

# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

Vol.14 No.2 1992

環境変異原研究

第14卷 第2号 1992年

目 次

日英ワークショップ "Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure" 特集号

特集号発刊にあたって	早津 彦哉.....	115
ワークショップの概要	.....	117
日英ワークショップ要旨	.....	119
"日英ワークショップ"をおえて	藤木 博太.....	125

特別講演集

Impression of the First Anglo-Japanese Workshop on Human Biomonitoring - Okayama, Japan	R. Colin Garner.....	127
ワークショップに参加して	山添 康.....	135
<sup>32</sup> P-ポストラベル法による DNA 付加体の検出	若林 敬二.....	137
免疫学的定量法: Dr. Colin Garner の話を中心に	許 南浩.....	139
ヒト血液細胞を用いた体細胞突然変異のモニタリングについて	秋山實利, 京泉誠之, 楠洋一郎, 平井裕子.....	143
分子生物的手法	根岸 和雄.....	149
発がん物質に対するヒトの暴露モニタリングの疫学的方法	津金昌一郎.....	153
ヒトのバイオモニタリングと企業研究	馬場 恒夫.....	157

印象記

I. ワークショップに参加して	青木 公子.....	161
II. ワークショップ「発癌物質に対するヒトの曝露のモニタリング」に 参加して	中務 治重.....	163
III. ワークショップ「分子生物学的手法の導入」は今——	平井 収.....	165
IV. The Anglo-Japanese Workshop on "Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure"; a Personal Viewpoint	Thomas Kubin.....	167

分科会・研究会報告

第1回(いわゆる)非変異・がん原性物質への対策研究会の報告	吉川 邦衛.....	169
微生物変異原性試験連絡協議会活動報告	荒木 明宏.....	171
哺乳動物試験分科会(MMS)活動報告	林 真.....	173
日本学術会議だより (No. 26, 27)	.....	177

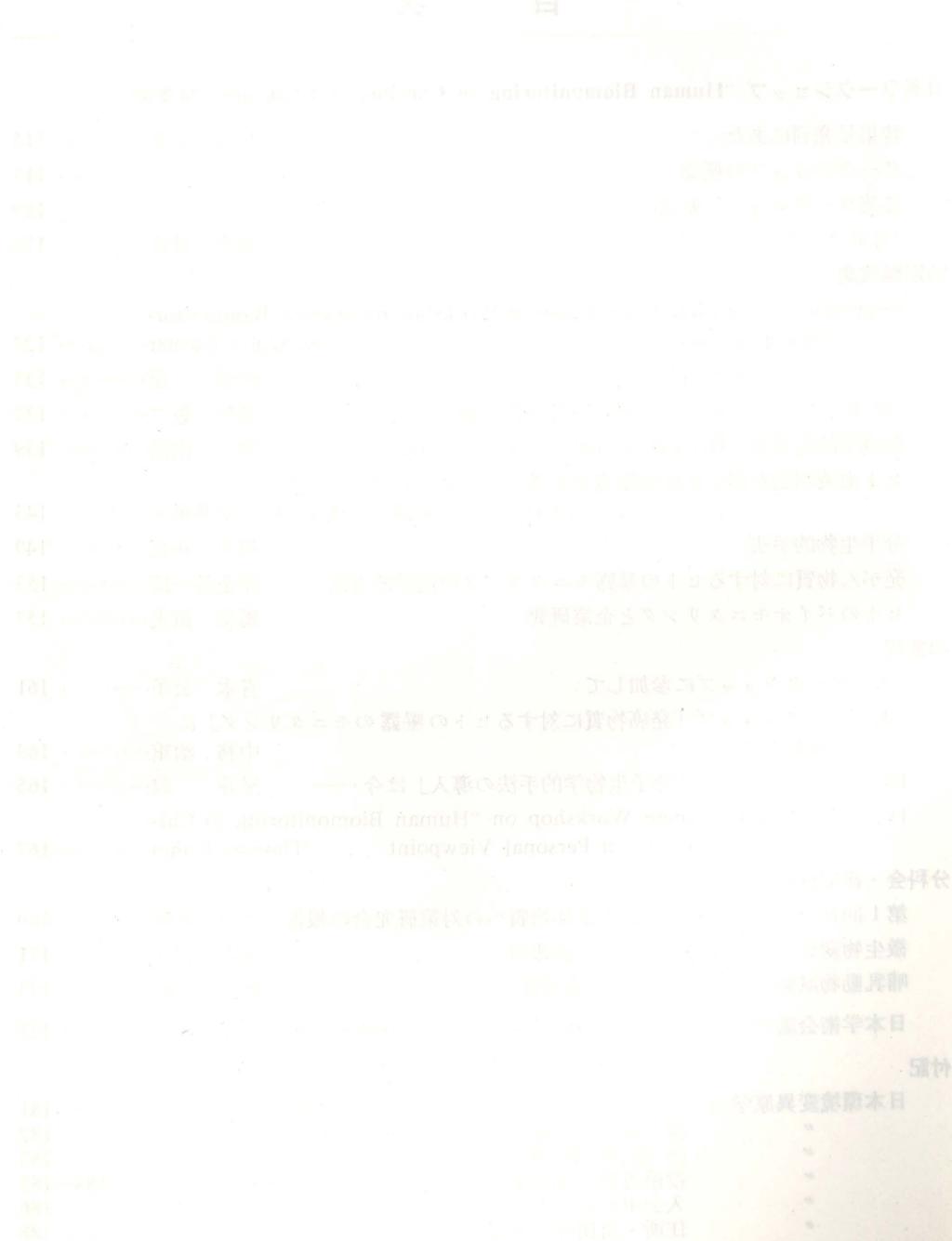
付記

日本環境変異原学会 会 則	.....	181
" 役員名簿	.....	182
" 評議員名簿	.....	183
" 投稿規定・執筆規定	.....	184~185
" 入会申し込み書	.....	186
" 住所・所属等変更届	.....	188

日本環境変異原学会

平成4年号を記念する

目



日英ワークショップ

“Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure”

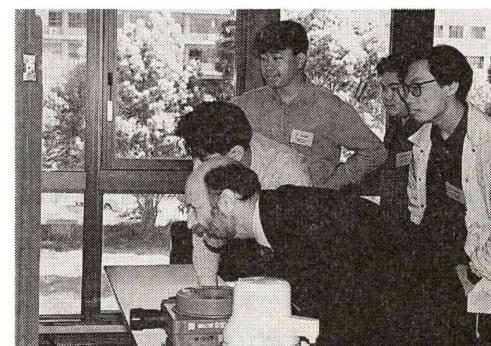
特集号発刊にあたって

平成4年5月に上記のテーマで日本環境変異原学会主催のワークショップが開催され、有意義な会を持つことができた。そこでこの集会の内容について本学会会員各位にお知らせしたいと考え、本特集号を企画した。人間の環境変異原への曝露を調べる技術とその利用がこれからますます重要な課題となると考えられる。本特集号がわが国でのこの分野の発展をうながすものになることを願っている。

早津彦哉



Workshop on “Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure” Okayama, May 11-12, 1992



## ワークショップの概要

日英スタディコース・ワークショップ ‘発がん物質に対するヒトの曝露’

“Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure”

とき：1992年5月11-12日

ところ：岡山大学、岡山市津島中

組織委員会：早津彦哉（岡山大学）（委員長）、藤木博太（国立がんセンター）、松島泰次郎（日本バイオアッセイ研）、菊池康基（武田薬品）、大西克成（徳島大学）

### 第1日 講演会

1. Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure—An Overview  
R. C. Garner (University of York)
2. The Use of Mass Spectroscopic Methods for Human Carcinogen Adduct Analysis  
P. B. Farmer (MRC)
3. Human and Experimental Biomonitoring using  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling  
D. H. Phillips (Institute of Cancer Research)
4. The Use of Immunological Methods for DNA Adduct Analysis  
R. C. Garner (University of York)
5. Biomonitoring: Genetic Endpoints  
C. F. Arlett (University of Sussex)
6. Molecular Methods for Detecting Mutations for Population Monitoring  
A. R. Lehmann (University of Sussex)
7. Molecular Epidemiology  
D. Coggan (University of Southampton)

### 第2日 小グループでの講習会

約10名ずつの6グループに分れ、それぞれ6名のイギリス人科学者に講演を受けた。各講師は各グループに1時間ずつ講習を行ない、総当たり、合計6時間の‘tutoring’を行なった。

日本側からの参加者：

一般参加者 57名、討論リーダー 6名、合計 63名

参加者名（アイウエオ順）

討論リーダー：秋山實利（放影研）、許 南浩（東大）、津金昌一郎（国立がんセ）、根岸和雄（岡山大）、山添 康（慶應大）、若林敬二（国立がんセ）

一般：秋山 隆（岡山大）、青木公子（昭和大）、新井明治（岡山大）、有元佐賀恵（岡山大）、幾井恵見（共立薬大）、市場正良（佐賀医大）、伊東和雄（岡山大），

講

稻田直実 (岡山大), 大江 武 (京都女子大), 太田美佳 (住友化学), 大杉理恵 (神戸大), 大谷昌士 (岡山大), 小野哲義 (岡山大), 加藤貴彦 (産業医大), 川上詔夫 (山之内製薬), 姜 鎧一 (東大), 京泉誠之 (放影研), 楠 洋一郎 (放影研), Thomas Kubin (岡山大), 桑鶴祥子 (岡山大), 河内泰英 (大鵬薬品), 佐藤茂秋 (神戸大), 柴原俊一 (大塚製薬), 下位香代子 (静岡県立大), 申 逸湜 (岡山大), 杉山千歳 (静岡県立大), 高橋一栄 (岡山大), 竹下達也 (阪大), 田中一三 (協和安全研), 常盤 寛 (福岡県保健環境研), 友野靖子 (岡山重井研), 中澤 徹 (岡山大), 中務治重 (岡山大), 繩村 剛 (岡山大), 中村 稔 (武田薬品), 根岸友恵 (岡山大), 野田雅俊 (岡山大), 花岡知之 (国立がんセ), 林 宏行 (明治製薬), 早津彦哉 (岡山大), 馬場恒夫 (ダイセル化学), 平井 収 (藤沢薬品), 黄 和信 (岡山大), 藤木博太 (国立がんセ), 船山高明 (岡山大), 堀川和美 (福岡県保健環境研), 松田知成 (京大), 真鍋芳樹 (香川医大), Sabina Mahmood (岡山大), 三尾隆彌 (神戸大), 牟礼佳苗 (阪大), 森本兼彌 (阪大), 屋舗哲也 (岡山大), 山下康弘 (日本新薬), 湯野幸一郎 (山之内製薬), 吉濱泰斗 (岡山大), 綿矢有佑 (岡山大)

師: Dr. R. C. Garner: University of London, 1970年卒. Ph. D. in Biochemistry. 現在 Reader of Cancer Research Unit, University of York

Dr. C. F. Arlett: University of Birmingham, 1960年卒. Ph. D. in Cytogenetics. 現在 MRC Non-Clinical Scientist, Special Appointment (教授相当) and Honorary Reader in Biology, University of Sussex

Dr. D. Coggan: Oxford University, 1976年卒. M. D. from Oxford University and Ph. D. from University of Southampton. 現在 Reader in Occupational and Environmental Medicine at the MRC Environmental Epidemiology Unit, University of Southampton

Dr. P. B. Farmer: Oxford University, 1968年卒. Ph. D. in Chemistry. 現在セクションリーダー, MRC Toxicology Unit, Carshalton

Dr. A. R. Lehmann: Cambridge University, 1967年卒. Ph. D. in Cancer Research. 現在 MRC Special Appointment (教授相当), MRC Cell Mutation Unit, Sussex University

Dr. D. H. Phillips: Oxford University, 1975年卒. Ph. D. in Biochemistry. 現在チームリーダー, Institute of Cancer Research, London

環境変異原研究 14: 119-124 (1992)

#### 日英ワークショップ要旨

### Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure—An Overview

Dr. R. C. Garner

Jack Birch Unit for Environmental Carcinogenesis, Department of Biology,  
University of York, Heslington, York YO1 5DD,  
United Kingdom

Classically, agents that cause human cancer have been identified either through an alert clinician noticing clusters of cancer cases as with bladder cancer and the dyestuffs industry, or as the result of epidemiological studies which examine the links between a particular exposure and disease incidence as with cigarette smoking and lung cancers. This approach has been able to link some forty different chemical exposures and human cancer but we still do not know for the majority of cancers what are the causative agents. We see on the one hand, human exposures to a vast number of chemical mutagens, both natural and man made and on the other hand a great deal of difficulty linking these exposures with cancer incidence. Even more baffling is the large number of chemicals that cause cancer in experimental animals and for which there is no evidence of human carcinogenicity. One could take the view that all these chemicals are potential human carcinogens and thus all must be regulated or the more scientific view that if we could understand mechanisms and species differences we could make more rational decisions.

The aim of human biomonitoring is to provide a mechanistic link between classical epidemiological studies and molecular biology. We know a great deal about mechanisms of carcinogenesis in an experimental situation, but very little about what goes on in man. In my view the aim of human biomonitoring is to identify cancer risk factors at a molecular level and hence establish which exposures are important and which less so. How can we determine the relevance to man of the potent carcinogenicity of dioxin in mice or the induction of rodent liver cancers induced by the peroxisome proliferators?

Mechanistically we would like to relate DNA damage (adducts) to a molecular event (mutation) with the subsequent biological effect (cancer). The level of DNA damage will be determined by host factors such as repair rates, metabolic activation and detoxification processes, distribution of adducts in the genome, neighbouring base effects etc etc. In the human situation one cannot easily remove samples of target organs for analysis and therefore surrogate dose monitors of exposure need to be identified. These will need calibrating and relating to target and non-target tissues. In addition studies over time will need to be performed. A single analysis will only provide a snapshot of the overall process. Do steady state levels apply to the physico-chemical or biological end-points?

This workshop is intended to examine effects at the DNA level in man using some of the more sensitive methods now becoming available. These include (1) the use of antibodies and physicochemical procedures to measure DNA damage at 1 adduct/ $10^8$  nucleic acid bases to (2) protein adduct measurements able to detect picograms of adduct to (3) measuring mutations at the 1/ $10^6$  level biologically to (4) measuring DNA base changes at the 1/ $10^5$  nucleic acid bases. Finally how these type of measurements will be incorporated into properly constructed epidemiological studies will also be presented.

## The Use of Mass Spectroscopic Methods for Human Carcinogen Adduct Analysis

P. B. Farmer

MRC Toxicology Unit, Woodmansterne Road,  
Carshalton, Surrey SM5 4EF, UK

*In vivo* exposure to alkylating carcinogens may be monitored by measurement of the covalently bound adducts that these compounds form with nucleophilic sites in nucleic acids and proteins. The analytical methods required to detect these adducts have to be of exceptional sensitivity. One technique which is applicable is mass spectrometry (MS) which can detect and quantify ions derived from the adduct molecule at low pg ( $10^{-12}$  g) levels per sample.

DNA adducts may be monitored by gas chromatography (GC)-MS of DNA repair products, such as N-7-alkylated guanines or N-3-alkylated adenines, that are excreted in urine. Alternatively DNA may be isolated from, for example, lymphocytes or placenta, and chemically hydrolysed to release carcinogen residues, which may be extracted and analysed by GC-MS. This latter procedure is especially appropriate for polycyclic aromatic hydrocarbon adducts.

Protein adducts are generally analysed using haemoglobin (Hb). Since, for a variety of compounds, the extent of Hb-adduct formation relates quantitatively with that of DNA-adducts, measurement of the former indicates the biologically-effective dose of the compound received. Monitoring procedures have been developed using capillary GC-MS for determining exposure to several carcinogens (e.g. methylating, ethylating, hydroxyethylating, hydroxypropylating agents) through determination of their adducts with cysteine and histidine in Hb.

Adducts at the N-terminal valine of hemoglobin may be determined by GC-MS measurements of pentafluorophenylthiohydantoin derivatives prepared by a modified Edman degradation procedure. This procedure has been used for example to measure N-hydroxyethylvaline in Hb of smokers, of workers exposed to ethylene oxide and of cancer patients treated with chloroethylnitrosoureas. Exposure to aromatic amines results in the formation of sulphinamide adducts with cysteine residues in hemoglobin which may be determined by GC-MS following hydrolysis to the free amines.

Examples of the application of all of these adduct measuring techniques to human samples will be presented.

## Human and Experimental Biomonitoring using $^{32}\text{P}$ -Postlabelling

D. H. Phillips

Haddow Laboratories, Institute of Cancer Research, Sutton, UK

As many chemical carcinogens exert their biological effects through the formation of chemically-stable covalent bonds with cellular DNA, the detection of these DNA modifications (adducts) in human DNA can provide evidence of prior exposure to environmental or occupational carcinogens and lead, through characterisation of the adducts, to the identification of previously unknown human carcinogens. Additionally, molecular dosimetry of DNA adducts in human tissues can provide data essential to reliable quantitative risk assessment of exposure to known carcinogens.

$^{32}\text{P}$ -Postlabelling analysis involves the following steps: a sample of DNA that contains adducts is digested enzymically to deoxyribonucleoside 3'-monophosphates by micrococcal nuclease and spleen phosphodiesterase. The DNA digest is then incubated with [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP in the presence of T4 polynucleotide kinase to yield [5'- $^{32}\text{P}$ ]deoxyribonucleoside 3',5'-bisphosphates. The  $^{32}\text{P}$ -labelled adducts are then separated from the normal nucleotides and resolved chromatographically and detected by monitoring their radioactive decay. Depending on the type of DNA damage under investigation, various enhancement procedures can be employed that allow adducts to be detected in microgram quantities of DNA at frequencies as low as 1 adduct/ $10^9$  nucleotides. It can be applied to the detection of adducts varying from those formed by small aliphatic compounds to bulky aromatics. The method does not require prior characterisation of an adduct in order to detect it, and is readily applicable to the study of DNA adduct forming ability of complex mixtures.

Studies on the presence of DNA adducts in the human respiratory tract have shown a strong correlation with exposure to tobacco smoke. Similarly,  $^{32}\text{P}$ -postlabelling analysis of DNA from white blood cells of workers occupationally exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in iron foundries, coke oven plants and aluminium production plants have revealed elevated levels of DNA damage compared to levels in unexposed controls.

### Selected references

- Phillips, Modern methods of DNA adduct determination. In: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis* I, Cooper, C. S. and Grover, P. L., eds., Berlin, Springer-Verlag, pp. 503-546 (1990).
- Hemminki *et al.*, DNA adducts in humans environmentally exposed to aromatic compounds in an industrial area of Poland. *Carcinogenesis*, 11, 1229-1231 (1990).
- Phillips *et al.*, Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells. *Int. J. Cancer*, 46, 569-575 (1990).
- Schoket *et al.*,  $^{32}\text{P}$ -Postlabelling detection of aromatic DNA adducts in peripheral blood lymphocytes from aluminium production plant workers. *Mutation Res.*, 260, 89-98 (1991).

## The Use of Immunological Methods for DNA Adduct Analysis

Dr. R. C. Garner

The Jack Birch Unit for Environmental Carcinogenesis, Dept of Biology, University of York, Heslington, York YO1 5DD, UK

The majority of human organic chemical carcinogens are thought to exert their biological effects through interaction with DNA. These interaction products, known as DNA adducts, are likely to be the pre-mutagenic lesions which give rise to base-pair substitution or deletion mutations. Much research has been spent chemically characterising these interaction products, establishing what metabolic transformation processes are involved in their formation and what cellular events are associated with their processing. In addition, experimental studies have looked at the biological consequences of carcinogen-nucleic acid base interactions, such as mispairing, alteration in helical structure, neighbouring base effects, etc. In an experimental situation, such studies can be performed because radiolabelled carcinogens can be used. In a human situation this is not possible and, therefore, methods need to be devised which enable one to examine numbers of adducts down to the level of  $10^9$ - $10^{10}$  nucleic acid bases.

Immunoassay is known to be one of the most sensitive methods for measuring analytes at low concentration. Immunoassay is commonly used in clinical chemistry; it is much less used in the field of DNA adduct analysis. This stems partly from the difficulty in raising antibodies to adducts and partly through the suspicion that antibody methods are unreliable. To generate antibodies, either polyclonal or monoclonal, thought should be given as to the

type of adduct it is wished to analyse and in what situation, ie in the test tube, on isolated purified DNA or in tissue sections using immunohistochemistry. Our laboratory has concentrated over the years on using a rabbit polyclonal antibody against benzo(a)pyrene-diol-epoxide-DNA and a mouse monoclonal antibody against aflatoxin for aflatoxin-adduct characterisation.

For immunoassay, attention needs to be paid as to whether it is desired to measure a variety of adducts of related structure, eg polycyclic aromatic hydrocarbon adducts, or a single adduct such as that produced by aflatoxin. In other words, is one looking for a class-specific antibody, or one that recognises a single adduct? We have used the antibodies that we have generated in a number of ways: (1) conventionally for immunoassay—here one takes isolated, purified DNA and performs a classical competitive inhibitor ELISA; (2) binding the anti-adduct antibodies to a solid support to make immunoaffinity columns: adducts are concentrated by application to the immunoaffinity column and subsequently eluted for analysis by immunoassay or  $^{32}\text{P}$ -postlabelling; (3) a novel approach in which DNA containing adduct is co-incubated with anti-adduct antibodies: the bound antibodies protect the DNA around the adduct from digestion with nucleases—the resulting protected oligonucleotides can then be end-labelled with  $^{32}\text{P}$ -ATP and polynucleotide kinase, run out on agarose gels and visualised by autoradiography. Protected DNA sequences therefore certain adducts.

The above approaches can be used for studies of DNA adducts in human tissues from autopsy, surgical or biopsy specimens. They can be used in case-control studies or other epidemiological programmes to examine exposures and DNA adduct levels. Immunological methods will be reviewed and data presented showing their utility in human biomonitoring.

#### Reference

Human carcinogen exposure-biomonitoring and risk assessment (1991), eds Garner, R. C., Farmer, P. B., Steel, G. S. and Wright, A. S. IRL Press, Oxford, United Kingdom.

### Biomonitoring: Genetic Endpoints

C. F. Arlett

MRC Cell Mutation Unit, University of Sussex  
Falmer, Brighton BN1 9RR, UK

Blood-derived cells are the obvious choice for human population monitoring using genetic endpoints. T-lymphocytes can now be cloned reliably and with high efficiency. This has made it possible to measure their mutant frequency to 6-thioguanine resistance which is a consequence of loss of or alteration in the gene coding for the enzyme hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase. Since the gene is recessive and X-linked and subject to inactivation in females, all members of the population are informative. This system has been studied in enough detail to give us some indication of the complexity of population monitoring. The major features of the system are (i) that there is an age-related response; (ii) smoking (in our hands) has a profound influence on mutant frequency giving a 30–40% enhancement over age-matched controls; (iii) blood from DNA repair defective, cancer-prone, individuals with xeroderma pigmentosum or ataxia-telangiectasia show elevated mutant frequencies. The system can be used to monitor populations exposed to hazardous working environments, but the effect of smoking habit is so substantial that it is likely to obliterate anything but the most dramatic effects unless compensated for by a rigorous experimental design.

Because of the ability to grow the cells in culture, molecular analysis of the mutants is practicable. By using probes for the T-cell receptor markers alpha, beta and gamma chains together with other rearrangements, it is now possible to determine the time at which a par-

ticular mutant was induced during haematopoiesis and whether clonal expansion has occurred. The HLA-A locus has also been suggested as a potentially useful system but it is only relevant to those individuals heterozygous for the locus.

Two erythrocyte based systems are available, but should be regarded as methods for detecting variants rather than mutants, since such cells cannot be propagated. The glycophorin A locus depends upon the co-dominant expression of alleles on chromosome 4 and the glycophorin loss assay utilizes antibodies for the different allelic forms in heterozygotes. It is thus not of universal applicability. A second system, using monoclonal antibodies to detect variant haemoglobin A, can be used in all individuals but it requires an extremely sophisticated computer-based image analysis scoring system, and it is unlikely to be used widely.

### Molecular Methods for Detecting Mutations for Population Monitoring

A. R. Lehmann

MRC Cell Mutation Unit, University of Sussex  
Falmer, Brighton BN1 9RR, UK

Circulating lymphocytes in humans contain cells mutated at the *hprt* locus. The *hprt* mutant frequency is age-dependent, increasing at about 1.3% per year. These mutants are detected by their resistance to the toxic analogue, 6-thioguanine. Exposure of a population to an environmental mutagen/carcinogen will result in an increase in the frequency of *hprt* mutants. Mutants are selected and expanded in the presence of 6-thioguanine and further information on the nature of the mutations can be gained by identification of the mutation at the nucleotide sequence level. RNA is extracted from a mutant clone and reverse transcribed into cDNA. The *hprt* cDNA is then specifically amplified using the polymerase chain reaction (PCR) with oligonucleotide primers flanking the *hprt* gene. The amplified cDNA is sequenced directly and compared with non-mutant cDNA to determine the base-change mutation in the mutant cells. This information may help to identify the causative environmental mutagen.

All existing mutation systems entail selection and outgrowth of the mutant population (eg. in the presence of 6-thioguanine in the case of *hprt* mutants). In order to avoid this step, we are trying to devise molecular methods to detect mutations at the DNA level without the need for selection. The technique we are using is termed the restriction site mutation method. The mutation target is a sequence at the cutting site for a restriction enzyme. A mutation in this sequence will prevent the restriction enzyme from cutting the DNA at this site. In order to detect such a mutation in a large population of wild-type DNA, DNA from the total population of cells is first digested exhaustively with the restriction enzyme. In principle only mutant DNA should survive this treatment. This DNA is then amplified using PCR with primers flanking the DNA restriction site. Wild-type DNA which has been cut at the restriction site will not be amplified. Only DNA which has not been cut can be amplified. The amplified mutant DNA is characterised and quantified.

## Molecular Epidemiology

D. Coggan

MRC Environmental Epidemiology Unit, University of Southampton,  
Southampton General Hospital, Southampton SO9 4XY

Much of epidemiology is concerned with assessing statistical associations between diseases and their known or suspected causes. For ethical reasons, most studies are *observational* rather than *experimental*. They are therefore liable to *confounding effects*. For example, an observed association between lung cancer and occupation might be confounded by differences in smoking habits between occupations.

Associations between exposure and disease may be assessed at the level of populations (eg geographical correlations) or at the level of individuals, (cohort studies, case-control studies). In a *cohort study*, individuals exposed to a known or suspected hazard are followed over time, and their disease incidence is compared with that of controls who are unexposed or exposed at a lower level. In a *case-control study*, cases of a disease are identified, and their past exposure to known or suspected causes is compared with that of controls who do not have the disease.

There are various ways in which biomonitoring of carcinogens might be applied using these study designs.

- 1) It could provide better measures of exposure to carcinogens, leading to more reliable estimates of risk.
- 2) It might allow the identification of people unusually susceptible to an environmental exposure (for example, because of metabolic differences).
- 3) It might help in assessing the causality of an observed association (for example, by demonstrating that a carcinogen causes genetic damage in the suspected target tissue).
- 4) It could provide intermediate measures of outcome that can be assessed after a shorter latency from exposure than overt cancer.

## “日英ワークショップ”をおえて

国立がんセンター研究所 がん予防研究部 藤木博太

5月に開催された第一回日英ワークショップ“発がん物質に対するヒトの暴露”について執筆を依頼されたので、組織委員の一人として簡単に記述する。このワークショップの企画について Dr. R. Colin Garner と最初に話し合ったのは約 3 年以上も前になる。その際の約束ごとは、旅費はイギリス側、場所は日本で、開催費は日本側の負担であった。うまくゆけば実習を含む計画もあった。幸いにも早津彦哉先生が日本環境変異原学会主催、しかも、岡山大学でと計画を実現された。一方、7 名の旅費を算出する、Dr. Garner の努力は大変なものであった。彼が謝辞に列挙している会社は少ないが、申請した件数ははるかに 50 社を越えた。この資金を集めると 3 年を要したというのが実状である。ワークショップのプログラムについても、いろいろな討論があったようである。もし、講演を主体にした通常のワークショップであったら、Dr. Thomas Kubin が記述しているように、three S の典型的なものだったであろう。Dr. Garner の意向を汲んだプログラムは、なかなか日本側に受け入れてもらえなかつたが、今になって振り返ると、“チャレンジ”は成功したと思っている。早津教授のご配慮に感謝する。Dr. Garner の印象記にあるように、tutoring の場合でも discussion が充分でなかったことは改善に価するが、日本の癌研究の体制の中に tutoring を企画し、それに日本側研究者が参加したこと自体、ます、喜ばしいことでもある。

東京で、この機会に、日本国際生命科学協会の主催で ILSI Japan 講演会，“食物とがん”が開かれた。Dr. David H. Philips は“DNA 附加体とリスク評価”，Dr. Garner は“食物とがん”という題で発表した。日本語通訳が解り易く、企業の方々から有益であったと伺った。この件に関しては、福富文武博士の御尽力に感謝する。

Dr. Philips がいる研究所の初代所長は、1930 年代、芳香族炭化水素の研究の端緒を作った Dr. Arthur Kennerway であると伺った。これら附加体の研究がイギリス学派の歴史的流れを汲むものであることをこのワークショップは示したのでもあった。イギリスの研究者は帰国前、国立がんセンター研究所を訪問され、今回のワークショップについて、いろいろと建設的なコメントをフランクに話して下さった。例えば、岡山大学 2 日目の tutoring は 6 つのグループに分けた、一人 6 回の talks だったので、大変な準備がなされていたようである。“さあ、3 年後には、日本側の研究者にそれぞれ 6 回の tutoring をやってもらおうか” Dr. Garner はそういう胸をはった。この特集号も、又、いろいろな意味に於いて“チャレンジ”である。

Impression of the First Anglo-Japanese Workshop  
on Human Biomonitoring – Okayama, Japan,  
11–12 May, 1992

R. Colin Garner

The inter-relationship between the environment and cancer makes studies in this research area of prime importance if the total cancer burden is to be reduced. Comparative epidemiology between countries provides the basis for much of our understanding of the role of the environment in cancer induction. However, there is a gap in our knowledge of the comparative molecular events that might be responsible for differences in cancer incidence. For example, we know that the incidence of gastric cancer is higher in Japan than in the United Kingdom, but no comparative studies have been performed on the genetic alterations or the chemical DNA interactions that might be responsible. To attempt to encourage the development of such comparative research a group of six British scientists, led by Dr. Colin Garner of the University of York, recently gave a series of lectures and tutorials to a number of Japanese scientists at Okayama University on 'Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure'. Dr. Garner gave the introductory lecture entitled 'Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure – An Overview', in which he outlined the principles of 'Human Biomonitoring', particularly the importance of such studies in establishing which environmental exposures might lead to cancer induction. He also emphasized the gulf between animal toxicology and human studies and how human biomonitoring might help bridge this gap.

He outlined the disadvantages of traditional methods for detecting human carcinogens,

viz epidemiology, animal cancer tests or genotoxicity assays (Table 1) and then moved on to discuss the different methods now available for measuring DNA damage (Table 2). One major problem for human biomonitoring studies concerns the ability to obtain tissues from man non-invasively, or to exploit the use of surgical or autopsy specimens (Fig. 1).

He concluded by asking a number of questions which are key.

- (1) What are the relative sensitivities of the various biological and chemical endpoints?
- (2) What is the relationship between DNA and protein adducts?
- (3) What is the relationship between animal models and man?
- (4) What is the predictive value of DNA adducts for cancer and mutation?

Dr. Peter Farmer (Medical Research Council, Carshalton) discussed the use of mass spectroscopic methods for human carcinogen adduct analysis (Fig. 2). Both DNA and protein adducts can be measured using this technique (Fig. 3). Limits of sensitivity are in the region of  $10^{-11}$  to  $10^{-12}$  g. In 1 ml of blood, whilst there is in the region of 100 mg of haemoglobin, there are only a few micrograms of DNA. Dr. Farmer discussed the use of mass spectrometry to measure small alkylated DNA adducts which had proved difficult owing to purification procedures. Dr. Farmer mentioned the use of immunoadsorption concentration of benzo(a)pyrene diol epoxide DNA adducts from human placenta and the subsequent hydrolysis of the adduct

R. Colin Garner, BPharm PhD MRCPPath

The Jack Birch Unit for Environmental Carcinogenesis, Department of Biology, University of York, Heslington, York YO1 5DD, United Kingdom

Table 1. Detection and Identification of Human Carcinogens

	METHOD	COMMENT
Environmental carcinogens	Epidemiology	Lacks resolving power to discriminate between individual contributory factors
Occupational carcinogens	Animal cancer tests	Poor sensitivity High versus low dose Cell proliferation a key factor
	Genotoxicity tests	Poor correspondence with animal cancer tests. <i>In vitro</i> versus <i>in vivo</i> differences Do not detect tumour promoters

Table 2. Detection and Identification of Human Carcinogens

	DETECTION METHOD
DNA adduct—	Immunoassay $^{32}\text{P}$ postlabelling Generic procedure e.g. uvrAB protein Fluorimetry GC/mass spectrometry
DNA base alteration	Restriction enzyme analysis Polymerase or ligase chain reaction Denaturing gradient gel electrophoresis
DNA mutation	Phenotypic selection

to release benzo(a)pyrene tetraol. The latter molecule could be characterised by mass spectrometry. He then went on to outline the different methods used for haemoglobin adduct measurement. Haemoglobin has the potential to be adducted at cysteine, valine, histidine, arginine or aspartic acid residues owing to the nucleophilicity of these amino acids. Much work had been carried out on examination of the terminal valine residue. In particular, studies had been performed on agents which hydroxyethylate this amino acid, such as fotomustine and ethylene oxide. In the case of fotomustine, an anti-cancer agent, when five individuals were examined, all receiving a similar dose, one individual

had ten times the level of hydroxyethyl valine compared with the rest. This highlights the wide inter-individual variability that is seen in the human population. New methods were being developed all the time in this area and Dr. Farmer discussed two recently-developed procedures: (1) mild alkali hydrolysis to yield alcohols from alkylated carboxylic acids in haemoglobin, and (2) release of aromatic amines from haemoglobin cysteine adducts. In the latter case examples were given of the release of 4-aminobiphenyl, particularly from cigarette smokers, and the release of methylene dianiline and N-acetyl methylene dianiline from occupationally-exposed groups.

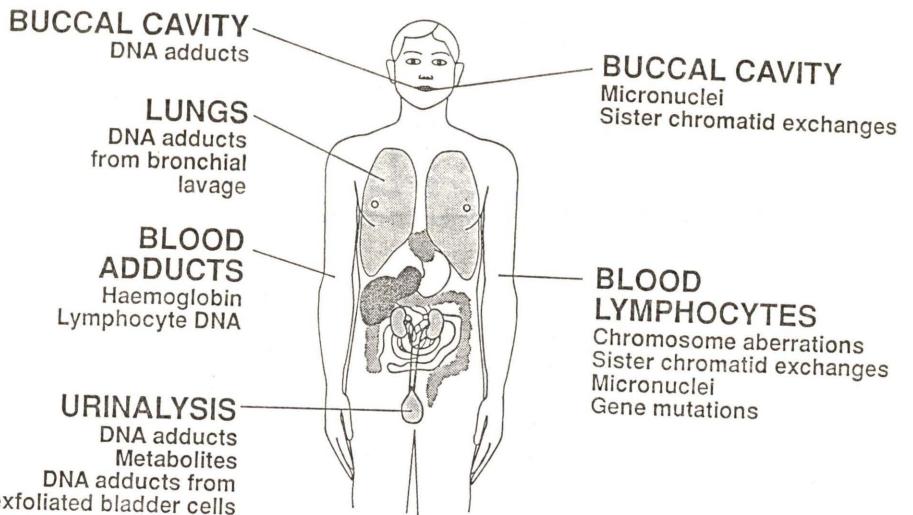


Fig. 1. Non-invasive Targets for Human Biomonitoring.

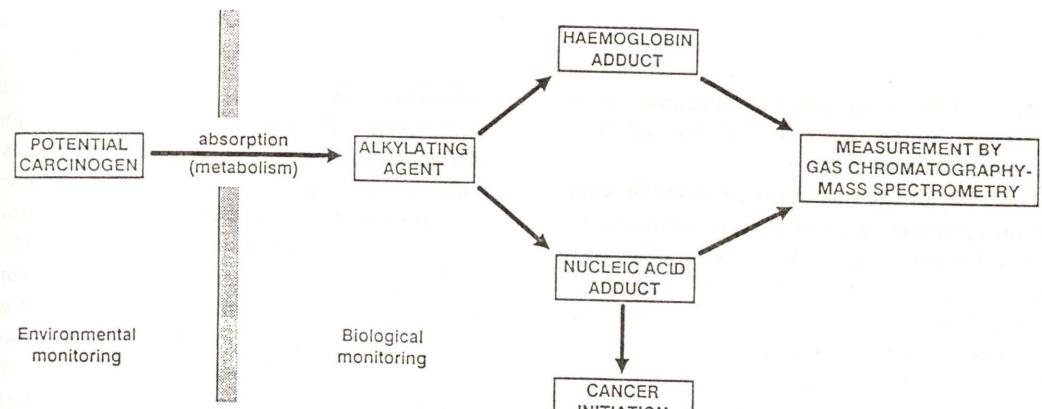


Fig. 2. Flow diagram for adduct measurements after carcinogen exposure.

One point that was not discussed in detail at the meeting was the cost of this type of analysis. Clearly it requires a dedicated mass spectrometer and skilled personnel to run the equipment. In my view, mass spectrometry can only be used in conjunction with cheaper procedures, particularly for large-scale population monitoring purposes. A stage has not yet been reached whereby mass spectrometry can be used to quantitate adducts detected by either  $^{32}\text{P}$ -postlabelling or immunoassay, owing to the greater sensitivity of the latter two methods.

The next speaker, Dr. David Phillips (Institute of Cancer Research, Sutton) discussed the use of  $^{32}\text{P}$ -postlabelling methods for DNA

adduct detection. This technique is a combination of biochemistry using DNA digestion enzymes and ion exchange thin-layer chromatography (Fig. 4). It takes advantage of the enzyme polynucleotide kinase, to label the 5'-hydroxy group of a 3'-nucleotide monophosphate with  $^{32}\text{P}$ -ATP. Since one can obtain the latter chemical at very high specific activity, the method enables DNA adducts to be detected at the  $10^{-9}$  to  $10^{-10}$  nucleotides. Dr. Phillips described his studies on the use of this technique to examine DNA adducts in the skin of mice treated with coal tar or creosote (Fig. 5). Maximum DNA binding occurred by 24 hours proceeded by a rapid loss of adduct which stopped after

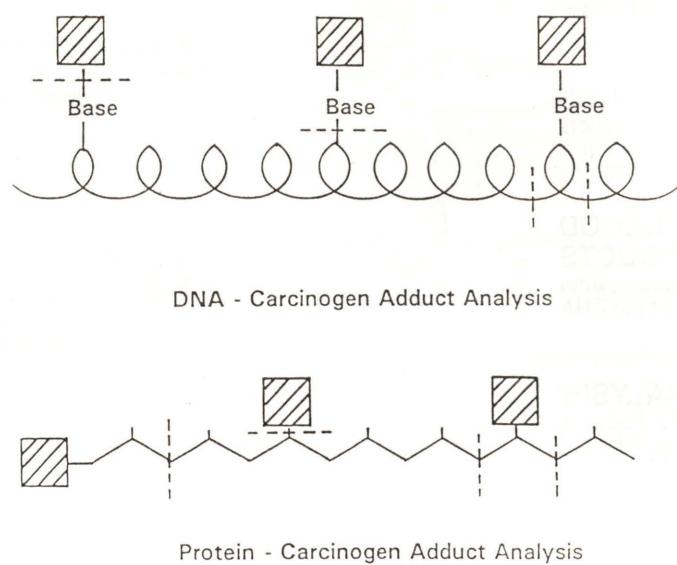


Fig. 3. Cleavage sites in DNA and proteins to release carcinogen moieties.

7 days. Thereafter adducts appeared to be relatively stable with a half-life of 9–10 months.

Dr. Phillips then went on to describe studies on lymphocyte adducts in occupationally-exposed persons, particularly foundry workers and aluminium smelter workers (Fig. 6), as well as the adducts seen in cigarette smokers in tissues, such as the lung and bladder. He mentioned the linear relationship seen, using this technique, between cigarette smoking and DNA adducts in the lung. In addition, the finding of discrete spots in human bladder tissue from smokers and non-smokers appeared a promising one for further study, since these were likely to be derived from aromatic amines.

After being subjected to a large mass of information, the participants and speakers were glad to break for lunch, relax and take in the wonderful weather arranged by Professor Hayatsu. Suitably refreshed, the Workshop continued with a lecture by Dr. Garner on 'The use of immunological methods for DNA adduct analysis'. Dr. Garner used two examples of this approach: (1) studies on the human liver carcinogen, aflatoxin B<sub>1</sub>, and (2) studies on DNA adducts of benzo(a)pyrene. Immunological assays can utilise either polyclonal or monoclonal

antibodies, each having their strengths and weaknesses. In the case of aflatoxin, Dr. Garner described a mouse monoclonal antibody which had been used to immunoconcentrate and then analyse animal and human tissues. Using this antibody, aflatoxin-DNA adducts had been detected in human colon, liver, pancreas, cervix and breast. High adduct levels had been found in all these tissues and Dr. Garner speculated on the possibility of endogenous aflatoxin generation from *Aspergillus* or other aflatoxin-producing species within the body. Antibodies can be used in a variety of ways: not only can they be used in immunoassays but they can be used to make immunoaffinity columns, which can be used to concentrate antigen. Such columns had been prepared with an anti-benzo(a)pyrene diol epoxide DNA antibody to immunoconcentrate adducts from human lung samples from smokers, ex-smokers and non-smokers. The amount of material bound varied from individual to individual, indicating differences in DNA adduct content which would have a bearing on biological outcomes.

Dr. Colin Arlett (MRC Cell Mutation Unit, Brighton) followed on to describe the methods currently available for analysing mutation in blood. He mentioned there were a

### <sup>32</sup>P-POSTLABELLING ASSAY

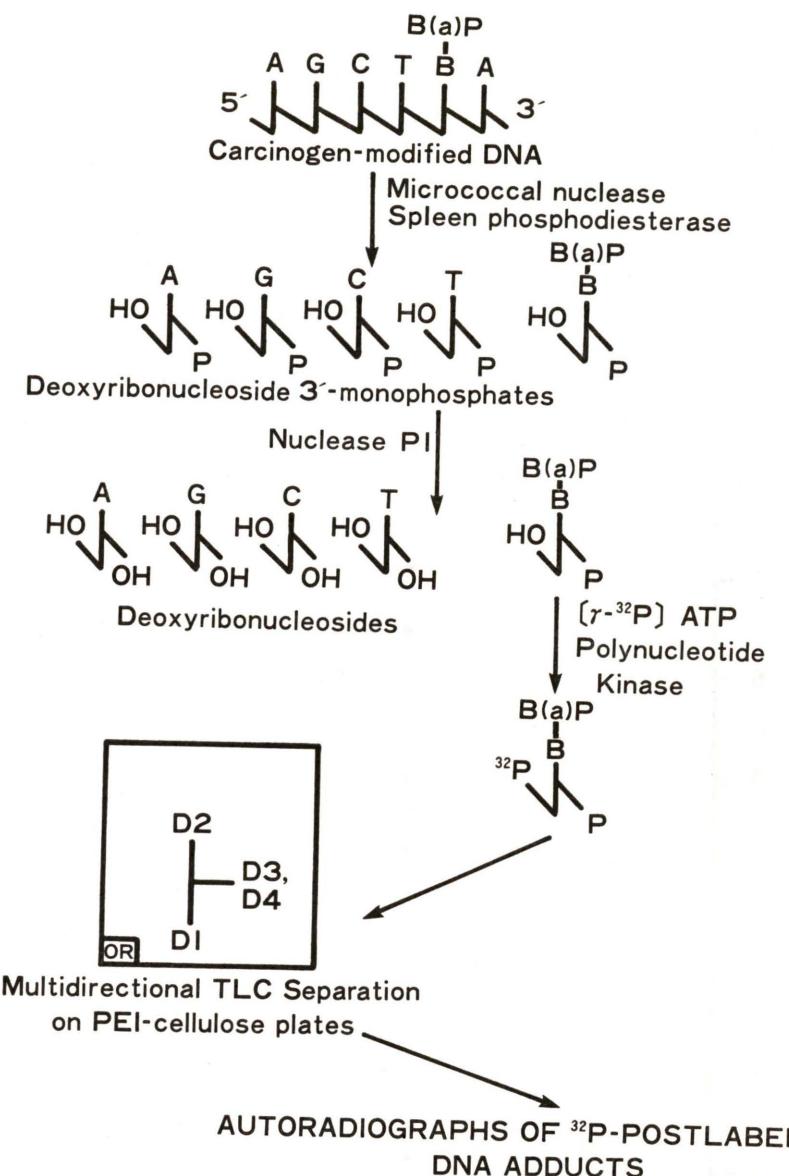


Fig. 4. Human and Experimental Biomonitoring using <sup>32</sup>P-Postlabelling.

number of systems, including analysing for mutation at the glycophorin A locus on chromosome 4 and analysis for haemoglobin A variants (Table 3). Neither of these techniques is widely used. The most commonly used method is the analysis of mutants at the HPRT locus in T-lymphocytes, which have been stimulated to divide *in vitro*. Selection is achieved using 6-thioguanine. Major

findings include the increase in mutant cells with ageing. There appears to be a particular increase during puberty or early adolescence of unknown aetiology. In addition, increased mutant frequencies have been observed in cigarette smokers (Fig. 8) and in individuals with cancer-prone conditions, such as ataxia telangiectasia. The mutation system requires up to 50 ml of fresh blood

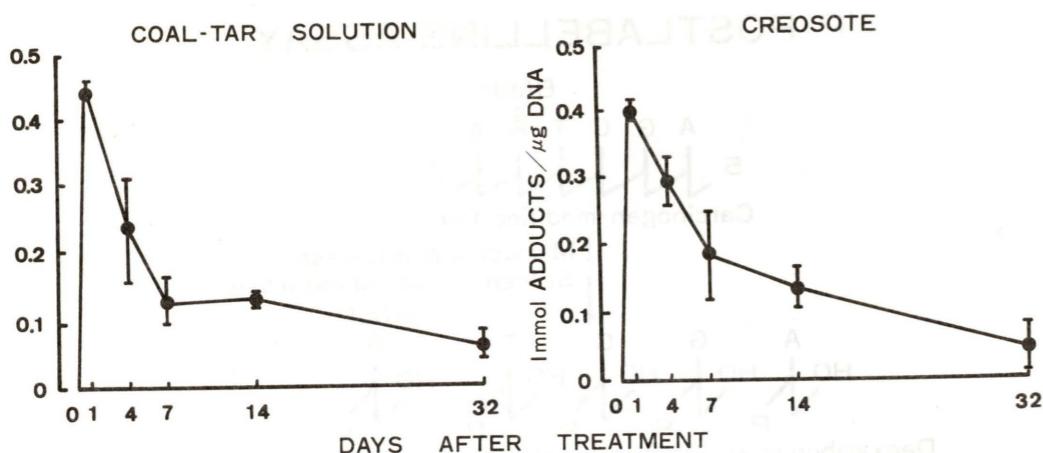


Fig. 5. Persistence of DNA Adducts in Skin After Single Topical Treatment of Mice.

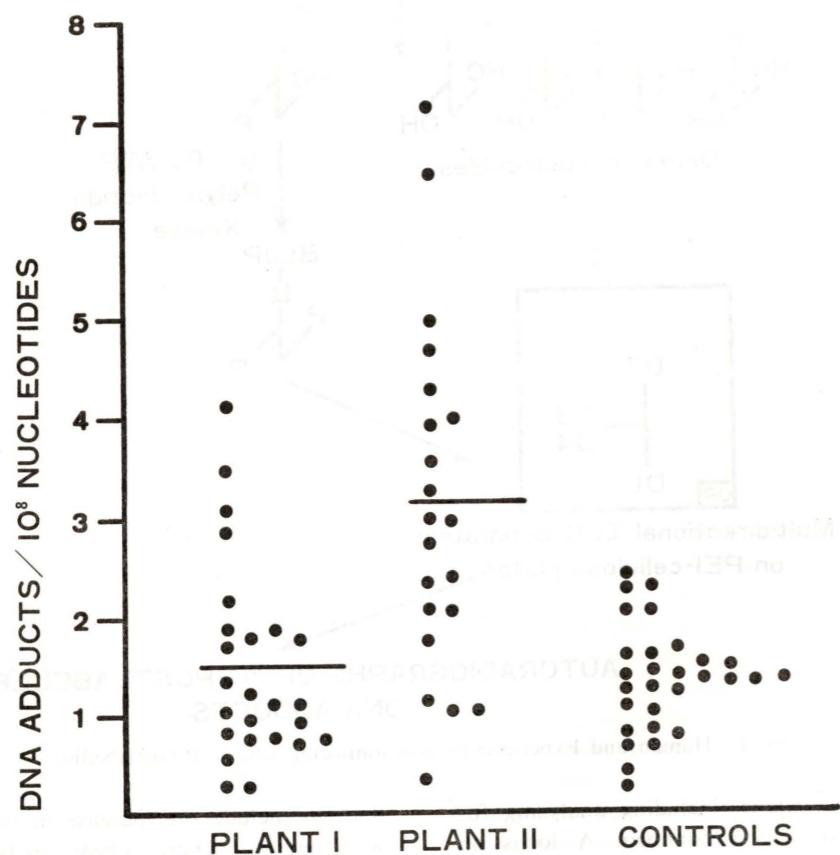


Fig. 6. Aromatic DNA Adducts in Lymphocytes from Aluminium Production Plant Workers.

and is one which requires further validation between laboratories. Dr. Arlett described an experiment in which he was transporting his own cells in him for a comparative study

with Dr. Akiyama (Hiroshima), using this technique.

Dr. Alan Lehmann (MRC Cell Mutation Unit, Brighton) followed on by describing

Table 3. Genetic Endpoints for Human Population Monitoring

A. ERYTHROCYTE BASED

1. Haemoglobin variants
2. Glycophorin A variants

B. LYMPHOCYTE BASED

1. HLA-A allele mutations
2. T-cell receptor complex (CD3/TCR alpha/beta).
3. *Hprt* mutations.

ties, i.e., mutations in the intronic regions. Dr. Lehmann then went on to describe novel methods using a combination of restriction enzymes and PCR to detect mutated sequences, without the need for prior selection. In this procedure one is looking for 1 mutant in  $10^7$  molecules. Current analysis methods are, on the whole, still operating at the  $10^{-5}$  level.

The first day concluded with a lecture on human biomonitoring from an epidemiological viewpoint by Dr. David Coggan (University of Southampton). Dr. Coggan outlined the different epidemiological methods that are used to detect human carcinogens. He highlighted studies which had demonstrated a clear gradient from metropolitan through to urban through to rural areas. In Table 4 the cancer incidence rates are detailed in comparison with England and Wales as 100 percent.

Table 4. Cancer incidence rates for metropolitan, urban or rural populations versus England and Wales as 100 percent

	Metropolitan	Urban	Rural
Bronchus	111	97	83
Bladder	103	100	91
Stomach	104	101	87

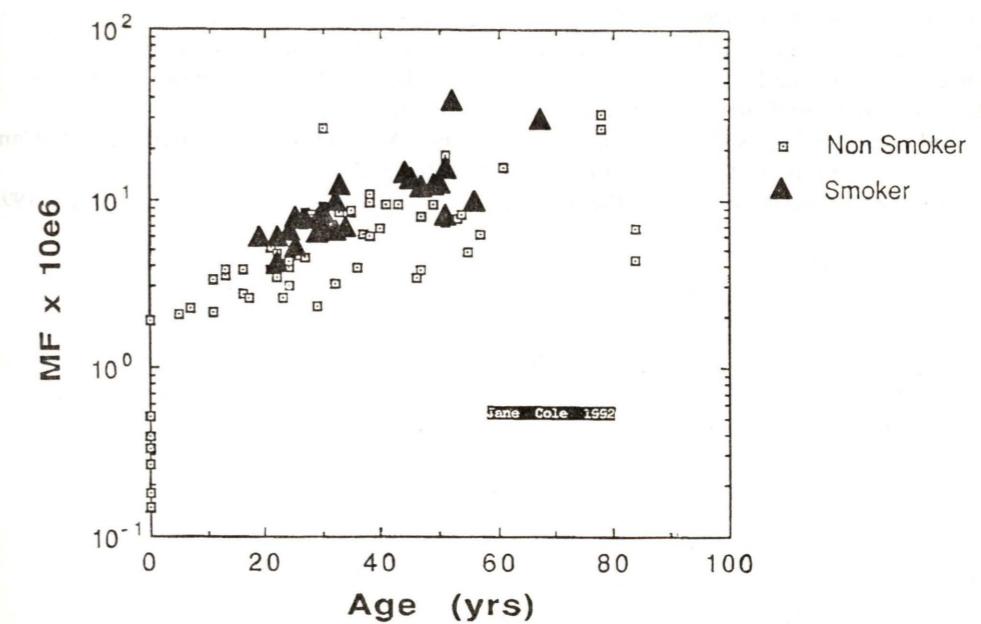


Fig. 7. Mutant Frequency of Normal Smoking Donors.

Dr. Coggan then outlined a large epidemiological study that had been conducted on ethylene oxide-exposed workers (2876 individuals). These were equally divided between industrially-exposed and those exposed in hospitals. Examination of the incidence of leukaemia was made and 3 cases were observed (expected 1.32). This highlights the difficulty with epidemiological studies of this nature where the effects were small. Molecular epidemiology would be of great assistance here in ascertaining if the level of hydroxyethyl valine adducts in haemoglobin, for example, would distinguish the 'at risk' population.

The first day was concluded by a very convivial mixer with attendees of the Workshop. The British scientists were by now becoming more familiar with Japanese food and the use of chopsticks. Were this not the case, they would by now be close to starvation!

The second day of the Workshop consisted of the visiting scientists giving a series of tutorials to the participants. In my personal view, this was not as successful as I might have wished. The time available was probably too short and the interaction with the tutorial group members could have been greater. Clearly there was a reluctance to have an open exchange of view which could reflect not only language difficulties, but a difference in teaching methods. In the United Kingdom it is the usual practice for a tutor to be asked questions by his students. Indeed, if no questions were asked the tutor wonders if he has either lectured poorly, or the stu-

dents have not understood the questions. Clearly, the next Workshop should try and concentrate on this aspect more. Nevertheless, this was an important way of giving more practical information to Workshop participants.

What are my concluding thoughts on the Workshop? It was a long time in the planning process and was essentially over in two days. The next Workshop needs to be longer and must include contributions not only from Britain but also Japan. Comparative molecular epidemiology between our two countries needs to be commenced. Nevertheless, we found our visit to be most productive giving us insights into research in this area in Japan. Our hosts were extremely generous and we all wish to visit Japan again. In particular we would like to thank Professor Hayatsu (Okayama University) and Dr. Fujiki (National Cancer Center, Tokyo) for their assistance in making this Workshop possible and to also extend our thanks to the following sponsors.

The Japan Environmental Mutagen Society  
Okayama University (Faculty of Pharmaceutical Sciences & Gene Research Centre)  
The Great Britain-Sasakawa Foundation  
Olympus Optical Co., Ltd.  
Chugai Boyeki Co., Ltd.  
The British Council (Japan)  
The Daiwa Anglo-Japanese Foundation  
(London)  
The Association for International Cancer Research (Scotland)

14 July, 1992

環境変異原研究 14: 135-136 (1992)

## ワークショップに参加して

慶應義塾大学 医学部 山添 康

本学会会長の早津先生の御尽力により岡山大学において「発がん物質に対するヒトの暴露のモニタリング」のスタディーコース・ワークショップが行われ、その1トピックスとしてDr. P. Farmer (MRC Toxicology Unit, Carshalton) は「The use of mass spectroscopic methods for the human carcinogen adduct analysis」の演題でマススペクトロメトリーの応用に関するセミナーを行った。彼の講演では一般的なマス(質量分析計)装置と分析原理の概説の後、発癌研究においての利用法とその例が示された。ここではその要旨と討論に参加した筆者の印象を記す。

マススペクトロメトリーは核酸付加体およびタンパク付加体の鋭敏な検出手法として利用されている。現時点においてマススペクトロメトリーによるこれら付加体の検出限度は $1/10^8$ 程度であり、核酸付加体の検出に関しては $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法に比べて感度は劣っている。しかしながら放射性同位体を必要とせず、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法と異なり、付加体の構造に関する情報を得ることが可能である等の利点が挙げられる。また $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法はタンパク付加体の検出に利用できないので、タンパク付加体の検出に関してはマススペクトロメトリーが最も鋭敏な方法とされている。

現在、化学物質のヒトへの暴露を計測する試料としては比較的容易に採取が可能な生体成分、おもに血液が使用されている。対象となる血中タンパクは血液中のアルブミンでもよいがヘモグロビンが約4ヶ月程度の寿命を持つため、これまでの研究ではヘモグロビン付加体として検出されることが多い。実際の手法としては通常1から2mlの血液を採取して、血漿と血球を分離後、溶血させ、さらに塩酸/アセトン処理によってグロビン画分を調製する。このうち化学処理によって付加物を遊離させ質量分析計で定量されている。

アクリルアミドはタンパクのシステインやヒスチジンと反応し、付加体を生成することが知られている。この反応によって、N-末端アミノ基も修飾されグロビンへの付加体も生成する。Dr. Farmer は N-末端アミノ基由来の 2-hydroxyethylvaline の生成に着目して、グロビンをギ酸分解後、フェニルイソチオネート化し、さらにシリル化誘導体として測定している。これらの手法は汚染・暴露が疑われるヒトの試料についてその原因物質の同定に有効と考えられる。

アデニンはDNAの分解だけでなく、食物と共に体内に取り込まれており、一定量が尿中に常に排泄されている。彼は各種アルキル剤の暴露の指標としてアデニンのメチル誘導体が利用できるのではないかと考え、尿中に排泄された3-メチルアデニンの測定を試みている。実際には XAD<sub>2</sub>カラム、HPLC による分離の後 t-butylidimethylsilyl 誘導体に導き、GCMS に供している。通常の磁場/電場を用いるセクターマスによる分析ではセレクトイオンモニタリングにも拘らず多数のピークが現われ、マスの分解度を変更する程度の操作では定量分析を行なうに十分な S/N 比が得られないが、タンデムマス装置を用いて測定すると定量が可能なことを示した。今後メチル化剤の暴露後に尿中 3-メチルアデニンレベルがどの程度変化するかを明らかにできればアルキル化剤の暴露を計測するよ

〒160 東京都新宿区信濃町 35

Learning on Protein Adduct Monitoring; Personal Impression on Dr. Farmer's Lecture  
Yasushi Yamazoe

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

指標となるかも知れない。

GCMS 法は  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法に比べて核酸付加体の検出感度はやや劣る。しかしながら測定した物質の構造についての情報が得られ、定量精度もより高い。今後 GCMS はその特長を活かして、例えば  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法でヒトにおいて化学物質の暴露が検出され、幾つかの物質の関与が予想される場合、ヘモグロビン等のタンパク付加体を GCMS で分析し、暴露物質を同定することによって  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法での結果を補強することが可能である。また GCMS 情報を基にヒトへの暴露を予測することにより、化学物質のヒトへの暴露レベルをより正確に評価できるのではないかと期待される。

環境変異原研究 14: 137-138 (1992)

## $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法による DNA 付加体の検出

国立がんセンター研究所 発がん研究部 若林 敬二

### 1. はじめに

ポストラベル法は Randerath 博士等により開発されたものであり、放射性同位元素 (RI) で標識した化合物を用いずに、DNA 付加体を感度高く検出できる方法である。この方法の使用法の実際につき、Institute of Cancer Research, Sutton, UK の D. H. Phillips 博士が彼の経験談をまじえ、解説した。Phillips 博士は  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法を用い、鉄工場労働者の白血球 DNA 中の芳香族炭化水素化合物-DNA 付加体の解析や、喫煙者の臓器 DNA 中の付加体の検索を精力的に行っている。以下に、Phillips 博士等の最近の論文を記す。

### 2. $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の実際

Fig. 1 に  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法のスタンダード法を示す。この方法の変法として Fig. 2 に示すような adduct 増感法、nuclease P1 法及び butanol 抽出法がある。これら方法の詳細については、“環境変異原研究” 13, 97-102 (1991) に記載されているので本稿では省略する。又、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法については、“核酸 II (新生化学実験講座 2)”, 日本生化学会編, pp. 133-144, 東京化学同人 (1989 年) においても解説されているので、参考されたい。

Phillips 博士は上記方法の説明に加えて、実験者への被曝量をいかに減らすかについて 2 つの方法を提示した。1 つ目の方法は、感度高く  $^{32}\text{P}$  を検出できる image analyzer を使用することにより、実験に用いる  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP を減少させることができることである。2 つ目の方法は、 $^{32}\text{P}$  の代わりに  $^{33}\text{P}$  を用いるものである。 $^{33}\text{P}$  を用いる

利点としては、 $\beta$  線のエネルギーが  $^{32}\text{P}$  に比べてかなり低いため、アクリルの防護板等を使用する必要がなく、又、放射線の飛程が短く、オートラジオグラフィーでの解像度が  $^{32}\text{P}$  よりも優れている点をあげている。しかし、 $^{33}\text{P}$  の市販価格は  $^{32}\text{P}$  に比べてかなり高いため、 $^{33}\text{P}$  を使用してポストラベル法を行なっている研究室は極くわずかであるのが現状である。

### 3. おわりに

$^{32}\text{P}$ -ポストラベル法は、対象とする物質を標識する必要がなく、高感度に DNA 付加体を検出できる利点がある。本法を用い、発がん物質を投与した動物における DNA 付加体の臓器分布、

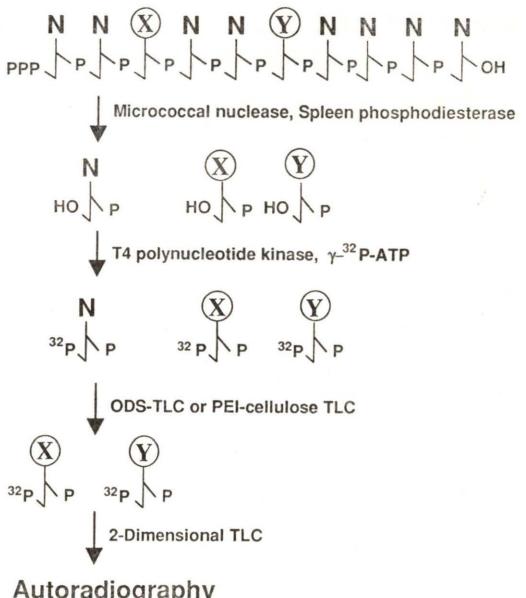


Fig. 1.  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling Method.

〒104 東京都中央区築地 5-1-1

Detection of DNA Adducts by  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling Method

Keiji Wakabayashi

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

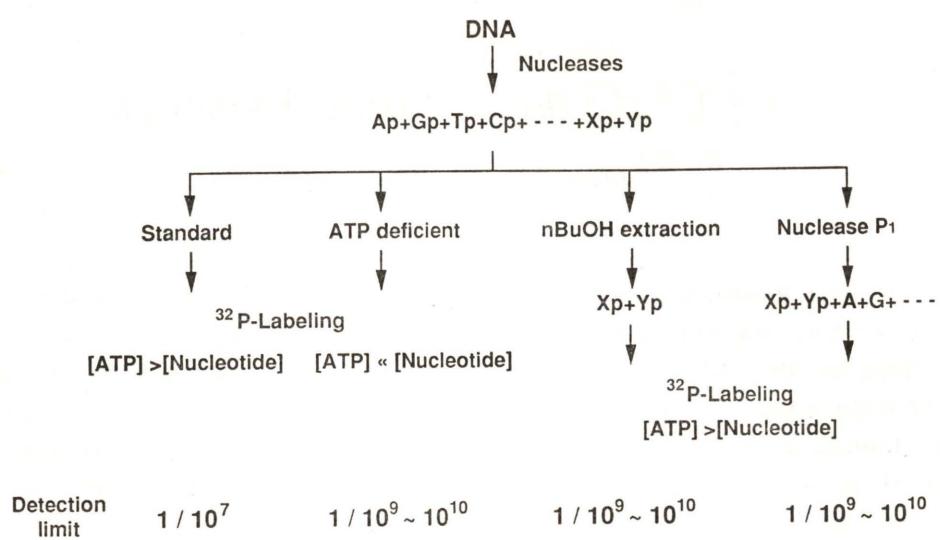


Fig. 2.

DNA 付加体の生成及び修復の経時変化、更にはヒト臓器中における環境発がん物質の DNA 付加体の検出等の研究成果が続々発表されている。又、他の手法と組み合せることにより環境発がん物質の突然変異機構のメカニズムを解明するのも役立つはずである。

ワークショップ終了後、数人の研究者より実際に<sup>32</sup>P-ポストラベル法を取り入れた研究を行いたいとの申し出があった事は、討論リーダーとして最も喜ばしい事であった。

#### 参考文献

- Hemminki, K., E. Grzybowska, M. Chorazy, K. Twardowska-Saucha, J. W. Sroczynski, K. L. Putman, K. Randerath, D. H. Phillips, A. Hewer, R. M. Santella, T. L. Young and F. P. Perera (1990) DNA adducts in humans environmentally exposed to aromatic compounds in an industrial area of Poland, *Carcinogenesis*, **11**, 1229-1231.
- Phillips, D. H., K. Hemminki, A. Alhonen, A. Hewer and P. L. Grover (1988) Monitoring occupational exposure to carcinogens: detection by <sup>32</sup>P-postlabelling of aromatic DNA adducts in white blood cells from iron foundry workers, *Mutation Res.*, **204**, 531-541.
- Phillips, D. H., A. Hewer, C. N. Martin, R. C. Garner and M. M. King (1988) Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking, *Nature*, **336**, 790-792.
- Phillips, D. H., A. Hewer, A. D. B. Malcolm, P. Ward and D. V. Coleman (1990) Smoking and DNA damage in cervical cells, *Lancet*, **335**, 417.
- Phillips, D. H., B. Schoket, A. Hewer, E. Bailey, S. Kostic and I. Vincze (1990) Influence of cigarette smoking on the levels of DNA adducts in human bronchial epithelium and white blood cells, *Int. J. Cancer*, **46**, 569-575.
- Schoket, B., D. H. Phillips, A. Hewer and I. Vincze (1991) <sup>32</sup>P-Postlabelling detection of aromatic DNA adducts in peripheral blood lymphocytes from aluminium production plant workers, *Mutation Res.*, **260**, 89-98.

## 免疫学的定量法：Dr. Colin Garner の話を中心に

東京大学医科学研究所 癌細胞研究部 許 南 浩

### 1. はじめに

ヒトのがんの大部分は化学物質によって引き起こされると考えられている。化学発がん物質の主な細胞内標的は DNA である。発がん物質の多くは DNA と共有結合し、その構造変化が突然変異、がんをもたらすのである。

DNA 付加体量は、暴露量（外因性および内因性発がん物質の量）、体内への吸収、分布、代謝活性化および解毒、DNA 修復のタイプと効率など、多数の要因に左右される。逆に言えば、DNA 付加体を定量することは、そうしたさまざまな要因を総括して、突然変異につながる直前の状態を把握することを意味する。

我々を取り巻く環境中には、多種多様な発がん物質が存在していると考えられる。また通常、発がん物質は複数種の DNA 付加体を形成する。各々の DNA 付加体の化学的安定性、修復の様相、生物作用等は異なっている。従って、ある特定の DNA 付加体と発がんとの関連性を検討するためには、個々の DNA 付加体を区別しうる特異性の高い方法が必要である。

ジエチルニトロソアミンによるラット肝がんの発生、エチルニトロソウレアによるラット脳腫瘍の発生、ベンツピレンによるマウス皮膚がんの発生など、代表的な発がん実験系においては、 $10^4 \sim 10^6$  のスクレオチドに一個の DNA 付加体が形成される。ヒト組織では、この約 1/100 のレベルだと推定される。またヒト組織 DNA 中の付加体の解析に際しては、多くの場合材料としての DNA 量が限定されるであろう。従って、検出感度の非常に高い方法が必要となる。加えて、手技

が簡便で容易であることが望ましい。

DNA 付加体を定量するにはいろいろなアプローチが考えられるが、免疫学的手技は上記の条件を最もよく満たす方法の一つであると言えよう。

Dr. Garner はこの免疫学的定量法について講演したが、聴衆の大部分が現に付加体の定量をやっているわけではないということもあってか、割合一般的な話に終始した。以下、その内容を軸にしながら、免疫学的定量法を概括する。一般的な手技は成書にゆずり、付加体定量に特徴的な議論を中心とする。

### 2. ポリクローナル抗体かモノクローナル抗体か

これまでに報告されている例では、ややポリクローナル抗体が多いが、目的に応じて使い分ける。ポリクローナル抗体は調製が簡単であり、特異性、Affinity constant ともにモノクローナル抗体に劣らないものをとることも可能である。しかし抗原はできるだけ純粋単一なものにする必要がある。

モノクローナル抗体では、いろいろな特異性をもったものを選択できる。例えば、 $0^\circ$ -エチルグアニンで免疫して、 $0^\circ$ -メチルグアニンにも $0^\circ$ -ブチルグアニンにも反応するものと、 $0^\circ$ -メチルグアニンにより選択的に反応するものを別々にとることができる。また組織染色でバックの少ないものといった選択も可能である。一度ハイブリドーマをとっておけば、抗体はいくらでもできるので、各研究機関に配布して国際的な比較実験も容易にできる。

### 3. 抗原の調製

DNA を発がん剤で処理してそのまま抗原として使う方法と、特定の付加体を合成して抗原とする方法がある。前者は特異性が問題になるので、モノクローナル抗体を作つて、選別する必要がある。後者はあらかじめ付加体の構造を知る必要があり、また合成法、生成物の安定性が問題なので、なかには適用しにくい付加体もある。

抗原が低分子の場合は、ウシ血清アルブミンや卵白アルブミン、キーホールリンペット・ヘモシアニンなどに結合させて免疫する。どの蛋白がよいかは、動物系統、結合法、抗原によって違うので、予測できない。抗原が蛋白に近すぎると認識されにくくなるので、ときにはスペーサーを入れることもある。Dr. Garner が Aflatoxin BI に対する抗体をつくったときは、蛋白一分子あたり 15~20 分子をスペーサーなしで結合させ、最終的に抗体を得ることができたといふ。

### 4. 抗体の調製

抗体調製の手順は、一般的なものに準ずる。抗体のタイマーは普通 Non-competitive ELISA でモニターする。つまり免疫に使つたのとは違う蛋白に結合した抗原を、あらかじめマルチウェルプレートにくっつけておき、被検血清を作用させた後、アルカリフォスファターゼかペロキシダーゼに結合させた二次抗体によって、血清中の抗体価を決めるのである。抗体価が十分になれば、採血して血清を分離するなり、細胞融合によるハイブリドーマの作製へと向かう。

抗体がとれたら、類縁化合物との交差反応性ができるだけ広範に調べておく必要がある。特異性が強ければ、目的とする DNA 付加体のみを選択的に定量することができ、逆に交差反応性が弱ければ、それをを利用して一連の構造の類似した付加体をまとめて検出することもできる。

### 5. 免疫学的定量法

抗体を利用した免疫学的定量法にはさまざまなものがあり、それぞれに長所と欠点をもつてゐるので、目的に応じて使い分ける必要がある。またある一つの方法に適している抗体が、別の定量法

には向かないこともある。

#### ① ELISA

最も広く使われている。手順の概略は上に述べたが、一定量の抗原を壁着させておき、被検試料と抗体を加える Competitive ELISA が実際の定量にはよく使われる。手技は簡便で多数のサンプルを解折するのに適しており、アイソトープを使う必要のないのも利点である。

#### ② Radioimmunoassay

液相で、一定量のアイソトープラベルしたスタンダードと抗体、被検試料を反応させ、抗体に結合したアイソトープ量を測定する Competitive RIA がよく行われる。感度は抗体の affinity constant とアイソトープの比活性に依存する。手技はやや繁雑だが、定量性、再現性の信頼度は高い。

#### ③ Immuno-slot-blot

DNA をニトロセルロース膜の上にスロット状に固定し、特異抗体、<sup>125</sup>I でラベルした二次抗体を作用させて定量する。少量の DNA を使う解析に適している。

#### ④ Immunoaffinity column

抗体をカラムに固定して DNA 水解物を通し、結合した分画を取り出す。定量は、<sup>32</sup>P-ポストラベリング、ELISA、HPLC などによって行う。最近試みられ始めた方法であるが、一段階で mg オーダーの DNA から十数 fmol の DNA 付加体を取り出すことができる。注目をあつめている。いかによい抗体を大量に作れるかが成否の鍵である。

#### ⑤ Immunostaining

ごく少量の材料を使って、DNA 付加体の組織局在を知ることができるという特長をもつてゐる。欠点は他の分画法と組み合わせることができないので、DNA 付加体の相対的な量が比較的高くないと検出できないことで、Aflatoxin のような比較的大きな付加体でも 10<sup>6</sup> に一個ぐらいが限界である。従って、通常のヒト組織のモニタリングには使えない。

#### ⑥ その他

以上の他にも、さまざまなアプローチが可能である。例えは、まず免疫沈降によって付加体をも

つ分画を濃縮し、その後いろいろな定量法と組み合わせることもできる。我々は最近、DNA 水解物を HPLC で分解し、<sup>32</sup>P-ポストラベリングをした後、特異抗体で免疫沈降するという、感度・特異性ともに非常に高い方法を開発した。

### 6. 二つの「S」

DNA 付加体定量法には、二つの「S」が重要である。

#### ① 特異性 Specificity

上に述べたようにヒト組織 DNA を解析すると、動物実験ではみられなかった正体不明で、しかも特異抗体に結合するものがよくてくる。一つの理由は、対象とする付加体の相対的含量が極端に低いためであろう。従って、定量法の特異性を抗体のそれに全面的に依存するのは危険で、容易に false positive の結果を生む。HPLC など他の分画法と組み合わせる必要がある。

#### ② 感度 Sensitivity

感度は二つの面から考えることができる。ある付加体が絶対量としてどれだけあれば検出できるかという絶対感度 (Absolute sensitivity) と、どのくらい多くの正常塩基の中から選択的に目的の付加体を検出できるかという相対感度 (Relative sensitivity) である。絶対感度が決まれば、相対感度はその方法が扱える DNA 量に依存する。

例えは Immunostaining は極端にいえば一個の細胞で定量できるわけで、絶対感度は非常に高い。しかし、相対感度が低いため、ヒトのモニタリングには向かないものである。Immuno-slot-blot も同様で、絶対感度は高いが、DNA を直接扱うので相対感度には限界がある。ELISA とか Radioimmunoassay は、DNA を加水分解したものを使えるので、他の分画法と組み合わせることによって相対感度をあげることができる。

このように方法の選択や、新しい方法の開発に際して、二つの「S」を基準にすれば考えやすい。

### 7. おわりに

ヒト組織 DNA 中の付加体を定量して発がん物質への暴露量をモニタリングし、さらに発がんリスクとの関連を探ろうという試みはようやく端緒についたところである。今回のワークショップが、日本でこの分野の研究が進展し次回は日英対等の議論ができるための契機となれば、早津先生のご苦労も報われよう。

最後に、本論文は Dr. Garner のお話を軸にしつつも、筆者の責任においてまとめたものである。特に、「はじめに」や「二つの S」などは筆者の考え方であることをお断わりしておきたい。

## ヒト血液細胞を用いた体細胞突然変異のモニタリングについて

放射線影響研究所 放射線生物学部 秋山實利, 京泉誠之,  
楠洋一郎, 平井裕子

### 1. 序

今回のワークショップにおいて, Arlett 博士は現在用いられているヒトの *in vivo* 体細胞突然変異の検出法についてのレビューをされ, バイオモニタリングにおける意義について語られた。これらの検出法は, 赤血球のグリコフォリン A(GPA) 遺伝子および T リンパ球のヒポキサンチンフォスフォリボシルトランスクフェラーゼ (HPRT), HLA-A, T 細胞抗原受容体 (TCR) の各遺伝子の突然変異測定系である。Arlett 博士はこの分野で長年に亘って活躍され, 特に最近ではラドンや喫煙による T リンパ球 HPRT 遺伝子の突然変異誘発を中心に行なっている (Briges *et al.*, 1991)。

我々の研究室でも, これら 4 種の方法を駆使して, 原爆被爆者を中心に放射線被曝の結果生じる体細胞突然変異の解析を行なってきた (Akiyama *et al.*, 1992)。特に TCR の突然変異検出系は我々が独自に確立した測定系なので (Kyoizumi *et al.*, 1990), 今回のワークショップで Arlett 博士に代表的突然変異検出法の一つとして紹介されたことは我々の悦びとするところであった。さらに手前味噌になるが, この 4 種の測定方法をすべて使えるのは, 現在のところ我々の研究室だけである。また, 原爆被爆者という比較的被曝線量のはっきりした集団から血液材料を得られるという利点があり, 我々はこれらの方法の比較評価を行えるという立場にある。個々の測定法の比較やリスク解析における意義については, 最近いくつかの

総説に著したので (Akiyama *et al.*, 1991; Nakamura *et al.*, 1991) 詳細はそれらを参照していただきたい。本稿では Arlett 博士のセミナー中に耳にした受講者の幾つかの疑問について, 我々の立場から答えてみたい。これら専門領域外の研究者からの素朴な疑問に対し, 最近の話題も含めて, できるだけ分かり易く解説したつもりである。読者の理解の一助になれば幸いである。

### 2. 何故血液細胞のこれらの遺伝子が突然変異のマーカーとして選ばれたのか?

採取が容易であるという点で, 血液細胞を材料にするのは分かるが, 血液細胞に発現される遺伝子は何十万種類もあるはずなのに何故 GPA であり TCR 遺伝子なのか。この問い合わせに対する一番明確な答えの一つは, ヒトの体細胞遺伝子の欠損型突然変異を検出しようとすれば, single gene allele の突然変異を検出できる系でなければならないという点である。つまり, 体細胞突然変異頻度は経験上 1 遺伝子当たり  $10^{-4} \sim 10^{-6}$  と考えられているので, 両対立遺伝子が共に発現を欠損する確率は  $10^{-8} \sim 10^{-12}$  となる。このような両対立遺伝子を共に欠損した突然変異体 10 個を得るために,  $10^9$  個以上のリンパ球を 1 人のヒトから採取するのは難しい。これらの点は, すべての遺伝子が single allele である大腸菌を使った突然変異物質のスクリーニングとは違う難しさがある。そこで, single gene allele の突然変異を見れる系として, X 染色体上の遺伝子である HPRT が最初

〒732 広島市南区比治山公園 5-2

Monitoring of Somatic Cell Mutations in Human Blood Cells

Mitoshi Akiyama, Seishi Kyoizumi, Yoichiro Kusunoki and Yuko Hirai

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

に使われ始めた (Morley *et al.*, 1983; Albertini *et al.*, 1982; Hakoda *et al.*, 1988)。X 染色体上の遺伝子はすべてヘミ接合体である。HPRT 遺伝子の突然変異 T リンパ球はチオグアニンに耐性なので、この薬剤とインターロイキン-2 存在下で選択的に増殖させることが出来る。

一方、赤血球を  $10^{10}$  個得るのは易しいが、増殖しないのでリンパ球のような clonogenic assay は使えない。Jensen らは、赤血球 GPA は MN 型の血液型物質であり、抗体によりその型の違いを識別できることに注目した (Langlois *et al.*, 1986)。MN 型ヘテロのヒトであれば、 $10^{-5} \sim 10^{-6}$  のオーダーで single gene allele を欠損した MO あるいは NO 型のヘミ接合型変異体、およびおそらく両対立遺伝子の組換えにより生じた MM あるいは NN 型のホモ接合型変異体が存在すると推定し、実際にセルソーター (FACS) によりそれらの存在を証明した。現在市販の FACS を用いれば、10 分前後で  $10^6$  個の赤血球は測定できる (Kyoizumi *et al.*, 1989a)。

また、HLA 遺伝子群は多型性があり、この遺伝子の作る表面抗原はモノクローナル抗体で識別できる。従って、ヘテロ接合体の対象者であれば GPA と同じ理屈で突然変異体は測定可能となる。実際、Morley らは抗 HLA-A 抗体と補体処理で生き残った T リンパ球突然変異体を検出し、その頻度を測定した (Janatipour *et al.*, 1988)。我々は FACS により、抗 HLA-A 抗体 (HLA-A2 または A24 を認識する) と反応しない突然変異体が  $10^{-4}$  の頻度で検出できることを示した (Kushiro *et al.*, 1992)。

T リンパ球の TCR ( $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖から構成される) をコードする遺伝子には、B リンパ球の抗体遺伝子と同様に、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖のそれぞれ 2 つの対立遺伝子のうち一方のみが発現する allelic exclusion の機構が働いている。つまり、TCR  $\alpha$ 鎖および  $\beta$ 鎖遺伝子はそれぞれ常染色体上にあるにもかかわらず、HPRT 遺伝子と同様にヘミ接合体の状態にあるため、突然変異体の検出が可能になる。正常 T リンパ球では、TCR  $\alpha\beta$  は CD3 分子群と複合体を形成し、細胞膜上に発現される。もし、 $\alpha$ 鎖あるいは  $\beta$ 鎖が欠損すると、CD3 分子

と複合体が形成されず膜上に発現されない。従って CD3 分子の表面発現をマーカーにして、FACS により突然変異体を検出できる。このような TCR 変異体 T リンパ球は末梢血中に  $10^{-4}$  のオーダーで存在することが示された (Kyoizumi *et al.*, 1990)。

これら欠損型突然変異の他に、点突然変異により生じたヘモグロビン (Hb)-S (鎌状赤血球の原因となる変異) を抗体により検出する系も考え出されている (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1984)。このような Hb の突然変異赤血球は  $10^{-8}$  オーダーで存在すると報告されているが、検出方法に問題があるようである。

以上の遺伝子以外にも、突然変異のマーカー遺伝子の候補は沢山あるはずである。例えば、X 染色体にコードされる遺伝子は、HPRT 以外にも多くあり、そのうちの幾つかはマーカーとして使えるかもしれない。

### 3. どの測定系がバイオモニタリングとして最も優れているのか？ また、実際に始めるとすればどの方法が可能か？

これらの間にに対する良い答は現在のところ我々は持ち合わせていない。どの方法も一長一短があり、より優れた方法の開発は現在も大きな課題である。Table 1 に各方法の比較を示したので参考にしていただきたい。もし、調査対象が大規模になる場合は使用血液量が少量で、しかも測定が簡便迅速に行える GPA 法もしくは TCR 法が適当であろう。特に血液の輸送に時間がかかる場合は、比較的丈夫な赤血球を使う GPA 法が良い。実際、我々はこの方法で旧ソビエトから輸送された血液を用いてチャルノブイリ被災者の調査を行い良好な結果を得ている。しかし、GPA 法は対象者が MN 型のヘテロ接合のヒトに限られる (集団の約 50%) とともに、高価な FACS が必要となる。また、TCR 法は対象者の制限はないが、その突然変異体は in vivo で半減期約 3 年で消失していくので (未発表データ)，被曝後長期間を経た場合には突然変異体は検出されなくなる (Umeki *et al.*, 1991; Kyoizumi *et al.*, 1992)。

また、この方法にも FACS が必要になる。HLA

Table 1. 各体細胞突然変異体測定系の比較

対象細胞 対象者の制限	突然変異遺伝子座			
	HPRT	TCR	HLA-A	GPA
T リンパ球 無	T リンパ球 無	T リンパ球 HLA-A2 ヘテロまたは A24 ヘテロの人	T リンパ球 HLA-A2 ヘテロまたは A24 ヘテロの人	赤血球 MN 型 ヘテロの人
1 検体当たりの必要血液量 1 検体当たりの測定時間 測定方法 変異体頻度の正常レベル 老化に伴う変異体頻度の上昇 放射線被曝による変異体頻度の上昇 in vivo での変異体の淘汰 変異体クローニングの増殖分離 変異遺伝子の解析	10 ml 2 週間 選択培養 $5 \times 10^{-6}$ + + + 有 可 可	1 ml 5 時間 FACS $2 \times 10^{-4}$ + +～ (半減期 3 年) 有 可 可	1 ml 5 時間 FACS $1 \times 10^{-4}$ + — 有? 可 可	1 ml 5 時間 FACS $2 \times 10^{-5}$ + ++ 無 不可 不可

以上は放影研で得られたデータにもとづく。

法も対象者に制限があるとともに、TCR 突然変異体同様、in vivo で消失していくようである (Kushiro *et al.*, 1992)。その点、HPRT 法は対象者に制限はなく、血液からのリンパ球分離と培養ができる研究室であれば、どこでも可能である。手始めにやるとすればこの方法が一番適当かもしれない。ただ注意しなければならないのは、他の T リンパ球の突然変異と同様、誘発された突然変異体が in vivo で徐々に消失していくと考えられている。

### 4. 突然変異体の遺伝子解析は可能か？

生成された突然変異の性質を知るためにには、その突然変異遺伝子の解析が必要になってくる。Table 1 にまとめたように、赤血球を用いる GPA 法では突然変異遺伝子の解析は不可能である。しかし、他の T リンパ球を用いる方法では、突然変異リンパ球クローニングが分離でき、その遺伝子の変異や染色体異常の解析が可能である。ただ TCR 突然変異体は in vitro での増殖能力がかなり劣っており、実際に解析できる突然変異クローニングは限られる。これは TCR/CD3 複合体自体が T リンパ球の増殖に直接関与しているからであり、in vivo で突然変異体が減っていくのはこのためであろう。

この点、HPRT や HLA 遺伝子の突然変異体は正常 T リンパ球クローニングと同程度に in vitro

で増殖し、多くの遺伝子解析のデータが報告されている。特に HPRT 遺伝子については、PCR 法を用いて增幅させた突然変異 HPRT 遺伝子のエクソンの塩基配列の解析が世界の各所で進んでいる。Arlett 博士も同じ Sussex 大学の Lehman 博士 (ワークショップ演者) の研究室と共同研究しており、Arlett 博士の所で分離した突然変異体を Lehman 博士の所で遺伝子解析しているらしい。また最近、Albertini のグループから面白い報告があった。ヒトの胎児期に自然誘発した HPRT 突然変異では、TCR や抗体遺伝子の再構成に関与していると考えられている recombinase が HPRT 遺伝子の欠失突然変異の生成にも関与しているらしい (Fuscoe *et al.*, 1991)。これはインtron 内にある break point の塩基配列を解析してみると、recombinase の認識する consensus sequence が見出されたことから推論された。Adult の突然変異ではこの配列はあまり検出されないので (突然変異クローニングの約 2%), この現象は recombinase 活性が胎児期において高いということと関係していると考えられる。

HLA-A 突然変異の遺伝子解析も、Morley と我々の研究室で行われている (Morley *et al.*, 1990; Kushiro *et al.*, 1992)。他の遺伝子座と異なり、HLA 突然変異では体細胞組換えを遺伝子レベルで解析することが可能である。実際、健常人の生体内で自然誘発したと考えられる変異体

の約1/3は体細胞組換えにより生じたホモ接合型であった。さらに、最近、高発癌症候群の一つである Bloom 症の患者では GPA 遺伝子座と同様に (Kyoizumi *et al.*, 1989b), HLA-A 遺伝子座でも体細胞組換えが高頻度 (正常の約 50 倍) に自然誘発していることが明らかになった (Kusunoki *et al.*, manuscript in preparation)。遺伝子解析により、この体細胞組換えの約 3 分の 2 は HLA-DQA と HLA-A 遺伝子座の間にその break point があることが分った。HLA 遺伝子座内での高頻度の組換えは生殖細胞系列でも報告されており、組織適合性抗原の多型性の生成機構と関連して興味深い。

## 5. 結語

従来、遺伝毒性物質のヒト体細胞遺伝子への影響を調べるバイオマーカーとしては染色体異常検査が唯一の方法であった。この方法は多大の労力と経験が必要で、もっと迅速簡便な方法が必要という理由から、種々の体細胞突然変異検出法が考案されてきた。DNA Adduct の分析が突然変異の前段階を検出するものであり、染色体異常がより大きな遺伝子構造異常を捉えているとすれば、体細胞突然変異のモニタリングはそれらの間を埋める知見を与えてくれるだろう。上に述べたように、どの体細胞検出法も一長一短があり、理想には遠い。しかし、ひとりひとりの対象者について、できるだけ多くのマーカー遺伝子を解析するということは、遺伝毒物曝露の有無を判断する点では重要なことである。このような multi-gene assay 系は perspective に発癌の危険性を予測するという将来の課題に近づくためには正しい方向と思われる。最後に、この拙文を読まれた方のひとりでも多くが、地味ではあるが、大変重要なこの分野に参画されることを期待したい。

## 参考文献

- Akiyama, M., Y. Kusunoki, S. Umeki, Y. Hirai, N. Nakamura and S. Kyoizumi (1992) Evaluation of four somatic mutation assays as biological dosimeter in humans, In A. W. C. Dewey *et al.* (eds), "Radiation Research: A Twentieth-Century Perspective Vol. II", New York, Academic Press. pp. 177-182.
- 秋山實利, 梅木繁子, 楠洋一郎, 平井裕子, 久代淳一, 京泉誠之, 中村典 (1991) 放射線被曝者における生物学的線量推定のための 4 種の体細胞突然変異検出法の評価, 環境変異原研究, **13**, 103-108.
- Albertini, R. J., K. L. Castle and W. R. Borcherding (1982) T cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 6617-6621.
- Bridges, B. A., J. Cole, C. F. Arlett, M. H. L. Green, A. P. W. Waugh, D. Beare, D. L. Henshaw and R. D. Last (1991) Possible association between mutant frequency in peripheral lymphocytes and domestic radon concentrations, Lancet, **337**, 1187-1189.
- Fuscoe, J. C., L. J. Zimmerman, M. J. Lippert, J. A. Nicklas, J. P. O'Neill and R. J. Albertini (1991) V(D)J recombinase-like activity mediates hprt gene deletion in human fetal T-lymphocytes, Cancer Res., **51**, 6001-6005.
- Hakoda, M., M. Akiyama, S. Kyoizumi, K. Kubuke, A. A. and M. Yamakido (1988) Measurement of in vivo HGPRT deficient mutant cell frequency using a modified method for cloning human peripheral blood T-lymphocytes, Mutation Res., **197**, 161-169.
- Janatipour, M., K. J. Trainor, R. Kutlaca, G. Bennett, J. Hay, D. R. Turner and A. A. Morley (1988) Mutations in human lymphocytes studied by an HLA selection system, Mutation Res., **198**, 221-226.
- Kyoizumi, S., N. Nakamura, M. Hakoda, A. A. Awa, M. A. Bean, R. H. Jesnsen and M. Akiyama (1989a) Detection of somatic mutations at the glycophorin A locus in erythrocytes of atomic bomb survivors using a single beam flow sorter, Cancer Res., **49**, 581-588.
- Kyoizumi, S., N. Nakamura, H. Takebe, K. Tatsumi, J. German and M. Akiyama (1989b) Frequency of variant erythrocytes at the glycophorin-A locus in two Bloom's syndrome patients, Mutation Res., **214**, 215-222.
- Kyoizumi, S., M. Akiyama, Y. Hirai, Y. Kusunoki, K. Tanabe and S. Umeki (1990) Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4<sup>+</sup> T cells, J. Exp. Med., **171**, 1981-1999.
- Kyoizumi, S., S. Umeki, M. Akiyama, Y. Hirai, Y. Kusunoki, N. Nakamura, K. Endoh, J. Konishi, M. Sasaki, T. Mori, S. Fujita and J. B. Cologne (1992) Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T-cell antigen receptor gene among radiation-exposed people, Mutation Res., **256**, 173-180.
- Kushiro J., Y. Hirai, Y. Kusunoki, S. Kyoizumi, Y. Kodama, A. Wakisaka, A. Jeffreys, J. B. Cologne, N. Nakamura and M. Akiyama (1992) Development of a flow-cytometric HLA-A locus mutation assay for human peripheral blood lymphocyte, Mutation Res., in press.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee and R. H. Jensen (1986) Measurements of the frequency of human erythrocytes with gene expression loss phenotypes at the glycophorin A locus, Hum. Genet., **74**, 353-362.
- Morley, A. A., K. J. Trainor, R. Seshadri and R. G. Ryall (1983) Measurement of in vivo mutations in human lymphocytes, Nature, **302**, 155-156.
- Morley, A. A., S. A. Grist, D. R. Turner, A. Kutlaca and G. Bennett (1990) Molecular nature of in vivo mutations in human cells at the autosomal HLA-A locus, Cancer Res., **50**, 4584-4587.
- Nakamura N., S. Umeki, Y. Hirai, S. Kyoizumi, J. Kushiro, Y. Kusunoki and M. Akiyama (1991) Flow cytometric measurements of somatic cell mutations in Thorotrast patients, Jpn. J. Cancer Res., **82**, 1349-1353.
- (1991) Evaluation of four somatic mutation assays for biological dosimetry of radiation-exposed people including atomic bomb survivors, In: B. L. Gledhill and F. Mauro (Eds.), New Horizons in Biological Dosimetry, Wiley-Liss Inc., New York, pp. 341-350.
- Stamatoyannopoulos, G., P. E. Nute, D. Lindsley, M. Farquhar, M. Brice, N. Nakamoto and T. Papayannopoulos (1984) Somatic-cell mutation monitoring system based on human hemoglobin mutants, In: A. A. Ansari and F. J. de Serres (Eds.), Single-cell Mutation Monitoring Systems, Methodologies and Applications, Topics in Chemical Mutagenesis 2, Plenum Press, New York, pp. 1-29.
- Umeki, S., S. Kyoizumi, Y. Kusunoki, N. Nakamura, M. Sasaki, T. Mori, Y. Ishikawa, J. B. Cologne and M. Akiyama (1991) Flow cytometric measurements of somatic cell mutations in Thorotrast patients, Jpn. J. Cancer Res., **82**, 1349-1353.

## 分子生物学的手法

岡山大学 遺伝子実験施設 根岸和雄

このワークショップは、人間が実際にどれほど発がん物質にさらされているかを種々の面から明らかにする手法を伝授しようとするものであった。そのなかで DNA レベルでどのような変異が起きているかを調べる手法について扱ったのがこのセクションである。発がんにいたる過程に変異が関与しているとすれば、どのような変異が実際に起きているかをモニターすることは変異のメカニズムやその発がん過程への関与を考えるうえで重要な示唆を与えることができる。Lehmann 博士はこのセクションで分子生物学的手法に基づいた human biomonitoring について述べた。これらは、1977 年に発見された PCR (polymerase chain reaction) 法による DNA 増幅を利用した方法であり、今後大きな成果が期待される新しい手法である。ここでは 2 つの手法が紹介された。ひとつは hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase をコードする *hprt* 遺伝子の変異スペクトラムを調べるものであり、もうひとつは制限酵素の切断部位の変異を検出する方法である。後者は未だ開発中の技術である。

第一の手法は次の原理に基づいている。Hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase の欠損した細胞は 6-thioguanine をスクレオチドに代謝することができないので、6-thioguanine に対して耐性となっている。そこで、6-thioguanine を含む培養液の中でも増殖できる細胞株(クローニング)を選べば、*hprt* 遺伝子に変異が起きたクローニングを選びだすことができる。この *hprt* をコードしている遺伝子は X-染色体上に存在する。そこで、男性の細胞は 1 つの遺伝子しか持っていない、女性の場合にも一方は不活性化している。その結果、標的

遺伝子に起きた変異は優性な野生遺伝子に隠されることなく表現されるし、逆に 6-thioguanine 耐性株には塩基配列の変化を持つ *hprt* mRNA のみが存在している。その塩基配列を調べれば変異スペクトラムが明らかになる (Dorado *et al.*, 1991)。リンパ球は interleukin-2 などで増殖させ得るので、6-thioguanine 耐性株をクローニングすることができる。そこで、人間の体内で起きている *hprt* 遺伝子の塩基配列変化を知ることが可能である (Recio *et al.*, 1990; Rossi *et al.*, 1992)。実際血流中のリンパ球は、6-thioguanine に対して耐性の(おそらく *hprt* 遺伝子に変異を持つ)細胞を含んでいる。この変異体の頻度は、1 年に 1.3% ずつ年令とともに増加する。電離放射線にその細胞が高い感受性をしめす遺伝病 ataxia telangiectasia の患者ではその増加率は更に大きい。ここで、一体どのような塩基配列の変化が増えているのか知ることはその遺伝病のメカニズムを知るうえで重要である。また、例えば単純なアルキル化剤は G から A へのトランジションを起こし、ベンゾ(a)ピレンなどの芳香族炭化水素は G から T へのトランスバージョンを起こすなど、それぞれの発がん物質が起こす変異の特異性はかなり良く解かって来ている。そこで変異のスペクトラムから、どの様なタイプの発がん物質にさらされていたかを考えるヒントを得ることができる。

ヒトの *hprt* 遺伝子は長さが 4 万 4 千塩基対の長大な遺伝子であるが、スプライシングにより大部分は切り出され、もとの遺伝子のわずか 3% の長さの 1.5 K スクレオチドの mRNA になる。さらに蛋白質をコードしているのは、その半分の 750 スクレオチド長の部分であるから、この部分

〒700 岡山市津島中 1-1-1

Molecular Methods for Detecting Mutations for Population Monitoring

Kazuo Negishi

Gene Research Center, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700, Japan

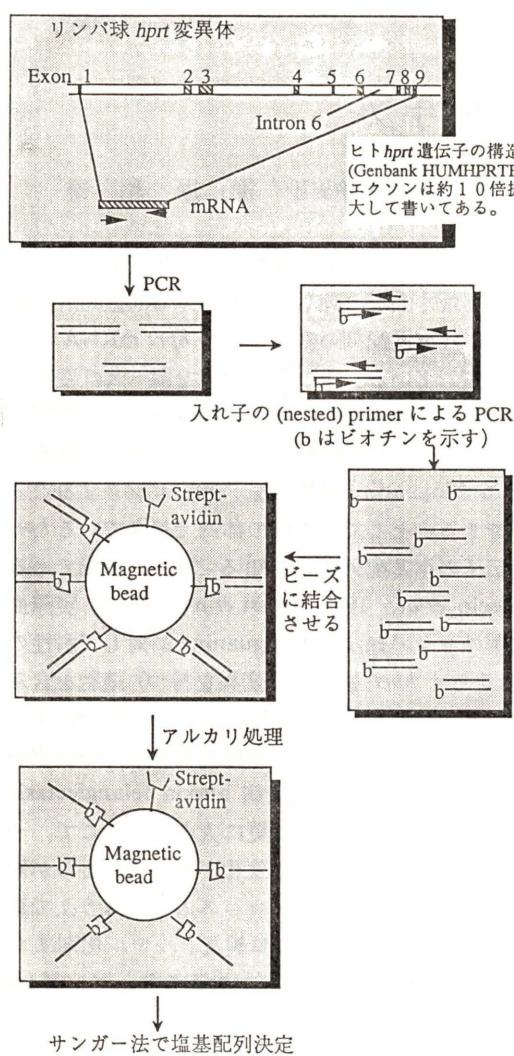


Fig. 1 ヒト *hprt* 変異体塩基配列決定の原理。

と上流付近の塩基配列を決定すれば変異を同定できることになる。

実際には、まず検体となる人間から血液を採取し、そこから 6-thioguanine に耐性を示すリンパ球のクローニングを選び出す。細胞数が  $10^7$  個となるまで増殖させ、この細胞から mRNA を抽出する。*hprt* mRNA に特異的なオリゴヌクレオチドを使って PCR をすると、*hprt* mRNA に相補的な DNA 断片だけが増幅される。これをアガロースゲル電気泳動にかけると通常一本バンドが見える。このバンドを抽出し、その塩基配列を調べるわけであるが、このような二本鎖の DNA 断片を

用いてサンガーフラッシュ法で塩基配列を決定するのは、もう一方の鎖が邪魔をするので必ずしも容易ではない。そこで cDNA の内側にアーナーする一対のプライマー (nested primers) を用いて、さらにもう一度 PCR を行なう。その際 5' 端末をビオチンでラベルしたものを、一方のプライマーとして用いる。これを、ビオチンに強い親和性を持っているストレプトアビシンをコートした magnetic beads に結合させる。アルカリで処理すると二本鎖がほどけ、末端にビオチンが結合した鎖のみを残し、もう一方の鎖は洗い流されてしまう。 $^{32}$ P で末端ラベルしたオリゴヌクレオチドを用いて、サンガーフラッシュ法で塩基配列を決定する。このようにして変異個所を決定することができる (Fig. 1)。

しかし、以上はもっとも単純なケースであり、PCR 後のアガロースゲル電気泳動で全くバンドを生じない場合もある。これは大きな DNA の欠失の結果、プライマーが結合する場所が消えてしまったためと考えられる。その場合には、ゲノム DNA の分析を行なう。即ち変異した細胞から DNA を取り出し、制限酵素 *pstI* で消化する。これを電気泳動で分離し、Southern transfer を行なう。プローブとして *hprt* クローンを用いて、これを分析するとそれぞれのエクソンに対応するバンドを観察することができる。本講演では、全くバンドが見られない *hprt* 遺伝子全体の欠失、第 6, 7, 8 番目エクソンにあたるバンドが消えた 3' 側の欠失、あるいは第 2, 3, 4 番目のエクソンにあたるバンドが消えた 5' 側の欠失の例が示された。

さらに、PCR 後の電気泳動で期待される位置より短い *hprt* cDNA のバンドが現われる場合がある。この場合、このバンドと本来の位置の *hprt* cDNA のバンドの 2 本のバンドが現われることが多い。この鎖長の短い cDNA の塩基配列を決定すると、そこでは大きな欠失が見られ、あるエクソンがそっくり失われている。これはイントロン内部のスプライスシグナルとなっている部分に変異が起き、あるエクソンが切り出されてしまい前後のエクソンがじかにつながってしまったためと考えられる。このことは cDNA を調べたので

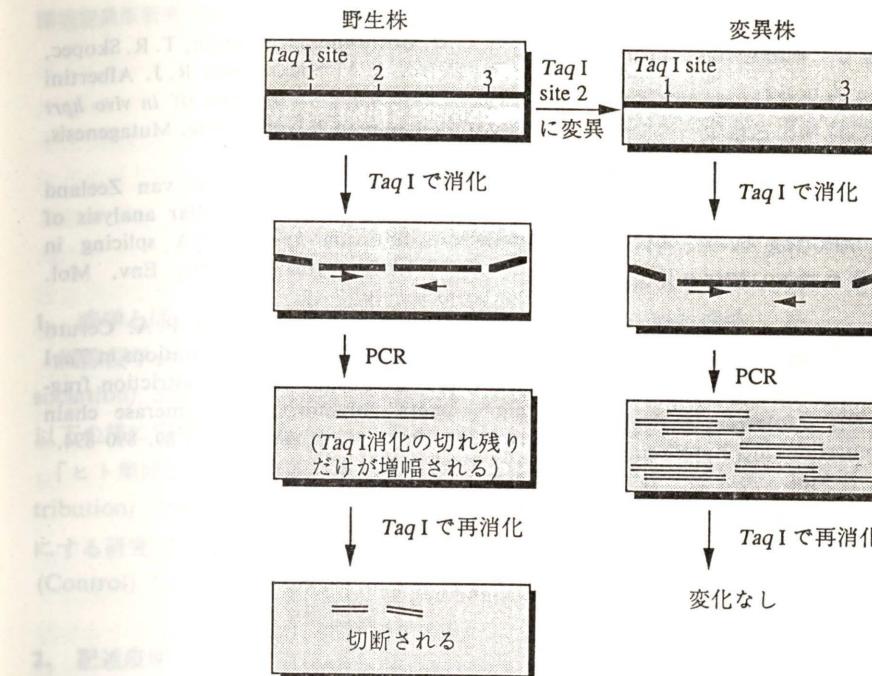


Fig. 2 制限酵素切断部位変異の検出法。

は確かめることはできない。ゲノム DNA のイントロンのスプライスシグナル付近の塩基配列を知る必要がある。実例として第 6 イントロンの終わり近くのスプライスシグナル部分に起きた A から T への点突然変異の結果、エクソン 7 が mRNA から欠失している変異体が示された。

以上述べた方法を使って、実際に正常な DNA 修復能を持つ人と xeroderma pigmentosum の患者と ataxia telangiectasia の患者の三者の変異スペクトルを比較した。その結果、xeroderma pigmentosum は正常とスペクトラムに大きな差はなかったが、ataxia telangiectasia では欠失の頻度が大きく増加していることがわかった。この実験結果は、数人の患者を調べたモデル的な研究ではあるが、ataxia telangiectasia では染色体切断が起きやすいことと良く一致している。

つぎに述べる第二の方法は、制限酵素切断部位の変異を検出する方法である。即ちある制限酵素に対する特定の切断部位が変異を起こし、その酵素にもはや認識されない配列へと変化したのを検出する方法である。変異した細胞をクローニングする必要がないので、どんな細胞にも応用できる

し、塩基配列さえわかっていればどんな遺伝子にも応用できる。似たようなアイデアに基づく方法は他のグループからも報告されている (Sandy et al., 1992)。Lehmann らの方法では、まず適切な制限酵素 (*TaqI* などが良い) でゲノム DNA を徹底的に消化する。この操作で親株と同じ配列の DNA を持つものはその特定の切断部位でも DNA が切断されるが、変異株では前後が結合した断片となっている。この DNA を用い、調べたい切断部位をはさむ様な一对のプライマーを用意し、PCR 法で DNA を増幅する。この操作で変異した DNA とわずかに切れ残った親株 DNA が増幅される。増幅された DNA 断片をさらに同じ制限酵素で消化する。これにより残りの親株と同じ配列の DNA は完全に消化される。これをゲル電気泳動で分離し、Southern transfer によりメンブレンに移し、適当なプローブでハイブリダイゼーションすれば、変異した DNA が元のサンプルにあったかどうかがわかる (Fig. 2)。

野生株 DNA に変異 DNA を混ぜ、変異 DNA を検出できるかどうか調べたモデル実験では、10 万分子に 1 分子変異 DNA が入っていれば検

出可能であることがわかった。実際に ethyl methanesulfonate で処理した細胞を用いて、変異バンドが検出されることも示された。この変異バンドは薬剤処理の直後には検出されないので、DNA 上の傷によるものではなく変異によるものである。

この方法の human monitoring への応用は始まったばかりであり、今後の成果が期待される。

#### 参考文献

Dorado, G., H. Steingrimsdottir, C. F. Arlett and A. R. Lehmann (1991) Molecular analysis of ultraviolet-induced mutations in a Xeroderma pigmentosum cell line, *J. Mol. Biol.*, **217**, 217-

222.

- Recio, L., J. Cochrane, D. Simpson, T. R. Skopec, J. P. O'Neil, J. A. Nicklas and R. J. Albertini (1990) DNA sequence analysis of *in vivo hprt* mutation in human T-lymphocyte, *Mutagenesis*, **5**, 505-510.  
Rossi, A. M., A. D. Tates, A. A. van Zeeland and H. Vrielink (1992) Molecular analysis of mutations affecting *hprt* mRNA splicing in human T-lymphocytes *in vivo*, *Env. Mol. Mutagenesis*, **19**, 7-13.  
Sandy, M. S., S. M. Chiocca and P. A. Cerutti (1992) Genotypic analysis of mutations in *TaqI* restriction recognition sites by restriction fragment length polymorphism/polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 890-894.

環境変異原研究 **14**: 153-155 (1992)

## 発がん物質に対するヒトの暴露モニタリングと疫学的方法

国立がんセンター研究所 疫学部 津 金 昌一郎

### 3. 分析疫学

国際疫学会 (International Epidemiological Association) が出版している疫学辞典では、疫学を以下のように定義している。

「ヒト集団において健康事象・疾病の分布 (Distribution) や規定因子 (Determinants) を明らかにする研究であり、その成果は、健康問題の制御 (Control) へと応用される」

### 2. 記述疫学

疾病分布を明らかにし、疾病の発生要因に関する仮説を設定することを目的とした疫学研究を記述疫学と呼び、通常、疫学調査の第1ステップとして実施される。方法としては、その疾病的特性について、人 (Who), 時間 (When), 場所 (Where) の3つの面から記述する。即ち、ある疾患に対して、人については、性差・年齢・人種・職業・嗜好・家族歴など、時間については、年次推移など、場所については、国際比較・国内地域較差・都市農村の別などについて記述し、その疾病的発生を規定している要因について考察する。

胃がんに関して例を挙げると、日本人に多く、家族発生が見られ、罹患率が減少傾向にあり、米国には少ないが南米に多く、日本国内においても東北に多く南北に少ないと特徴が、死亡・罹患統計や胃がんになった患者の統計的観察によって知ることができる。そして、種々の生活環境要因などの人・時間・場所による分布を考慮して、食事中の塩分が胃がんの発生を規定しているかもしれないという仮説を引き出すことになる。

上記の記述疫学研究により引き出された仮説を、第二ステップとしてヒト集団において検証するのが分析疫学である。疾病発症を規定する要因が、必ず時間的に先行しているという前提があるので、分析疫学の方法として、要因と疾病の時間関係から3つに分類される。

#### ①コホート研究

要因 (暴露の有無や程度) をとらえた上で、前向きに疾病の発症を観察する研究方法で、最も自然な時間関係にある。即ち、要因への暴露の有る集団と無い集団を追跡し、両群からの疾病発症確率を比較する方法である。肺がんを例として具体的に説明すると、喫煙の有無を調査してから、その後の肺がんの発症の有無を追跡し、喫煙群と非喫煙群における肺がん発症率を比較する。

この研究方法の長所は、時間関係が正常であるために、要因把握におけるバイアスが入りにくく信頼性が高いことであり、また、喫煙と肺がんのみならず、心筋梗塞など他の疾病との関連も同時に検討可能である。一方、がんなどの発生頻度が低い疾病を研究するためには、数万～数十万の単位の人を数年～数十年追跡しなければならず莫大な費用と労力を要するという欠点もある。

#### ②患者対照研究

コホート研究とは逆に、疾病の有無を先にとらえてから、後ろ向きに (過去の) 要因を観察する研究方法である。即ち、疾病を発症した者と発症していない者の両群における、過去の要因への暴露の有無を比較する方法である。肺がんを例にすると、肺がん患者と肺がんになっていない健康人

〒104 東京都中央区築地 5-1-1  
Human Biomonitoring of Environmental Carcinogens and its Application for Epidemiologic Study  
Shoichiro Tsugane  
National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

(あるいは他の疾病的患者)に、病気になる前に喫煙していたか否かを質問し、肺がん群と非肺がん群における喫煙率を比較する。

この研究方法の長所は、肺がん患者100名程度と同数の非肺がん対照を集めて、過去の喫煙歴を聴けば良いのであるから、費用や労力も大してからず、調査の着手から結果を得るまでに数ヶ月から1~2年で済むという利点がある。特に、難病や男性乳がんなどのような稀な疾病においては、この研究方法でしか要因へのアプローチが困難である。しかしながら、過去の記憶に頼って要因を調査しなければならないので、様々なバイアスが入り信頼性に欠ける。また、適切な対照の選定が大変困難である欠点もある。

#### ③相関研究

疾病と要因と同じ時間軸の上で、断面的にとらえる研究方法である。即ち、目的とする疾病発症率の異なる様々な集団において、現時点の要因保有率との関連を検討する。

具体的には、1990年における肺がん罹患率が異なる2から数十の集団において、ほぼ同年の各集団の喫煙率を調査し、両者の相関関係を見る。もちろん、1970年当時の喫煙率のデータが利用できるのならば、そちらの方が良い。しかしながら、一般的には要因調査をその時点で行うので、最も新しい利用出来る疾病罹患率となると、同じ時間軸のものにならざるを得ない。各集団における、現在の要因への暴露状況が過去とパラレルであるという仮定が必要となる。また、当該集団の疾病発症率と相関させるためには、要因保有率や暴露レベルの把握を、その集団の代表的サンプルで行わなければ無意味となるので、厳密な無作為抽出サンプルを設定する必要がある。

本研究方法の利点は、各集団、数十人~百数十人の人達について、要因に関する詳細な調査を行い得ることである。また、ここでほぼ完全な相関が得られ、かつ、別の疫学手法や実験研究での一致した結果や生物学的機序の科学的説明が可能であれば、集団の疾病発症率を規定する重要な要因ということとなり、現実的な予防対策へ結びつけ易いという利点もある。これは、逆に、相関研究での完全な相関だけでは、因果関係に結びつかない

いという欠点である。

#### 4. 介入研究

コホート研究の一つであるが、要因と疾病との因果関係を検証するための最終ステップとなる。即ち、記述疫学と分析疫学によってほぼ確立された、疾病発症の要因について、それを加えたり除外することによって、その疾病的発症率に変化を与えるか否かを検証する。要因の有無に関して、人為的な操作が加わるので、実験疫学ともいう。具体的には、特定集団に対して、禁煙運動を展開することにより肺がんの発症率が減少するか否かを検証することが挙げられ、現在、世界各国において実施されている。

この研究方法の変法が、介入の効果を無作為に分けた複数群で比較検討する、無作為比較試験であり、重度喫煙者における $\beta$ -カロテンによる肺がん予防効果を検証する研究が、この手法で行われている。

#### 5. 発がん研究における疫学の成功と限界

疫学研究は、喫煙と肺がんとの因果関係を明らかにすることにおいて、大きな貢献をした。そして、現在はその応用の段階であり、禁煙運動による喫煙率の低下により、米国の若年層の肺がん罹患率の減少という効果をもたらした。この成功の原因は、要因である喫煙の暴露レベルを本人への質問調査という簡単な手段で容易に、かつ、正確に把握出来たことである。先に述べた、患者対照研究の手法でも、過去の喫煙習慣は、比較的正確に把握可能である。

しかしながら、食事や一般環境からの発がん物質の暴露レベルを、簡単な調査票を用いた聞き取りやアンケートで正確に把握するのは困難を極める。特に、患者対照研究の手法で、過去の暴露レベルを聞き取るということは、絶望的と言わざるを得ない。また、数万人の人達に詳細な質問調査を実施し、10年以上待つのも莫大な費用と労力が必要となる。

#### 6. バイオ・モニタリングの疫学研究への応用

発がん物質に対するヒトの暴露モニタリング

(バイオ・モニタリング)は、環境発がん物質の個人の暴露レベルに対して正確な情報を与えてくれる可能性がある。この情報に基づいて、暴露レベルの高低による発がん率の差を観察することは、当該発がん物質が、実際にヒトがんの発症のリスクになるか否かを考える際に必須である。

このバイオ・モニタリングが患者対照研究では、殆ど応用出来ないことは、自明である。即ち、がん発症者において、過去の暴露レベルを測定することは不可能であるし、現在の暴露レベルが明らかになったとしても、それががんの原因か結果かを判定することは出来ない。

一方、コホート研究では、上記の問題はなく理想的である。しかしながら、数万人の血液や尿を測定しなければならず、現実的とはいえない。ポストラベルや遺伝子変異を数万人について測定する事を想像出来るであろうか？また、その時に測定をしないと、10年経って、あれをやるべきだったと言っても後の祭である。

相関研究は、3つの疫学研究手法の中では最も現実的であり、サンプリングなど研究デザインをしっかりと組めば、かなりの情報を提供してくれることが予想される。

#### 7. コホート内患者対照研究

調査対象数が少なくてすむという患者対照研究の利点と、要因を先に把握するというコホート

研究の長所を組み合わせた研究手法としてコホート内患者対照研究という手法がある。これは、コホート研究において血液や尿のサンプルを数万~十数万の対象者から収集し、超低温で保存し、数年~十数年経過した後、がん発症者数十~百数十人と同数の非発症者の保存試料を分析するという手法で、Nested Case-control Study(網をかけた対象者の中での患者対照研究)とも呼ばれる。

暴露レベルはがん発症前のものであるし、測定検体数も少なくて済む。また、このコホートの中で、複数の疾病と複数の要因について、検討可能である。最近では、同一のコホート研究のなかで、 $\beta$ -カロテンと肺がん、ヘリコバクター感染と胃がん、脂質と心筋梗塞の関連などが明らかにされている。

#### 8. おわりに

現在、厚生省がん研究助成金のなかで、著者らが中心となって、「多目的コホートによるがん・循環器疾患の疫学研究」を行っている。このコホートでは、数万人の一般住民の血漿と白血球が超低温下で保存されている。この血漿や白血球からのDNAが、将来、日本環境変異原学会の会員を始めとした多領域の研究者によって、がん・循環器疾患の撲滅のために利用されることを願ってやまない。

## ヒトのバイオモニタリングと企業研究

ダイセル化学工業株式会社総合研究所 生理評価研究所 馬場 恒夫

### 1. はじめに

先般、岡山大学で2日間にわたって催されたワークショップは、異色の試みであり化学企業の中で日常的に変異原性試験を実施している若輩の私にとっては、ともすれば忙しさにまけて隅に追いやられている研究心を刺激する事極めて大であった。

本稿では、大学等の基礎研究者には馴染みが薄いと思われる化学企業に於ける化学物質の安全性評価システムを紹介しながら、企業サイドに於ける毒性試験の特徴及び民間企業と国公立等の基礎研究施設との変異原研究についての今後の在り方を、今回のワークショップの感想を踏まえながら述べてみたい。

### 2. 化学物質の製造と法規制

化学工業は、私共の生活に有用な多種多様の化学物質を供給するのみならず、各種産業やハイテク産業等にも貴重な素材を提供する事により、産業の発展と生活の便宜に計り知れない貢献をしている。ちなみに日本に製造輸入されている化学物質の種類は、およそ4万種以上にも達し、年ごとに数100種の新規物質が新たに加わっていると言われる。

化学工業は、このように人類社会の発展に必須の存在として限りなく成長を続けている一方では、原油流出やフロン、PCB汚染等に知られるようにヒトに対する害悪はおろか、長期にわたって地球環境や生物界に甚大な影響を及ぼす危険性も同時に包含している事が次第に明らかとなってきた。

私が勤務しているダイセル化学工業株式会社(以下、ダイセル化学と略)は、化学品を製造販売する事を業としており、その製品群は、セルロース誘導体、有機合成品、中間体、プラスチック製品、フィルム原料、工業用フィルム、各種樹脂等多岐にわたっている。

ところで、日本に於ては、化学物質の製造や輸入販売する為には、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(以後、化審法と略)及び化学物質を取扱う作業者の安全を守る為に労働安全衛生法(以後、安衛法と略)が、その他医薬品については、薬事法、農薬については農薬取締法、食品については食品衛生法等各種の法律が定められており、これらの法律に従って化学物質の届出や許可を受けなければ原則的に製造販売ができない事になっている。

そこで、本稿では化学工業に最も関係の深い化審法を中心とした化学物質の安全性評価システムを紹介したい。

化審法は、全世界を震撼させたPCB汚染を未然に防止する為、昭和48年に制定された。すなわち、新規に製造または輸入しようとする化学物質がPCBと類似した性質、土壤中に於ける難分解性と生物への高蓄積性及び長期毒性の性質を有するかどうかを事前に審査する事により、これらの性質を有する化学物質を特定化学物質(PCB、ティルドリン、アルドリン、DDT等8種が指定されている)に指定して、製造、輸入及び使用等の必要な規制を行う事とした。その後、諸外国の化学物質の規制に対する動向や近年、電子工業で多用されて社会問題となったトリクロロエチレン

〒671-12 兵庫県姫路市網干新在家 1239

Human Biomonitoring and Current Situation of Mutagenicity Studies in Chemical Industries  
Tsuneo Baba

Research Center, Daicel Chemical Ind., Ltd., 1239 Shinzaike, Aboshi-ku, Himeji-shi, Hyogo 671-12,  
Japan

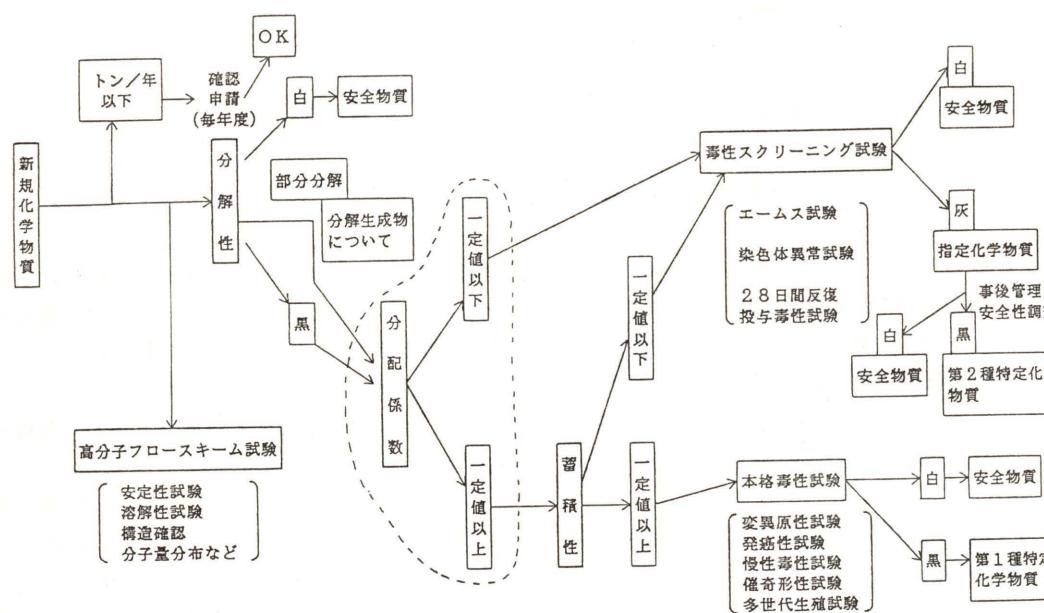


Fig. 1 新規化学物質事前審査の一般的なフロー。

による地下水汚染のような化学物質に対する情況の変化に対応する為、昭和 61 年に抜本的な改定が行われた。この改定により、事前審査制度がさらに充実された他、事後管理制度が新たに導入される事になった (Fig. 1)。すなわち、新規化学物質の届出に際し、従来の特定化学物質かどうかの判定に加えて、トリクロロエチレンのような低蓄積性で難分解性及び長期毒性が心配される物質 (指定化学物質) に該当するかどうかの判定も併せて必要となった。この為、毒性試験として OECD-MPD (Minimum Pre-marketing Set of Data) の試験項目である変異原性試験及び 28 日間の反復投与毒性試験が新たに導入された。

化学物質の長期毒性スクリーニング試験である変異原性試験については、細菌を用いる復帰突然変異試験及び哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の 2 種類の in vitro 試験に加えて、生体に摂取された場合の化学物質の安全性を評価する為、上記の 2 種類の変異原性試験に加えて、in vivo 試験であるげっ歯類を用いる小核試験を実施して、総合的に化学物質の変異原性の有無を判断する事になった。

また、安衛法に於ても昭和 62 年に従来からの

微生物を用いる変異原性試験に加えて、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験も併せて実施するよう改定された。

### 3. ダイセル化学に於る化学物質の安全性評価

現在、ダイセル化学では、化審法を対象とする化学物質の分解性及び濃縮度 (蓄積性) 試験を行なう GLP 試験施設を保有し、新規化学物質の届出に必要な試験を実施している。また、毒性試験としては、社内に於る安全性評価の為、中間体や研究段階にある各種の新規物質について、in vitro 及び in vivo の変異原性試験を実施して、当該化学物質の安全性を確認する事により、研究投資の節減と研究の効率化に役立てている。さらに、化審法や安衛法等当該法規制に従う必要のある場合は、社外の受託 GLP 毒性試験施設に依頼する事により、化学物質の安全性を評価している。

特に、変異原性試験については、工場の製造現場から出荷・輸送及びユーザーの安全を考慮する為、別途に、「変異原性等に基づく化学物質の安全性指針」を作成する事により、発癌性、微生物を用いる変異原性試験、染色体異常試験及び小核

試験のデータから、当該化学物質の安全性区分を 4 段階に分けて、製造に於る防護の為の安全具、製造設備の密閉性、貯蔵及び輸送方法、廃棄方法及びユーザーサイドに於る使用時の注意等を検討した上で、製造を承認する事となっている。そして、この目的の為に、社内に「化学品安全性専門委員会」を設けている。

より安全で有用な化学物質を社会に供給する事は容易ではなく、法規制に従うと同時に、化学物質の安全性評価の為に、国及び民間企業が共に間断なく努力を続けてゆく必要がある。

ダイセル化学に於ても、化学物質の創製は企業の存続基盤であり、より安全な化学物質を社会の用として提供する為、より完璧な化学物質の安全管理システムを構築する事を目指している。

### 4. 化学企業に於る毒性評価の特徴

化学物質の安全性に対する配慮なくしては、将来的に、化学企業として生き残り得ない事は、日本のみならず、アメリカ及びヨーロッパ等の先進工業国の趨勢となってきた。さらに、年々増加する新規化学物質の数が膨大な事と相俟って、化学物質を生産している製造者 (化学企業) の責任が、製造物責任 (Product Liability) と共に、日々、益々明確化されつつある。

しかしながら、化学企業に於ける毒性試験は、化学物質の開発研究と比較するとどうしてもネガティブな側面があり、また、人件費や設備費等企業としての経済合理性の範囲から逸脱できない問題点をも含んでいる。この点に、化学企業に於ける毒性試験と国公立等の毒性に関する基礎研究機関との接点が生ずるはずである。また、最近の傾向として、国が規制の為に定めた毒性試験を実施しているだけでは、実験者の意識とレベルの向上がはかれない事と、当該試験だけでは、化学物質の真の安全性が保証できない事もあり、欧米諸国と足並を揃える意味もあって、作業標準書 (SOP) の統一化と共に、法に定められた試験項目に加えて、毒性試験に研究の部分を取り込む事が強く望まれるようになった。

実際、日常業務として変異原性試験を実施している立場からすると、試験自体は学究的興味をそ

るものではないし、SOP の完成度が高い程、実験者は単に定められたシナリオに従って手を動かしているに過ぎなくなってしまう。この現実は、どの化学企業の毒性試験に係わっている研究者の共通する感慨ではないかと思っている。

さらに、企業に於ける毒性試験結果は、開発を断念してビジネスの行方を左右しかねないし、製造設備の安全性を増強する等大きな投資を決断しなければならない場合も生じてくる。この為、毒性の程度と実務との間に明確な対応関係が求められる。

微生物を用いる変異原性試験は、比較的容易に変異原性の強さを数値化できるが、形態学的な観察が中心となっている染色体異常試験や小核試験に於ては、結果の数量化は可能であってもその意味合いに不明瞭さが残る。

実際上の問題として、製造現場に於ては、変異原性の強さの程度を基準として、具体的な設備の改良や安全具を検討しなければならない為、変異原性や発癌性については、安全の閾値が明らかに算出できると同時に、その強さについても化学及び生化学あるいは分子生物学のレベルで、たとえば、スペクトルのピークの高さから数量化できるような決定的で明白な指標の必要性を痛切に感じている。

この事について、今回のワークショップの内容は、重要な示唆を与えている。紹介されたように、MS-スペクトルや  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法及び免疫学的方法により、変異原物質の DNA-付加物を直接定量する事が可能であるし、リンパ球の hprt 変異株を用いれば DNA-付加物以外の変異を DNA レベルで検出定量化できる可能性を有している。

しかしながら、これらのどの方法も多種多様な化学物質の毒性スクリーニング系としては、複雑すぎたり、ラジオアイソトープを多量に使用する等、実用に至る迄には未だ多くの研究が必要かと思われる。

以上、化学企業に於る変異原性試験の特徴をまとめてみる。

1. 広範囲で多種多様な化学物質に対応できる。

2. 簡便で迅速かつ素人（化学、機械、事務職等）分かりのする明白な実験結果が得られ、且つ試験は、安全に実施できる。
3. ヒトに於ける安全の閾値を明示でき、変異原性の強さと危険性の程度を容易に関係づけられる。

実際、このような試験系の存在が可能かどうかは別にしても、評価結果をもとに何らかの判定を下し、それに伴なう具体的措置を講じなければならぬのが化学企業に於ける現実である。

### 5. 結び

今回のワークショップの課題は、発癌物質に対するバイオモニタリングであったが、化学企業が自ら生産した化学物質のバイオモニタリングを実施しなければならないような事態は、あってはならない事である。しかしながら、ヒトのバイオモニタリングに使用した方法を動物細胞や実験動物を利用する変異原性スクリーニング系に応用する事は比較的容易ではないかと思われる。ワークショップで紹介された内容が、より確実な変異原性（発癌性）スクリーニング系としても実用化される事を期待している。さらに、一化学企業が生産する化学物質は、またたく間に世界中に流通する事を考えれば、世界の毒性研究者と膝を交えて語り合える今回のワークショップの試みは、貴重な経験であり、今後もどしどし進めて欲しい。また、環境変異原学会・MMSに於ても、現在の共

同研究とは別に、先端的な個別研究テーマを導入しても良いのではないかと思われる。なぜなら、企業に於ける毒性評価は、前述したようにネガティブな側面がある為、テーマが先端的であればある程一企業単独では、社内での研究のオーソライズが困難である。テーマを官民もしくは民民で分担することにより企業側研究者の負担の軽減がはかられるし、何よりも先端的研究の共同研究により、毒性試験に係わる研究者の交流が促進され、研究活動にも弾みがつくのではないかと思われる。一化学企業が製造した化学物質は、すでに一企業ではどうにもならない程の影響力をヒトと地球環境に及ぼす潜在力を保有している。それ故、化学物質の安全性評価は、当該企業のみならず、すべての化学企業に働く毒性研究者の相互に共通した課題として取組む時期にきているのではないかと感じている。

### 謝辞

本稿の機会を与えて下さった岡山大学薬学部早津彦哉教授に深く感謝いたします。

### 参考文献

- 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修（1987）化審法毒性試験法の解説（東京慈恵会医科大学客員教授大森義仁編），化学工業日報社。  
通商産業省基礎産業局化学品安全課監修（1990）逐条解説化審法，第一法規出版。

### 印象記 I

## ワークショップに参加して

昭和大学 薬学部 青木公子

血清中の酵素活性測定により肝臓の変化を知ることが出来るように、採取が容易である尿や血液を検体として薬物に限らず他の多くの要因により生じる生体変化のモニタリングを可能にすることは特にヒトにとって重要である。この点から今回のワークショップのテーマ「発ガン物質に対するヒト曝露のモニタリング」は非常に興味をひくものであった。募集人員 60 名のこと大急ぎで申し込みをし、許可をいただいて出かけた岡山大学のキャンパスは新緑と学生達の活気にあふれていた。ワークショップ会場である自然科学研究科の建物は少し離れたところに位置しており、静かでゆったりとした、たたずまいであった。

本ワークショップでは 7 名の英国の方達を講師とし、初日の大講義室での講演会に統いて 2 日目は 6 グループに分かれて小会議室で各講師持回りによる講義を受けた。両日共、演題に精通されている日本人の方が初日は座長として 2 日目は通訳兼世話役として講師と行動と共にされたのは、講演内容を理解するうえで大きな助けとなった。演題は変異原物質（発癌物質）により修飾された DNA またはタンパク質の分析、DNA 損傷の結果として現れる変異体の測定と疫学に分かれていた。乱用薬物の抗体を得て免疫測定法を確立し、また 2-ナフトヒドロキサム酸の DNA 付加体の構造決定を試みている筆者にとっては、DNA の分解法、DNA の特定付加体測定法である免疫測定法とタンデム形の GC-MS 法、また感度は高いものの非特定付加体の分析法である  $^{32}\text{P}$ -ポストラベリング法に关心があった。常に修飾された DNA の酵素分解生成物がスクレオシドであるかどうかを疑問を感じていたが、DNA の酵素分解に対する抵抗性は一部の付加体を除いては明らかにされておらず今後のデータの蓄積が望まれた。 $^{32}\text{P}$ -ポストラベリング法は一度は試みたい方法であるが、一回の実験に使用する RI 量の多さから汚染に対する細心の注意が必要とされ簡単には行なえないことを痛感した。免疫測定法が RI から酵素標識へと移行したのと同様に、ポストラベリング法においても RI である新しい標識体使用が可能になることを切に願っている。特にわが国と英国の違いが感じられたのは、疫学であった。英国では細分化された同一の仕事に長期にわたり携わっていることが普通である上に、職業歴及び病歴などのデータと死後に臓器が長期にわたり保存されていることが疫学研究の成果に結び付いており我が国の遅れを感じた。

今回のワークショップの特徴は講師がすべて英国人であったこと、1 グループが約 10 人の小グループに分かれてのセミナーで細かな実験手技についても質問が可能だった点ではないかと思われる。我々は一日中同じ部屋にいて講師の方達が交替する形をとっており、前日からのハードなスケジュールのため最後には演者の方達の声も渴れ、筆者の頭もパンク状態であった。しかし質疑応答の中でグループ内の人々とも親しみが増し、さらに酸化的障害を受けた DNA 分析にかなりの方が興味をもって仕事を進められていることがわかったことは大きな収穫であった。最後にこのような企画を推進実行して下さった岡山大学早津教授はじめ研究室の皆様に感謝する次第です。

〒142 東京都品川区旗の台 1-5-8  
An Impression on the Workshop in Okayama  
Kimiko Aoki  
Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

印象記 II

ワークショップ「発癌物質に対するヒトの曝露のモニタリング」に参加して

岡山大学 医学部 中 務 治 重

5月11, 12日に岡山大学大学院自然科学研究所で行われた表題のごときワークショップに參加した。主催の日本環境変異原学会の会員でもない一介の内科医である私が參加するきっかけとなったのは教室の辻孝夫教授の勧めだった。私は日常、病院で診療に携わるかたわら癌、とくに消化器癌の発癌や転移のメカニズムに興味をもち研究をすすめていることもあり、またプログラムを見て<sup>32</sup>P-ポストラベル法などによるDNAアダクトの検出などの講義も面白そうに思えたので出席してみることにした。

ワークショップには約60人の出席者があり、表題のAnglo-Japanese Study Course Workshopの名が示唆するように、英国から招聘された6名の講師による講義と日本人出席者による質疑討論が行われた。第一日目は先ず“Carcinogenesis”の編集者で今回の英国グループのリーダーでもあるガーナー博士から発癌物質に対するヒトの曝露のモニタリングに関する概説があり、引き続いて6つのテーマについて英国からの講師達による講義があった。この講義はそれぞれよくまとまっており、また英語での講義中、わかりにくいところでは日本人の座長が適宜要約されたり解説をいれられ、門外漢の私にも理解しやすいものであった。第二日目には参加者が10人ずつ6つの小グループにわかれ、前日のそれぞれのテーマについて講師達の補足説明と質疑応答が行われた。このシステムは学会でも初めての試みらしく、時に主催者や講師の意図と出席者の希望とが食い違うこともあったが、全体に有意義で終始友好的にすすめられ好評であった。とくに実際に研究室で実験中のスライドを示し、実験器具やそのセッティングを供覧された講師もあり、しかもそれが私にとって最も興味のあった<sup>32</sup>P-ポストラベル法についてだったので、私には大変有り難かった。しかし、この小グループ制では講師はそれぞれのグループにたいして一日のうちに計6回同じことをしゃべらなければならず、また各講師にずっと付き添って回られた討論リーダーの御苦労もたいへんだろうと思われた。

今日国民の4人に1人が悪性腫瘍で亡くなる現実と、そのほとんどが原因不明であることは臨床に携わる者として非常に残念である。近年の分子生物学のめざましい発展に随分期待がよせられているが、残念ながら根本的な解明は未だなされていない。私どもが日常診療することの多い肝細胞癌を例に取ってみると、その日本での発生のほとんどはC型あるいはB型の慢性肝炎か肝硬変に見られる。アフラトキシンB1はよく知られた肝発癌物質であるが、日本ではアフラトキシンB1よりもウイルスに関連した肝癌が圧倒的に多い。これらの基礎になる慢性肝疾患は、それぞれC型(RNAウイルス)とB型(DNAウイルス)の肝炎ウイルスによるが、これらのウイルスが直接肝発癌を起因するという証拠は未だない。例えば、B型肝炎ウイルスのトランスジェニックマウスでも肝癌の発生は多くなく、ウイルスのみでの発癌は容易でないように思われる(Chisari et al., Cell 59:1145, 1989)。

〒700 岡山市鹿田町 2-5-1, 岡山大学医学部第一内科  
An Impression of Workshop on "Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure".  
Harushige Nakatsukasa, M. D.  
Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan

現在、推察される機序として、ウイルス肝炎による細胞回転の持続的な亢進があることが DNA の損傷や修飾をおこす機会を増しているのではないかと考える人が多い。その場合、DNA の損傷や修飾をおこすモノとして環境や食物中に存在する化学発癌物質が重要となる。ヒトに対する発癌化学物質の検出には、疫学的方法、動物を使った実験や試験管内での方法があると今回のワークショップで習ったが、それぞれに弱点があり今一つ決定的なものとはなり得ていない。今回私は  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法やマススペクトロメトリーなどを使って DNA アダクトを解析することにより癌患者に発癌させるきっかけとなった化学物質を同定できないかと期待してワークショップに出席したが、それはまだまだ難しいようである。このワークショップへの参加は現在私達に何ができるか、何ができないかについて改めて考える良い機会であり、また私にとってこれから研究の方向付けにさいし示唆に富むものであった。

最後に、このワークショップを大変有意義で楽しいものにオーガナイズされた岡山大学薬学部の早津彦哉教授をはじめ主催者と英国からの講師の皆様に謝意を表したい。また今回の企画が今後継続、発展して、個々の癌患者の発癌に起因した化学物質の検出や同定が近い将来可能になることを願っている。

環境変異原研究 14: 165 (1992)

### 印象記 III

## ワークショップ「分子生物学的手法の導入」は今――

藤沢薬品工業(株)安全性研究所 平 井 収

欧米では、環境中や製造現場での発癌物質を、科学的手法でモニターする活動が盛んである。このような活動を変異原研究者に伝え、共に考えるワークショップが、「発癌物質に対するヒトの曝露のバイオモニタリング」と題して本年 5 月 11 日から 12 日に岡山で開催された。

ヒトのサンプルから DNA や蛋白への発癌物質付加体を測定するには、高感度な測定法が要求される。 $^{32}\text{P}$ -ポストラベリング法は、ラジオアイソトープで標識した特定の標品を用いる必要がなく、非常に高感度である点から、多くの付加体研究に用いられている。一方、実験的に発癌物質を処理した動物では、一種類の発癌物質で数十もの DNA 付加体が検出され、また異なる細胞種間で様々なパターンの DNA 付加体が認められると言われている。ましてや、ヒトではタバコ喫煙や食生活等 DNA 付加体形成への影響要因も多い。このような付加体研究をヒトの曝露のモニタリングに利用するために、どのような工夫がされているのか。

$^{32}\text{P}$ -ポストラベル法を用い、コークス炉やアルミニウム製造プラントの従業員を対象とした取り組みを紹介した D. H. Phillips (Haddow 研究所) の講演では、対照群の設定方法や研究所間での比較試験、動物を用いたモデル実験から、ヒトのモニタリングへの彼らの自信を感じられた。しかし、 $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法の改良が進み、 $10^{10}$  ネクレオチドあたり 1 付加体をも検出可能な域に達しているにもかかわらず、この方法にも付加体の構造が全く推定できないという欠点がある。それに対して、gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 法は  $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法に比較して測定感度が 1000 倍以上低いが、付加体の構造に関する情報が得られ、検査試料としてヘモグロビンを利用出来る等により、特定の付加体を検出する上で有用である。また、付加体の検出、同定を行う上で免疫学的手法は、最も感度の良い方法のひとつであり、放射性物質を用いない ELISA 法は簡便性に優れている。ヒトの曝露のモニタリングには、これら手法が目的に応じてうまく使い分けられていた。ところで、検出された付加体レベルと発癌との相関性はどうであろうか。R. C. Garner (York 大学) の講演では、付加体レベルが高いと発癌が高率に起こることは必ずしも言えないし、エチレンオキサイドのヘモグロビン付加体レベルと HPRT 突然変異頻度との相関性が認められないことも、最近報告されている。Garner は、講演のまとめとして発癌物質の生物学的効果と生化学的効果を基に相対的な検出感度を比較し、また DNA と蛋白の付加体相互の関連性、および癌と突然変異に対する DNA 付加体の意味について考論した。

瀬戸内海の温かな気候に恵まれた 2 日間、多数の出席者による活発な質疑応答を通じ、日本の変異原研究の新たな盛り上がりを感じた。疫学研究から分子生物学的手法を用いた研究に到る幅広い成果を統合した今回のワークショップで、化学物質による曝露を地道に、正確に測定する事の重要性を改めて認識した。

〒532 大阪市淀川区加島 2-1-6  
Current Status of Molecular and Biological Analysis in Biomonitoring  
Osamu Hirai  
Toxicology Research Laboratory, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 2-1-6 Kashima, Yodogawa-ku,  
Osaka 532, Japan

印象記 IV

The Anglo-Japanese Workshop on "Human Biomonitoring to Carcinogen Exposure"; a Personal Viewpoint

岡山大学 薬学部 Thomas Kubin

I have to admit that when I first heard about this workshop I had some doubts about its success for several reasons. Now that I have been in Japan for more than three years, I have gotten a good insight into Japanese lectures, seminars, sessions and conferences. All of these had the three S's in common: Sleep, silence and sadness. **Sleep**, for a large number of sleeping participants, **silence**, for the very few questions asked by the audience, and **sadness**, for the remaining feeling on the way home. Speeches were given in such a monotony that many times I have thought, "why don't they produce a video and send it?" Having felt that Japanese Universities do not pay any attention to the increasing number of foreign students, especially the ones involved in master and doctoral courses, I finally gave participating up in any kind of these performances in Japan.

Bearing this in my mind, I was very surprised when I heard about this International workshop, which was trying to "internationalize" science in the true sense of the word in Japan! I knew that it was a fashion of the Japanese to invite "foreign lecturers", listen to their research topics for one or two hours and say in a very polite way "sayonara". So did this workshop mean something like a Japanese style seminar with foreign lecturers comparable to sushi with ketchup or a real approach to an international communication. Was to expect a westernized Meiji-jidai session or a real discussion among open minded scientists?

That this meeting could not be an easy trial was clear from the very beginning. The Japanese are very accurate, love harmony and tend to answer a question only when they are hundred percent sure. On the contrary the Europeans like to put an answer or opinion into a story and are "aggressive" in their discussions while enjoying a small feeling of uneasiness of their opponents. Westerners have their kids educated in a broad field of subjects while the Japanese emphasize detailed education. Otherwise how could it be that Japanese remember the alphabet, hiragana, katakana and thousands of Kanjis having one of the world's lowest number of illiterates while Westerners can be proud to read fluently words composed of only 24 letters and build up their life on it.

This Anglo-Japanese Study Course Workshop was a challenge from the very beginning. I could not imagine a bigger difference among homo sapiens based on the complete differences in the culture and living habits of the participants. So what was I to expect for this "extra-galactic event"?

I remember quite well when the first coffee break came, and thinking abou what has been said, I became involved into a discussion with a Japanese. My thought "shinjirarenai-unbelievable". It was the first time in my three years of stay in Japan that a Japanese tried talk to me in a meeting, and - again - "shinjirarenai" only one hour after the opening. From this moment I really had no time to sleep or not to be a participant. Obviously, the Japanese were not only talking and thinking about communication any more, but they were actually doing it. The next day of this workshop was also unusual for Japan, since Japanese

〒700 岡山市津島中 1-1-1  
Thomas Kubin

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

Professors encouraged their Japanese participants to ask questions, not to be quiet, not to be silent, not to be passive, but to be active, to be vivid to ask questions and to be aggressive. This was not only a very well organized workshop but also its tutorials were very meaningful because all lecturers reviewed their performances and provided additional informations during the tutorial to give everyone a chance to deepen the understanding and to play an active part. This really moved me, and I became so excited that I could not resist asking questions even if these questions were not directly related to the lecturer's research topic. It surely was great!

I was also a little bit worried about the language barrier since from my own experience many so called "native speakers" do not realize that the differences between the English and the Japanese language such as differences in grammar, structure and pronunciation are overwhelming so that in order for the Japanese to understand them, a great extent depends on the willingness of the lecturers. Judging from the tutorial the workshop has been in that respect a success.

Surely this workshop was a great challenge and there is much more to expect for the future if the organizers go on and not become discouraged by this stony pathway. Knowing that up to now the westerners with their incredible ignorance have paid little attention to Japan despite its international importance and power I sincerely hope that the British lecturers keep their promises and intensify their contact with Japanese scientists.

I will always remember the preface of the book "*Origins of Human Cancer*": Cancer research is a broad discipline embracing with diverse backgrounds. These workers tend to form subgroups of individual specialists that rarely meet or exchange information. "This is my deep belief. Let's destroy that".

## 第1回（いわゆる）非変異・がん原性物質への 対策研究会の報告

三菱化成・総合研究所 吉川邦衛

### 概要と目的について

標記の非変異・がん原性物質は、すでに国際的に問題となっている non-genotoxic carcinogens を日本語に訳したもので、多少語呂が悪いのは翻訳者である黒川雄二部長(国立衛試)の責任(?)であるのでお許し願いたい。しかし、この語呂の悪さも枕詞としていわゆるを付け、感覚的にコンセンサスを得られ易いものを作り上げていただいたのは、東京薬大の渡部烈教授である。

非変異とは一体どのような試験で規定されるべきなのか議論の多いところであるが、各変異原性試験の信頼性つまり、陽性検出率と陰性検出率とを考慮した結果、まず Ames 試験で陰性を示すがん原性物質に適用するのが妥当と考え、これを前提とした内容で本対策研究会を推進することにしている。

第 20 回大会のワークショップ「いわゆる non-mutagenic carcinogen をめぐる諸問題」の後、夜 6 時から 8 時半まで「第 1 回非変異・がん原性物質への対策研究会」が開かれ、この間 6 時間近くにわたり、熱心に討論・議論が行われた。延々と座長をして下さった梅田誠先生と薬木博太先生に深く感謝申し上げます。会場にはワークショップの開始時点で 500 名程が、また夜の対策研究会の閉会時点でも 200 名程が集まっており、標記の問題に対する関心の深さが伺われた。

がん性予測に対する現行の 3 点セット (Ames 試験、染色体異常試験、マウス小核試験) の実績が評価され、つぎにこの 3 点セットではがん性予測に不十分であることが再確認された。さらに、これを補完するにはどのような短期試験が有効かについて話し合われた。

発がんイニシエーターの検出側から、肝・腎の酸化的 DNA 障害 (8-OH-dG) (高木篤也、国立衛

試) とショウジョウバエの翅毛スポット試験 (井上裕章、三菱化成) が報告された。

また、in vitro 発がんプロモーターの検出側から、JB6 細胞の軟寒天コロニー形成試験結果 (中村好志、静岡県立大) と V79 細胞の細胞間代謝協同阻害試験結果 (梅田 誠、横浜市大) が発表された。さらに、in vivo-in vitro 発がんプロモーターの検出側から、ラット胃の RDS (旗千恵、東大医研) とラット肝の RDS (宇野芳文、三菱化成) の成果が報告された。以上の試験方法がいかに非変異・がん原性物質を拾い上げができるかについて、活発な質疑・応答が続いた。また、指定討論者として Balb/c 3T3 細胞の 2 段階トランスフォーメーション試験 (酒井綾子、国立衛試) と NTP の化学物質をスクリーニングした V79 細胞の試験 (岩瀬裕美子、三菱化成) について、それぞれの成果が発表された。

その結果、どの補完試験も非変異・がん原性物質を陽性にすることでは有益であるが、上述の 3 点セットほどのがん原性物質に対するスクリーニング・データがなく、今後この点に関するデータの蓄積が待たれる。

しかしながら、がん原性の予測において発がんイニシエーターのみならず発がんプロモーターに対する関心が高まったのは、本ワークショップおよび本研究会の成果と自負している。

非変異・がん原性物質の問題を改めて取り上げざるを得なかった理由は、本学会の大部分を占める企業の会員が長年求める学会テーマと、過去の学会におけるそれとがあまりにもかけ離れていたからである。つまり、このテーマの違いは研究成果を発表すればよい立場と、変異原性試験に真の実用性を求められている立場との相違とも言

えよう。したがって、非変異・がん原性物質のテーマは、上述の両者におけるギャップを埋める意味で、非常にタイムリーな企画であったように思う。

最後に、当対策研究会の目的は変異原性試験を

中心にして、これと関連するあらゆる科学的手段を用いながら、Ames 試験陰性のがん原性物質をいかに早期に見つけるかである。

現在、当研究会の会員は 108 名で、以上の目的を果たすため最大限の努力を払うつもりです。

環境変異原研究 14: 171-172 (1992)

## 公開研究会報告

# 微生物変異原性試験連絡協議会活動報告

微生物変異原性試験連絡協議会 事務局 荒木明宏

## 1. 協議会の活動について

微生物変異原性試験連絡協議会 (Ames テスト連絡会) は、1988年に微生物変異原性試験を受託している受託機関が中心に Ames テストの精度向上を目的として設立した。

現在までに Ames 博士をはじめたセミナーなど 8 回の定例会を開催し、4 回の定例会は環境変異原学会の大会期間中に公開で実施し、情報交換の場としている。現在 30 機関が加入していて、A・B・C・D の 4 つの共同研究グループが自主的に活動をしている。共同研究の概要は、以下の様である。

### A グループ

昨年に引き続き Ames テストの機関間の変異原性試験結果における差が、菌株の系統的な差なのか、用いる材料のロットとの差なのか、操作上の差によるかを検討中である。昨年度は菌株の差について調査し、研究結果は環境変異原学会第20回大会で発表した。今年度は、用いる材料の差を中心に調べている。

### B グループ

昨年の A グループの共同研究結果より、Ames 試験に用いる菌株の前培養条件が、変異原性物質への感受性にどのように影響するかを検討中である。今年度は、AF-2 について調べているが、次年度からは多種の変異原物質について調査を開始する。

### C グループ

今年度より新しくスタートした研究グループで、Ames 試験のバックグラウンドデータの管理の方法について検討を行っている。今年度は、各

機関の管理方法と問題点についてアンケート調査を行う。

### D グループ

今年度より新しくスタートした研究グループで、新しく開発された菌株および試験方法について検討を行っている。今年度は、OECD のテストガイドライン改訂に伴い、導入が予定される TA102 等についての情報調査とアンケート調査を行う。

以上、協議会で実施している共同研究の概要について説明したが、今後とも、共同研究結果で公開できるものは、環境変異原学会の大会の場をおかりして公表していく事を予定しております。

## 2. 「第 8 回定例会」報告

第 8 回の微生物変異原性試験連絡協議会 (Ames テスト連絡会) の定例会は、公開研究会として 11 月 8 日の午後 6:30 より大会の会場に約 140 名が参加して開催された。今回の演題は、以下の 6 題であった。

1. 第 1 回共同研究結果報告より  
微生物変異原性試験連絡協議会  
事務局
2. 復帰変異試験の結果におよぼすニュートリエンントプロスの影響  
慈恵医科大学 公衆衛生学教室  
清水 英佑
3. 前培養における Airration の生育曲線及び AF-2 反応曲線への影響  
コニカ(株) 環境管理室  
安全性試験センター 北 陽子
4. Ames 試験の実験データのバラツキを少なくするために

(株)武田分析研究所 坂本 豊

5. 前培養条件の差が与える TA98 の AF-2 に対する感受性の変化

日本バイオアッセイ研究センター

荒木 明宏

6. 労働省精度管理委託調査結果報告より

前東京大学医科学研究所

松島 泰次郎

第1回共同研究においては、機関間の AF-2 に対する変異原性誘発の感受性差が、試験菌の機関間における系統差ではなく、むしろ用いている材料や前培養条件に起因している事を提示した(事務局)。前培養条件(エアレーション等)が菌の生育および AF-2 の感受性差に影響している事を示した(北、荒木)。また、TA1535 の ENNG に対する感受性差がニュートリエントプロスのロット差により大きく影響されている事が当会の顧問である清水先生より提示された。Ames 試験の実験データーのバラツキを少なくするために、溶媒対照値の分布型を調べる事の重要性が示され(坂本)当会の顧問である松島先生より、精度管理委託調査結果をふまえて、前培養条件の設定が、精度管理上重要である事が伝達された。

### 3. 今後の活動課題

受託機関の情報交換、問題解決の場として当会は発足したが、共同研究のスタートにより活動基盤が固まってきた。今後、受託機関のみならず、微生物変異原性試験の従事者の情報交換の場として共同研究、セミナーなどを通じて発展していく事が課題である。

### 4. 事務局より

第20回大会におきましては、「定例会」公開研究会の会場の手配等、組織委員会の皆様に大変お世話になりました。また、今回は活動報告を環境変異原研究に紹介していただきました事、皆様に御礼申し上げます。

#### 事務局連絡先

神奈川県秦野市平沢 2445 番地  
日本バイオアッセイ研究センター内  
微生物変異原性試験  
連絡協議会事務局  
0463-82-3911

環境変異原研究 14: 173-175 (1992)

#### 分科会報告

## 哺乳動物試験分科会(MMS)活動報告

MMS 分科会幹事 国立衛生試験所 林 真

早いもので、日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会(JEMS・MMS)は昨年の秋に設立10周年を迎えることができた。1982年に土川清先生(元国立遺伝学研究所)のご尽力により、優性致死セミナーと小核試験研究会が融合して発足して以来10年間、年2回の定例会を欠かさず開催すると共に、「小核試験」および「マウス毛色スポットテスト」に関する共同研究を行ってきた。特に小核試験の共同研究は8年間続いており(現在第6回と第7回の研究が進行中)、その間に得られたデータは膨大なものであり、合計43報の論文として Mutation Research 誌に掲載された。現在小核試験の共同研究は、基礎的な実験条件の検討がほぼ終了し、試験結果を解釈するための本質的な問題に取り組んでいる。

1991年には第19回の定例会が6月14, 15日に八ヶ岳で、富士生物科学研究所の井上達生会員のお世話により開催された。初日のナイトセッションでは深夜まで共同研究の発表が続き、活発な意見交換がなされた。翌朝は、6時からテニスを楽しむ人たちや、朝から研究の議論に熱をあげる人たちがおり、MMS 分科会の活性の高さを示していた。

第20回定例会は JEMS の第20回大会の最終日(11月8日)に日本教育会館にて開催された。開催に先立ち、1991年10月21日にご逝去された土川前会長のご冥福を祈って1分間の黙禱が捧げられた。定例会では、佐藤会員(JT)と森田会員(日本グラクソ)により、第6回と第7回の小核試験共同研究の経過報告の後、国立衛生試験所の鈴木孝昌会員により、米国ヘイゼルトン社への出張報告がなされた。「トランプショニックマウスとの半年間」と題して、MutantMouse を用いた in vivo 突然変異試験と末梢血を用いた小核

試験を組み合わせる試験系の開発に関する共同研究の報告であり、新しい in vivo 変異原性試験の一つとして今後の発展が期待される。

翌1991年11月9日には設立10周年記念特別講演会が東京大学・医科学研究所講堂で148名(非会員を含む)が参加して開催された。特別講師として米国より Dr. B. C. Myhr (Hazleton Washington) と Dr. J. D. Tucker (Lawrence Livermore National Laboratory) を招き、「トランプショニックマウスを用いる in vivo での突然変異検出系」、および「chromosome painting と動原体染色」と言った流行の先端を行くテーマを、時間をかけて講演して頂いた。英語での講演にかかわらず活発な討議がなされ、これらのテーマに対する関心の高さが示された。これらの特別講演の他、食薬センター渋谷会員と国立衛生試験所の林会員によって、これまでに行われてきた MMS 分科会での共同研究の総括がなされた。なお、設立10周年を記念して MMS 分科会のロゴマークが会員より公募され、中川聖子会員(住友化学)の作品が、最優秀作品に選ばれた。このロゴマークが本分科会のシンボルとして永く愛されることが期待される。



以下に第15回から第20回定例会および設立10周年記念特別講演会のプログラムを示す。

#### 第15回定例会

日 時: 1989年5月18日  
場 所: 社会文化会館(東京)  
世話人: 須藤 鎮世(伊藤ハム)

佐々木 有(残留農薬研)

1. 総会(ICEM 参加報告, 会計報告, 幹事選挙)
2. 実験計画提案: スポットテスト共同研究
3. 結果報告: 第4回小核試験共同研究「投与回数」
4. 招待講演: 「ハムスター初期胚の染色体異常」  
美甘 和哉(旭川医大)
5. 小核試験画像解析システムのデモンストレーション

Dr. Felix Romagna (Sanxoz)

#### 第16回定例会

日 時: 1989年11月21日

場 所: こまばエミナース(東京)

世話人: 祖父尼 俊雄(国立衛試)

MMS Communication No. 2 刊行

1. まとめ: 第4回小核試験共同研究「投与回数」  
須藤 鎮世(伊藤ハム)

2. 紹介: 小核試験の投与回数に関する国際共同研究

島田 弘康(第一製薬)

3. 5-FU の小核誘発について

大内田 昭信(大鵬薬品)

渋谷 彰(食薬センター)

田村 博信(日本新薬)

4. 小核試験における連投効果のシミュレーション・モデル

林 真(国立衛試)

#### 第17回定例会

日 時: 1990年6月15, 16日

場 所: 静雲荘(箱根)

世話人: 佐々木 有(残留農薬研)

渋谷 徹(食薬センター)

1. 総会(会計報告, 幹事選挙)

2. 中間報告: 第5回小核試験共同研究について  
参加者全員

3. 模擬討論会: 小核試験標準プロトコール  
須藤案, 林案について立場を逆にした討論。

なお, 第一日の中間報告終了後, 静岡実験動物研究会との共催で, 土川清先生の国立遺伝学研究所退官記念講演会が開かれた。演題は「変異原性試験と実験動物」。

#### 第18回定例会

日 時: 1990年10月25日

場 所: 都久志会館ホール(福岡)

世話人: 竹内 正紀(吉富製薬)

菊野 秩(化学品検査協会)

MMS Communication No. 3 刊行

1. 事務連絡
2. 小核試験標準プロトコールの検討  
標準プロトコール検討委員会
3. 経過報告: 第5回小核試験共同研究「マウス末梢血を用いる小核試験」  
佐々木 有(残留農薬研)
4. 正常ラットと摘脾ラットにおける末梢血小核の出現について

青儀 巧(大塚製薬)

林 真(国立衛試)

#### 第19回定例会

日 時: 1991年6月14, 15日

場 所: いこいの村 八ヶ岳(小淵沢)

世話人: 井上 達生(富士生物)

1. 総会(会計報告, 幹事選挙)
2. 経過報告: 第5回小核試験共同研究「マウス末梢血を用いる小核試験」  
佐々木 有(ファイザー製薬)
3. 経過報告: 第7回小核試験共同研究「小核試験における加齢の影響について」  
佐藤 精一(JT)
4. 経過報告: 第6回小核試験共同研究「がん原生との相関性」

森田 健(日本グラクソ)

研究報告:

参加者全員

5. 話題提供: 「CHL および CHO を用いる染色体異常試験の国際共同研究」  
祖父尼 俊雄(国立衛試)

6. 話題提供: 「International Biostatistics Conference in the Study of Toxicology」

林 真(国立衛試)

7. 話題提供: 「薬事規制の調和に関する国際会議(ICH)」

菊池 康基(武田薬品)

8. 特別講演: 「発生工学的手法によるヒト疾患モデル動物の開発」

横山 峰介(実中研)

MMS Communication No. 4 刊行

1. 開会の挨拶

祖父尼 俊雄(国立衛試)

2. Transgenic mouse を用いる in vivo 突然変異試験系の解説

鈴木 孝昌(国立衛試)

3. In vivo mutation assay system using a lacZ transgenic mice

Dr. Brian C. Myhr(Hazleton Washington)

4. マウス胚の体細胞と生殖細胞の突然変異: マウススポット共同研究の結果と今後の発展

渋谷 徹(食薬センター)

5. Chromosome painting & kinetochore staining

Dr. James D. Tucker  
(Lawrence Livermore National Laboratory)

8. 小核試験: 共同研究のまとめと標準プロトコールの提案

林 真(国立衛試)

7. 閉会

なお、イベントとして昼食会、MMS 分科会ロゴマークの発表と表彰式、Tシャツの配布を行った。

#### 哺乳動物試験分科会(JEMS・MMS)

会長: 祖父尼 俊雄(国立衛試)

幹事: 朝野 哲秀、青儀 巧、近藤 耕治、佐々木 有、佐藤 精一、渋谷 徹、島田 弘康、須藤 鎮世、田中 憲穂、林 真、一ツ町 晋也、森田 健、若田 明裕

事務局: 食品薬品安全センター秦野研究所

## — 共同主催国際会議閣議了解得る —

平成4年9月 日本学術会議広報委員会

平成5年度の日本学術会議の共同主催国際会議6件については、平成3年5月の第111回総会において決定されましたが、政府としても、本年6月30日の閣議において、これらの会議を日本で開催すること及び所要の措置を講ずることを了解しましたので、お知らせします。

### 平成5年度の共同主催国際会議の閣議了解

1. 日本学術会議では、昭和28年9月の国際理論物理学会議、昭和30年の国際数学会議の開催以来、平成3年度までに123件、本年度も6件の国際会議を関係の学会と共同して開催し、我が国のみならず世界の学術水準の向上に努めてきたところである。平成5年度にも、下記の6会議の共同開催を既に平成3年5月に決めているが、本年6月30日、政府全体としても、これらの会議の開催とこれについての所要の措置（会場・警備・入国手続き上の配慮・予算措置等）を講ずる旨の閣議了解を行った。  
(平成5年度開催会議)

- ・アジア社会科学研究協議会連盟第10回総会  
平成5年9月5日から11日（川崎市・かながわサイエンスパーク）
- ・第15回国際植物科学会議  
平成5年8月23日から9月3日（横浜市・横浜国際平和会議場）
- ・第7回太平洋学術中間会議  
平成5年6月27日から7月3日（沖縄県宜野湾市・沖縄コンベンションセンター）
- ・第24回国際電波科学連合総会  
平成5年8月23日から9月3日（京都市・国立京都国際会館）
- ・第21回国際純粹・応用物理学連合総会  
平成5年9月20日から25日（奈良県奈良市・奈良県新公会堂）
- ・第6回国際気象学大気物理学協会科学会議及び第4回国際水文科学協会科学会議合同国際会議  
平成5年7月11日から23日（横浜市・横浜国際平和会議場）

#### 〔閣議了解の内容〕

##### 〔各国際会議ごとに了解〕

1. (各会議名)を(共同主催学会名)と共同して平成5年度に我が国において開催すること。
2. 関係行政機関は、上記会議の開催について所要の措置を講ずること。

2. なお、国際会議共同主催の申請から決定までのスケジュールはおおむね次のようになっている。

- ・会議開催3年前(年末まで)申請募集
- ・会議開催2年前

(2-3月頃)

関係部会、運営審議会附置国際会議主催等検討委員会でのヒアリング等

(3-4月頃)  
運営審議会での決定、総会への報告  
・会議開催1年前  
(6-7月頃)  
閣議了解（政府としての共同主催正式決定）  
共同主催学会との合意書締結、組織委員会の発足  
現在本年未締切りの平成7年度共同開催会議の募集を広報しているところである。（詳細は、日本学術会議月報をご覧下さい。）

### 日本学術会議主催公開講演会

本会議では、毎年公開講演会を開催しています。この講演会は会員が講師となり、一つのテーマを学際的に展開しています。この秋には二つの講演会の開催が決まりましたので、お知らせします。多数の方々のご来場をお願いします。入場は無料です。

I 公開講演会「20世紀の意味と21世紀への展望」  
日時 平成4年10月5日（月）13:30~16:30

会場 日本学術会議講堂

演題・演者

「国際政治の観点から—『長い平和』は持続可能か」  
永井陽之助 第2部会員  
(青山学院大学教授)

「文明論的観点から」 弓削一達 第1部会員  
(フェリス女学院大学学長)

「科学・技術の観点から」 伊達宗行 第4部会員  
(大阪大学理学部長)

II 公開講演会「医学からみた日本の将来」

日時 平成4年11月28日（土）13:30~16:30

会場 金沢市文化ホール 大集会室  
金沢市高岡町15-1 TEL 0762-23-1221

演題・演者

「子どもたち」 馬場一雄 第7部会員  
(日本大学名誉教授)

「成人病」 五島雄一郎 第7部会員  
(東海大学教授)

「医療技術の開発」 澄美和彦 第7部会員  
(東京大学名誉教授)

「食物と栄養」 内藤博 第6部会員  
(共立女子大学教授)

「医療制度の将来」 下山瑛二 第2部会員  
(大東文化大学教授)

## 物理学研究連絡委員会報告 「物理学研究の動向と将来への課題」

7月24日の運営審議会において標記の報告の公表が承認された。1970年代から1980年代にわたって、日本の物理学の研究動向、研究環境を、かなり厳しい批判的スタンスで蒐集した客観的数据に基づいて分析し、1990年代における日本の物理学の課題を展望しようとする野心的な報告である。日本の物理学研究・教育の将来を論ずるための不可欠の資料といえる。A4版112ページにまとめられており、日本物理学会の協力を得て、同学会会誌別刷の形で関係者に公開される予定である。

本報告は、もともと第14期物理学研究連絡委員会が、久保亮五委員長の提案に基づいて「物理学の研究・教育に関する調査小委員会」(委員長長岡洋介京大基研所長、幹事中井浩二高エネ研教授、委員小林俊一東大理、鈴木洋上智大理I、玉垣良三京大理、平田邦男山梨大教育、小沼通二慶大理の各教授)を設置してデータの蒐集・分析・要約を1990年7月から1991年5月にわたって精力的に行い、1990年6月20日の物理学研究連絡委員会全体会議に提出されたものである。第14期物研連任期終了に伴い、報告書及び今後の進め方についての取扱いを次期物研連への引継事項とした。これを受けて、第15期物理学研究連絡委員会は1992年5月22日の全体会議において本報告の取扱いについて協議し、公表を決定して中嶋貞雄委員長を通じて7月7日の第4部会の了承を求め、運営委員会に提案することとなつた次第である。

本報告書が、日本の物理学の研究・教育に関心を寄せる多方面で活用されることを期待したい。

## 物理学研究連絡委員会報告 「理論物理学の研究体制の充実について」

7月24日運営審議会において標記の報告の公表が承認された。湯川秀樹博士のノーベル賞受賞にちなんで初の全国共同利用研究所として設置された京都大学基礎物理学研究所と一般相対論のユニークな研究で知られる広島大学理論物理学研究所は、1990年に統合され、内外の期待を集めつつ、理論物理学の総合的研究を目指す拡充・強化された基礎物理学研究所として再発足することとなった。しかし、現実には分野間の均衡が十分でなく、また北白川と宇治に建物が分離されている等、統合の実を十分に挙げ得ない現況である。

1992年5月22日の物研連全体会議は、このような状況の改善が速やかに改善され、理論物理学における日本の輝かしい伝統が復活されるよう、関係各方面に報告、支援を要請することとなつた。

## 材料工学研究連絡委員会報告 「繊維工学研究・教育に関する諸問題」 「産・学協力による繊維工学研究と教育の振興」

わが国の繊維産業はかつて、日本を支える大産業であった。石油危機、貿易摩擦などによって低迷を余儀なくされた時期もあったが、今日では先端産業の要素技術ともなっ

て、その幅を拡大し、また新合織に象徴されるような高度機能商品を開発し、日本は世界のトップレベルを行く繊維技術国となった。現在繊維産業の従業員数は280万人、総取引額は約64兆円に達し、日本産業の中でも上位を占める基幹産業となっている。

この繊維産業を支える繊維科学技術教育を見ると、かつて国立大学には3つの繊維学部と、染色化学・加工学を含めて19の繊維関連学科があったが、産業構造の変化と共に改組転換され、今日では繊維系学生の定員50人と激減するに至っている。大学院教育では、繊維学研究科の名称は一時期全廃された。その後、産・学の強い要望によって、平成3年に信州大学工学研究科に、繊維生物機能科学、繊維機能工学、繊維極限材料工学の3大講座が唯一設置されるに至った。

ところが、繊維産業の将来は、世界人口の増加、発展途上国の人一人当たりの繊維消費量の増加から、繊維需要は膨大な成長力を秘めている。さらに、消費者主導型経済社会となって、ファッションにも、色、柄、デザインに加えて高機能性と加工技術が重要となってきている。また、繊維素材から最終商品までをシステム化した生産・物流技術、産業資材用途の拡大、地球環境改善への用途開発への期待高性能スーパー繊維による航空・宇宙、海洋、原子力、土木・建築分野への貢献、光ファイバーによる情報通信分野、中空糸による人工腎臓、酸素濃縮などヘルスケア分野、海水脱塩造水など先端分野でも重要な産業として自立しつつある。

こうした繊維産業発展の基礎となる高度技術の開発を促進し、その力を次世代へと継承させるためには、高度に訓練・教育された人材の育成が不可欠である。我が国にとって、繊維科学技術の研究・教育機構の再構築は焦眉の急となっている。これに対して、欧洲ではE C統合を控え、各国の特徴に応じ産学協力し、繊維系大学の単位互換制度を指向するなど、繊維技術教育の再活性化に成功している。米国では繊維関連大学が十数校もあり、その中でノースカロライナ州立大学を繊維科学技術教育のセンターとして、ニューヨーク州立ファッション工科大学をアバラン・ファッション教育のセンターとして位置付けて、全世界へ人材を送り出している。

我が国で、産学協力して設立する機構としては、全国繊維関連大学、研究所、及び地域産業を結ぶ役割を持ち、我が国の優れた繊維工学知識の世界への発信と、国際的人材育成への寄与のため、欧洲、米国と並ぶ、東アジアの繊維科学・技術の中心機関として活動することが望まれる。

この活動は、我が国に全世界の人々から期待されている国際貢献の一つとなろう。

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 №.27

### 秋の総会開催される

平成4年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は去る10月21日から23日まで、第115回総会を開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、同総会の議事内容及び総会中に発表した会長談話等についてお知らせします。

#### 日本学術会議 第115回総会報告について

日本学術会議第115回総会(第15期・第4回)は、10月21日~23日の3日間開催されました。

総会の初日は、会長からの前回総会以降の経過報告について、運営審議会附置委員会、部会、常置委員会、国際対応委員会、特別委員会の各委員長、部長からの報告がありました。また、本年9月27日から10月11日までの間、二国間学術交流委員会の代表団がアメリカ合衆国を訪問し、アメリカ合衆国の学術の現状を視察するとともに、大統領補佐官始めとする連邦政府機関の関係者、国立科学財團の関係者、その他関係機関の関係者との意見交換を行い、多大なる成果が得られたとの訪米報告が行われました。午後からは各部会が開催され、国際対応委員会や研究連絡委員会の在り方等について審議が行われました。

なお、二国間学術交流の成果等に関する「平成4年度日米学術交流について」の会長談話を21日付けで発表しました。

総会2日目は、学術分野における国際貢献についての自由討議が行われ、国際貢献の意義、方針等について活発な討議が行われました。本件については、日本学術会議第15期活動計画の中に重点目標として掲げられており、また、昨年秋の第113回総会において内閣官房長官から、学術研究の分野で我が国がどのような国際的貢献をなすべきかについて全学問領域から総合的に検討し、意見を出すよう求められ、以来、日本学術会議としては重要案件として審議してきたものです。

午後からは、米スペースシャトル「エンデバー」で微重力実験に取り組んだ毛利衛さん、向井千秋さん、土井隆雄さんの三宇宙飛行士を招き、実験成果等の報告をしていただくとともに会員との意見交換が行われました。

なお、「学術分野における国際貢献について」の会長談話を22日付けで発表しました。

総会3日目は、文化としての学術特別委員会を始めとする各特別委員会、各常置委員会が開催されました。

#### 平成4年度日米学術交流について(会長談話)

平成4年10月21日

1 本年度の日本学術会議の二国間学術交流事業として、9月27日から10月11日までの2週間にわたり、私を団長とし、各部所属の会員7名、その他事務局2名、計10名で構成する代表団がアメリカ合衆国を訪問した。

2 今回の日米学術交流は、21世紀に向けて我が国の学術の発展向上を図るために、日米両国の緊密な連携協力が不可欠であることから、アメリカ合衆国の学術研究の現状と動向について調査するとともに、関係機関の責任者等と忌憚ない意見交換を行うためであった。なお、この機会に、いわゆるビッグ・サイエンスの象徴ともいべきSSC、NASA、NIH等の現地視察を行った。

3 連邦議会の会期末で1993年度予算案の調整等のため極めて多忙な時期であったにもかかわらず、いずれの機関においても、トップ又はそれに準ずる責任者が自ら出席するなど、代表団は温かく誠意あふれた応接を受け、関係者の日本の学術への期待が極めて大きいことが印象的であった。代表団の感想として特記すべき点をいくつか挙げれば、次のとおりである。

(1) アメリカ合衆国の学術政策の基盤は、確固たるものがあり、これに割り当てる国家予算のスケールも大きい。これは、学術に対する同国の期待の大きさを表すものである。例えば、1863年にリンカーン大統領のイニシアティブで設立された科学アカデミーは、政府からの独立を前提とし、政府、議会の諮問に応えるなど、政府、議会との緊密な連携の下に、国民並びに人類の福祉の向上に寄与しているが、その後設立された工学アカデミー、医学会とともに、総額約250億円余に上る予算を毎年政府から受け取っている。これは、日本学術会議の使命と今後の発展を考える上で参考となるものである。

(2) 学術の国際協力については、日米両国は、経済力、先端科学技術の水準から見ても、世界の中で指導的役割を果たすべき立場にあり、両国の学術交流を中心として新しい時代の知識と技術を創造し、人類の発展に寄与していく必要がある、との認識がアメリカ合衆国との関係者にあり、我が国としても、このことを考慮すべきである。

(3) 日本政府が本年4月に決定した科学技術政策大綱における国家予算の倍増計画については、アメリカ合衆国との関係者は、大きな期待と好意をもって注目している。

(4) S S C、宇宙開発などのビッグ・サイエンスについては、それぞれの計画が学術における開拓者精神とでもよぶべき情熱をもって推進されていることをが、認められた。特に、3名の日本人宇宙飛行士達との懇談は感動的ともいいくべき印象を残した。

また、S S C計画への資金面での参画問題については、我が国の学術研究の基盤自体が不十分であり、これの充実強化が優先的課題であること、欧州やアジア諸国等との協力をどう考えるか、S S C計画自体への国民の理解をどう促進するか、など今後早急に検討しなければならない課題があること、などの当方の説明に対して、これを傾聴する姿勢が見られた。

4 今回の日米学術交流の間に形成された代表団の一致した認識は、冷戦終焉後の新しい世界秩序形成過程における諸課題の一つとして、学術のあらゆる領域にわたっての国際協力が今後ますます重要性を持つということであった。そのことは、今回の代表団へのアメリカ合衆国側の対応からも十分窺われるところであった。

5 代表団としては、今回の訪米の結果について、総会、運営審議会、その他の関連の委員会等において会員に報告するとともに、政府関係者に対しても、必要に応じて報告を行う予定である。その上で、日本学術会議会員はもとより、政府並びに国民の間で、我が国の学術に関する国際協力・貢献の在り方について十分な論議が行われるよう強く期待するものである。

6 終わりに、今回の代表団の訪米に当たり、格別の御協力をいただいたアメリカ合衆国側関係者及び在アメリカ合衆国日本大使館の関係者に対し、ここに深い感謝の念を表するものである。

#### 学術分野における国際貢献について(会長談話)

平成4年10月22日

現在、我が国の国際的な貢献が強く求められており、各方面でその方策が討議されているところである。日本学術会議としては、平成3年10月の第113回総会において、時の坂本三十次内閣官房長官から、学術研究の分野で我が国がどのような国際的貢献をなすべきかについて全学問領域から総合的に検討するよう求められ、以来、特別委員会を設けて検討するとともに、今回の第115回総会においても、会員全員による討議を行った。

今回の総会での討議を踏まえ、私としては、次の点を強調したい。

1 本来学術の国際貢献とは、日本における学術研究の成果を広く世界に伝達・発信し、学術の進歩に貢献することである。

2 海外から研究者が進んで来日し、優れた研究成果を挙げられるような高水準の研究施設を整備するとともに、外国人が日本の文化・学術を吸収する能力を高められるような諸条件を整備・充実する必要がある。

3 上記2を実現するためには、省庁の枠を超えて、官民の総力を結集して、必要な資金の確保、人材の養成等についての基本方策を策定し、推進する新しいシステム(例えば学術協力機構)が必要である。

上記の趣旨を踏まえ、本会議としては、具体的な貢献策について提案すべく、全力を挙げて検討し、速やかに結論に達したいと考えている。

#### 日本学術会議主催公開講演会

本会議では、毎年公開講演会を開催しています。この講演会は会員が講師となり、一つのテーマを学術的に展開しています。平成4年度最後の公開講演会が決まりましたので、お知らせします。多数の方々の御来場をお願いします。入場は無料です。

公開講演会「科学技術を通じての国際貢献」

日時 平成5年2月22日(月) 13:30~16:30

会場 日本学術会議講堂

演題・演者

「日本の科学技術」

西澤潤一 第5部会員  
(東北大学学長)

「社会科学と自然科学との学際研究を通じての国際貢献」

松田武彦 第1部会員  
(産能大学学長)

「日本の貴重な体験の伝授」

猪瀬博 第5部会員  
(学術情報センター所長)

「21世紀の科学技術」

近藤次郎  
日本学術会議会長

[申込み先] はがきに、住所・氏名・郵便番号を明記し、  
2月15日までに下記宛てお申し込みください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議事務局「公開講演会係」

電話 03-3403-6291 内線 227,228

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目的とする。

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

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

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

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。

2. 奨励賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行い、将来の成果が期待される研究者(原則として会員)に授与する。

3. Mutation Research誌の特別巻を特価で購入配付する。

4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。

5. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

会長 1名 庶務幹事 1名  
会計幹事 1名 國際交流幹事 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、國際交流幹事、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な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な事項の承認を行う。

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5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50,000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	渋谷徹
国際交流幹事	長尾美奈子
編集幹事	佐藤茂秋
会計監査	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	慶應義塾大学医学部
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
渋谷徹	(財)食品薬品安全センター秦野研究所
島田弘康	第一製薬(株)中央研究所
清水英佑	東京慈恵会医科大学
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	慶應義塾大学医学部
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

## 原著論文募集のお知らせ

昭和 63 年 8 月に学会活性化対策の一環として編集委員会が組織され、以来機関誌「環境変異原研究」および JEMS News の定期刊行をめざして努力してまいりました。その間執筆規定の整備、編集委員会の体制強化等原著論文掲載に関する準備を進め、昨年は評議員および会員を対象とした原著論文掲載に関するアンケート調査を実施し、回答者の 70% 以上が原著論文掲載に賛成でした。ここに至って原著論文掲載の環境が整ったと判断し、本年より原著論文を募集し平成 6 年 1 月より原著論文掲載誌を刊行する旨を第 21 回大会総会において会員の皆様にお知らせしました。「環境変異原研究」を会員相互のコミュニケーション誌として位置づけ、会員のための機関誌として育てていきたいと念じておりますので、会員諸氏の積極的な投稿をお願いします。原著論文募集の具体的な開始時期については次号の「環境変異原研究」または「JEMS News」でお知らせしますが、原著論文募集および掲載に関する大綱は以下の通りです。

1. 「環境変異原研究」を会員相互のコミュニケーション誌として位置づけ、会員が自由に投稿できる場を提供する。
2. 原著論文の範囲は「総説」、「一般論文」、「短報」ならびに「資料」とし、未発表の学術論文とする。
3. 用語は日本語を原則とするが、英語も受け付ける。また英文タイトルと 100 語程度の英文要旨をつける。なお図表も日本語を原則とするが英語でも良い。
4. 編集委員会組織を原著論文掲載に対応できるよう強化し、また原著審査委員長は学会長が兼任する。
5. 「環境変異原研究」の発行回数は大会抄録号を除いて当面年 3 回とし、各号に原著論文を掲載する。
6. 原稿募集を平成 5 年度中に開始し、平成 6 年度中（1994 年 1 月予定）に原著掲載誌を発刊する。

平成 5 年 3 月 JEMS 編集委員会

## 環境変異原研究投稿規定

### 1. 掲載論文

環境変異原研究に関する未発表の「総説」、「一般論文」、「短報」、「資料」、「大会講演要旨」などを掲載する。掲載論文の採否は編集委員会の審査により決定する。

「総説」は、一つのテーマに関連する多くの研究論文の総括、評価、解説などである。  
「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の報文で、それ自身独立して価値ある結論あるいは事實を含むものとする。

「短報」は、新しい事實や価値あるデータを含む短い報告とする。

「資料」は、環境変異原に関する調査の結果または統計などをまとめたものとする。

### 2. 投稿資格

筆頭著者は日本環境変異原学会会員に限る。ただし、招待寄稿の場合にはこの限りではない。

### 3. 報文の書き方

報文の用語は日本語または英語とし、執筆規定に従い簡潔にわかりやすく書く。総説は、写真・図表を含めて刷り上がり 12 頁以内、原著は同じく 8 頁以内、短報・資料は 4 頁以内とする。この制限頁の超過分や多額の経費を要する図表の実費は著者負担とする。なお学会所定の原稿用紙は、下記編集委員会事務局まで請求する。

### 4. 報文の送り先

論文原稿は正 1 部コピー 2 部の計 3 部を、下記日本環境変異原学会編集委員会事務局宛に書留便で送付すること。なお、最終稿では正 1 部およびフロッピーディスク（使用した機種とソフト名を明記）を送付すること。

原稿の送付および校正刷の返却、その他編集についての問い合わせ先：

〒105 東京都港区新橋 5-23-7 ニュー三栄ビル  
三造写真工業株式会社内  
日本環境変異原学会編集委員会事務局  
TEL 03-3433-8581  
FAX 03-3433-0470

### 5. 著作権

本誌に掲載された記事、論文などの著作権は日本環境変異原学会に帰属するものとする。従って、本会が必要と認めた場合は転載し、また外部から引用の申請があった場合には、編集委員会において検討の上許可することがある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部を複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著作者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて申し出を行い、許諾を求めなければならない。

### 6. 校正

著者校正は原則として原稿に対する誤植の訂正に限る。原稿にない加筆・変更をしないこと。

### 7. 著者負担金

1) 投稿論文は、組版代の一部負担金として刷り

上がり 1 頁につき 2,000 円を著者が負担する。また規定の頁数を越えた分については、超過頁分についての実費は著者負担とする。

- 2) カラー印刷等特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りは著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申し込み書に 50 部単位で申し込むこと。

## 環境変異原研究執筆規定

1. 用語は日本語または英語とする。
2. 原稿は原則としてワープロを用い、左横書きで作成する。

日本文の場合：原稿は A4 版用紙に 1 行 22 字、1 頁 20 行で印字する（刷り上がりの 1/4 頁に相当する）。また、別に英文の題名、著者名、所属機関名および要約（300 字以内）を付ける。なお、手書きの原稿を希望する場合には、日本環境変異原学会所定の原稿用紙を用いる。

英文の場合：原稿は A4 版のタイプ用紙にダブルスペースでタイプする。一行打字数は 60 字、1 頁 25~27 行を標準とする。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。

なお、各頁は左 3 cm、右 5 cm、上 3 cm、下 6 cm の余白をとる。

3. 投稿論文の記述は、第 1 頁は表題、著者名、所属および所在地、第 2 頁は要約（Summary）およびキーワード（5 語以内）、第 3 頁以下、緒言（Introduction）、実験材料および方法（Materials and Methods）、結果（Results）、考察（Discussion）、謝辞（Acknowledgements）、参考文献（References）、表・図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明はすべて英文とする。

4. 学名、遺伝子記号などはイタリック（原稿に赤字でアンダーライン表示）とし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。

5. 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、CAS 番号を文中に表示する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる（文頭の場合は大文字）。

また文中の英語はすべてタイプするかまたは活字

体で書く。

6. 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
7. 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
8. 表、図（写真）は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号 Fig. 1, 2 … を付し、説明文を別紙に添える。
9. 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面に Fig. 1, 2 … および上下を鉛筆書きし、A4 版の台紙に一枚ずつ軽く糊付けする。台紙の下部に Fig. (一連番号) および説明を付す。
10. 表は表の上部に Table (一連番号) と説明を記入すること。表には縦野を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するときは表示の語句の右肩に a, b, c … を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
11. 本文中の文献引用は著者名および年号をもつてする。
12. 引用文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名は Chemical Abstracts の記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁（単行本の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁）の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。

Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 31, 347-364.

Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B. H. Margolin, B. Matter and M. D. Shelby (1985) Overview and conclusion of the IPCS collaborative study on in vitro assay systems, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds.), Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Elsevier, Amsterdam, pp. 117-174.

藤川和男、梁 治子、近藤宗平（1984）ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目されている短期試験法、環境変異原研究, 6, 107-113.

佐々木正夫（1983）環境変異原と染色体異常、染色体異常（外村 晶編），朝倉書店, pp. 107-113.

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)	
所属機関 所在地	〒 電話	内線( ) FAX
	(和)	
自宅 住所	〒 電話	内線( ) FAX
	(和)	
会誌送付先	① 所属機関 ② 自宅	

学歴	学部	学部学校名	卒業年次	年
	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	( <input checked="" type="checkbox"/> )
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( ) FAX (和)
(英)	
新 自宅 住 所	〒 電話 内線( ) FAX (和)
(英)	
会誌送付先	① 所属機関 ② 自宅

送付先：〒105 東京都港区新橋5-23-7  
三造写真工業株式会社内 学会事務局

環境変異原研究 第14巻 第2号 1992年

平成5年3月10日 印刷  
平成5年3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

ISSN 0910-0865