトロ基のヒドロキシアミノ基、アミノ基への還元など) による活性化と第 II 相反応 (抱合反応) による活性化とに大別される (Table 1)。

Ames 試験では、*S. typhimurium* TA 株と被検化学物質の他に、外部から代謝活性化酵素系として S9mix (ラット肝 9,000 xg 上清に NADPH 産生系を加えた系) を添加する。哺乳動物においては、各種薬物代謝酵素が最大の比活性をしめす臓器は主として肝であり、S9mix は菌体外に肝を想定した薬物の代謝の場を設け、そこで生成する変異原性活性代謝物を TA 株で検出しようとするものである。各種 TA 株も薬物代謝酵素と機能が類似した限られた数種類の酵素を持っているが、P-450 をもたないこと、基質特異性の点で、哺乳動物肝の酵素と差異があることに注意する必要がある。P-450 の補酵素 NADPH の産生系を含む S9mix の添加は、特に酸化的代謝を中心とする第 I 相反応により活性化される変異原の検出には有効であるが、第 II 相反応により活性化を受ける変異原に対しては、S9mix 中には補酵素が存在しないために全く無力である (Fig. 1)。アセチル抱合 (Saito *et al.*, 1986)、グルタチオン抱合 (Kerklaan *et al.*, 1985) は菌自身の持つ酵素によって

〒192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

From Stand Point of the Research of Metabolism of Mutagens

Haruhiro Okuda, Kenichiro Ogura, Akira Hiratsuka and 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

Table 1. Metabolic Activation of Mutagens and Carcinogens

1. Activation of chemicals by phase I reactions

- 1) Oxidation
 - a. Epoxidation ----- arenes and olefines
 - b. Hydroxylation ----- *N*-nitrosodialkylamines and arylamines
- 2) Reduction ----- nitro and nitroso compounds
- 3) Hydrolysis ----- epoxides and glycosides

2. Activation of chemicals by phase II reactions

- 1) Sulfation ----- arylhydroxamic acids and *N*-OH-arylamines
- 2) Glucuronidation ----- arylhydroxamic acids
- 3) Acetylation ----- arylhydroxamic acids and *N*-OH-arylamines
- 4) Aminoacylation ----- *N*-OH-arylamines
- 5) Glutathione conjugation ----- 1,2-dihaloalkanes

3. Formation of active oxygen

- 1) Superoxide by catecols, hydroquinones, and *etc.*
- 2) Lipid hydroperoxides by halogenated carbon radicals

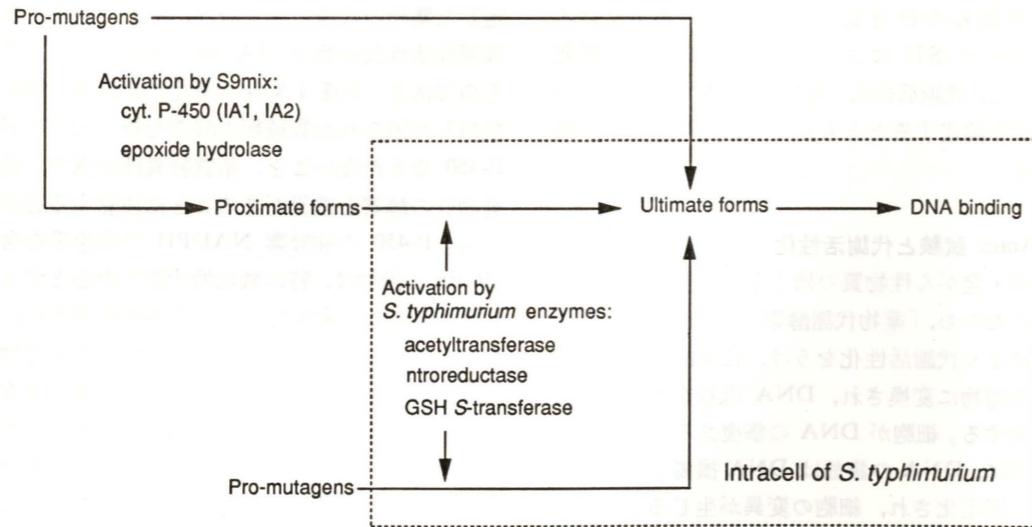


Fig. 1. Metabolic activation of pro-mutagens by *S. typhimurium*-S9mix system.

も触媒されるものの、これらに関与する酵素は哺乳動物の持つ酵素とは基質特異性や比活性が低いことなどの点で性質を大きく異にしている。

従って、第 II 相反応により活性化される発がん性物質を Ames 試験法で感度良く検出するためには、S9mix に替えて被検物質の予想される代

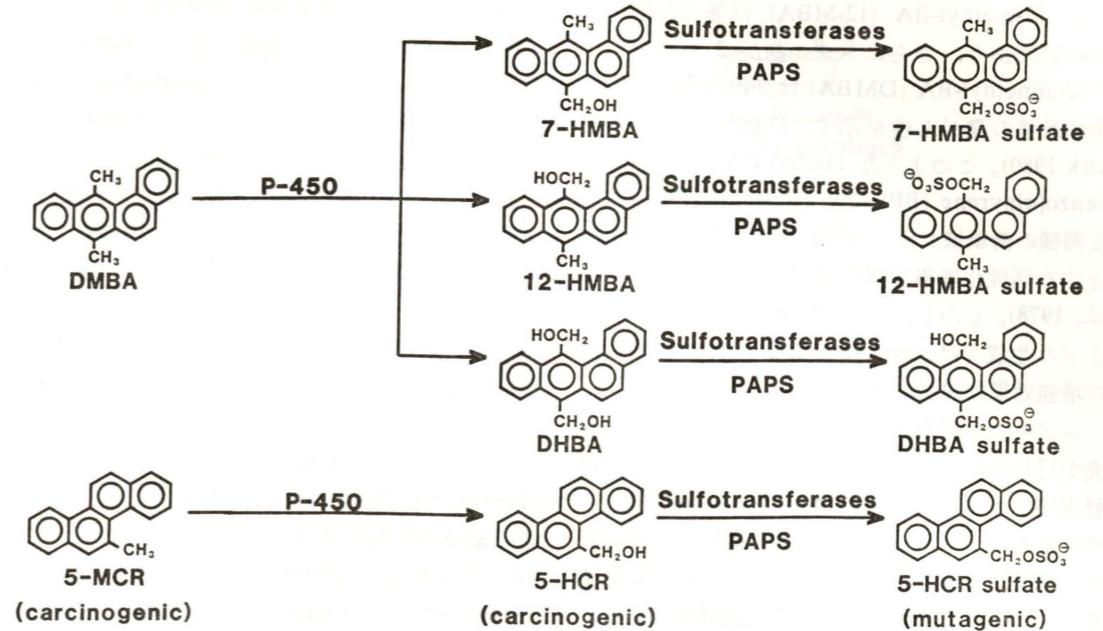


Fig. 2. P-450/sulfotransferase-mediated activation of the potent carcinogens, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 5-methylchrysene.

謝活性化機構に応じた活性化系を添加することがきわめて重要となる。

3. 第 II 相反応による発がん性物質の代謝的活性化

生体内において化学物質は第 I 相酵素により 1 次極性化されたのち、第 II 相酵素により抱合官能基を付与され、水溶性が増大、排泄の過程へと導かれる。第 II 相反応は第 I 相反応で生成した活性代謝物を生体から排泄除去する役割が主であるために、これら無毒化する経路としてのみ理解されがちである。しかし、抱合される化合物の構造によっては、きわめて求電子性に富む抱合体が生成し、抱合官能基の脱離をとめない、生体内求核試薬である DNA と反応する。

硫酸抱合体は発がん性物質を活性化する代表的な抱合体の一つである。ST による活性化機構は Miller らにより精力的に研究され、芳香族ヒドロキシルアミンや芳香族ヒドロキサム酸は ST により反応性に富む *O*-スルホネートを生成することが明らかにされている (Clayson *et al.*, 1976)。発がん性メチルアレーンの P-450 における主代

謝物ヒドロキシメチルアレーンも ST により活性な硫酸エステルへと代謝される。Fig. 2 に我々の研究室で明らかにされたヒドロキシメチルアレーンの代謝活性化機構の例を示す。これらの硫酸抱合体はいずれも硫酸基の脱離をとめない、非酵素的に DNA と反応する。

アセチル抱合 (*N,O*-アセチル転移) は硫酸抱合と競合する活性化機構であり、発がん性物質によってはむしろアセチル抱合の寄与が活性化の点で大きいといわれている。本活性化系の詳細は本誌 (本号) の山添博士 (慶応大・医) による総説を参照いただきたい。ジハロアルカン類はグルタチオン抱合により活性化されることが Guengerich らの研究により証明されている (Dr. Guengerich (Vanderbilt Univ.) 自身により本誌 (本号) 特別講演論文として詳細に紹介されている)。

4. ヒドロキシメチルアレーンのスルホトランスフェラーゼ依存的な活性化と変異原性の発現

Benz[a]anthracene (BA) はきわめて微弱な発がん性しか示さないが、その 7-位あるいは 12-位にメチル基が結合した 7-methyl-BA (7-MBA) お

よび 12-methyl-BA (12-MBA) は強力な発がん性物質であり、さらにメチル基が 2 個結合した 7,12-dimethyl-BA (DMBA) は多環芳香族炭化水素中最強の発がん性を示す (Dipple 1976; Selkirk 1980)。このような methyl-BA 類に関して、benzo[a]pyrene (BP) のラット肝における活性化と同様の湾領域ジオールエポキシドを活性代謝物とする活性化機構が提唱されている (Jerina *et al.*, 1978)。しかし、この湾領域のジオールエポキシドの生成ではメチル基による BA の発がん性の増強効果は説明し得ない。

エポキシド経由の活性化機構の解明に膨大な研究が行われたために、エポキシド以外の代謝物は軽視されがちであるが、methyl-BA 類の側鎖メチル基のヒドロキシメチル基への酸化は、未処置ラット肝においては芳香環の酸化経路に匹敵するかあるいはそれ以上の主たる代謝経路である。すなわち 7-hydroxymethyl-12-methyl-BA (7-HMBA), 12-hydroxymethyl-7-methyl-BA (12-HMBA) および 7,12-dihydroxymethyl-BA (DHBA) あるいは 7-hydroxymethyl-BA (7-

HBA) はそれぞれ対応する DMBA あるいは 7-MBA の発がん性主代謝物である (Sims 1970; Yang *et al.*, 1975)。これら hydroxymethyl-BA 類についてもジオールエポキシドへと代謝されて発がん性を示すことが提唱されてきた。

しかし、hydroxymethyl-BA 類の変異原性を ST による活性化系共存下の場合と P-450 による活性化系共存下の場合で比較すると、hydroxymethyl-BA 類は未処置ラット肝を用いた場合、S9mix 系存在下よりも、肝可溶性画分 (S105)-PAPS 産生系 (ST による活性化系) 存在下においてははるかに強い変異原性を *S. typhimurium* TA98 に対して示した (Fig. 3) (Watabe *et al.*, 1982, 1985a, b), 1986)。また DMBA の未処置ラット肝 S9-NADPH 系存在下を示す変異原性は、さらに上記活性化系に PAPS 産生系を添加することにより増大した (Watabe *et al.*, 1985a)。この結果は変異原性を指標とする限り、hydroxymethyl-BA 類の活性化としては、エポキシドを経る活性化機構よりも ST により硫酸エステルへと代謝される機構の方が重要であることを示している。

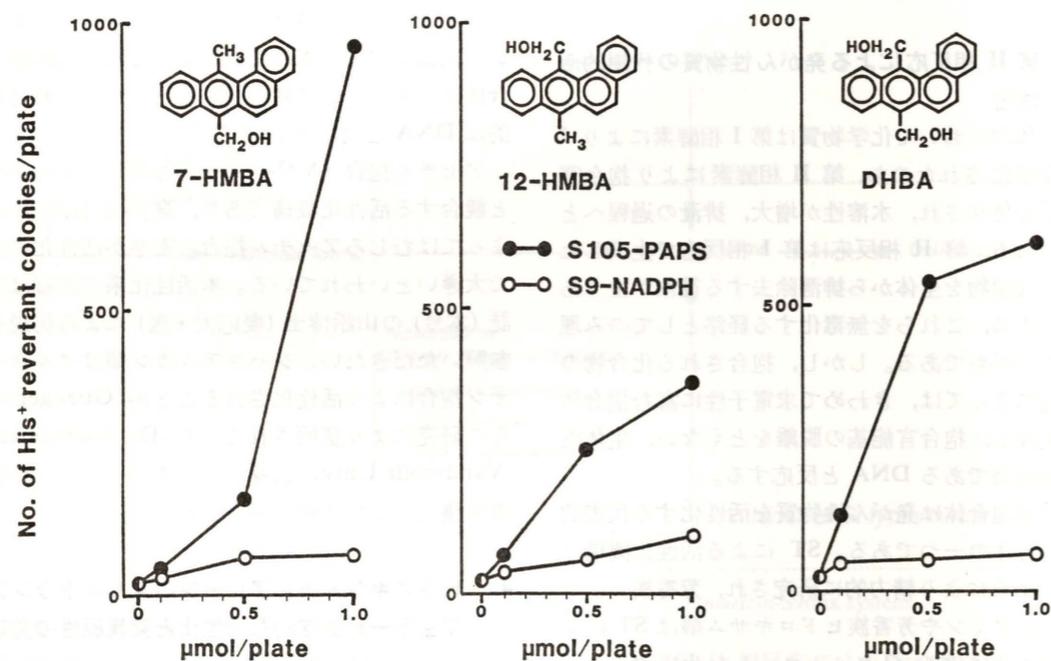


Fig. 3. Mutagenicity of hydroxymethyl derivatives of benz[a]anthracene toward *S. typhimurium* TA98 in the presence of metabolic activation systems. S105 and S9 represent 105,000 and 9,000 xg supernatant fractions of untreated rat liver homogenate.

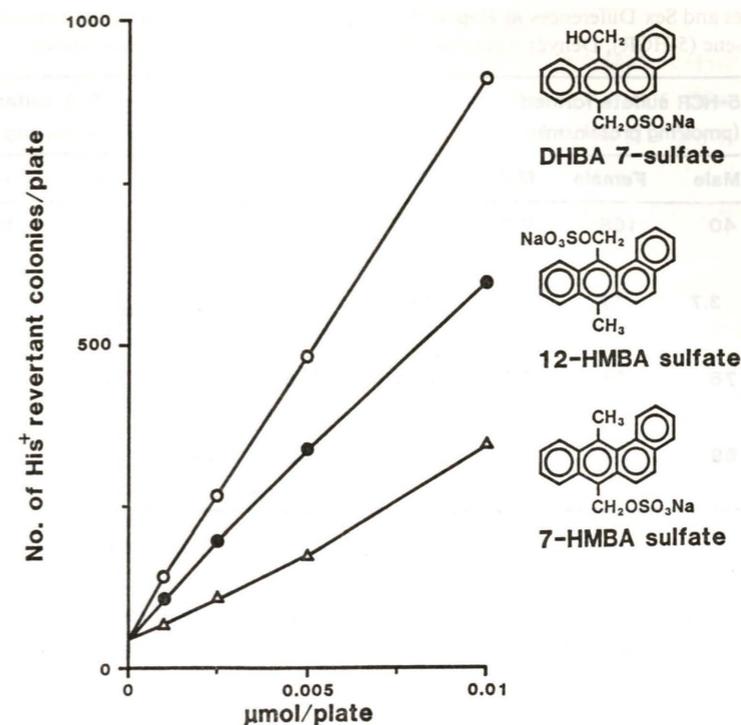


Fig. 4. Intrinsic mutagenicity of hydroxymethyl sulfate esters of methylbenz[a]anthracenes toward *S. typhimurium* TA98.

筆者らは、hydroxymethyl-BA 類の硫酸エステルを上記 S105-PAPS 系より単離し、合成標品と同定した。これらの硫酸エステル類は水中ではきわめて反応性に富み (37°C, pH 7.4 における半減期数分-1 分以内)、強い直接変異原性を示した (Fig. 4)。なお、これら活性な硫酸エステル類は無水 dimethyl sulfoxide (DMSO) などの非プロトン性溶媒中では比較的安定 (4°C で 5-7 日間是不変) であるので、筆者らは硫酸エステルを DMSO 溶液として変異原性試験等に供している。

タバコ煙中に存在する多環状芳香族炭化水素である 5-methylchrysene (5-MCR) は BP に匹敵する発がん性を示すが、BA の場合と同様に、母核である chrysene (CR) の発がん性はきわめて弱い (Dipple, 1976)。5-MCR のラット肝における発がん性主代謝物である 5-hydroxymethyl-CR (5-HCR) はラット肝 S105-PAPS 産生系共存下強い変異原性を *S. typhimurium* TA98 に対して示すが、S9-NADPH 系共存下では殆ど無視し得るほどの変異原性しか示さなかった (Okuda

et al., 1986)。ラット肝 S105-PAPS 系より直接変異原性を有する 5-HCR sulfate が単離された。5-HCR に関して、ST による代謝の方が、P-450 による代謝よりも活性化の点で大きな寄与を得ることが推察されている。

5. Ames 試験法における活性化系の性差

通常 Ames 試験法では雄ラット肝より調製した S9 が薬物代謝酵素源として用いられる。しかし、ある種の薬物代謝酵素の活性や基質特異性には著しい種差、性差が存在することはよく知られている。例えば、ラット、マウスの肝の ST 活性は、アイソザイムによって、異なる著しい性差が存在する (Jakoby *et al.*, 1984; Singer, 1985)。すなわち、phenol 類を良好な基質とする phenol ST (PST) 活性は雄>雌であるのに対して、アルコールや hydroxysteroid 類を良好な基質とする hydroxysteroid ST (HST) 活性は雌>雄である。ST によって活性化される発がん性物質に対する実験動物の発がん感受性と ST 活性の性差、種差

Table 2. Species and Sex Differences in Hepatic Cytosolic Sulfotransferase Activities toward 5-Hydroxymethylchrysene (5-HCR), Dehydroepiandrosterone (DHA) and 4-Nitrophenol (4-NP)

Species ^{a)}	5-HCR sulfate formed (pmol/mg protein/min)			4-NP sulfate formed ^{b)} (pmol/mg protein/min)			DHA sulfate formed ^{b)} (pmol/mg protein/min)		
	Male	Female	M/F	Male	Female	M/F	Male	Female	M/F
Rat (Wistar)	40	168	0.24	197	85	2.3	957	1885	0.51
Mouse (ddy)	3.7	17	0.22	141	173	0.81	0.46	2.27	0.20
Guinea pig (Hartley)	76	85	0.89	432	346	1.25	318	356	0.89
Hamster (Golden)	69	84	0.82	59	40	1.48	497	432	1.15

a) Age (body weight) of the animals — rats : 7 w (180-200 g) ; mice : 7 w (25-30 g) ; guinea pigs : 4 w (240-250 g) ; hamsters : 7 w (80-90 g) .

b) 4-NP (0.1 μmol) or DHA (0.05 μmol) was incubated with hepatic cytosols (2 mg protein) in the presence of PAPS (0.12 μmol) in 0.1 M phosphate buffer (1 ml), pH 7.4, at 37°C for 10-30 min. Phenol and hydroxysteroid sulfotransferase activities were assayed by the methylene blue method.

との相関性が、肝発がん性物質 *N*-hydroxy-acetylaminofluorene (*N*-OH-AAF) に関して詳細に研究されている (DeBaun *et al.*, 1970)。 *N*-OH-AAF は PST アイソザイムで *O*-サルフェートへ活性化されるが、肝における活性化には顕著な種差 (ラット > マウス)、性差 (両種ともに雄 > 雌) が存在することが明らかになっている。この種差および性差は *N*-OH-AAF の *in vivo* における肝タンパク質との結合および肝発がん感受性の種差、性差と良く一致し、ST が *in vivo* において *N*-OH-AAF の活性化に関与する証拠の一つとなっている。同様に著名な肝発がん性物質 *N*-methyl-4-aminoazobenzene (MAB) の近接発がん性物質である *N*-OH-MAB も ST によって活性化されるが、この活性化にも性差 (雄 > 雌) の存在が報告されている (Kadluber *et al.*, 1976)。

ヒドロキシメチルアレーンに対する ST 活性を、5-HCR に対する硫酸抱合能を指標として各種雌雄実験動物肝で測定した (Table 2)。5-HCR に対する ST 活性には、*N*-OH-AAF や *N*-OH-MAB に対する ST 活性において認められた性差とは逆に、ラット、マウスでは雌 > 雄の性差が存在した (Okuda *et al.*, 1989a)。ここで認められた

性差は HST の良好な基質である dehydroepiandrosterone (DHA) に対する ST 活性の性差と良く一致した。なお、我々は、この 5-HCR を活性化する ST は雌ラット肝中には少なくとも 3 種類存在することを明らかにしており、その中で最大の活性を有するアイソザイム STa の単離、精製 (Ogura *et al.*, 1990a) および cDNA クローニングによる一次構造の決定 (Ogura *et al.*, 1990b) に成功している。STa はその阻害剤を用いた研究から HST アイソザイムに属していることを明らかにしている。

したがってヒドロキシメチルアレーンの S105-PAPS 系共存下における変異原性を高感度に検出するには雌ラット肝 S105 を使用することが適当である。実際、発がん性を有する 6-hydroxymethyl-BP は雌ラット肝 S105-PAPS 系共存下において、雄ラット肝 S105-PAPS 系共存下よりもはるかに強い変異原性を示した (Fig. 5)。

6. ヒドロキシメチルアレーンの ST 依存的な DNA 修飾

いままで述べてきたヒドロキシメチルアレーン類はラット肝 S105-PAPS 共存下いずれも仔牛胸

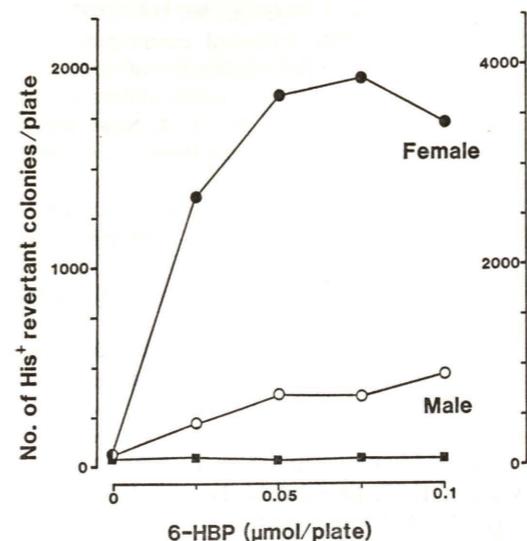


Fig. 5. Sex difference in mutagenicity toward *S. typhimurium* TA98 of 6-hydroxymethylbenzo[a]pyrene in the presence of rat liver S105-PAPS system. Open and closed circles: each mixture consisting of female (closed circles) and male (open circles) rat liver S105s (equivalent to 50 mg of liver wet weight), PAPS (0.6 μmol), and 6-hydroxymethylbenzo[a]pyrene (6-HBP) dissolved in DMSO (0.1 ml) was incubated with an overnight culture (0.1 ml) of *S. typhimurium* TA98 (10^8 cells) at 37°C for 20 min in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (0.8 ml), diluted with soft agar and poured onto hard agar plates to count His revertant colonies after incubation at 37°C for 48 hr. Closed squares: each mixture consisting of female rat liver S105 and 6-HBP was incubated with *S. typhimurium* TA98 in the absence of PAPS under the aforementioned conditions.

腺 DNA を修飾するとともに、これらの硫酸エステル類も DNA と非酵素的に高率に反応した。7-HMBA (Watabe *et al.*, 1985c), DHBA (Watabe *et al.*, 1987), および 5-HCR (Okuda *et al.*, 1989b) の各硫酸エステルにより修飾を受けた仔牛胸腺 DNA を分析したところ、上記の硫酸エステル類はいずれも DNA の両プリン塩基の環外アミノ基と選択的に結合していることが明らかになった。Hydroxymethyl-BA 類の硫酸エステルは guanine と選択的に結合しているのに対して、5-HCR sulfate は adenine と選択的に結合していた。

7. まとめ

以上述べてきた様に、いわゆる Ames 試験法の限界は、活性化系として S9mix を使用するために、活性化される変異・発がん性物質は第 I 相反応により活性化されるもののみである点である。第 II 相反応により活性化される変異・発がん性物質を検出するためにはそれに適合する活性化系を新たに追加する必要がある。膨大な数にのぼる新規化学物質の全てを各種の第 II 相反応による活性化系共存下で試験することは非常に困難であろう。しかし、現在では薬物代謝研究の進歩により、化学物質の構造から、高い確率でその代謝活性化経路を予測できる時代となっている。したがって、第 II 相反応による活性化が予測されるときにはその第 II 相反応系を追加して Ames 試験を行うことが今後要求されるであろう。その際、筆者らの ST による活性化の研究からも明らかのように、雄ラット肝のみならず、雌雄各種実験動物の肝や肝以外の臓器の S9 や S105 の使用も検討する必要があると思われる。Ames 試験を単にガイドラインに定められたプロトコールに従った試験にしてしまうのではなく、一歩踏み込んで、代謝活性化系の中味に変化をもたせて、*S. typhimurium* TA 株の優れたバイオ検出器としての役割を引き出していきたい。

参考文献

- Clayson, D. B. and R. C. Garner (1976) Carcinogenic aromatic amines and related compounds, In: C. E. Searle (Ed.), Chemical Carcinogens, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 366-461.
- DeBaun, J. R., E. C. Miller and J. A. Miller (1970) *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluorene sulfotransferase: Its probable role in carcinogenesis and in protein-(methionine-S-yl) binding in rat liver, *Cancer Res.*, **30**, 577-595.
- Dipple, A. (1976) Polynuclear aromatic hydrocarbons, In: C. E. Searle (Ed.), Chemical Carcinogens, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 245-314.
- Jakoby, W. B., M. W. Duffel, E. S. Lyon and S. Ramaswamy (1984) 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.

ワークショップ「いわゆる Non-mutagenic Carcinogen をめぐる諸問題」

活性酸素研究の立場から

国立がんセンター研究所 生物学部 葛西 宏

1. はじめに (8-ヒドロキシグアニンの発見とその意義)

ヒト癌の原因の大半が環境因子であるという疫学的研究結果から我々癌研究者はその原因物質をあらゆる手段を投じて探し出さなければならない。これまでの化学発癌研究の歴史を振り返ってみると Kennaway らの実験ではマウスの皮膚への塗布による長期の発癌試験を行いながらコールタール (ピッチ) 中の発癌物質の分離精製を行い10年以上もの歳月を費やしてベンツピレンの単離に成功している (1933)。近年にいたり Ames 法などの短期試験の普及により突然変異原物質の Assay 法が著しく簡便になり、その結果多くの研究者が環境中の“発癌物質”を捕らえる事に成功している。しかしそれらは飽くまでも発癌候補物質であり必ずしも発癌性があるとは限らない。一方 Ames 法などでは検出できない発癌物質もある。このギャップはどうすれば埋める事が出来るであろうか。一つの解決法はこれまで誰も行わなかった新しい検出方法を試すことであろう。

多くの発癌物質はそのままの形で、あるいは代謝活性化を受けた後に DNA と反応する事が分かっている。DNA 成分の中でもグアニンが最も発癌物質と反応しやすい。この事に着目し我々は1982年頃からグアニン誘導体の付加体 (Adduct) 分析による化学的な変異原物質、発癌物質の検出・同定法の研究を開始した。一つの方法はグアニンの糖部分に強い蛍光を発する化合物を結合させ、高感度に Adduct を検出する方法である。この方法によりグリオキサール、メチルグリオキサール、AF-2, 4NQO などの変異原を Ames

法と同程度の感度で検出できた (Kasai *et al.*, 1984)。一方、抽出物中の未知変異原の同定にもこの Adduct 分析は威力を発揮する。サルモネラ菌 TA100 に対し変異原性を示す加熱グルコース中の直接変異原 (direct mutagen) の正体を明らかにするために、イソプロピリデングアニシン (IPG) と加熱グルコースを反応させ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により Adduct を分析したところ、グリオキサール・IPG および 8-ヒドロキシン・IPG の2種類の Adduct が形成されている事が分かった。この実験で見出されたグアニンの C-8 位の水酸化反応はこれまでに報告されていない新しいグアニンの修飾反応であったため、その生成機構、突然変異との関係について興味もたれた。デオキシグアニシンをモデル化合物として何が 8-ヒドロキシデオキシグアニシン (oh⁸dG) の生成に有効であるかを調べたところ、活性酸素 (Active Oxygen) がこの反応に関与している事が分かった (Kasai and Nishimura, 1984) (Fig. 1)。DNA でも同じ反応が起こった。活性酸素は放射線発癌において DNA 損傷を起こす本体であり、また活性酸素が酸素の代謝により生体内で絶えず発生している事から、近年、自然発生癌や老化との関連で注目されている。我々はもともと活性酸素をねらって研究していた訳けでもなく、この未知変異原によるグアニン・Adduct の解析により偶然この活性酸素による DNA 損傷を見出したのである。後に述べる通りこの 8-ヒドロキシグアニン (oh⁸Gua) は様々な物質により細胞内 DNA 中にも生じる。特にこのワークショップのテーマである Non-genotoxic Carcino-

- acetyltransferase, *J. Biochem.*, **99**, 1689-1697.
- 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.
- Sims, P. (1970) Studies on the metabolism of 7-methylbenz[a]anthracene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and its hydroxymethyl derivatives in rat liver and adrenal homogenates, *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2261-2275.
- Singer, S. S. (1985) Preparation and characterization of the different kinds of sulfotransferases, In: D. Zakim and D. A. Vessay (Eds.), *Biochemical Pharmacology and Toxicology*, vol. 1, Wiley-Interscience Publication, New York, pp. 95-159.
- Watabe, T., T. Ishizuka, M. Isobe and N. Ozawa (1982) A 7-hydroxymethyl sulfate ester as an active metabolite of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene, *Science*, **215**, 403-405.
- Watabe, T., T. Ishizuka, T. Fujieda, A. Hiratsuka and K. Ogura (1985a) 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., 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. Fujieda, A. Hiratsuka, T. Ishizuka, Y. Hakamata and K. Ogura (1985c) 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., Y. Hakamata, A. Hiratsuka and K. Ogura (1986) A 7-hydroxymethyl sulphate ester as an active metabolite of the carcinogen, 7-hydroxymethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*, **7**, 207-214.
- 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.
- Yang, S. K. and V. D. William (1975) Metabolic pathways of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in hepatic microsomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 2601-2605.
- 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' O (Eds.), *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Academic Press, New York, pp. 173-188.
- Kadlubar, F. F., J. A. Miller and E. C. Miller (1976) Hepatic metabolism of *N*-hydroxy-*N*-methyl-4-aminoazobenzene and other *N*-hydroxyarylamines to reactive sulfuric acid esters, *Cancer Res.*, **36**, 2350-2359.
- Kerklaan, P. R. M., C. E. M. Zoetemelk and G. R. Mohn (1985) Mutagenic activity of various chemicals in *Salmonella* strain TA100 and glutathione deficient derivatives. On the role of glutathione in the detoxification or activation of mutagens inside bacterial cells, *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2151-2156.
- Ogura, K., T. Sohtome, A. Sugiyama, H. Okuda, A. Hiratsuka and T. Watabe (1990a) Rat liver hydroxysteroid sulfotransferase (sulfotransferase a) catalyzing the formation of reactive sulfate esters from carcinogenic polycyclic hydroxymethylarenes, *Mol. Pharmacol.*, **37**, 848-854.
- Ogura, K., J. Kajita, H. Narihata, T. Watabe, S. Ozawa, K. Nagata, Y. Yamazoe and R. Kato (1990b) 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**, 1494-1500.
- Okuda, H., A. Hiratsuka, H. Nojima and T. Watabe (1986) A hydroxymethyl sulphate ester as an active metabolite of the carcinogen, 5-hydroxymethylchrysene, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 535-538.
- Okuda, H., H. Nojima, N. Watanabe and T. Watabe (1989a) 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.
- Okuda, H., H. Nojima, K. Miwa, N. Watanabe and T. Watabe (1989b) 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.
- Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki and R. Kato (1986) *N*-Hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase in hamster liver: Identity with arylhydroxamic acid *N,O*-acetyltransferase and arylamine *N*-

〒104 東京都中央区築地 5-1-1

From viewpoint of active oxygen research—

Hiroshi Kasai

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

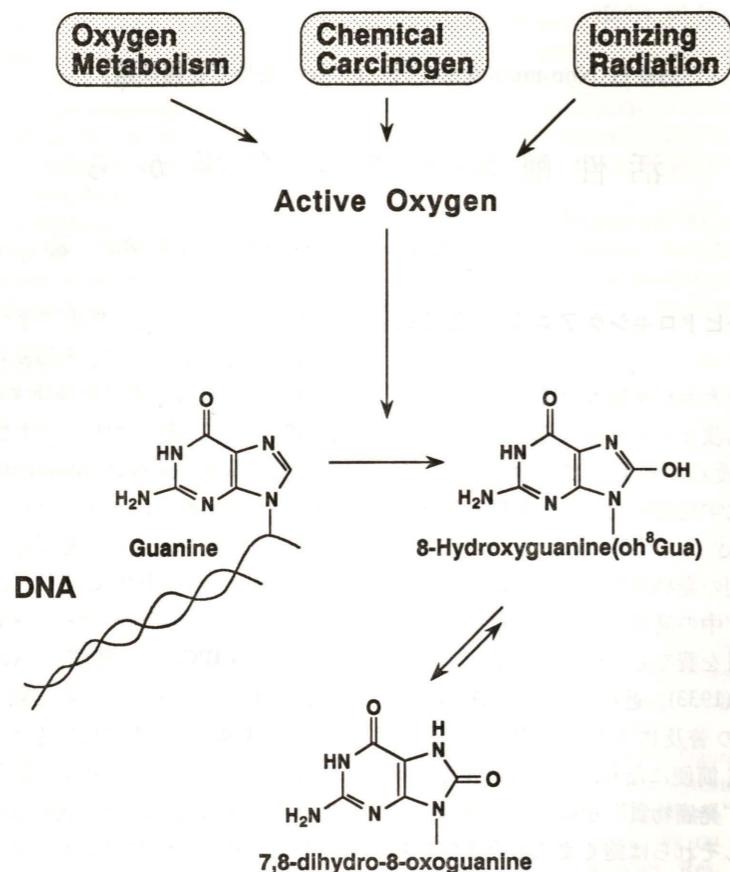


Fig. 1. 活性酸素による 8-ヒドロキシグアニンの生成。

gen のいくつかはラットへの経口投与後、発癌標的臓器 DNA 中に oh⁸Gua を生成させた。従ってこの活性酸素こそ Non-genotoxic Carcinogen の発癌機構を探る上で重要な研究テーマかも知れない。これまで発癌研究の歴史の中で、活性酸素はごく少数の研究者によって研究されたに過ぎない。それは活性酸素が不安定で捕らえ難く、その検出のためには ESR などのごく限られた手段に頼らざるを得なかったためであろう。我々の見出した oh⁸Gua は HPLC に接続した電気化学検出器 (ECD) により、DNA 鎖切断やチミングリコールよりも容易に高感度分析ができるので生体内の酸化 DNA 損傷のマーカーとして今後多くの研究者によって利用される可能性がある。

2. 8-ヒドロキシグアニンの生成と修復

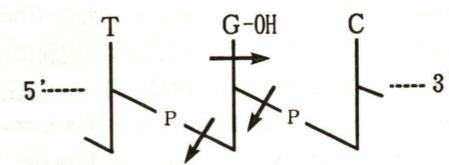
これまでの研究により oh⁸Gua は X 線 (Kasai

et al., 1984)、アスベストと H₂O₂ の共存 (Kasai and Nishimura, 1984)、タバコの煙濃縮物 (Kasai and Nishimura, 1991)、嚙みタバコ (Nair *et al.*, 1987)、ニッケル化合物 (Kasprzak and Hernandez, 1989) などのヒト発癌に関連すると思われる因子を *in vitro* で DNA に作用させる事により生じる事が分かった。Floyd らによって開発された HPLC-ECD による oh⁸Gua の分析法 (Floyd *et al.*, 1986) は特に細胞内 DNA を分析する際に威力を発揮する。通常 1-2 A₂₆₀ Unit の DNA (50-100 μg) があれば 100 万ヌクレオチドに 1 分子の oh⁸Gua を検出できる。腎発癌物質として知られる臭素酸カリウム (KBrO₃) をラットに投与する事により腎 DNA に特異的に oh⁸Gua が生成することが分かった (Kasai *et al.*, 1987)。発癌性を示さない酸化剤、NaClO や NaClO₂ を投与したときには DNA 中の oh⁸Gua の生成は見られな

かった。他にも Ciprofibrate (Kasai *et al.*, 1989) や Simfibrate (Takagi *et al.*, 1989) などのペルオキシゾーム増殖剤 (肝)、2-ニトロプロパン (肝) (Fiala *et al.*, 1989)、Fe-ニトリロ三酢酸 (腎) (Umemura *et al.*, 1990)、1,6-ジニトロピレン (乳腺) (Djuric and Potter, 1990)、コリン欠乏飼料 (肝) (Hinrichsen *et al.*, 1990; Nakae *et al.*, 1990) などの発癌因子によりラット標的臓器 DNA 中に oh⁸Gua の生成が認められた。これらの結果の多くは 2 日-1 週間程度の短期実験によって得られており、活性酸素を発生する発癌物質の新しいスクリーニング法として有望である。以上の結果から細胞内 DNA 中の oh⁸Gua の生成は発癌と何らかの関係があることが示唆された。

しかし一方で oh⁸Gua は正常細胞にもかなりの量 (1-2/10⁸ dG) 存在すること、また上記実験では極めて多量の発癌剤が投与されていること等から artifact の可能性も完全には否定できなかった。DNA に修飾が起こった場合それは細胞にとって何らかの障害になるはずであり、細胞はそれを修復する必要がある。従って、oh⁸Gua が本当に生物学的に意味のある DNA 損傷であれば、細胞は oh⁸Gua に対する修復酵素を持っているはずである。我々はマウスの γ 線照射により生じた肝 DNA 中の oh⁸Gua が時間の経過とともに減少する事を見出した (Kasai *et al.*, 1986)。この事からマウス肝には oh⁸Gua に対する修復酵素が存在する事が示唆された。我々は oh⁸Gua を一ヶ所に含む DNA を化学合成し、5' または 3' 末端を ³²P でラベルし、二本鎖 DNA とし、これを基質として用いる事により、大腸菌から oh⁸Gua エンドヌクレアーゼ (oh⁸Gua の位置で DNA 鎖を切断する酵素) を精製した (Chung *et al.*, 1990)。Maxam-Gilbert 法による DNA 塩基配列分析のゲルパターンとの比較から DNA 鎖は Fig. 2A に示した位置で切れている事が分かった。またこの oh⁸Gua エンドヌクレアーゼは oh⁸Gua 塩基を DNA から遊離させる活性 (グリコシラーゼ活性) も同時にもっていた (Tchou *et al.*, 1991)。従って修復機構としては oh⁸Gua が遊離して生じた AP (脱プリン) 部位の 5' 側および 3' 側で DNA 鎖が切れた事になる。同様の oh⁸Gua エンドヌク

A) *E. coli*



B) Mammalian

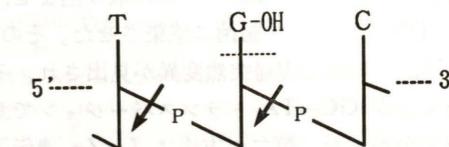


Fig. 2. oh⁸Gua エンドヌクレアーゼの修復機構。

ラーゼ活性は哺乳動物細胞にも検出されたが、DNA 切断位置が Fig. 2B に示された様に大腸菌の場合とは異なっていた (Yamamoto *et al.*, 1992)。いずれにせよ大腸菌および哺乳動物細胞には DNA 中の oh⁸Gua を特異的に修復する酵素が存在する事から oh⁸Gua の生成は artifact ではなく実際に細胞内で起こっておりそれが細胞にとって有害なものである事が分かった。

ここで見出された大腸菌の oh⁸Gua エンドヌクレアーゼはこれまでに報告されているエンドヌクレアーゼ III, IV などとは性質が異なっていたが、開環グアニン (Fapy) を修復する Fapy グリコシラーゼとはあらゆる点で良く似ていた。その後の研究により、実際に Fapy グリコシラーゼにより DNA から oh⁸Gua が遊離する事、oh⁸Gua の部位で DNA 鎖の切断が起こる事が分かり、oh⁸Gua エンドヌクレアーゼは Fapy グリコシラーゼと同一酵素である可能性が強まった (Tchou *et al.*, 1991)。

3. 8-ヒドロキシグアニンによる突然変異の機構

DNA 中の oh⁸Gua が突然変異を起こすかどうかは発癌との関連で極めて興味深い問題である。例えば同じ活性酸素による DNA 損傷の中でも 5-ヒドロキシメチルウラシルはフェージ DNA 中に多量に存在し突然変異を起こさない事が分かっている。これまでの幾つかのグループによる研究から DNA 中の oh⁸Gua は GC→TA トランスポージョンを起こす事が明らかになった (Wood

et al., 1990; Shibutani et al., 1991; Moriya et al., 1991)。ここではワシントン大の Cheng と Loeb が我々と共同で行った二つの実験について紹介する (Cheng et al., 1992)。第一の方法では、化学合成した oh^8dGTP をエキソヌクレアーゼ活性を欠いた DNA ポリメラーゼ I (exo⁻ DNA pol I) を用いて強制的に M13 DNA の lacZ α 遺伝子中の特定の位置一ヶ所に取り込ませ、二本鎖 DNA の形で大腸菌に感染させた。その結果、0.7% の頻度で復帰突然変異が見出され、そのほとんどが GC \rightarrow TA 転写エラーであることが分かった。第二の方法は LacZ α 遺伝子の特定の領域にかけてギャップを作り、dATP, dCTP, dTTP および高濃度の oh^8dGTP (100 倍量) の存在下で Exo⁻ pol I を用いて DNA 合成を行わせ、その領域の様々な部位に oh^8Gua を取り込ませた M13 ファージを作製し、大腸菌に感染させて得られる β -ガラクトシダーゼの活性の失われた変異株 (白色または淡青色のプラーク) を調べる方法 (forward mutation assay) である。その結果 16% の頻度で突然変異が見出され、内訳は 97% が AT \rightarrow CG であり 3% が GC \rightarrow TA であった。前者は *in vitro* の DNA 合成中に oh^8dGTP が dTTP の代わりに A と塩基対を作る形で取り込まれたために生じ、また後者は G の代わりにプラスミド DNA 中に取り込まれた oh^8Gua が大腸菌中で複製するときに読み間違いを起こしたため生じたと考えられる。これらの突然変異の機構としてはいずれの場合にも oh^8Gua が 8-ケト型および syn 型構造を取る事により A と Hoogsteen 型塩基対を形成したために起こったと考えられる (Fig. 3)。

上に述べた oh^8Gua による突然変異、GC \rightarrow TA および AT \rightarrow CG 転写エラーは実際に自然界で起こっているのであろうか。最近の研究により、GC \rightarrow TA を引き起こすミューター座位 *mutM* は Fapy グリコシラーゼ (oh^8Gua エンドヌクレアーゼ) 遺伝子と一致する事が分かった (Michaels et al., 1991)。すなわち oh^8Gua 修復酵素の欠損によって GC \rightarrow TA 転写エラーが増加することがわかり、大腸菌の自然誘発突然変異に oh^8Gua が深く関わっている事が判明

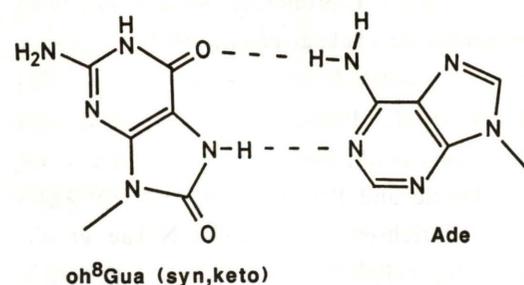


Fig. 3. 8-ヒドロキソグアニン (ケト型, syn 型) とアデニンの塩基対形成。

した。一方、AT \rightarrow CG 転写エラーを引き起こすミューター座位 *mutT* も知られている。最近の研究によりこの *mutT* タンパクは oh^8dGTP を加水分解するフォスファターゼである事が分かった (Maki and Sekiguchi, 1992)。このタンパクの存在により、ヌクレオチドプール中に生じた oh^8dGTP が DNA 中に取り込まれるのを防いでいるらしい。このことから oh^8dGTP が dTTP の代わりに DNA 中に取り込まれる突然変異の機構も自然界に存在するらしい。発癌過程ではどうであろうか。ニッケル化合物投与により生じたラット腫瘍の *K-ras* 遺伝子の DNA を調べたところ 16 例中 11 が 12 番目のコドンの所で GC \rightarrow TA 転写エラーを起こしている事から oh^8Gua が関与している可能性が考えられる (Kasprzak et al., 1990)。またヒト肺癌および肝癌の p53 癌抑制遺伝子では高頻度で GC \rightarrow TA 転写エラーが見出されており、これらにも oh^8Gua が関与している可能性が考えられる (Hollstein et al., 1991)。しかし γ 線による CHO 細胞の *aprt* 遺伝子の点突然変異のうち、 oh^8Gua 型の GC \rightarrow TA 転写エラーは 14% に過ぎず (Meuth, 1990)、他の突然変異のメカニズムについては不明な点が多い。

4. おわりに

我々の加熱グルコースの例が示した通り、環境中には活性酸素を発生する化合物が多数存在すると思われる。Ames からもサルモネラ菌 TA102, TA104 等を用いた研究により環境変異原としての活性酸素の重要性を指摘している。KBrO₃ や

ペルオキシゾーム増殖剤の例で示された通り、化学物質そのものは活性酸素を発生せず、腎 (前者) または肝ペルオキシゾーム (後者) に到達した後に初めて活性酸素を発生する機構が存在する事が分かった。従ってこれらの発癌物質の検出には実験動物を用いた短期試験が最適であろう。事実、国立衛生試験所の黒川ら及び他の多くの研究者により Non-genotoxic Carcinogen に関して、 oh^8Gua の分析が精力的におこなわれている。この“ oh^8Gua 法”も Ames 法などを補足する形で短期試験の一つとして取り入れればという意見もあるが、現時点ではデータの蓄積が未だ不十分であろう。今後、さらに Non-genotoxic Carcinogen について oh^8Gua の分析を継続するとともに、ヒト発癌についても尿や血液の試料に関して oh^8Gua の分析を行い活性酸素の関与を調べてゆく必要がある。

参考文献

- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L. A. Loeb (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G \rightarrow T and A \rightarrow C substitutions, *J. Biol. Chem.* in press.
- Chung, M. H., H. Kasai, D. S. Jones et al. (1990) An endonuclease activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA, *Mutation Res.*, **254**, 1-12.
- Diuric, Z and D. W. Potter (1990) Oxidative DNA damage by 1,6-dinitropyrene *in vivo*. Proceedings of 81st Annual Meeting of the AACR, **31**, 146.
- Fiala, E. S., C. C. Conaway and J. E. Mathis (1989) Oxidative DNA and RNA damage in the liver of sprague-dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane, *Cancer Res.*, **49**, 5518-5522.
- Floyd, R. A., J. J. Watson, P. K. Wong, D. H. Altmiller and R. C. Rickard (1986b) Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: Sensitive detection and mechanisms of formation, *Free Radicals Res. Commun.*, **1**, 163-172.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991) p53 Mutations in human cancers, *Science*, **253**, 49-53.
- Hinrichsen, L. I., R. A. Floyd and O. Sudilovsky (1990) Is 8-hydroxydeoxyguanosine a mediator of carcinogenesis by a choline-devoid diet in the rat liver, *Carcinogenesis*, **11**, 1879-1881.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984a) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137-2145.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984b) DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide, *Gann*, **75**, 841-844.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1991) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance, In: Sies H (ed.), *Oxidative Stress, Oxidant and Antioxidants*, Academic Press Ltd., p. 99-116.
- Kasai, H., H. Hayami, Z. Yamaizumi, H. Saito and S. Nishimura (1984a) Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2127-2136.
- Kasai, H., H. Tanooka and S. Nishimura (1984b) Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation, *Gann*, **75**, 1037-1039.
- Kasai, H., P. F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair, *Carcinogenesis*, **7**, 1849-1851.
- Kasai, H., S. Nishimura, Y. Kurokawa and Y. Hayashi (1987) Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA, *Carcinogenesis*, **8**, 1959-1961.
- Kasai, H., Y. Okada, S. Nishimura, M. S. Rao and J. K. Reddy (1989) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator, *Cancer Res.*, **49**, 2603-2605.
- Kasprzak, K. S. and L. Hernandez (1989) Enhancement of hydroxylation and deglycosylation of 2'-deoxyguanosine by carcinogenic nickel compounds, *Cancer Res.*, **49**, 5964-5968.
- Kasprzak, K. S., K. Higinbotham, B. A. Diwan, A. O. Perantioni and J. M. Rice (1990) Correlation of DNA base oxidation with the activation of K-ras oncogene in nickel-induced renal tumors, *Free Rad. Res. Commun.*, **9** (Suppl. 1), 172.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992) Mut T protein specifically hydrolyzes 8-oxodGTP, a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature*, in press.
- Meuth, M. (1990) The structure of mutation in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1032**, 1-17.
- Michaels, M. L., L. Pharm, C. Cruz and J. H. Miller (1991) Mut M, a protein that prevents G \cdot C \rightarrow T \cdot A transversions, is formidopyrimidine-DNA glycosylase, *Nucl. Acids Res.*, **19**, 3629-3632.
- Moriya et al. (1991) Site-specific mutagenesis using

- a gapped duplex vector: a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*, *Mutation Res.*, **254**, 281-288.
- Nair, U. J., R. A. Floyd, J. Nair, V. Bussachini, M. Friesen and H. Bartsch (1987) Formation of reactive oxygen species and of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA in vitro with betel quid ingredients, *Chem. Biol. Interact.*, **63**, 157-169.
- Nakae, D., H. Yoshiji, H. Maruyama, T. Kinugasa, A. Denda and Y. Konishi (1990) Production of both 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA and 7-glutamyltransferase-positive hepatocellular lesions in rats given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 1081-1084.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1990) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431-434.
- Takagi, A., K. Sai, T. Umemura, R. Hasegawa, Y. Kurokawa and H. Kasai (1989) Production of 8-hydroxydeoxyguanosine in rat liver DNA by oral administration of peroxisome proliferators, *Igaku no Ayumi*, **149**, 65-66.
- Tchou, J., H. Kasai, S. Shibutani, M. H. Chung, J. Laval, A. P. Grollman and S. Nishimura (1991) 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 4690-4694.
- 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 nitrilotriacetate (Fe-NTA), *Carcinogenesis*, **11**, 345-347.
- Wood, M. L., M. Dizdaroglu, E. Gajewski and J. M. Essigmann (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: Genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome, *Biochemistry*, **29**, 7024-7032.
- Yamamoto, F., H. Kasai, M. H. Chung, E. Ohtsuka, T. Hori and S. Nishimura (1992) Ubiquitous presence in mammalian cells of enzymatic activity specifically cleaving 8-hydroxyguanine containing DNA, *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.

ワークショップ「いわゆる Non-mutagenic Carcinogen をめぐる諸問題」

発がん性試験実施の立場から

国立衛生試験所安全性生物試験研究センター毒性部 黒川 雄二

1. Non-genotoxic carcinogen の出現から現在まで

発がん性試験の歴史を見ると、先ず 1930 年代から 1960 年代にかけて強力な変異原性を有する(その後明らかとなったわけだが) 発がん物質(芳香族炭化水素, 芳香族アミン, 芳香族アゾ化合物, 脂肪族化合物, N-ニトロ化合物など)が合成され, 専ら種々の標的臓器における発がん実験モデルを作成することを目的として, 比較的少数の動物を用いた短期の試験が行なわれた。1970年代に入り Ames test が導入され, 上記の既知発がん物質と変異原性の間に極めて高い相関関係が認められたことが, 発がんの研究者間にもしかすると動物を用いなくとも発がん性が予知可能ではないかという, 一種の楽観的な期待感を抱かせた事実は未だに記憶に新しいところである(小田嶋, 橋本, 1978)。

一方, 1975年頃から環境化学物質の発がん性検索の為に多数の動物を用いる長期の試験が米国国立癌研究所(NCI)を皮切りに世界的に開始された。その当初は変異原性を有する物質が優先的に選ばれ試験されていたが, 次第に生産量, 使用量, 暴露量などのような環境的な要素にもとづいて被験物質が選択されるようになった。その傾向は昭和 45 年に小田嶋成和先生(当時国立衛生試験所薬品病理部長)によって開始された厚生省がん研究助成金による組織的な班研究の課題名の変遷を見ると極めて明らかである(厚生省, 1987-1990)。即ちそれらは, 「化学物質の癌原性発現条件に関する研究」(昭和 45~47 年), 「化学物質の

癌原性検索法の確立」(昭和 48~49 年), 「突然変異原性物質の動物発癌テストに関する研究」(昭和 50~55 年), 「環境化学物質の動物発がん試験に関する研究」(昭和 56~57 年), 「長期動物実験による環境化学物質の発がん性評価に関する研究」(昭和 58~61 年), 「発がん物質の規制決定に関する基礎的研究」(昭和 62~平成元年), 「環境化学物質による発がん修飾の評価に関する研究」(平成 2 年~)と変化している。即ち, 動物を用いる発がん性試験に関する方法論の詳細な検討が先ず行なわれ, それに基づく変異原性物質の発がん性試験がなされたのが第 1 期であろう。第 2 期には, 変異原性とは関わりなくヒトの環境要因として重要な化学物質(医薬品, 食品添加物, 農薬など)が被験物質として選択され発がん性の検索が行なわれた。現在は第 3 期ともいべき段階で, 続々と出てきたこれらの環境化学物質の発がん性試験結果を如何にヒトの発がん要因として考えるか, いわゆるリスクアセスメントの時代になっている。そして今後は, 発がん性を修飾する要因に眼が向けられて行くようである。

この様な状況の下に次第に non-genotoxic carcinogen の存在が明らかになってきたのである。1980 年代初頭には米国 EPA 及び何人かの発がん研究者の間から, 発がん物質を大きく genotoxic と non-genotoxic の 2 つに分類する提案がなされた(Perera, 1984)。これは端的にいえば, genotoxic carcinogen には threshold が存在しないが, non-genotoxic carcinogen にはそれが存在するとして, リスクアセスメントをその点から分け

〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

From the View Point of Carcinogenicity Testing

Yuji Kurokawa

Division of Toxicology, National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagayaku, Tokyo 158, Japan

で行なおうとするものであったが、non-genotoxic carcinogen の発がん機構がはっきりと分からないうちは不可能であるという結論に達している。

しかしながら non-genotoxic carcinogen という言葉がかなり広く使われだし、それに対する関心が高まってきたのはごく最近の事である。シンポジウムとしては、'Conference on Non-mutagenic Carcinogens' と題して 1986 年に英国で 5 日間にわたって開催されたものが最初であり、筆者は唯一の日本人として出席する機会があった(黒川, 1986)。冒頭からいわゆる非変異原性発がん物質を何と表現するかという言葉の問題で揉め、non-mutagenic, non-genotoxic, epigenetic の 3 派に分かれてのかなり激しい討論があったが、未だに決着はついておらず現在でもこの 3 つの言葉が適当に使われているようである(筆者はこの論文中では一応 non-genotoxic に統一しておいた)。印象的だったのは、製薬会社及び行政関連の人が 6 割を占めていたことで、そのせいも前述したように特に non-genotoxic carcinogen のリスクアセスメントを従来の genotoxic carcinogen と同様にすべきか否かが最大の関心事であった。まとまった monograph としては筆者の知る限りでは、1987 年に出版された 'Nongenotoxic Mechanism in Carcinogenesis' ではないかと思う(Butterworth & Slaga, 1987)。これらの動きを踏まえて、1987 年度から 2 年間の厚生省がん研究助成金研究班「変異原性を持たない物質による動物発がんとその評価」が組織され、ペルオキシゾーム増殖剤、腎毒性物質が活性酸素による DNA 傷害を生ずること、ウラシルが細胞増殖を刺激することなどが見いだされた。この班研究は更に 1989 年から 2 年間「非変異原性発がん物質の発がん機構における活性酸素の関与に関する研究」として継続され、現在は「環境化学物質による活性酸素の関与した発がんとその修飾」となっている。最も最近では昨年 6 月にベルギーで 2 日間開催された 'Early Indicators of Non-genotoxic Carcinogenesis' がある。このワークショップの目的はその題が示す如く変異原性試験で陰性である物質から、何とか他の方法(今回は病理組

織学的な指標を用いたものが多かったが)で non-genotoxic carcinogen を早期に検索しようというものである(Sobels, 1991)。参加しての印象では、86年の時と同じように科学的見地からの研究に基づき、なるべく早く non-genotoxic carcinogen のリスクアセスメントの方法論を確立したいという願いが強くていた。

2. 米国 National Toxicology Program (NTP) の発がん性試験における non-genotoxic carcinogen

一方、米国 NCI に始まった環境化学物質の発がん性試験は、1978年に米国国立環境保健科学研究所(NIEHS)が中心となり更に大規模なものとなった。それらの試験結果を化学構造、変異原性、発がん性の 3 点から解析した論文が先ず 1988 年に 222 物質について出され、発がん性陽性であった物質の中の約 3 分の 1 がサルモネラを用いた復帰突然変異原性試験で陰性で、しかも DNA との化学的反応基を持たないという事実が明らかとなって注目を浴びた。NTP ではこれらを novel chemical carcinogen と名付けている(Ashby & Tennant, 1988)。1991 年には更に物質数が増えて 301 となりそれらについて同様の解析をした大論文が出された(Ashby & Tennant, 1991)。

それによると発がん性に関しては、動物種、性、標的臓器の 3 面からグループ A~F の 6 段階に分類している。グループ A はラット(F344)、マウス(B6C3F1)の 2 種の単一あるいは両性の 1 ヶ所以上の臓器に発がん性を示す最も強力とみなされるものであり、B から D にかけてその程度が弱くなっている。総被験物質 301 のうち A から D に属する 162 (54%) が発がん性を有すると結論された物質である。その中で Ames test 陰性の物質は実に 71 (44%) に達する。しかし発がん性の強度によって分けてみると、Ames test 陰性物質はグループ A では 30%、グループ B から D までをまとめると 57% であり、non-genotoxic carcinogen の方がより弱い発がん性を示すことがうかがえる。

発がん性の面から興味深いことは変異原性と発がん標的臓器の間の関係がかなり明らかに認めら

れたことである。non-genotoxic carcinogen の標的臓器としては第一にマウスの肝臓が上げられる。即ち、マウス肝に発がん性を示した物質は全発がん物質の 50% (81/162) にも及びしかもその中でマウス肝以外には発がん性を示さない物質は 68% (55/81) あり、それらの 44% (24/55) が Ames test 陰性であった。他の明らかな non-genotoxic carcinogen の標的臓器としては、造血組織(白血病)、腎臓、甲状腺が上げられ、特に腎発がん物質は male rat kidney carcinogen と名付けられるくらいに特異的な発がん性を示している。一方、明らかに genotoxic carcinogen の標的になる臓器には、ラットの Zymbal gland、マウスの肺がある。

3. Non-genotoxic carcinogen の特徴

non-genotoxic carcinogen とは読んで字の如く、先ず第一に non-genotoxic であることが前提である。しかしこの点がきわめて問題となることが多い。即ち衆知のように数多くの変異原性試験の方法があるので、ある物質について多くのテストがされればされるほどその中で陽性を示す結果が生ずる可能性が高くなっていく。が、それらは新規の方法論であるかあまり普及していないものであることが多いので validity に関して問題が生ずることがある。そのような点を考慮してか、既述の如く NTP では Ames test が陰性かつ DNA との structural alerts を持たない場合を non-genotoxic と定義づけている。勿論そのような物質が明らかな発がん性を有することも、non-genotoxic carcinogen の絶対的な条件である。毒性の面からみれば、多くの non-genotoxic carcinogen は低毒性であり(500 mg/kg. bw 以上の投与量が必要であるという)、その結果長期間投与した後でその最終時期(1.5 年から 2 年)に癌発生を見ることが多いのである。その癌発生に関しては、NTP の結果で述べたように極めて高い種、性、臓器特異性を示すことが特徴である。発がんメカニズムとして現在最も考えられているのが、酸素ラジカルの関与と細胞/組織毒性に基づく細胞増殖である。前者については、酸化 DNA 傷害の指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-

OH-dG) を用いた *in vivo* の研究からかなりの non-genotoxic carcinogen が、secondary genotoxic carcinogen であることが示されている(Floyd, 1990; 長谷川, 1991; 黒川, 1990)。更に酸化的 DNA 傷害と細胞増殖の関連性も重要視されている。

4. Non-genotoxic carcinogen の分類

これまでの分類は主としてその発がんメカニズム(明白なものは少ないのだが)に基づいてなされたものが多いが、その特徴として掲げた臓器特異性を考慮すると、発がん標的臓器によって分類することがより簡単で妥当のようである。なお、ここに掲げる物質はなんらかの文献に non-genotoxic carcinogen として引用されたものであるが、必ずしもいま現在全てについて non-genotoxic carcinogen とする見解が一致している訳ではないことをお断りしたい(Butterworth & Slaga, 1987; Sobels, 1991; Clayson & Arnold, 1991; Butterworth, 1990; McCoy *et al.*, 1990)。例えば、かなりの物質は適切な実験がなされればプロモーターであることが証明される可能性があり、この点なども non-genotoxic carcinogen の今後の一つの問題点であろう。

肝: NTP の結果でも見たように、マウス肝のみに発がん性を示した物質は殆んどが non-genotoxic carcinogen といってもいいくらいである。その他のよく知られた物質ではラット肝にも発がん性を有することが多い。組織学的には肝細胞癌である(例外として PBB による肝細胞芽腫がある)。発がん機構の上から最もよく研究されているのは、いわゆるペルオキシゾーム増殖剤であり、抗高脂血剤とプラスチックサイザーに大別できる。前者には, clofibrate, simfibrate, ciprofibrate, nafenopin, gemfibrozil, Wy-14643 などが、後者には di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) がある。これらの投与により 8-OH-dG が上昇することから、ペルオキシゾーム増殖の結果生ずる過剰の過酸化水素が酸化的 DNA 傷害を生ずることが判明している(高木ら, 1989; Takagi *et al.*, 1990a, 1990b)。これらは同時に細胞増殖刺激作用も示す。農薬も数多く

あるがそれらの機構解明は未だしの感がある。それらには、DDT, chlordane, aldrin, dieldrin, heptachlor, lindane, mirex, hexachlorocyclohexane (HCH), hexacyclobenzene (HCB), dicofol などがある。環境汚染の意味から重要視されている PCB, PBB, ダイオキシン, 四塩化炭素, trichloroethylene, tetrachloroethylene も肝を標的とする。細胞毒性と発がんの見地から注目されるのは、上記の四塩化炭素と、抗ヒスタミン剤の methapyrilene である。phenobarbital はよく知られたプロモーターであるが、non-genotoxic carcinogen としても記載されている。

腎：腎を標的臓器とする non-genotoxic carcinogen は同時に腎毒性を有することが特徴である。前述の male rat kidney carcinogen が代表的なものであり、unleaded gasoline, trimethylpentane, p-dichlorobenzene, d-limonene が上げられる。これらでは雄ラットにのみ存在する α -2u-globulin が、投与により腎尿細管に蓄積し細胞毒性を生じ細胞増殖を引き起こし、腎細胞癌の発生に至ると考えられている。この明らかな種、性特異性の故に人での発がん性は否定的である。鉄ニトリロ三酢酸はラット、マウスで腎細胞癌を発生させる。その機構には酸化的 DNA 傷害と脂質過酸化が深く関与することが報告されている (Umemura *et al.*, 1990a, 1990b)。他に、クロロホルム, ochratoxin A も腎を標的とする。数種の合成エストロゲンは、特に雄ハムスターに腎癌を発生し興味深い。

胃：BHA は高濃度で長期間投与後にラット、マウス、ハムスターに前胃腫瘍を生ずる。イスでの発生はないが食品添加物であることからそのリスクアセスメントが未だに論議的となっている。腺胃では、H2 blocker である潰瘍治療剤の omeprazole がヒトではきわめて稀なカルシノイド腫瘍をラットにのみ発生する。

腸：カラゲナン, デキストラン硫酸, キシリトールなどによる大腸, 盲腸の癌発生がある。

膀胱：ウラシルによる膀胱癌は結石形成に基づく細胞増殖によるものとされており、その作用は可逆性である。サッカリン, 住血吸虫, 凍結処理による発がん性も細胞増殖刺激作用から説明され

ている。

肺：アスベストの吸入による肺中皮腫の発生は、ラット、マウス、さらにはヒトでも証明されており最も典型的な solid state carcinogenesis とされている。

内分泌臓器及び生殖器：下垂体, 甲状腺, 副腎, 乳腺, 子宮, 睪丸などでは腫瘍の自然発生率が高くなり高い。その機構としては、feedback 機構を介しての hormonal imbalance による細胞増殖が想定されているが、non-genotoxic carcinogen によるものはそれを更に増幅した結果と考えられるものが多い。甲状腺ではその機能亢進症治療薬 (thiouracil, propyluracil, thiourea, methimazole) による濾胞細胞腫瘍がよく知られている。子宮では diethylstilbestrol (DES) によるゲッソ類の内臓癌の発生があり、この物質はさらにヒトで経胎盤的に特に腔癌を発生させることが疫学的に確かめられている。一般に合成エストロゲン (estradiol, ethynylestradiol, estriol など) は複数の内分泌, 生殖臓器に腫瘍発生を見るのが特徴である。

5. おわりに

筆者はたまたま厚生省の一研究所に勤務していることから、多くの化学物質の許認可申請に於てその毒性・発癌性の評価に係ることが多い。その経験からいえば、現実企業における新規化学物質 (医薬品, 農薬, 食品添加物, 工業薬品, 化粧品等) の開発段階に於て、genotoxic な物質はごく一部 (抗癌剤など) を除いては取り上げられず大部分はいわばお倉入りという状態である。つまり申請段階で発がん性試験が要求されているとすれば、今後ほとんどが non-genotoxic な物質での試験となることは自明である。従ってもちろん発がん性が陰性の物質も多いことであろうが、益々 non-genotoxic carcinogen の増加も予想され、その機構解明, 新しい短期試験法の開発, リスクアセスメントの方法などが今後の重要な課題であることは間違いないであろう。

参考文献

Ashby, J. and R. W. Tennant (1988) Chemical

structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP, *Mutation Res.*, **204**, 17-115.

Ashby, J. and R. W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, *Mutation Res.*, **257**, 229-306.

Butterworth, B. E. (1990) Consideration of both genotoxic and nongenotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential, *Mutation Res.*, **239**, 117-132.

Butterworth, B. E. and T. J. Slaga, eds. (1987) *Non-genotoxic Mechanisms in Carcinogenesis*, Banbury Report **25**, Cold Spring Harbor Laboratory.

Clayson, D. B. and D. L. Arnold (1991) The Classification of carcinogens identified in the rodent bioassay as potential risks to humans: What type of substance should be tested next?. *Mutation Res.*, **257**, 91-106.

Floyd, R. A. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis, *Carcinogenesis*, **11**, 1447-1450.

長谷川隆一, 高木篤也, 佐井君江, 梅村隆志, 黒川雄二 (1991) 非変異原性発がん物質 (Non-mutagenic carcinogens) による DNA の酸化的傷害, *Oncologia*, **24**, 22-30.

厚生省がん研究助成金による研究報告集, 昭和62年~平成2年度, 国立がんセンター。

黒川雄二 (1986) Conference on Non-mutagenic Carcinogens に出席して, *トキシコロジーフォーラム*, **9**, 660-662.

黒川雄二 (1990) 非変異原性物質の発癌機構における酸化的 DNA 傷害, 8-ヒドロキソデオキシングアノシンの発癌標的臓器での検索, *医学のあゆみ*, **154**, 178.

McCoy, G. D., H. S. Rosenkranz and G. Klopman (1990) Non-mutagenic carcinogens are primarily hydrophobic, *Carcinogenesis*, **11**, 1111-1117.

小田嶋成和, 橋本嘉幸編著, 化学物質と癌の発生, 学会出版センター, 1978.

Perera, F. P. (1984) The genotoxic/epigenetic distinction: Relevance to cancer policy, *Environm. Res.*, **34**, 175-191.

Sobels, F. H. ed. (1991) Early indicators of non-Genotoxic carcinogenesis, *Mutation Res.*, Special Issue, vol. 248, No. 2.

高木篤也, 佐井君江, 梅村隆志, 長谷川隆一, 黒川雄二, 葛西 宏 (1989) ペルオキシソーム増殖剤経口投与によるラット肝 DNA 中の 8-ヒドロキソデオキシングアノシンの生成, *医学のあゆみ*, **149**, 65-66.

Takagi, A., K. Sai, T. Umemura, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990a) Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators; Di(2-ethylhexyl)phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate, *Cancer Lett.*, **53**, 33-38.

Takagi, A., K. Sai, T. Umemura, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990b) Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 213-215.

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

Umemura, T., K. Sai, A. Takagi, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990b) Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration, *Cancer Lett.*, **54**, 95-100.

第15期特別委員会の活動始まる

平成4年3月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議では、昨年10月の総会において設置された第15期の各特別委員会が活動を始めましたが、今回の日本学術会議だよりでは、これらの特別委員会に加えて、日本学術会議主催 IGBP シンポジウム等についてお知らせいたします。

第15期の特別委員会

昨年10月の第113回総会で決定された、日本学術会議の第15期活動計画では、活動の重点目標として、①人類の福祉・平和・地球環境の重視、②基礎研究の重視、③学術研究の国際貢献の重視、の3本の柱を掲げるとともに、これらの重点目標を踏まえて、多方面の科学者によって構成される日本学術会議にふさわしく各分野にわたって広く対応し、かつ第15期中に適切な形で報告・提言に取りまとめるべき具体的課題として14の課題を選定している。

具体的課題のうち、今期中に一応の結論を出すことが望ましい臨時的な7つの課題については、それぞれ特別委員会を設置し、審議を開始した。

各特別委員会の名称及び任務等は次のとおりである。

- ◆文化としての学術
委員長：宅間 宏（第4部会員）
（任務）学術は、人類発展の基礎である。学術研究の意義についての社会的認識を深めるため、文化としての学術の在り方を検討する。
- ◆平和と安全
委員長：香西 茂（第2部会員）
（任務）平和と安全の確保や国際摩擦の解消等に関する研究推進の在り方及び研究体制等について検討する。
- ◆死と医療
委員長：小坂二度見（第7部会員）
（任務）医療技術の急速な進展は、自然科学の分野だけでなく、人文・社会科学の領域にも種々の問題を提起している。終末医療における尊厳死、安楽死や医療経済の問題、さらに説明と同意などの社会的側面等人的死と医療の在り方について検討する。
- ◆生命科学と社会的諸問題
委員長：山科郁男（第7部会員）
（任務）生命科学とその応用の急速な進展に伴い、倫理的、社会的諸問題並びに規制の在り方等について検討する。その際、我が国における生命科学の研究体制の在り方にも留意する。
- ◆人口・食糧・土地利用
委員長：梶井 功（第6部会員）
（任務）世界人口の増加や地球環境変化による食糧需給の不安定化問題と、これらに伴う土地利用変化の諸影響等を総合的に検討して、人間活動の在り方を探る。また、一極集中の激しい我が国の現状を勘案し、今後の国土利用の在り方についても検討する。

- ◆資源・エネルギーと地球環境
委員長：吉野正敏（第4部会員）
（任務）資源・エネルギーの開発と利用に伴う自然及び人間社会への影響を研究し、「持続可能な発展」のための諸方策と環境教育の在り方等について検討する。

- ◆巨大システムと人間
委員長：内山喜久雄（第1部会員）
（任務）技術革新・システムの巨大化が人間に及ぼす影響について、安全性確保と人間性尊重の立場から検討する。

これらの各特別委員会は、発足以来現在までに各々2～3回の会議を開催して、それぞれの任務に添った具体的な審議課題や今後の審議計画等について熱心に審議を進めている。今後の審議の成果が大いに期待されているところであり、今後、審議成果が発表され次第紹介していく予定である。

公開講演会の開催状況

第15期に入って、初めて開催された日本学術会議主催公開講演会は、「文明の選択—都市と農業・農村の共存を目指して—」と題して、平成4年1月27日(月)13時30分～16時30分に、福岡明治生命ホール(福岡市)で開催され、水間会員(第6部)、北村会員(第6部)及び利谷会員(第2部)の講演が行われ、多数の聴講者があった。

つづいて、「子どもの人権を考える」と題して、平成4年3月7日(土)13時30分～16時30分に、日本学術会議講堂で開催され、堀尾会員(第1部)、永井会員(第2部)及び馬場会員(第7部)の講演の後、熱心な質問が続出した。

地球圏—生物圏国際協同研究計画(IGBP)シンポジウム

日本学術会議主催の地球圏—生物圏国際協同研究計画(IGBP)シンポジウム「日本のIGBP研究の現状と将来」が去る2月4日(火)、5日(水)の両日、日本学術会議を会場として開催された。

日本学術会議においては、平成2年4月の総会において、「地球圏—生物圏国際協同研究計画(IGBP)の実施について(勧告)」を採択し、政府に対し研究の積極的な推進を求めたところであるが、IGBPについて国内の各研究者、研究機関において実施される研究の促進を図るとも

に、この研究が極めて多くの分野にわたり、また多数の研究機関が関与していることから、この研究の連絡、調整を図る場として、本シンポジウムを開催することとしたものである。また、我が国のIGBPの研究が、広義のモンスーン・アジア地域、西太平洋地域、極域を中心に行われることから、これらの地域の研究者を招きそれぞれの国の研究の状況の紹介、意見交換を行った。

本シンポジウムの内容は次のとおりである。

〔1日目〕

講演 IGBPについて

第1領域～大気微量成分の変動と生物圏

- (1) 地球大気化学国際協同研究計画 (IGAC)
- (2) IGACの東アジアにおける展開 (APARE)

第2領域～海洋における炭素循環

- (3) 海洋における炭素循環

第3領域～地球変化に係わる生態系及び水循環

- (4) 炭酸ガス変動が炭素循環に及ぼす影響
- (5) 水循環と生態系 (BAHC)

第4領域～地球圏-生物圏の相互作用を考慮したモデリング

- (6) 気候モデルおよび大気化学モデル
- (7) 局地気候・環境モデリングの立場から
- (8) 生態系モデリングの立場から

第5領域～IGBPにおける地球観測衛星の整合性と問題点

- (9) 気象衛星データの現状と将来
- (10) 地球観測衛星データの現状と将来
- (11) NASA EOS と ASTER

第6領域～古環境変化の原因と応答

- (12) PAGESについて
- (13) 南極氷床ドーム深層掘削観測計画
- (14) 温暖化と沿岸環境

第7領域～農林水産活動の地球環境への影響

- (15) 農業生態系に関する地球環境研究-メタンと温暖化-
- (16) 森林・林業に関する地球環境研究-炭素収支と温暖化の抑制-

〔2日目〕

特別講演～ナショナルプロジェクト紹介～

オーストラリア、中国、フィリピン、タイ及び日本

領域別個別討議

第1領域から第7領域まで

各領域からの報告

総合討論

当日は2日間にわたるシンポジウムであったが300人を超える参加者があり、盛況のうちに終了した。

本シンポジウムの成果は、報告書として取りまとめ、今後の研究の参考資料として関係機関・研究者等に配布することとしている。

なお、平成4年度にも引き続き本シンポジウムを開催する予定である。

二国間学術交流事業

日本学術会議では、二国間学術交流事業として毎年代表団を海外に派遣し、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、これまでにアメリカ合衆国、連合王国、オーストラリア、中華人民共和国等19か国に代表団を派遣してきた。

平成3年度は、11月4日から14日までの11日間の日程で、ベルギー王国及びオーストリア共和国へ、川田侃副会長を団長とする計10名(うち随行事務官2名)から成る代表団を派遣した。

ベルギー王国では、科学技術担当省、科学、文学及び芸術に関する王立アカデミー、ブリュッセル自由大学、EC本部教育関係機関、EC本部環境総局などを、また、オーストリア共和国では、科学省、オーストリア科学アカデミー、ウィーン大学、ドナウ河畔の国連都市にある国際原子力機関 (IAEA)、国連工業開発機関 (UNIDO) などを訪問した。

各訪問先では、関係者との間で、それぞれの国の学術研究体制や科学技術政策などをめぐって活発な意見交換が行われた。

特に印象的だったものとして、まずベルギー王国では、ECが推進しているERASMUS計画、これは EC Action Scheme for the Mobility of University Studentsの略で、EC12か国の大学生を域内各国へ相互留学させて、専門科目や語学の能力向上あるいは風俗習慣の理解をはかるというもので、ECの将来に大きく貢献するものと思われる。また、ベルギー王国は、長い歴史の流れの中で、フランス語とオランダ語の2か国語が話されてきたため、この言語間の対立が、政治・経済の発展はもとより、学問の分野にも非常に複雑な影響を与えていることであった。今回訪問した科学、文学及び芸術に関する王立アカデミーやブリュッセル自由大学もまったく同名のアカデミーと大学がフランス語系(ワロン系)とオランダ語系(フラマン系)とに分かれて存在しており、我々の代表団も、団編成を2班に分けてこれらの機関を訪問することになったことは、非常に印象的であった。

オーストリア共和国では、650年の伝統をほこるウィーン大学やオーストリア科学アカデミーの建物の重厚さに目を見はり、またドナウ河畔に作られた国連都市にIAEAとUNIDOの2つの国連機関を訪問した際には、IAEAのチェルノブイリ原発事故以後の核問題への積極的な取り組みやUNIDOの開発途上諸国における工業発展に対する貢献度の大きさに団員一同大いに感激するとともに、D. L. Siason Jr. UNIDO事務局長の流暢な日本語には、だれもがびっくりさせられた。

近年、学術、特に基礎研究における我が国の国際貢献の重要性がウェイトを増す中で、この種の学術交流事業は益々強化されるべきものであることを、派遣代表団員全員が強く認識させられた今回の渡欧であった。

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

№.25

学術国際貢献特別委員会設置される

平成4年5月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る4月15日から17日まで第114回総会(第15期3回目の総会)を開催し、新たに「学術国際貢献特別委員会」を設置しました。今回の日本学術会議だよりでは、同総会の議事内容及び3月に開催されたAASSREC執行委員会等についてお知らせいたします。

旧ソ連邦の科学者に対する緊急の支援措置について(会長談話)

平成4年2月25日

日本学術会議

会長 近藤次郎

ソ連邦が解体したことに伴い、旧ソ連邦における多くの科学者は、研究の継続が困難となり、研究組織も崩壊の危機に直面していると伝えられており、これが事実とすれば、世界に与えるその影響は計り知れないものがあると思われる。

いうまでもなく、人類の進歩にとって科学の向上発展は不可欠のものであり、その意味で、今日の旧ソ連邦の実情は憂慮に堪えないところである。

この際、我々日本の科学者は、学協会等を通じる等の方法で、旧ソ連邦の科学者に対し、能う限りの支援を行う必要があると考える。

なお、旧ソ連邦の科学者と我が国の科学者との間の一般的な国際学術交流・協力をより一層充実するための方策等については、我が国の学術の分野における国際貢献の一環として、日本学術会議において引き続き検討することとしたい。

(注)

本談話は、日本学術会議において国際交流・協力問題について調査・審議を行っている第6常置委員会から2月14日(金)の連合部会に問題提起され、各部会で検討され審議を経た後、2月25日(火)の第785回運営審議会に提案され審議されたものである。

日本学術会議第114回総会報告

日本学術会議第114回総会(第15期3回目の総会)は、4月15日～17日の3日間開催された。

第1日(4月15日)の午前。まず、会長からの前回総会以後の経過報告及び各部・各委員会等の報告が行われた。次いで、今回総会に提案されている2案件について、それぞれ提案説明がなされた後、質疑応答が行われた。

第1日の午後。各部会が開催され、午前中に提案説明された総会提案案件の審議が行われた。

第2日(4月16日)の午前。前日提案された案件の審議・採決が順次行われた。

まず、「副会長世話担当研究連絡委員会の運営について(申合せ)の一部改正」が採択された。これは、「副会長世話担当研究連絡委員会運営協議会」という名称を「複合領域研究連絡委員会運営協議会」に改めるとともに、運営協議会のより円滑な運営を図るために、必要な措置を講じたものである。

次いで、「学術国際貢献特別委員会の設置について(申合せ)」が採択された。これは、学術の分野における我が国の国際貢献の在り方について検討するための特別委員会を設置したものである。

なお、審議・採決の終了後、さきに会長談話として発表した「旧ソ連邦の科学者に対する緊急の支援措置について(平成4年2月25日)」に関連して、旧ソ連邦の科学者の実情調査のために、当会議からロシアに派遣された第6常置委員会幹事の宅間会員から、その調査結果について報告が行われた。

第2日の午後。各部会が開催され、各部における懸案事項について審議が行われた。

第3日(4月17日)午前には、各常置委員会が、午後には、各特別委員会がそれぞれ開催された。

学術国際貢献特別委員会の設置

本会議は、昨年10月に開催した第113回総会における内閣官房長官からの学術の分野における我が国の国際貢献の在り方についての検討依頼を踏まえ、今回の第114回総会において学術国際貢献特別委員会を設置した。

AASSREC執行委員会の開催

去る3月23日から26日にかけて4日間、AASSREC (Association of Asian Social Science Research Councils) 執行委員会が日本学術会議の会議室で開催された。外国代表団は前AASSREC会長で現副会長のR・トリニダド教授(フィリピン社会科学協議会)、同じく副会長代行のJ・J・スモリッツ教授(オーストラリア社会科学アカデミー)、AASSREC事務局長のD・N・ダナガーレ教授(インド社会科学協議会)、同じく事務幹事のV・K・メータ博士(同上)のAASSREC側4理事と、タイ国バンコック駐在のUNESCO人間社会科学地域アドヴァイザーのY・アタル博士の5名。

日本側は、現AASSREC会長の川田侃日本学術会議副会長のほか、来年9月に川崎市のKSP(神奈川サイエンス・パーク)で日本学術会議が共催して開く予定の「AASSREC第10回日本総会」の組織運営委員会委員長山田辰雄教授(慶応義塾大学、アジア政経学会理事長)、同事務局長・平野健一郎教授(東京大学、アジア政経学会前理事長)、及び日本学術会議AASSREC専門委員会幹事浦田賢治会員(第2部)の3名がオブザーヴァーの資格で参加、連日、時間を措しむかのように、AASSRECの運営や来たるべき第10回総会の打合せなどについて、熱心な討議が続けられた。

また討議の合間を縫うようにして、外国代表団は近藤次郎日本学術会議会長表敬訪問、日本学術会議運営審議会における挨拶などのほか、川崎市にも赴き市長表敬訪問、KSP視察などを精力的に行った。日本学術会議も、近藤会長主宰のレセプションを催し、関係諸国の東京駐在大使館スタッフなどを招いて、アジア・太平洋地域における学術交流と発展のための意見交換の場を設け、友好的な雰囲気なかで談論が風発、至るところで談笑の花が開いた。

AASSRECはアジア・太平洋地域の社会科学領域における国際学術上部組織で、いわゆるアンブレラ・オーガニゼーションである。1973年にインドのシムラで「社会科学の教育・研究に関するアジア会議」が開かれた際に設立が合意され、それ以来UNESCOの協力のもとに発展を遂げてきた。AASSRECは加盟各国それぞれの文化的伝統を尊重しつつ、社会科学の研究、教育、知識の普及などを促進することを通して、この地域における社会科学の発達を図ることを目的に、加盟諸国の社会科学協議会、またはこれに類する団体(1国1会員)により構成されている。

加盟国はオーストラリア、インド、中国、ニュージーランド、フィリピンなど、1991年8月現在、15カ国であるが、国(くに)会員のほかに、準会員の制度もあり、将来この地域の各国の学協会や研究所等が準会員としてAASSRECの活動に参加する道も開かれている。出版活動としては、隔年に開催される総会における諸報告やシンポジウムなどの出版のほか、定期刊行物「aassrec panorama」が年2回出されている。

AASSRECには最高決定機関である総会のほかに、会長、副会長(2名制)、事務局長の4名で構成される理事会が置かれているが、これにさらにUNESCOの地域アドヴァイザーが加わって開かれる執行委員会に事実上の運営権限があるようにみえる。今回、日本学術会議で開かれた会議はAASSRECとしては極めて重要な会議であったといえる。AASSRECはUNESCOによって承認された「非政府機関(NGO)」の地位をもち、絶えずUNESCOと緊密な関係を保っているが、同じくUNESCOによって承認されたNGOの地位をもつIFSSO(国際社会科学団体連盟)とも相互協力関係にある。

平成4年(1992年)度共同主催国際会議

日本学術会議では、我が国において開催される学術関係国際会議のうち毎年おおむね6件について、学・協会と共同主催している。

本年もまた、6件の国際会議を共同主催することとしており、その概要は、次のとおりである。

◆第5回世界臨床薬理学会議(7月26日~31日)

この会議は、臨床薬理学に関する研究を進展させるため討議を行い、最新の研究情報を交換することを目的として横浜市(横浜国際平和会議場)において開催される。

参加予定人数は3,000人(国外1,500人、国内1,500人)、参加予定国数は49か国。

◆第14回国際平和研究学会総会(7月27日~31日)

この会議は、平和学に関する研究を進展させるため討議を行い、最新の研究情報を交換することを目的として京都市(国立京都国際会館及び立命館大学)において開催される。

参加予定人数は450人(国外250人、国内200人)、参加予定国数は45か国。

◆第8回国際バイオレオロジー会議(8月3日~8日)

この会議は、バイオレオロジー学に関する研究を進展させるため討議を行い、最新の研究情報を交換することを目的として横浜市(横浜国際平和会議場)において開催される。

参加予定人数は500人(国外150人、国内350人)、参加予定国数は26か国。

◆国際地質科学連合評議会及び第29回万国地質学会議

(8月24日~9月3日)

国際地質科学連合評議会は、同連合の最高決定機関であり、運営事項を協議、決定することを目的とするものである。また、万国地質学会議は、地質学に関する研究を進展させるため討議を行い、最新の研究情報を交換することを目的として京都市(国立京都国際会館)において開催される。

参加予定人数は5,300人(国外3,200人、国内2,100人)、参加予定国数は94か国。

◆第9回国際光合成会議(8月30日~9月5日)

この会議は、光合成に関する研究を進展させるため討議を行い、最新の研究情報を交換することを目的として名古屋市(名古屋国際会議場)において開催される。

参加予定人数は1,000人(国外500人、国内500人)、参加予定国数は41か国。

◆第11回国際光生物学会議(9月7日~12日)

この会議は、光生物学に関する研究を進展させるため討議を行い、最新の研究情報を交換することを目的として京都市(国立京都国際会館)において開催される。

参加予定人数は1,000人(国外600人、国内400人)、参加予定国数は52か国。

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。次年度の年費の額は評議員会において審議し総会において定める。

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

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

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

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

評議員は正会員の投票により選ぶ。会長は評議員の互選によって定める。庶務幹事、会計幹事、国際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。役員および評議員の任期は2年とする。役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

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

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

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

附記

1. 本会則は平成2年1月1日より施行する。
2. 本会は事務所を静岡県三島市谷田1,111番地に置く。
3. 正会員、学生会員および賛助会員の会費は、それぞれ年額5,000円、3,000円および1口20,000円とする。ただし、Mutation Research誌の特別巻の配付を希望するものは、会費の他に別途定める購読料を本会へ前納するものとする。

日本環境変異原学会平成4～5年役員名簿

会 長	早 津 彦 哉
庶務幹事	祖父尼 俊 雄
会計幹事	洪 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	松 下 秀 鶴
〃	乾 直 道
賞等選考委員	祖父尼 俊 雄
	菊 池 康 基
	渡 部 烈
	佐々木 正 夫
	若 林 敬 二
編集委員	島 田 弘 康
	後 藤 純 雄
	菊 川 清 見
	林 真
	田 中 憲 穂
企画委員	大 西 克 成
	菊 池 康 基
	若 林 敬 二
	山 添 康

日本環境変異原学会平成4～5年評議員名簿

(五十音順)

氏 名	所 属
大 西 克 成	徳島大学医学部
加 藤 隆 一	慶応義塾大学医学部
鎌 滝 哲 也	北海道大学薬学部
菊 川 清 見	東京薬科大学薬学部
菊 池 康 基	武田薬品工業(株)研究開発本部
黒 田 行 昭	麻布大学生物科学総合研究所
後 藤 純 雄	国立公衆衛生院
佐々木 正 夫	京都大学放射線生物研究センター
佐 藤 茂 秋	神戸大学医学部
洪 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
須 藤 鎮 世	伊藤ハム(株)中央研究所
祖父尼 俊 雄	国立衛生試験所
武 部 啓	京都大学医学部
田 中 憲 穂	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
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 島 泰次郎	日本バイオアッセイ研究センター
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
渡 部 烈	東京薬科大学

日本環境変異原学会入会申込書

平成 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

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

所属機関 部局 職名	(和)
	(英)
所属機関 所在地	〒 電話 内線 () 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 |
| 11. 高等植物 | 12. 食品 | 13. 気体・粉じん | 14. 医薬品 | 15. 農薬 |
| 16. 代謝 | 17. 分子機構 | 18. その他 () | | |

研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)

加入学会名 (本学会以外の)

推薦者 (日本環境変異原学会評議員)

氏名 (署名) 印

入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

入会申込書の送付先: 〒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

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	①
旧所属	

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

環境変異原研究 第14巻 第1号 1992年

平成4年6月10日 印刷
平成4年6月20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

Fax 03-3433-6070

ISSN 0910-0865