

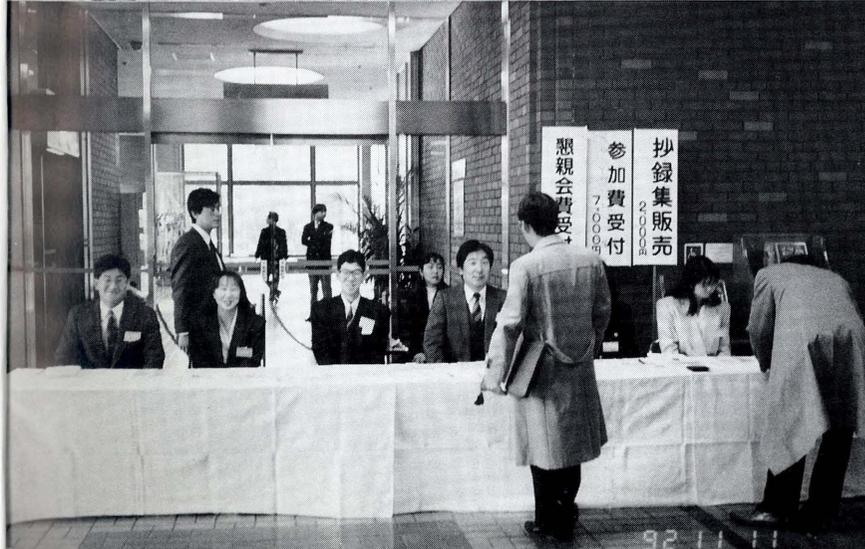
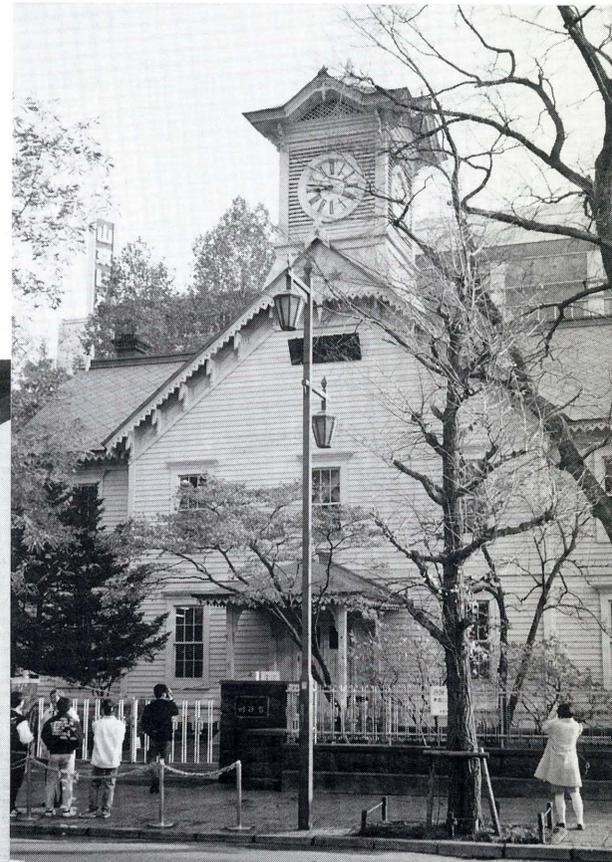
# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

Vol.15 No.1 1993

# 日本環境変異原学会 第21回大会

札幌



目次

奨励賞受賞講演

ニトロアレーン、芳香族アミンに高感受性を示すサルモネラ菌株の開発  
能美 健彦…………… 1

シンポジウム「バイオテクノロジーによる新しい変異原性試験法の展開」

高感受性サルモネラ・テスター株開発のストラテジー：薬物代謝酵素遺伝子の導入と DNA 修復酵素遺伝子の破壊  
能美健彦, 渡辺雅彦, 山田雅巳, 祖父尼俊雄, 小田美光…………… 13

チトクローム P 450 および P 450 還元酵素 cDNA の導入による変異原高感受性細胞株の樹立  
澤田 稔, 北村龍司, 鎌滝哲也, 扇谷 悟…………… 23

培養細胞を用いる非変異・癌原物質の検出系の開発  
田中憲穂, 佐々木澄志, 山影康次…………… 33

トランスジェニックマウスを用いた変異原の高感度解析法の開発  
権藤洋一, 中尾和貴, 高橋美千江, 池田由美子, 茂手木淑子, 竹下 綾, 勝木元也…………… 39

シンポジウム「なぜ変異原性試験を行うのか」

環境変異原学会の役割—その歴史的展望のこころみ  
近藤宗平…………… 51

Ames 試験のガイドライン化の経緯について  
松島泰次郎…………… 55

染色体異常試験とマウス小核試験のガイドライン化の経緯  
石館 基…………… 59

変異原性試験のハーモナイゼーションの必要性について  
菊池康基…………… 69

アンケート調査による企業からの提言  
坂本 豊, 大島稔彦, 杉山千代美, 柴原俊一…………… 73

シンポジウム「変異原性試験で何がわかるか：問題点と展望」

Ames 試験の問題点  
小木曾重文, 三宅幸雄…………… 83

染色体異常試験の問題点  
森田 健, 矢嶋信浩…………… 89

マウス小核試験の問題点  
若田明裕, 大内田昭信, 鈴木 洋…………… 97

遺伝毒性試験  
藤川和男, 佐々木 有, 長尾哲二…………… 103

三点セットから補完試験まで  
島田弘康…………… 109

非変異・がん原物質による酸化的 DNA 傷害について  
——特に 8-OH-deoxyguanosine の測定——  
佐井君江…………… 123

発癌プロモーター *In Vitro* 試験について  
酒井綾子, 梅田 誠, 中村好志, 佐々木澄志, 岩瀬裕美子…………… 131

*In vivo-in vitro* ラット・マウスの UDS と RDS 試験について  
降旗千恵, 宇野芳文…………… 155

日本学術会議だより (No. 28, 29) …………… 173

付記

日本環境変異原学会 会 則…………… 177

” 役員名簿…………… 178

” 評議員名簿…………… 179

” 投稿規定・執筆規定…………… 180

” 入会申し込み書…………… 182

” 住所・所属等変更届…………… 184



奨励賞受賞講演

ニトロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示すサルモネラ菌株の開発

国立衛生試験所 変異遺伝部 能 美 健 彦

1. はじめに

ニトロアレーン, 芳香族アミンは環境変異原のクラスであり, この中には実験動物に対し発癌性を示す化合物も少なくない。我々はこれまで遺伝子工学的手法を用いて, 環境中に存在するニトロアレーン, 芳香族アミンの変異原性を高感度に検出するエームテスト用のサルモネラ株を開発してきた。本稿ではそのうち, YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 株の開発の経過と, これら高感受性株の中に導入されているサルモネラのアセチル転移酵素遺伝子に関する分子生物学的研究について紹介する。

2. サルモネラの薬物代謝酵素であるニトロ還元酵素とアセチル転移酵素

1,8-dinitropyrene に代表される変異原性, 発癌性を有するニトロアレーンは, ガソリン車やディーゼル車の排気ガス, タバコの煙, 汚染された室内の空気, 都市の大気, 河川の底質などに存在している (Rosenkranz and Mermelstein, 1983; Tokiwa and Ohnishi, 1986)。一方, benzidine, 4-aminobiphenyl, 2-naphthylamine に代表される芳香族アミンは化学工業原料として使用されてきたが, 最近では焦げた食品中から Glu-P-1 などのヘテロサイクリックアミン系の変異原物質が単離されている (Sugimura, 1985, 1986)。

こうした complex mixture 中に含まれるニトロアレーン, 芳香族アミンの変異原性検出には,

従来 *Salmonella typhimurium* TA98 と TA100 が汎用されてきた (Ames *et al.*, 1975, Maron and Ames, 1983)。しかし, 環境中に実際に存在する微量のニトロアレーン, 芳香族アミンの変異原性を検出するためには, 通常, 大量のサンプルの採取, 抽出が不可欠であり, より高い検出感度を有する指標菌株の開発が望まれていた。

ニトロアレーン, 芳香族アミンは直接 DNA に作用するわけではなく, その代謝物が DNA を攻撃することが知られている (Kato and Yamazoe, 1988)。Fig. 1 は代表的なニトロアレーンおよび芳香族アミンのサルモネラ細胞内における代謝活性化経路を示したものである。ニトロアレーンはバクテリアの持つニトロ還元酵素により *N*-水酸化体へ還元され, その後アセチル転移酵素により活性化 (水酸基の酸素原子のアセチル化) され, 最終的に生じたニトロニウムイオンが DNA を攻撃するものと考えられている。一方, 芳香族アミンは微生物細胞の外でチトクローム P-450 などの酸化酵素により *N*-水酸化され, その後 *N*-水酸化体が微生物細胞内に入ってから, ニトロアレーンと同一の経路を経て DNA に作用する。したがって, ニトロ還元酵素, アセチル転移酵素はこれら化合物の変異原性発現の律速段階になっているものと考えられる。

我々は, *S. typhimurium* TA1538 株からニトロ還元酵素およびアセチル転移酵素の遺伝子をクローニングし, それぞれの遺伝子を持つマルチコ

〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Development of new *Salmonella* tester strains highly sensitive to mutagenic nitroarenes and aromatic amines

Takehiko Nohmi

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

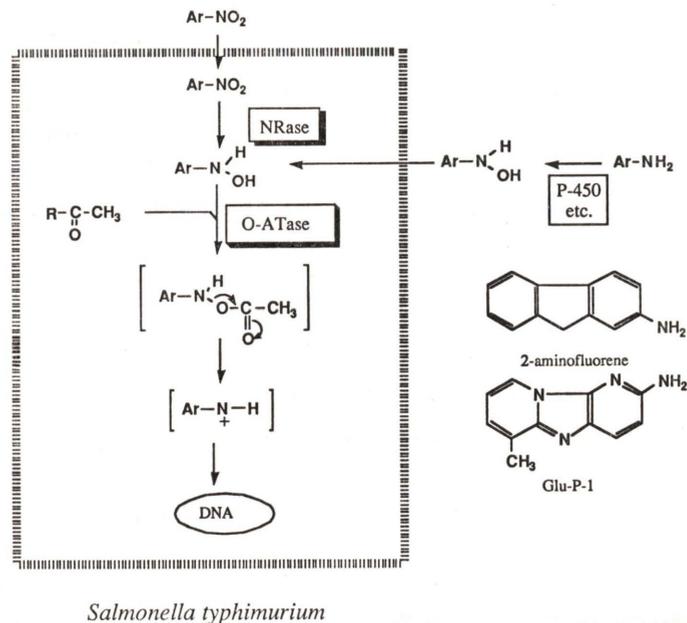
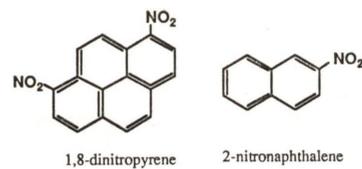


Fig. 1 ニトロアレーン、芳香族アミンの *Salmonella typhimurium* 細胞内における代謝活性化経路  
ニトロ還元酵素 (NRase) と *O*-アセチル転移酵素 (*O*-Acase) は、ニトロアレーン、芳香族アミン  
の変異原性発現の律速因子となっている。

ピープラスミドを、従来から使われてきた TA100, TA98 へ導入することで、ニトロアレーン、芳香族アミンに対し高い感受性と特異性をもつ指標菌株を作製しようと考えた。

### 3. 遺伝子クローニング

遺伝子をクローニングするためにはいろいろな方法があるが、クローニングを行った 1986 年当時は、ニトロ還元酵素、アセチル転移酵素ともアミノ酸配列、塩基配列が不明であったため、遺伝子の機能に基づいてクローニングを行うこととした。

まず TA1538 の染色体 DNA を抽出し、*Sau*3A1 で部分分解した後、*Bam*H1 で開環した pBR322 プラスミドに連結し、*S. typhimurium* TA1538 の遺伝子ライブラリーを作製した。次に作製したラ

イブラリー DNA で TA1538NR あるいは TA1538/1,8-DNP 株を形質転換した。TA1538NR 株および TA1538/1,8-DNP 株は、アメリカのケースウェスタンリバース大学のローゼンクランツらにより単離された TA98NR 株、TA98/1,8-DNP 株から pKM101 プラスミドを除いたミュータントで、TA1538NR 株はニトロ還元酵素活性が著しく低下し、TA1538/1,8-DNP 株はアセチル転移酵素活性が低下している。このため、これらの株は 2-nitrofluorene の致死作用に対して抵抗性になっており、TA1538 が生存することのできない高い濃度の 2-nitrofluorene を含む培地上でも生育することができる。もしこれらの抵抗性株にライブラリー中に含まれるニトロ還元酵素遺伝子、アセチル転移酵素遺伝子が導入されたならば、形質転換株は 2-nitrofluorene の致死作用に対し感

受性になるものと予想される。そこで形質転換株を、50  $\mu$ g/ml の濃度の 2-nitrofluorene を含む培地上にレプリカし、この培地上で生存することのできなくなった形質転換株を選択した (Watanabe *et al.*, 1987)。

### 1) ニトロ還元酵素遺伝子のクローニング

2,500 個の形質転換株からニトロ還元酵素活性が宿主の TA1538NR よりも著しく高まっている株を 1 株得た。この株が持っていたのが pYG111 プラスミドである。pYG111 は 14.4 kb のプラスミドで、pBR322 由来の複製開始点とアンピシリン耐性遺伝子を持つ他に、約 10 kb の TA1538 由来の染色体 DNA を持っていた。各種欠失変異体を用いた実験からニトロ還元酵素はそのうちの約 1.6 kb 領域に存在していることが判明した。TA100, TA98 株はこの pYG111 と同じアンピシリン耐性のプラスミド pKM101 を持っている。そこで、この 1.6 kb 領域を含む *Pst*I site (2.6 kb) から *Pst*I site (9.45 kb) までの 6.85 kb フラグメントを別の pBR322 の *Pst*I site へサブクローニングし、テトラサイクリン耐性を持ったプラスミド pYG216 を作製した。pYG216 を TA98, TA100 株へ導入し、YG1021, YG1026 とした。

pYG111 および pYG216 を持つ菌株は対照株である TA1538 (pBR322) よりも約 50 倍高い nitrofurazone ニトロ還元酵素活性を示した。また pYG216 を持つ株はエームテストを行うと、2-nitrofluorene に対し対照株に比べ TA1538NR で 15 倍、TA98 で約 20 倍、TA100 で約 6 倍高い感受性を示した。これらの結果に基づき、クローニングしたプラスミド上にはサルモネラのニトロ還元酵素遺伝子が存在するものと結論した (Watanabe *et al.*, 1989)。また塩基配列を決定することによりサルモネラのニトロ還元酵素は 217 個のアミノ酸からなる分子量 23,955 の蛋白質と推定した (Watanabe *et al.*, 1990-a)。ニトロ還元酵素は NADPH を補酵素とするフラビン蛋白質と予想されているが、これまでに報告されている NADPH 結合 consensus sequence は見いだされなかった (能美ら, 1990)。

### 2) アセチル転移酵素遺伝子のクローニング

同様に、アセチル転移酵素についても、約 10,000 個の形質転換株からアセチル転移酵素活性が宿主の TA1538/1,8-DNP よりも著しく高まっている株を 4 株得た。そのうちの 2 株が持っていたのが pYG122 プラスミドである。pYG122 は 11.65 kb のプラスミドで、pBR322 由来の複製開始点とアンピシリン耐性遺伝子を持つほか、約 7 kb の TA1538 由来の染色体 DNA を持っていた。各種欠失変異体を用いた実験からアセチル転移酵素はそのうちの 1.35 kb 領域に存在していることが判明した。TA100, TA98 に導入するため、この 1.35 kb 領域を別の pBR322 の *Sca*I site へ導入し、テトラサイクリン耐性となったプラスミド pYG219 を作製した。

pYG122 および pYG219 を持つ株は、対照株である TA1538 (pBR322) 株よりもそれぞれ約 50 倍および約 100 倍高い *N*-hydroxy-Glu-P-1 *O*-アセチル転移酵素活性を示した。また、pYG219 を持つ株はエームテストを行うと、対照株に比べ TA1538/1,8-DNP で 40 倍、TA98 で約 30 倍、TA100 で約 40 倍、2-nitrofluorene に対し高い感受性を示した。これらの結果に基づき pYG122 および pYG219 プラスミド上にはアセチル転移酵素遺伝子が存在するものと結論した (Watanabe *et al.*, 1990-b)。そこで TA98 に pYG219 を組込んだ YG1024 と、TA100 に pYG219 を組込んだ YG1029 を用い、ニトロ還元酵素活性の増大した YG1021, YG1026 株とともに 30 種類の芳香族ニトロ化合物、芳香族アミノ化合物、芳香族ヒドロキシルアミンに対する感受性を調べた。

### 4. YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 株の感受性

YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 の 30 種類の化合物に対する感受性を TA98, TA100 と比較した (Table 1, 2)。感受性は化合物の nmol ( $\mu$ mol) 当たりの誘発 His<sup>+</sup> 復帰株数を算出して表した。また比較を容易にするために括弧内に TA98, TA100 の感受性を 1.0 とした時の相対的な値を示した。

ニトロ還元酵素活性の上昇した株 YG1021,

Table 1. *Salmonella typhimurium* TA 98, YG 1021, YG 1024 の感受性の比較

| Chemical                           | S9 mix | Induced His <sup>+</sup> Revertants per nmol |              |                |
|------------------------------------|--------|--|--------------|----------------|
|                                    |        | TA 98  | YG 1021      | YG 1024        |
| 2-Nitrofluorene                    | —      | 293 (1.0)                                    | 2045 ( 7.0)  | 3181 (10.9)    |
| 2,6-Dinitrotoluene <sup>a</sup>    | —      | 15 (1.0)                                     | 2260 (150.7) | 136 ( 9.1)     |
| 1-Nitropyrene                      | —      | 514 (1.0)                                    | 12172 (23.7) | 3415 ( 6.6)    |
| 2,4-Dinitrotoluene <sup>a</sup>    | —      | 74 (1.0)                                     | 1508 (20.3)  | 348 ( 4.7)     |
| 2,4,6-Trinitrotoluene <sup>a</sup> | —      | 863 (1.0)                                    | 9028 (10.5)  | 4724 ( 5.5)    |
| Nitro-Glu-P-1                      | —      | 3507 (1.0)                                   | 7503 ( 2.1)  | 55357 (15.8)   |
| 2-Aminofluorene                    | +      | 74 (1.0)                                     | 68 ( 1.0)    | 2240 (30.3)    |
| 1,8-Dinitropyrene                  | —      | 72186 (1.0)                                  | 82902 ( 1.1) | 2152908 (29.7) |
| 2-Acetylaminofluorene              | +      | 32 (1.0)                                     | 27 ( 0.8)    | 506 (15.8)     |
| 2-Aminoanthracene                  | +      | 360 (1.0)                                    | 275 ( 0.7)   | 7595 (21.1)    |
| Glu-P-1                            | +      | 12812 (1.0)                                  | 16577 ( 1.3) | 203968 (15.9)  |
| m-Phenylenediamine <sup>a</sup>    | +      | 7462 (1.0)                                   | 8824 ( 1.2)  | 24483 ( 3.3)   |
| N-Hydroxy-Glu-P-1                  | —      | 6551 (1.0)                                   | 6093 ( 0.9)  | 32547 ( 5.0)   |
| N-Hydroxy-2-aminofluorene          | —      | 2117 (1.0)                                   | 1187 ( 0.6)  | 32216 (15.2)   |
| Nitrofurazone                      | —      | 5 (1.0)                                      | 7 ( 1.4)     | 10 ( 2.0)      |
| Furylfuramide                      | —      | 14644 (1.0)                                  | 14644 ( 1.0) | 23744 ( 1.6)   |
| 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene     | +      | 6 (1.0)                                      | 9 ( 1.5)     | 5 ( 0.8)       |
| Trp-P-2                            | +      | 10493 (1.0)                                  | 9085 ( 0.9)  | 6232 ( 0.6)    |

感受性は、各化合物の nmol 当たりの誘発 His<sup>+</sup> 復帰株数を算出して表した。括弧内に TA 98 の感受性を 1.0 とした時の相対的な値を示した。YG 1021 株は TA 98 株のニトロ還元酵素増産株であり、YG 1024 は TA 98 のアセチル転移酵素増産株である。

<sup>a</sup> これらの化合物については、その感受性を化合物の  $\mu\text{mol}$  当たりの誘発 His<sup>+</sup> 復帰株数で表した。

Table 2. *Salmonella typhimurium* TA 100, YG 1026, YG 1029 の感受性の比較

| Chemical                             | S9 mix | Induced His <sup>+</sup> Revertants per nmol |             |             |
|--------------------------------------|--------|--|-------------|-------------|
|                                      |        | TA 100                                       | YG 1026     | YG 1029     |
| 2-Nitronaphthalene                   | —      | 25 (1.0)                                     | 83 ( 3.3)   | 69 (2.8)    |
| p-Nitrophenetole                     | —      | 202 (1.0)                                    | 3042 (15.1) | 1159 (5.7)  |
| N-Hydroxy-p-phenetidine              | —      | 11 (1.0)                                     | 4 ( 0.4)    | 74 (6.7)    |
| p-Nitrosophenetole                   | —      | 10 (1.0)                                     | 8 ( 0.8)    | 50 (5.0)    |
| Methyl methanesulfonate <sup>a</sup> | —      | 236 (1.0)                                    | 157 ( 0.7)  | 330 (1.4)   |
| N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine | —      | 585 (1.0)                                    | 251 ( 0.4)  | 611 (1.0)   |
| 2,6-Dimethylphenylhydroxylamine      | —      | 31 (1.0)                                     | 11 ( 0.4)   | 41 (1.3)    |
| 1-Nitrosopyrrolidine                 | +      | 62 (1.0)                                     | 13 ( 0.2)   | 65 (1.0)    |
| Aflatoxin B1                         | +      | 10993 (1.0)                                  | 8120 ( 0.7) | 12086 (1.1) |
| 4-Nitroquinoline N-oxide             | —      | 2377 (1.0)                                   | 1599 ( 0.7) | 2897 (1.2)  |
| Benzo[a]pyrene                       | +      | 134 (1.0)                                    | 89 ( 0.7)   | 159 (1.2)   |
| Lucidin                              | —      | 1013 (1.0)                                   | 1113 ( 1.1) | 592 (0.6)   |

感受性は、各化合物の nmol 当たりの誘発 His<sup>+</sup> 復帰株数を算出して表した。括弧内に TA 100 の感受性を 1.0 とした時の相対的な値を示した。YG 1026 株は TA 100 株のニトロ還元酵素増産株であり、YG 1029 は TA 100 のアセチル転移酵素増産株である。

<sup>a</sup> これらの化合物については、その感受性を化合物の  $\mu\text{mol}$  当たりの誘発 His<sup>+</sup> 復帰株数で表した。

YG1026 は、芳香族ニトロ化合物に対して特異的に高い感受性を示した。YG1021, YG1026 が高い感受性を示した化合物は、2-nitrofluorene, 2,6-dinitrotoluene, 1-nitropyrene, 2,4-dinitrotoluene, 2,4,6-trinitrotoluene, nitro-Glu-P-1, 2-nitronaphthalene, p-nitrophenetole であった。YG1021 と TA98 の感受性の差は各化合物ごとに異なり、YG1021 は 2,6-dinitrotoluene に対し TA98 よりも約 150 倍高い感受性を示したが、nitro-Glu-P-1 に対しては約 2 倍高い感受性を示したにすぎなかった。

ニトロ基を有する化合物であっても、1,8-dinitropyrene, 4-nitroquinoline N-oxide, nitrofurazone, furylfuramide に対しては、YG1021, YG1026 とも全く高い感受性を示さなかった。これら 4 種のニトロ化合物は、ニトロ還元酵素欠損株である TA98NR, TA100NR に対する変異原性により 2 つのグループに分けて考えられる。すなわち 1,8-dinitropyrene, 4-nitroquinoline N-oxide は、TA98NR, TA100NR に対し TA98, TA100 と同程度の変異原性を示すのに対し、nitrofurazone, furylfuramide は、TA98NR に対し TA98 よりも 70-80% 低い変異原性を示す。このことから 1,8-dinitropyrene, 4-nitroquinoline N-oxide は、別種のニトロ還元酵素により還元されるのに対し、nitrofurazone, furylfuramide は、TA98 に存在する少量のニトロ還元酵素だけで十分にすばやく還元されてしまうため、ニトロ還元酵素活性を増大させても効果が観察されなかったものと考察した。

アセチル転移酵素活性の増大した YG1024, YG1029 は、芳香族ニトロ化合物 (2-nitrofluorene, 2,6-dinitrotoluene, 1-nitropyrene, 2,4-dinitrotoluene, 2,4,6-trinitrotoluene, nitro-Glu-P-1, 2-nitronaphthalene, p-nitrophenetole, 1,8-dinitropyrene), 芳香族アミン (2-aminofluorene, 2-acetylaminofluorene, 2-aminoanthracene, Glu-P-1, m-phenylenediamine), 芳香族ヒドロキシルアミン (N-hydroxy-Glu-P-1, N-hydroxy-2-aminofluorene, N-hydroxy-p-phenetidine), 芳香族ニトロソ化合物 (p-nitrosophenetole) に対し TA98, TA100 よりも高い感受性を示した。YG

1024, YG1029 と TA98, TA100 との感受性の差は各化合物ごとに異なり、1,8-dinitropyrene に対し YG1024 は TA98 よりも約 30 倍高い感受性を示したが、YG1029 は 2-nitronaphthalene に対し TA100 よりも約 3 倍高い感受性を示したにすぎなかった。YG1024, YG1029 はアルキル化剤 (methyl methanesulfonate, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), 芳香族炭化水素 (benzo[a]pyrene, 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene) などには、高い感受性を示さなかった。

Trp-P-2, 4-nitroquinoline N-oxide は、芳香族アミン、芳香族ニトロ化合物であるが、YG1024, YG1029 いずれも高い感受性を示さなかった。これらの化合物は、アセチル転移酵素の欠損株である TA98/1,8-DNP6, TA100/1,8-DNP に対し TA98, TA100 と同程度の変異原性を示す。このことから、Trp-P-2, 4-nitroquinoline N-oxide はアセチル転移酵素以外の代謝酵素により *S. typhimurium* の菌体内で代謝活性化されることが示唆された。4-nitroquinoline N-oxide の N-水酸化体については、seryl-tRNA 合成酵素により活性化されることが報告されている (Tata and Tada, 1975)。

以上の結果に基づき、ニトロ還元酵素活性の増大した YG1021, YG1026 はニトロアレーンを含む芳香族ニトロ化合物に対して、アセチル転移酵素活性の増大した YG1024, YG1029 は芳香族ニトロ、アミノ化合物から生ずる芳香族ヒドロキシルアミンに対して、それぞれ特異的に高い感受性を示すテスター株であるものと結論した (Einistö *et al.*, 1991)。

##### 5. Complex mixture 中に含まれる変異原の高感度検出

次に樹立した YG 株が、実際に complex mixture 中に含まれるニトロアレーンあるいは芳香族アミンの変異原性検出に有効であるか否かを調べるため、喫煙者および非喫煙者の尿に含まれる変異原に対する TA98, YG1021, YG1024 の感受性を調べた (Einistö *et al.*, 1990)。

5 人の喫煙者、および非喫煙者を募り、500 ml の尿を 2 回提供してもらった。500 ml の尿中に

含まれる多環芳香族変異原をブルーレーオンを用いて抽出し、抽出物を 200  $\mu$ l の DMSO に溶解し、その 50, 25, 12.5, 6.25  $\mu$ l を +S9 mix の条件下で、3 種の指標菌株 TA98, YG1021, YG1024 を用いて変異原性試験を行った。喫煙者の尿は非喫煙者に比べ著しく高い変異原性を示し、非喫煙者の尿はコントロールよりも僅かに高い変異原性を示した。菌株ごとに比較するとアセチル転移酵素活性の増大した YG1024 は他の 2 株よりも約 7 倍高い感受性を示した。ニトロ還元酵素活性の増大した YG1021 は TA98 とほぼ同等の感受性を示した。これらの結果から①喫煙者の尿中には

芳香族アミン系の変異原が存在すること② YG1024 は complex mixture 中の変異原の高感度検出に有効であるものと結論した。

ニトロ還元酵素、アセチル転移酵素活性の増大した YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 は、現在、26 ケ国、約 160 研究機関で、大気 (Suzuki *et al.*, 1992; Houk *et al.*, 1992), 河川 (Sayato *et al.*, 1990), 食品 (Wild *et al.*, 1991), 代謝物 (Josephy, 1989; Josephy *et al.*, 1989; Cunningham and Matthews, 1990; Espinosa-Aguirre *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1992; Pan *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Seo *et al.*, 1993), 実験

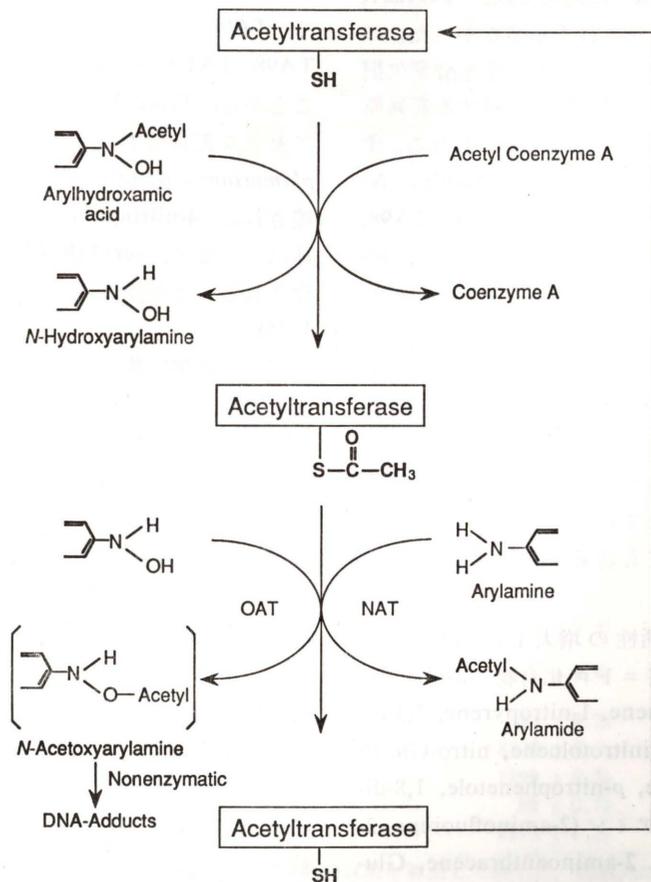


Fig. 2. アセチル転移酵素の行う触媒反応

アセチル転移酵素は acetyl CoA または arylhydroxamic acid から自身のシステイン残基にアセチル基を受け取り、アセチル酵素中間体を形成し、その後アセチル基を arylamine の窒素原子 (*N*-アセチル化反応) あるいは arylhydroxylamine の酸素原子 (*O*-アセチル化反応) に転移する。*O*-アセチル化により生成する *N*-acetoxyarylamines は反応性に富む化合物であり、非酵素的に分解し DNA 付加物を形成する。

動物やヒトの尿 (Einistö, 1991; Scheepers *et al.*, 1991) などに含まれる微量のニトロアレーン、芳香族アミンの検出に広く使われている。

### 6. アセチル転移酵素は高等生物にも存在する

YG1024, YG1029 に組み込まれているアセチル転移酵素は、バクテリアにのみ存在するのではなく、ヒトを含む高等生物にも存在する。哺乳類の肝臓に存在するアセチル転移酵素は isoniazid をはじめ芳香族アミン系薬物の代謝に関与することから、薬物代謝酵素の 1 つとして研究が進められてきた (Hein, 1988)。

Fig. 2 は、サルモネラおよび高等生物のアセチル転移酵素に共通する触媒反応の概要を示したものである。すなわち、バクテリアからヒトにいたるまでアセチル転移酵素は活性中心にシステイン残基を持ち、このシステイン残基がアセチル基の供与体である acetyl CoA あるいは芳香族ヒドロ

キサム酸からアセチル基を受け取り、アセチル酵素中間体を形成する。その後、*N*-アセチル転移反応の場合には受け取ったアセチル基を芳香族アミンの窒素原子へ、そして *O*-アセチル転移反応の場合には芳香族ヒドロキシルアミンの酸素原子に転移し、酵素自身は再びアセチル化されない状態に戻り、この反応を繰り返す。実際、サルモネラのアセチル転移酵素は acetyl CoA に依存した *N*-アセチル転移、*O*-アセチル転移の他に、低いながら芳香族ヒドロキサム酸に依存した *N,O*-アセチル転移活性を示す。このようにアセチル基の受容部位となる活性中心システイン残基は、各種アセチル転移反応の要となるアミノ酸であるが、そのアミノ酸配列上の位置は同定されておらず、またアセチル基転移の詳しい機構も不明であった。

### 7. サルモネラのアセチル転移酵素遺伝子の解析

我々は、アセチル転移酵素の触媒機構を明らか

|   |      |
|---|------|
| CTGCAGGAGATTATGAAAATAAATATCAACAAAATCATGAAAGGCATCTGTATGTGCTTACCGCAGGACTGGCTACGGATTTACGC      | 90   |
| GAGTAATTGAACATTTATGTAATGTTACGGCTAAAGTTGGGAGTTCGTGCAATGCAGGAATATCCATAATCACTTGTCTGATGCTG      | 180  |
| TACGTGATGGACTGTTTACTATAGATGTCGAGCTTTCGTGATGTCGGATGTTAACTTCGAAACAATCTTCGGCTGATAGCTGAAGTAAGC  | 270  |
| CAATCGTCAGGATATCGGATGGGAAACATACCTTTCGAGGTTGAGGGACCTTTGAAAGAGATTTGTATGAGACTGGAAGAGGGCTTTTGT  | 360  |
| AAGCGCCAGGCTACTATGATTTATGATTTGATGAAAAATATAAAACCGTCAGAGAGCGAATGGCAGCATATAATGCCTTACCTCAGGCAT  | 450  |
| TAGGCGCCATTCGCTGTTAGAAATATATATCGCTCGGGCCAGCAACTGCAGGAGCGGAAAGCGCAATGGGGCCGACATAAAGCTC       | 540  |
| GCTACCAATACTATTTGGCAATTAATAAAGCGTTTATGTTTACCGAGTTTGTGTAAGAAATCAGACTCGCTGAGCGCGGTAAAAAT      | 630  |
| TTTACACCGCGCTATTTTGGGGGCTGTCGAAAGAGATTCAGAACCCGATTTCCGTTTGTGCGCAAAATTCACGTCCTCCGCG          | 720  |
| GGCAGCGCGCGCTGCTTATTTTTCAAAAGTATCCACCGCTATTCACGGATAGGGTATCTGTTGCGCAGGATATTCGCGCTCAGC        | 810  |
| CTGTGTCCGCAAGCGCAAGCATTAATGTTAATGGAAGCCCTCAGATGACCTCTTTTACATGCTTATTTACGGATATACATGTCAGCCG    | 900  |
| S.D. M T S F L H A Y F T R L H C Q P  |      |
| TTGGGGTTCCTACGGTGAAGCGCTCAGAACGCTTCACTTAGCGCAACTGCGGATTCCTTTTGAANAATTCGGATGTCCTACTGCTCT     | 990  |
| L G V P T V E A L R T L H L A H N C A I P F E N L D V L L P                                 |      |
| CGTGAATACAGCTCGATGAGACGGCATTAGAGGAGAACTGCTTTATGCGCGCGGTTGATGACTGTTTGAACITGAATGGCGCTGTTT     | 1080 |
| R E I Q L D E T A L E E K L L Y A R E G G Y C F E L N G L F                                 |      |
| GAAACCGCTTACCGGACATCGGTTTAAAGCTCGGAGCTTATTTGGGGGGTCAATCTGCTCATCCGCGCAGTTTACCGCGCGGCGAG      | 1170 |
| E R A L R D I G F N V R S L L G R V I L S H P A S L P P R T                                 |      |
| CACGTTTGGCTGCTGTTGATGTTGAGGATGAGCAGTGGATCGCGGACGTTGGGGTTTGGCGGCAAAAGCGCTAACCGCACCGCTTCTGTC  | 1260 |
| H R L L L V D V E D E Q W I A D V G F G G Q T L T A P L R L                                 |      |
| CAGGCTGAATTTGCCAGAAACCGCGCATGCGCAATCCGCTGATGCAGGAGGAAAGCAATGGAATTTTAACTTCGCGCACCATGAG       | 1350 |
| Q A E I A Q Q T P H G E Y R L M Q E G S T W I L Q F R H H E                                 |      |
| CACGTCAGTCGATGACTGTTTGTATCGGGGTCGAGCAGCAGGCGATCATGTGATGGCAATTTCTGCTCGGCTCAGTGGCGCAA         | 1440 |
| H W Q S M Y C F D L G V Q Q Q S D H V M G N F W S A H W P Q                                 |      |
| TTCCATTTTGTGTCATGTTGATGTTGCGCCATTTGCTGATGGCGGCAAGCTGACATTAACGAATTTCCACTTCAGCGGTTACAC        | 1530 |
| S H F R H L L L M C R H L P D G G K L T L T N F H F T R Y H                                 |      |
| CAGGACATGCGGTTGAACAGTCAATGTTACCGGATGACCGTCTGTTGATGATCACTTACTTCAGCAGCAGTTTGGCTTCGCGCTAAATGAT | 1620 |
| Q G H A V E Q V N V P D V P S L Y Q L L Q Q Q F G L G V N D                                 |      |
| GTAAGCAGGTTTACCGAGCGGAGCTGGCGGTAATGCTGATTTGATACCCATTCAGAGCGGGAATAATTTTTCGCGCG               | 1710 |
| V K H G F T E A E L A A V M A A F D T H P E A G K Stop                                      |      |
| AGGATTTGGGGCTGCAAAAGTAAAAAATTAATGGCCATTCGGCATGAAACAGAAATGACCGCTTGGCGGAGATGGTACGCTTTTCC      | 1800 |
| GGCTGTTATGCGAATGGTACCGTAAACATCAACAGTACCTCTTTCGCTAAAGCGCGCCCTGATGGCTTGAATTCGACGGTTTTA        | 1890 |
| CGTCTAGCGCCATCAGGCCATGATGAGCAGGCAATGCGCCCATGCGGCAATGGCGTTTCCCGTTACCGGATCTTCCCAATTCCTATC     | 1980 |
| GCCGGGAAACATTCGCGCATCGGTTTTCGTTTTCGCGGCAATTCGAAAGGAAAGCGCTTACAGCCAAATTTGCTGCTGAT            | 2070 |
| CGCTCAGGCTGCGAGTTAGGAAAGGCAATCAATATCAAGCTTGGTTTGGAGCAGGATC                                  | 2134 |

Fig. 3. サルモネラのアセチル転移酵素遺伝子の塩基配列

高等生物でも保存されているアミノ酸配列 Arg-Gly-Gly-X-Cys に二重下線をつけ、アセチル基の結合部位と考えられるシステイン 69 残基を丸で囲んだ。S. typhimurium TA 1538/1, 8-DNP 株でフレームシフト変異 (CCC→CC) が発見された部位を小さな四角で囲んだ。pYG 219 プラスミドにサブクローニングした 1.35 kb DNA フラグメントを大きな四角で囲んだ。

にする事を目的に、サルモネラのアセチル転移酵素遺伝子の塩基配列を決定するとともに、その推定アミノ酸配列を高等生物のアセチル転移酵素のアミノ酸配列と比較した。

決定したサルモネラのアセチル転移酵素遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列を Fig. 3 に示す。サルモネラのアセチル転移酵素遺伝子は 843bp の open reading frame を持ち、ここには分子量 32,177 の蛋白質がコードされていた (Watanabe *et al.*, 1992)。実際にこの遺伝子から分子量約 32,000 の蛋白質が発現している事は、別途行ったマキシ・セルを用いたラベル実験により確認した。また決定した塩基配列を基に、PCR 法を用いてサルモネラのアセチル転移酵素欠損株である TA1538/1,8-DNP 株のアセチル転移酵素遺伝子を増幅しその塩基配列を決定する事により、TA 1538/1,8-DNP 株では 197 番目のセリン残基と 198 番目のヒスチジン残基にまたがる 3 つ連続したシトシン CCC のうち 1 つが欠失し、204 番目のコドンにストップ・コドン UGA (オパール) ができている事が判明した。すなわち我々がクローニングしたアセチル転移酵素遺伝子が、TA 1538/1,8-DNP 株では変異している事が明らかとなった。

#### 8. 高度に保存されているアセチル転移酵素の Arg-Gly-Gly-X-Cys 配列

サルモネラのアセチル転移酵素の推定アミノ酸配列を、高等生物のアセチル転移酵素、すなわち、ヒト、ウサギ、ハムスター、トリのアセチル

転移酵素と比較した (Watanabe *et al.*, 1992)。

N-末端から 180 番目までのアミノ酸配列を比較すると、25-30% の相同性が存在した。アセチル転移酵素の活性中心にはシステイン残基が存在する。サルモネラのアセチル転移酵素には 5 つのシステイン残基が存在するが、その中で高等生物においても保存されているのは 69 番目のシステイン残基だけであった。

Fig. 4 は、高度に保存されているサルモネラのシステイン 69 および高等生物のシステイン 68 残基近傍のアミノ酸配列をクローズ・アップしたものである。四角く囲んだシステイン 69 残基を含む Arg-Gly-Gly-X-Cys 配列は、塩基配列が決定されている全てのアセチル転移酵素で保存されていた。また下線で示した塩基性アミノ酸 (リジン、アルギニン) が多い事も特徴的である。特にサルモネラのアルギニン 65, 高等生物のアルギニン 64 残基は高度に保存されていた。

これらの結果から、サルモネラのシステイン 69 はアセチル転移酵素の触媒反応において重要な役割をはたしているものと考え、このアミノ酸をアラニン残基に変えた変異アセチル転移酵素を作製し、その活性を測定した。その結果、69 番目のシステイン残基をアラニンに変えた変異蛋白質は、野生型と同様、分子量約 32,000 にバンドとして蛋白質は検出されるが、isoniazid N-アセチル転移酵素活性は全く検出されず、また N-hydroxy-Glu-P-1 を基質にした O-アセチル転移酵素活性も検出されないことが判明した。これらの結果から、サルモネラのアセチル転移酵素のシステ

|                       |    |                                     |    |
|-----------------------|----|-------------------------------------|----|
| <i>S. typhimurium</i> | 61 | Leu-Tyr-Ala-Arg-Arg-Gly-Gly-Tyr-Cys | 69 |
| Human-M,P             | 60 | Val-Arg-Arg-Asn-Arg-Gly-Gly-Trp-Cys | 68 |
| Rabbit-M,P            | 60 | Val-Arg-Arg-Asn-Arg-Gly-Gly-Trp-Cys | 68 |
| Hamster-M             | 60 | Val-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly-Gly-Trp-Cys | 68 |
| Mouse-M,P             | 60 | Val-Arg-Lys-Lys-Arg-Gly-Gly-Trp-Cys | 68 |
| Chicken-PG1           | 60 | Val-Lys-Lys-Lys-Arg-Gly-Gly-Trp-Cys | 68 |
| Chicken-L             | 60 | Val-Lys-Lys-Lys-Arg-Gly-Gly-Trp-Cys | 68 |
| Chicken-PG2           | 60 | Val-His-Lys-Lys-Arg-Gly-Gly-Trp-Cys | 68 |

Fig. 4. アセチル転移酵素の活性中心と考えられるサルモネラのシステイン 69 残基、高等生物のシステイン 68 残基近傍のアミノ酸配列の比較。

Arg-Gly-Gly-X-Cys 配列は塩基配列が決定されている全ての生物種のアセチル転移酵素で保存されている。塩基性アミノ酸 (アルギニン、リジン) に下線を付した。M, P はモノモルフィック、ポリモルフィックを表し、PG, L は松果体、肝臓を表す。

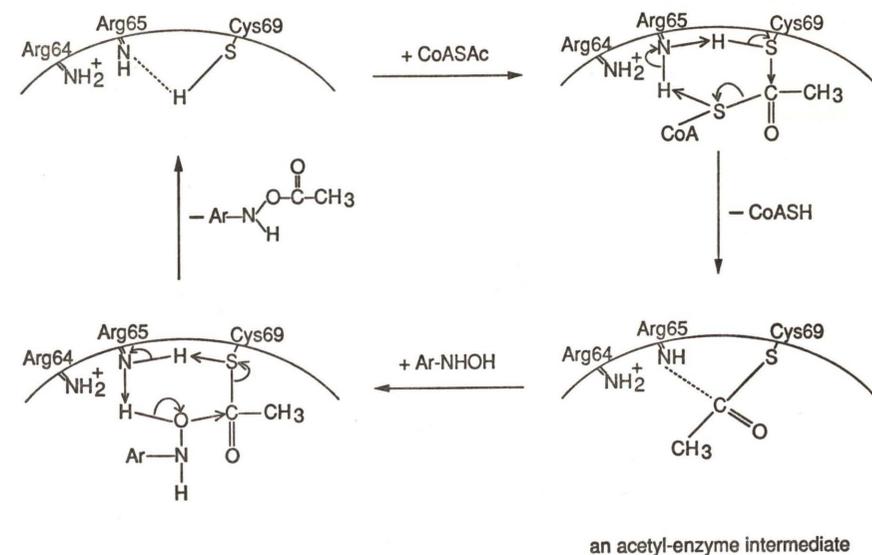


Fig. 5. アセチル転移酵素の触媒機構

サルモネラのアセチル転移酵素の場合、64 番目のアルギニンあるいは 65 番目のアルギニンが脱プロトン化し、これが活性中心のシステイン 69 の SH 基を活性化しているものと考えられる。活性化されたシステイン 69 残基は acetyl CoA と反応し、アセチル酵素中間体を形成する。アセチル基を受け取る芳香族ヒドロキシルアミンが来ると、この脱プロトン化したアルギニンはヒドロキシルアミンからプロトンを引きつけ、ヒドロキシルアミンのアセチル化を助ける。この結果 O-アセチル化された芳香族ヒドロキシルアミンが生成し酵素は元の状態へ戻る。

ン 69 残基、また高等生物のシステイン 68 残基はアセチル転移酵素の活性中心として働いているものと考え、Fig. 5 に示す様な触媒機構モデルを作成した。

#### 9. アセチル転移酵素の触媒機構モデル

64 番目のアルギニン、65 番目のアルギニンはいずれも単独で存在した場合には、中性条件下ではプロトネートした状態で存在する。しかし、2 つの塩基性アミノ酸が隣接して存在する場合には電気的な反発により一方の塩基性アミノ酸のアミノ基が脱プロトン化する事が知られている (acetate decarboxylase の場合)。このことへの類推から、サルモネラのアセチル転移酵素の場合も、64 番目のアルギニンあるいは 65 番目のアルギニンが脱プロトン化し、これが活性中心のシステイン 69 の SH 基を活性化しているものと考えた。

活性化されたシステイン 69 残基は acetyl CoA と反応し、アセチル酵素中間体を形成する。アセ

チル基を受け取る芳香族ヒドロキシルアミンが来ると、この脱プロトン化したアルギニンはヒドロキシルアミンからプロトンを引きつけ、ヒドロキシルアミンのアセチル化を助ける。この結果 O-アセチル化された芳香族ヒドロキシルアミンが生成し酵素は元の状態へ戻る。この O-アセチル化された芳香族ヒドロキシルアミンは非酵素的に分解し DNA 付加物を形成する。

この反応機構は N-アセチル化反応にもあてはまり、N-アセチル化の際には、アセチル基を受け取るのが、芳香族ヒドロキシルアミンではなく芳香族アミンとなる。また、高等生物のアセチル転移酵素もシステイン 68 とそれに近接した塩基性アミノ酸を持つ事から、同様の反応機構でアセチル転移反応が進むものと考えられる。ヒトのポリモルフィック N-アセチル転移酵素のシステイン 68 をグリニンに変えた変異酵素は、大腸菌で発現させると酵素としては安定であるが、N-アセチル転移酵素活性は消失する事が報告されている (Dupret and Grant, 1992)。

この反応機構, 特にシステイン 69 が acetyl CoA の結合部位である事を証明するため, 現在, 精製したサルモネラのアセチル転移酵素についてその生化学的性質の検討を進めている。

#### 10. おわりに

以上, ニトロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示す新しいサルモネラ・テスター株の開発の経過と, YG1024, YG1029 株に組み込まれたサルモネラのアセチル転移酵素に関する分子生物学的研究について紹介した。

ヒトを含む哺乳類のアセチル転移酵素は, 遺伝的多型を示す事が知られている (Hein, 1988)。すなわち芳香族アミン系の薬物, 化合物に対するヒトの代謝速度は遺伝的に異なっており, アセチル化速度の早い rapid acetylator, 中間の intermediate acetylator, アセチル化速度の遅い slow acetylator の 3 グループに分かれる。そして, このアセチル転移酵素に関する遺伝的多型は, 膀胱癌や直腸結腸癌などの素因に関連しているといわれている。我々の行ったサルモネラのアセチル転移酵素に関する研究が, ヒトのアセチル転移酵素の研究 (Deguchi, 1992) の一助となることを願っている。また, クローニングしたサルモネラの薬物代謝酵素遺伝子を用いて作製した高感受性サルモネラ・テスター株が, 環境変異原からのヒト遺伝子の防護という目的にこれからも幅広く利用される事を祈念している。

#### 謝辞

本研究の共同研究者である国立衛生試験所変異遺伝部の渡辺雅彦博士, 祖父尼俊雄部長, 前部長である石館 基先生, フィンランドの労働衛生研究所の P. Einistö 博士, そしてアセチル転移酵素の反応機構についてご討論いただきました東京薬科大学の渡部 烈教授に感謝いたします。

#### 参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31, 347-364.  
Cunningham, M. L. and H. B. Matthew (1990)

- Evidence for an acetoxyarylamine as the ultimate mutagenic reactive intermediate of the carcinogenic aromatic amine 2,4-diaminotoluene, *Mutation Res.*, 242, 101-110.  
Deguchi, T. (1992) Physiology and molecular biology of arylamine *N*-acetyltransferases, *Bio-medical Res.*, 13, 231-242.  
Dupret, J. and D. M. Grant (1992) Site-directed mutagenesis of recombinant human arylamine *N*-acetyltransferase expressed in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 267, 7381-7385.  
Einistö, P. (1991) Role of bacterial nitroreductase and *O*-acetyltransferase in urine mutagenicity assay of rats exposed to 2,4,6-trinitrotoluene, *Mutation Res.*, 262, 167-169.  
Einistö, P., T. Nohmi, M. Watanabe and M. Ishidate Jr. (1990) Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG 1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking, *Mutation Res.*, 245, 87-92.  
Einistö, P., M. Watanabe, M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1991) Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or *O*-acetyltransferase activities. *Mutation Res.*, 259, 95-102.  
Espinosa-Aguirre, J. J., R. E., Reyes, and C. Cortinas de Nava (1991) Mutagenic activity of 2-chloro-4-nitroaniline and 5-chloro salicylic acid in *Salmonella typhimurium*: two possible metabolites of niclosamide. *Mutation Res.*, 264, 139-145.  
Hein, D. W. (1988) Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis, *Biochem. Biophys. Acta*, 948, 37-66.  
Houk, V. S., S. Goto, O. Endo, L. D. Claxton, J. Lewtas, and H. Matsushita (1992) Detection of direct-acting mutagens in ambient air: a comparison of two highly sensitive mutagenicity assays. *Environ. Mol. Mutagen.*, 20, 1-28.  
Joseph, P. D. (1989) New developments in the Ames assay: High-sensitivity detection of mutagenic arylamines, *BioEssays*, 11, 108-112.  
Joseph, P. D., A. L. H. Chiu and T. E. Eling (1989) Prostaglandin H synthase-dependent mutagenic activation of benzidine in a *Salmonella typhimurium* Ames tester strain possessing elevated *N*-acetyltransferase levels, *Cancer Res.*, 49, 853-856.  
Kato, R. and Y. Yamazoe (1988) *N*-Hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase in mammalian livers and *Salmonella*, in: C. M. King, L. J. Romano and D. Schuetzle (Eds.), *Carcinogenic and Mutagenic Responses to Aromatic Amines and Nitroarenes*, Elsevier, New York, Amsterdam, London, pp. 125-136.  
Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised

- methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.  
能美健彦, 渡辺雅彦, P. Einistö, 松岡厚子, 祖父尼俊雄, 石館 基, 遺伝子工学的手法を用いた新しいサルモネラ指標菌株の開発, 環境変異原研究 (1990) 12, 57-65.  
Pan, Y. H., G. R. Reddy and G. A. Reddy (1992) Prostaglandin H synthase-dependent genotoxicity of 2,4-diaminotoluene. *Environ. Mol. Mutag.* 19, 201-208.  
Rosenkranz, H. S. and R. Mermelstein (1983) Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal, *Mutation Res.*, 114, 217-267.  
Sayato, Y., K. Nakamuro, H. Ueno and R. Goto (1990) Mutagenicity of adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water, *Mutation Res.*, 242, 313-317.  
Scheepers, P. T. J., J. L. G. Theuws and R. P. Bos (1991) Mutagenicity of urine from rats after 1-nitropyrene and 2-nitrofluorene administration using new sensitive *Salmonella typhimurium* strains YG 1012 and YG 1024, *Mutation Res.*, 260, 393-399.  
Seo, K., J. Riley, D. Cortez, E. D. Wagner and M. J. Plewa (1993) Characterization of stable high molecular weight mutagenic product(s) of plant-activated *m*-phenylenediamine, *Mutation Res.*, in press.  
Smith, B. J., L. DeBruin, P. D. Joseph and T. E. Eling (1992) Mutagenic activation of benzidine requires prior bacterial acetylation and subsequent conversion by prostaglandin H synthase to 4-nitro-4'-(acetylamino)biphenyl, *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 431-439.  
Sugimura, T. (1985) Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process, *Mutation Res.*, 150, 33-41.  
Sugimura, T. (1986) Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan, *Sciences*, 233, 312-318.  
Suzuki, J., K. Kuwayama and S. Suzuki (1992) Mutagenicity assay for nitroarenes of air pollutants held in leaves of woody plants, *Mutation Res.*, 271, 89-96.  
Tada, M. and M. Tada (1975) Seryl-tRNA syn-

- thetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide, *Nature (London)*, 255, 510-512.  
Thompson, D. C., P. D. Joseph, J. W. K. Chu and T. E. Eling (1992) Enhanced mutagenicity of anisidine isomers in bacterial strains containing elevated *N*-acetyltransferase activity, *Mutation Res.*, 279, 83-89.  
Tokiwa, H., and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 17, 23-60.  
Watanabe, M., T. Nohmi and M. Ishidate Jr. (1987) New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 974-979.  
Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1989) A sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA 98 and TA 100, *Mutation Res.*, 216, 211-220.  
Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1990-a) Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene, *Nucleic Acids Res.*, 18, 1059-1059.  
Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1990-b) Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase levels, *Mutation Res.*, 234, 337-348.  
Watanabe, M., T. Sofuni and T. Nohmi (1992) Involvement of Cys 69 residue in the catalytic mechanism of *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase of *Salmonella typhimurium*: Sequence similarity at the amino acid level suggests a common catalytic mechanism of acetyltransferase for *S. typhimurium* and higher organisms, *J. Biol. Chem.*, 267, 8429-8436.  
Wild, D., B. E. Watkins and M. Vanderlaan (1991) Azido- and nitro-PhIP, relatives of the heterocyclic arylamine and food mutagen PhIP-mechanism of their mutagenicity in *Salmonella*, *Carcinogenesis*, 12, 1091-1096.

## 高感受性サルモネラ・テスター株開発のストラテジー： 薬物代謝酵素遺伝子の導入と DNA 修復 酵素遺伝子の破壊

国立衛生試験所，変異遺伝部，能美健彦<sup>1</sup>，渡辺雅彦<sup>1</sup>，山田雅巳<sup>1</sup>，祖父尼俊雄<sup>1</sup>  
大阪府立公衆衛生研究所，ウイルス課 小田美光<sup>2</sup>

### 1. はじめに

環境変異原の研究では，バクテリア，哺乳類培養細胞，昆虫，マウスなどいろいろな生物が，化学物質のヒト DNA に対する作用を推測・評価するために用いられている。この中で，エームテストや *umu* テストなど微生物を用いる変異原性試験は，大気，水，食品，代謝物，ヒトや実験動物の尿など complex mixture 中に含まれる微量の変異原を高感度に検出する際の「Sensitive biodeceptor」として汎用されている点に特色がある。我々はこうした微生物変異原性試験法の特色をより高める事を目的に，遺伝子工学的手法を用いて，高い感受性と特異性を備えた新しいサルモネラ・テスター株の開発を行ってきた。

サルモネラ・テスター株の感受性に影響を与える因子を Fig. 1 に示す。化学物質の多くは直接 DNA に作用するわけではなく，酵素的に代謝された後にその代謝物が DNA に作用して変異原性を示す。そして DNA 上の損傷はバクテリアの中にある DNA 修復酵素により修復される。修復を逃れた DNA 上の損傷は，多くの場合，DNA 複製酵素や RecA 蛋白質そして UmuDC/MucAB 蛋白質の作用により突然変異へと固定される(能美，1991)。従って，高感受性テスター株を開発するためには①テスター株の代謝活性化能を高

めたり②テスター株の DNA 修復能を欠損させることが有効であると考えられる。特に，代謝酵素や DNA 修復酵素がある特定の構造を持った変異原に対して特異的に作用する場合には，テスター株は特定のクラスの変異原に対して特異的に高感受性を示すようになることが期待される。

本稿では①薬物代謝酵素遺伝子を導入する事により作製したニトロアレーン，芳香族アミンに高感受性を示すサルモネラ・テスター株と② DNA 修復酵素遺伝子を破壊することによって作製したアルキル化剤に高感受性を示す新しいテスター株について紹介する。

### 2. 薬物代謝酵素遺伝子の導入とその効果

変異原性を有するニトロアレーン，芳香族アミンは，大気，水，食品などの complex mixture 中に広く存在していることが知られている (Rosenkranz and Mermelstein, 1983; Tokiwa and Ohnishi, 1986)。我々はニトロアレーン，芳香族アミンに高い感受性を有するテスター株を開発するため，これら化合物の代謝活性化に関与するサルモネラのニトロ還元酵素およびアセチル転移酵素遺伝子をクローニングし，それぞれの遺伝子を持つマルチコピープラスミドを，エームテストに汎用されている *S. typhimurium* TA98, TA100 株へ

1) 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

2) 〒537 大阪府大阪市東成区中道 1-3-69

The strategy of development of high sensitive *Salmonella* tester strains: Introduction of genes encoding drug-metabolizing enzymes and disruption of DNA repair genes

Takehiko Nohmi<sup>1</sup>, Masahiko Watanabe<sup>1</sup>, Masami Yamada<sup>1</sup>, Toshio Sofuni<sup>1</sup> and Yoshimitsu Oda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences

<sup>2</sup>Laboratory of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health

## Metabolic Activation and Mutagenesis

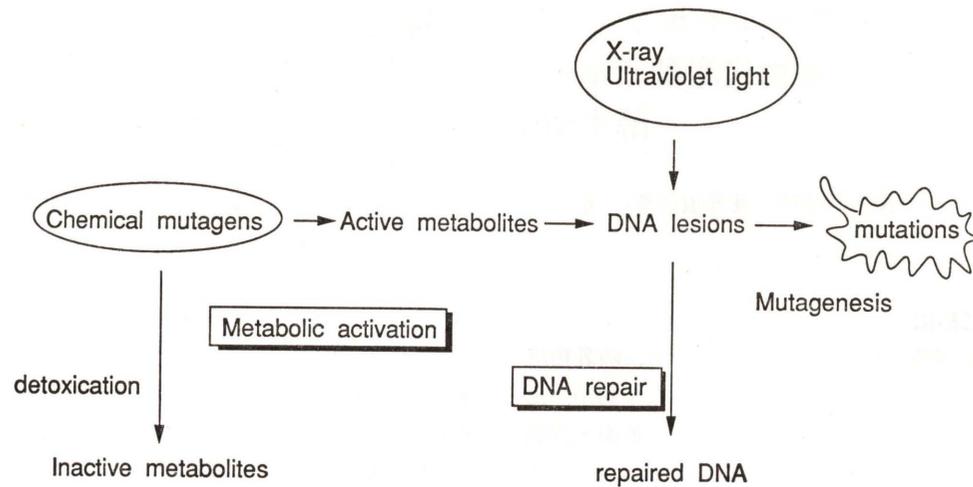


Fig. 1. サルモネラ・テスター株の感受性に影響を及ぼす各種の因子。  
テスター株の代謝活性化能と DNA 修復能は、感受性に大きな影響を及ぼしている。

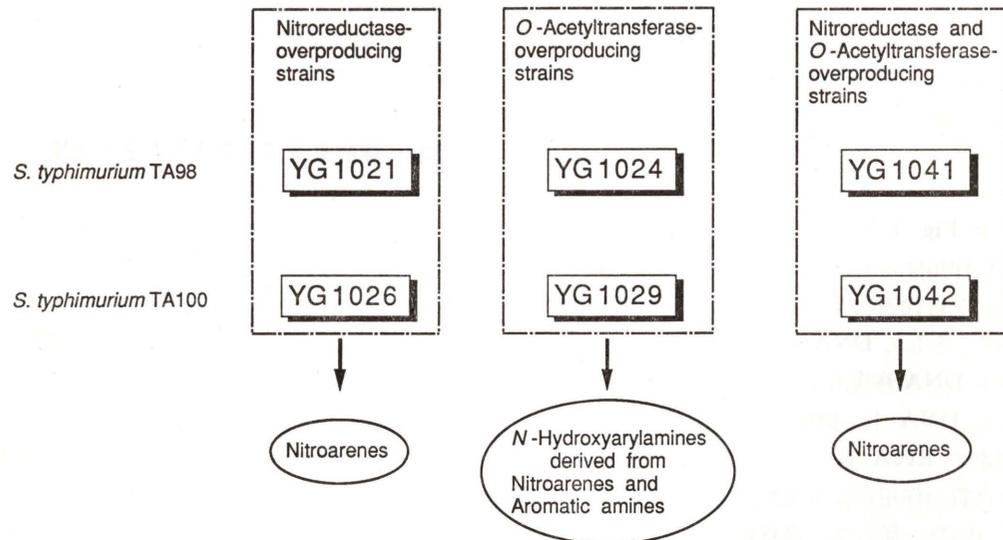


Fig. 2. ニトロ還元酵素活性、アセチル転移酵素活性が増大したエームテスト用サルモネラ株。  
*S. typhimurium* YG 1021, YG 1026 はニトロ還元酵素活性が増大した TA 98, TA 100 の誘導株であり、ニトロアレーンを含む芳香族ニトロ化合物に対し高感受性を示す。*S. typhimurium* YG 1024, YG 1029 はアセチル転移酵素活性が増大した TA 98, TA 100 の誘導株であり、ニトロアレーン、芳香族アミンから生ずる芳香族ヒドロキシルアミンに対し高い感受性を示す。*S. typhimurium* YG 1041, YG 1042 はニトロ還元酵素活性とアセチル転移酵素活性が増大した TA 98, TA 100 の誘導株であり、ニトロアレーンを含む芳香族ニトロ化合物に対し高い感受性を示す。

導入した (Watanabe, *et al.*, 1987, 1989, 1990, 能美 1993)。

YG1021, YG1024 は TA98 のニトロ還元酵素およびアセチル転移酵素増産株であり、同様に YG1026, YG1029 は TA100 のニトロ還元酵素およびアセチル転移酵素増産株である (Fig. 2)。これらの菌株のうち、YG1021, YG1026 はニトロアレーンなどの芳香族ニトロ化合物に高感受性を示し、YG1024, YG1029 は芳香族ニトロ化合物、芳香族アミンから生ずる芳香族ヒドロキシルアミンに対し高感受性を示すことから、complex mixture 中に含まれるニトロアレーン、芳香族アミン

の高感受性検出に広く用いられている (Einistö *et al.*, 1990, 1991, Einistö, 1991)。

### 1) ニトロアレーンに高感受性を示す新しいエームテスト用テスター株 YG1041, YG1042 の開発

最近、我々はニトロ還元酵素とアセチル転移酵素両方の酵素活性を高めた TA98, TA100 の新しい誘導株 YG1041, YG1042 を作製した (Fig. 2)。

YG1041, YG1042 には、カナマイシン耐性遺伝子の他にニトロ還元酵素遺伝子とアセチル転移酵素遺伝子を持つプラスミド pYG233 が導入されている。YG1041, YG1042 株は、TA98, TA100

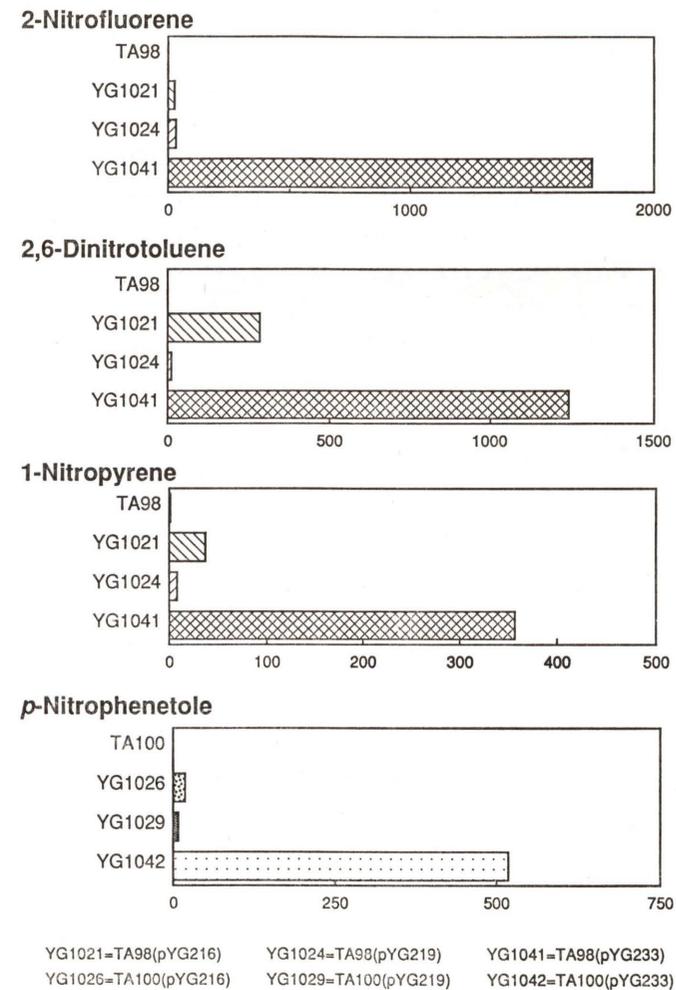


Fig. 3. *S. typhimurium* YG 1041, YG 1042 の感受性。  
テスター株の感受性は各化合物に対する nmol 当たりの誘発復帰株数を計算し、TA 98 あるいは TA 100 に対する相対的な値として棒グラフに示した。

よりも約 50 倍高い nitrofurazone ニトロ還元酵素活性を示し、アセチル転移酵素活性に関しては TA98, TA100 よりも約 300 倍高い isoniazid N-アセチル転移酵素活性を示した。

Fig. 3 は、作製した YG1041, YG1042 の 4 種の芳香族ニトロ化合物に対する感受性を、他の菌株と比較したものである。感受性は nmol 当たりの誘発復帰株数を計算し、TA98 あるいは TA100 に対する相対的な強さとして棒グラフに示してある。図に示すように、YG1041, YG1042 はニトロ還元酵素活性のみが増大した YG1021, YG1026, あるいはアセチル転移酵素活性のみが増大した YG1024, YG1029 よりも、2-nitrofluorene, 2,6-dinitrotoluene, 1-nitropyrene, p-nitrophenetole に対し他の 3 菌株よりも高い感受性を示した。

これまでに 29 種類の構造の異なる化合物について試験を行い、YG1041, YG1042 は変異原性発現のためにニトロ還元酵素とアセチル転移酵素、両方の酵素活性を必要とする芳香族ニトロ化合物に対し、特異的に高い感受性を示すものと結論した (Hagiwara *et al.*, 1993)。したがって、YG1041, YG1042 は complex mixture 中に含まれるニトロアレーンの高感度検出に有効であるものと考えられる。

## 2) umu テスト用高感受性テスター株 NM3009 の開発

umu テストは、微生物を用いる変異原テストの 1 つで、このテストでは、化学物質の DNA 損傷性を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をはかることで判定することができる (Oda *et al.*, 1985)。umu テストはエームテストに比べ①短時間に結果を得ることができ②バクテリアに対して毒性を示す物質やヒスチジンを含む抽出物でも試験ができるなどの優れた点をもっている。

我々は、サルモネラのニトロ還元酵素とアセチル転移酵素の両方の遺伝子を組み込んだプラスミドを、従来から用いられてきた *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 株へ導入することにより、ニトロアレーンに高感受性を示す新しい umu テスト用試験菌株 NM3009 を作製した。

Fig. 4 はテスター株のニトロ化合物に対する感

受性を、従来から用いられてきた TA1535/pSK1002 株の感受性を 1 とし、棒グラフに示したものである。ニトロ還元酵素とアセチル転移酵素の両方の活性が増大した NM3009 株は、他の 3 株、すなわち従来から用いられてきた TA1535/pSK1002 株、そのニトロ還元酵素増産株である NM1011 株 (Oda *et al.*, 1992)、アセチル転移酵素増産株である NM2009 株 (Yamazaki *et al.*, 1992) よりも 1-nitropyrene, 1-nitronaphthalene, 2-nitronaphthalene に対し高い感受性を示した。これまでに 17 種類の芳香族ニトロ化合物がテストされ、NM3009 株は代謝活性化のためにニトロ還元酵素とアセチル転移酵素の両方の活性を必要とする芳香族ニトロ化合物に対し、特異的に高い感受性を示すことが明らかにされている (Oda *et al.*, 1993)。

## 3) ヒトのアセチル転移酵素を発現するサルモネラ・テスター株

高感受性株作製の為に用いられてきたアセチル転移酵素はバクテリアのみに存在するわけではなく、ヒトを含む高等生物にも存在する。ヒトの肝臓に存在するアセチル転移酵素としては、遺伝的多型を示すポリモルフィック・アセチル転移酵素と、遺伝的多型を示さないモノモルフィック・アセチル転移酵素が知られており (Hein, 1988)、これらの酵素遺伝子は既にクローニングされその構造も明らかにされている (Deguchi, 1992-a, 1992-b)。

カナダの D. M. Grant と P. D. Josephy のグループは、ヒトのモノモルフィック・アセチル転移酵素あるいはポリモルフィック・アセチル転移酵素を発現する *S. typhimurium* TA1538/1,8-DNP 株を作製し、2-aminofluorene, benzidine, MeIQ に対する感受性を比較した (Grant *et al.*, 1992)。その結果、2-aminofluorene に対してはヒトのモノモルフィック・アセチル転移酵素を発現するサルモネラ株がより高い感受性を示したのに対し、benzidine, MeIQ に対してはポリモルフィック・アセチル転移酵素を発現する株がより高い感受性を示した。この結果は、ヒトの 2 種類のアセチル転移酵素は基質特異性が異なっていること

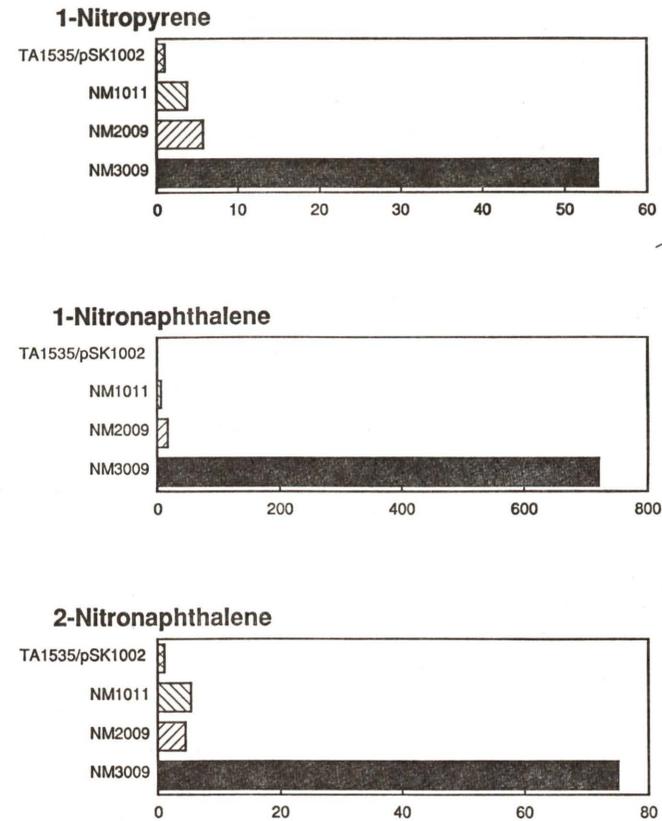


Fig. 4. ニトロ還元酵素活性とアセチル転移酵素活性が増大した *umu* テスト用テスター株 *S. typhimurium* NM3009 の感受性。

テスター株の感受性は、バックグラウンドよりも 2 倍以上高く *umuC* 遺伝子を発現させるのに必要な各化合物のドーズ (ng/ml) を求め、親株である *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 に対する相対的な値として棒グラフに示した (テスター株の感受性が増大し、より低いドーズで *umuC* 遺伝子が発現するようになるほど、棒グラフの値が大きくなっている)。

*S. typhimurium* NM1011 はニトロ還元酵素活性が増大した TA1535/pSK1002 の誘導株であり、NM2009 はアセチル転移酵素活性が増大したテスター株であり、NM3009 はニトロ還元酵素とアセチル転移酵素活性の両方が増大したテスター株である。

を示唆している。

ヒトのアセチル転移酵素を発現するテスター株の感受性は、サルモネラのアセチル転移酵素を発現する YG1012, YG1024 株の約半分程度ということであるが、ヒトの代謝酵素を発現するサルモネラ・テスター株は、高感受性という意味よりも、むしろ変異原試験の結果をヒトへ外挿する際に重要な役割を果たすものと期待されている。

## 3. DNA 修復酵素遺伝子の破壊とその効果

メチル化剤、エチル化剤などのアルキル化剤は環境変異原のクラスであり、この中には実験動物

に対し発癌性を示す物質が多数含まれている。メチル化剤による DNA 損傷のうちで、変異の誘発に重要な役割をはたしているのが  $O^6$ -メチルグアニンである。 $O^6$ -メチルグアニンは、 $O^6$ -メチルグアニン DNA メチル転移酵素によって修復され、この DNA 修復酵素はバクテリアからヒトまで広く生物界に存在している。

大腸菌は 2 種類のメチル転移酵素 Ada と Ogt を持っている。Ada は分子量 39kDa の蛋白質で、 $O^6$ -メチルグアニンの他、 $O^4$ -メチルチミン、メチルフォスフォトリエステルの修復を行い、その発現は低濃度メチル化剤処理により誘導される

(Lindahl *et al.*, 1988)。これに対し Ogt は分子量 19kDa の蛋白質で O<sup>6</sup>-メチルグアニン, O<sup>4</sup>-メチルチミンの修復は行いが, メチルフォスホトリエステルの修復は行えず, その発現は誘導されない点で Ada と異なっている。また Ogt はエチル化剤による DNA 損傷を Ada よりも効率よく修復する (Margison *et al.*, 1989)。

サルモネラにも *ada*, *ogt* に対応する遺伝子が存在するものと予想されていたが, その実体は不明であった。我々は, サルモネラの *ada* 遺伝子 (*ada*<sub>ST</sub>), *ogt* 遺伝子 (*ogt*<sub>ST</sub>) の一方あるいは両方を特異的に破壊すれば, アルキル化剤に対し高感受性を示すサルモネラ・テスター株ができるものと考え, これら遺伝子のクローニング, ならびに遺伝子破壊を行った。

### 1) *ada*<sub>ST</sub> 欠損サルモネラ株 YG7100 の感受性

サルモネラの *ada*<sub>ST</sub> 遺伝子は, 大腸菌の *ada* 遺伝子と塩基配列レベルで 70% の相同性を示し, 分子量 39kDa の蛋白質をコードしていた (Hakura *et al.*, 1991)。このサルモネラの Ada 蛋白質が, 実際に O<sup>6</sup>-メチルグアニン, メチルフォスホトリエステルの修復を行うことはイギリスの B. Sedgwick のグループによって明らかにされた (Vaughan and Sedgwick, 1991)。そこでクローニングした遺伝子をもとに, 相同的組換えを利用して, サルモネラ染色体上の *ada* 遺伝子の破壊を行った (Yamada *et al.*, 1993)。

*S. typhimurium* TA1535 の *ada*<sub>ST</sub> 遺伝子欠損株 (YG7100) は, 大腸菌の *ada* 欠損株と同様, MNNG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) の致死作用に対し高い感受性を示した。しかし, MNNG の突然変異誘発作用に対する感受性は, 大腸菌の場合には, *ada* 欠損株が親株よりも約 10 倍以上高かったのに対し, サルモネラの *ada*<sub>ST</sub> 欠損株の場合には親株である TA1535 とほぼ同様な感受性を示したにすぎなかった。この結果から, 大腸菌とは異なりサルモネラの場合には, Ada よりも Ogt が MNNG による変異の誘発からサルモネラを守っているものと考え, サルモネラの *Ogt*<sub>ST</sub> 遺伝子のクローニングを行い, 更に *ogt*<sub>ST</sub> 欠損株を作成した。

### 2) アルキル化剤に高感受性を示す *ogt*<sub>ST</sub> 欠損サルモネラ株 YG7104, YG7108

サルモネラの *ogt*<sub>ST</sub> 遺伝子は, 大腸菌の *ogt* 遺伝子とヌクレオチドレベルで 77% の相同性を示し, 分子量 19kDa の蛋白質をコードしていた (Yamada *et al.*, unpublished results)。クローニングした *ogt*<sub>ST</sub> 遺伝子を基に, 相同的組換えを用いサルモネラの染色体上の *ogt*<sub>ST</sub> 遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子と置き換えた。

まずプラスミド上の *ogt*<sub>ST</sub> 遺伝子をクロラム

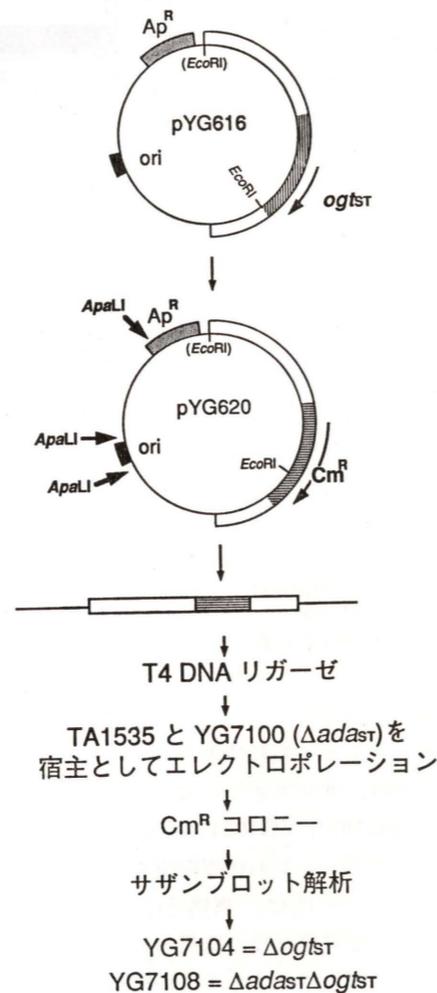


Fig. 5. プレ・ライゲーション法によるサルモネラ *ogt* 遺伝子 (*ogt*<sub>ST</sub>) の破壊。  
*S. typhimurium* TA 1535 株および YG 7100 株 (Δ*ada*<sub>ST</sub>) の *ogt* 遺伝子をクロラムフェニコール耐性 (Cm<sup>R</sup>) 遺伝子と置換した。

フェニコール耐性遺伝子と置き換え, pYG620 を作製した (Fig. 5)。次にこのプラスミドを制限酵素で切断し, 複製開始点を除いた直線状の DNA を調製した。この直鎖 DNA を T4DNA ライゲースで処理してから, 電氣的に *S. typhimurium* TA1535 およびその *ada*<sub>ST</sub> 欠損株である YG7100 株に導入した。カナマイシン耐性コロニーを分離して, サザン・ブロット法により *ogt*<sub>ST</sub> 遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子におきかわっていることを確認し, *ogt*<sub>ST</sub> 遺伝子が欠損した TA1535 株を YG7104, *ada*<sub>ST</sub> と *ogt*<sub>ST</sub> の両方が欠損した TA1535 株を YG7108 と命名した。細胞内に DNA を導入する前の段階で直鎖 DNA を T4-

DNA ライゲースで処理することから, 我々はこの方法をプレ・ライゲーション法と呼んでいる (上述した *ada*<sub>ST</sub> 遺伝子の破壊もプレ・ライゲーション法で行った)。

YG7104, YG7108 株につき, 各種アルキル化剤に対する感受性を親株である TA1535 と比較した (Fig. 6)。アルキル鎖長の異なる MNNG, ENNG (*N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine), PNNG (*N*-propyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine), BNNG (*N*-butyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) に対し, YG7104 株 (*ogt*<sub>ST</sub> 欠損株), YG7108 株 (*ada*<sub>ST</sub>, *ogt*<sub>ST</sub> 二重欠損株) は親株である TA1535 に比べ MNNG のみならずアルキル鎖長の伸び

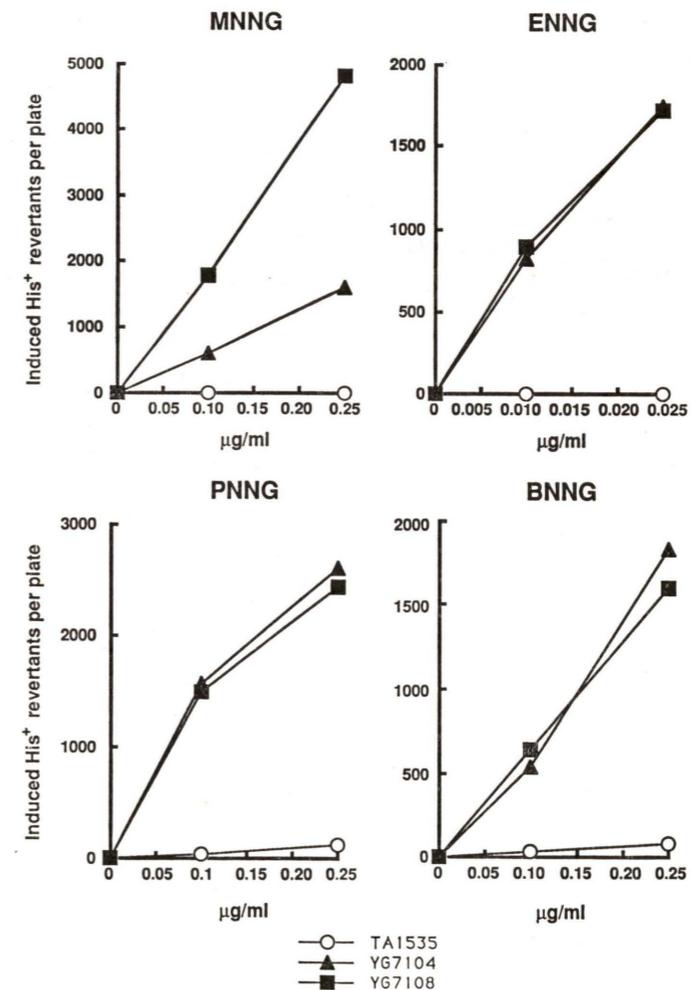


Fig. 6. *S. typhimurium* TA 1535 株とその *ogt*<sub>ST</sub> 欠損株 (YG 7104) および *ogt*<sub>ST</sub> *ada*<sub>ST</sub> 二重欠損株 (YG 7108) の各種アルキル化剤に対する感受性。

た ENNG, PNNG, BNNG に対しても高い感受性を示した。*ogt<sub>ST</sub>* 欠損株では、親株がいき値を示す低いドーズから誘発復帰株数の増加が観察された。これらの結果から、TA1535 の *ogt<sub>ST</sub>* 欠損株である YG7104 株、そして *ada<sub>ST</sub>*, *ogt<sub>ST</sub>* 二重欠損株である YG7108 株は、各種アルキル化剤の高感度検出に有効であるものと結論した。

#### 4. まとめ

以上、遺伝子工学的手法を用いて作製した高感受性サルモネラ株の性質について紹介した。これらのテスター株は、complex mixture 中に含まれる微量の変異原性ニトロアレーン、芳香族アミンまたアルキル化剤の高感度検出に有効であると考えられる。また、変異原の代謝活性化経路や DNA 修復機構を考察する上でも有用な菌株であると考えられる。

#### 参考文献

- Deguchi, T. (1992-a) Physiology and molecular Biology of arylamine *N*-acetyltransferases, *Bio-medical Res.*, 13, 231-242.
- Deguchi, T. (1992-b) Sequences and expression of alleles of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase of human liver, *J. Biol. Chem.*, 267, 18140-18147.
- Einistö, P. (1991) Role of bacterial nitroreductase and *O*-acetyltransferase in urine mutagenicity assay of rats exposed to 2,4,6-trinitrotoluene, *Mutation Res.*, 262, 167-169.
- Einistö, P., T. Nohmi, M. Watanabe and M. Ishidate Jr. (1990) Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG 1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking, *Mutation Res.*, 245, 87-92.
- Einistö, P., M. Watanabe, M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1991) Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or *O*-acetyltransferase activities. *Mutation Res.*, 259, 95-102.
- Grant, D. M., P. D. Josephy, H. L. Lord and L. D. Morrison (1992) *Salmonella typhimurium* strains expressing human arylamine *N*-acetyltransferase: Metabolism and mutagenic activation of aromatic amines. *Cancer Res.*, 52, 3961-3964.
- Hagiwara, Y., M. Watanabe, Y. Oda, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG 1041 and YG

1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activities. *Mutation Res.*, 291, 171-180.

- Hakura, A., K. Morimoto, T. Sofuni and T. Nohmi (1991) Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium ada* gene, which encodes *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, *J. Bacteriol.*, 173, 3663-3672.
- Hein, D. W. (1988) Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis, *Biochem. Biophys. Acta*, 948, 37-66.
- Margison, G. P., D. P. Cooper and P. M. Potter, The *E. coli ogt* gene, *Mutation Res.*, 233, 15-21.
- Lindahl, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 133-157.
- 能美健彦, 誤りがち DNA 修復の分子機構: 大腸菌の UmuD, UmuC, RecA, DNA 複製酵素と紫外線誘発突然変異 (1991) 蛋白質核酸酵素 36, 1911-1925.
- 能美健彦 (1993) ニトロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示すサルモネラ菌株の開発, 環境変異原研究, 15, 1-11.
- Oda, Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa (1985) Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Res.*, 147, 219-229.
- Oda, Y., T. Shimada, M. Watanabe, M. Ishidate Jr., and T. Nohmi (1992) A sensitive *umu* test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM 1011 having a high nitroreductase activity, *Mutation Res.*, 272, 91-99.
- Oda, Y., H. Yamazaki, M. Watanabe, T. Nohmi and T. Shimada (1993) Highly sensitive *umu* test system for the detection of mutagenic nitroarenes and *Salmonella typhimurium* NM 3009 having high *O*-acetyltransferase and nitroreductase activities, *Environ. Mol. Mutag.* 21, 357-364.
- Rosenkranz, H. S. and R. Mermelstein (1983) Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro containing chemicals were not created equal, *Mutation Res.*, 114, 217-267.
- Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 17, 23-60.
- Vaughan, P. and B. Sedgwick (1991) A weak adaptive response to alkylation damage in *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.*, 173, 3656-3662.
- Watanabe, M., T. Nohmi and M. Ishidate Jr.

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

- Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1989) A sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA 98 and TA 100, *Mutation Res.*, 216, 211-220.
- Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1990) Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltrans-

- ferase levels, *Mutation Res.*, 234, 337-348.
- Yamada, M., A. Hakura, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) New method for gene disruption in *Salmonella typhimurium*: construction and characterization of an *ada*-deletion derivative of *Salmonella typhimurium* TA1535, *J. Bacteriol.*, in press.
- Yamazaki, H., Y. Oda, Y. Funae, S. Imaoka, Y. Inui, F. P. Guengerich and T. Shimada (1992) Participation of rat liver cytochrome P 450 2E1 in the activation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase-overproducing *Salmonella typhimurium* strain NM 2009, *Carcinogenesis*, 13, 979-985.

## チトクローム P 450 および P 450 還元酵素 cDNA の 導入による変異原高感受性細胞株の樹立

北海道大学・薬学部 澤田 稔<sup>1</sup>, 北村龍司<sup>1</sup>, 鎌滝哲也<sup>1</sup>  
工業技術院・北海道工業開発試験所 扇谷 悟<sup>2</sup>

### 1. はじめに

環境中に存在する変異原性物質の多くは、生体内でチトクローム P450 (以下 P450 と略す) などの薬物代謝酵素によって代謝的に活性化されたのち初めてその変異原性を発揮する。しかし、変異原性試験に汎用されている細胞株では、ごく一部を除いて、P450 はほとんど検出されない。肝細胞でも培養系に移すことにより P450 の発現が急激に減少することは周知の事実である。そこで変異原性試験の際には、通常、ラットの肝臓から調製した S9 mix を培地に添加する方法がとられているが、問題点も多い。例えば、S9 mix そのものが細胞毒性を示すので添加濃度や時間が著しく制限されることや、標的細胞の外で代謝されるため、寿命の極端に短い代謝物は核内に到達できないことなどである。また、薬物代謝酵素の性質にも動物種差が知られており、結果をヒトに外挿する場合に問題となる。我々は、これらの諸問題を解決する新しいアプローチとして、遺伝子工学的手法により薬物代謝酵素を安定的に発現する細胞株を樹立し変異原性試験に応用することを試みた。現在変異原性試験に用いられている細胞にヒト P450 の cDNA を導入し安定的発現細胞株を作製することは、上記の問題点を克服する有力な手段と考えられ、世界的にもいくつかの試みがなさ

れている (Doehmer *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1989; Langenbach *et al.*, 1992)。

最初に、チャイニーズハムスターの線維芽細胞株 CHL にカニクイザル P450 1A1 の cDNA を導入し (Sawada *et al.*, 1992), さらにモルモットの NADPH-チトクローム P450 還元酵素 (以下 P450 還元酵素と略す) の cDNA を導入して P450 の活性を一層高めることに成功した (Sawada *et al.*, 1993)。P450 は薬物代謝の第 I 相酵素の中心的存在であり、基質特異性やその他の性質の異なる多数の分子種からなるスーパーファミリーを形成している (Nelson *et al.*, 1993)。近年これらの遺伝子や cDNA が次々に単離され構造や機能の解析が進められている。このうち P450 1A1 は、ベンゾピレンなどの芳香族炭化水素の活性化に関与すると考えられている分子種であり、3-メチルコランスレン (3-MC) や TCDD などによって強く誘導されることが知られている (Ioannides and Parke, 1990)。

### 2. P450 1A1 発現細胞株の樹立

P450 1A1 をコードする cDNA は、当教室において 3-MC を投与したカニクイザルの肝 cDNA ライブラリーからクローニングし、MKah1 と命名したものである (Komori *et al.*, 1992)。この

1) 〒060 札幌市北区北 12 条西 6 丁目

2) 〒062 札幌市豊平区月寒東 2 条 17 丁目

Development of Mutagen-Sensitive Cell Lines by Introducing Cytochrome P450 and P450 Reductase cDNAs

Minoru Sawada<sup>1</sup>, Ryuji Kitamura<sup>1</sup>, Satoru Ohgiya<sup>2</sup> and Tetsuya Kamataki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Drug Metabolism, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Nishi 6, Kita 12, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

<sup>2</sup>Government Industrial Development Laboratory-Hokkaido, Agency of Industrial Science and Technology, 2-17 Tsukisamu-higashi, Toyohira-ku, Sapporo 062, Japan

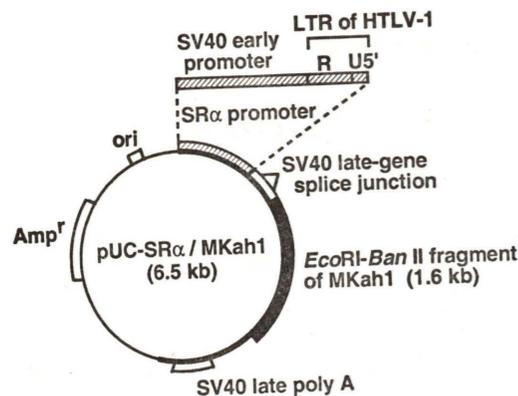


Fig. 1. P450 1A1 発現プラスミドの構造。大線部は pcDL-SRα296 (Takebe et al., 1988) 由来, 細線部は pUC 119 由来。

クローンはヒトの P450 1A1 との間に、塩基配列では 95%, 推定アミノ酸配列では 94% の相同性を有している。まず *EcoRI* と *BanII* 処理によって MKah1 から翻訳領域を含む約 1.6 kb の配列を切り出し, SRα プロモーター (Takebe et al., 1988) をもつベクター pUC-SRα の *PstI* 部位に挿入して発現プラスミド pUC-SRα/MKah1 (Fig. 1) を作製した。これをネオマイシン耐性遺伝子をもつプラスミド pMC1 NeoPolyA とともにリン酸カルシウム-DNA 共沈殿法 (Graham and van der Eb, 1973) により CHL 細胞にトランスフェクトし G418 で選択した。次いで, 得られた

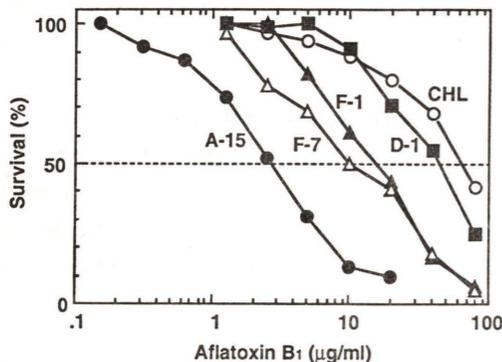


Fig. 2. CHL 細胞および P450 1A1 発現プラスミドを導入した細胞株 (D-1, F-1, F-7, A-15) の AFB<sub>1</sub> に対する感受性。AFB<sub>1</sub> で 48 時間処理した細胞を固定後, クリスタルバイオレットで染色し, 相対的染色強度を測定して生存率とした。

G418 耐性細胞株について, RNA スロットプロット分析およびノーザンプロット分析を行ない, いくつかの株で P450 1A1 mRNA が発現していることを確認した。親細胞の CHL では, mRNA レベルでの発現はまったく観察されなかった。

mRNA レベルで発現量の多い細胞株についてアフラトキシン B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) に対する感受性を調べたところ, Fig. 2 に示す結果が得られた。感受性の強さは, D-1 < F-7 = F-1 < A-15 の順であり, mRNA の発現量との間に良い相関がみられた。50% 生存率を示す濃度をもとに比較すると, A-15 株の感受性は CHL の約 25 倍に増大したことになる。A-15 株を AFB<sub>1</sub> で処理する際に P450 1A の特異的阻害剤である α-ナフトフラボン (α-NF) (Wiebel et al., 1971; Huang et al., 1981) を添加すると, Fig. 3 に示すように AFB<sub>1</sub> の毒性はほぼ完全に抑制された。図には示さないが, CHL 細胞に AFB<sub>1</sub> を作用させた場合には, α-NF の添加効果はまったく認められなかった。これらの結

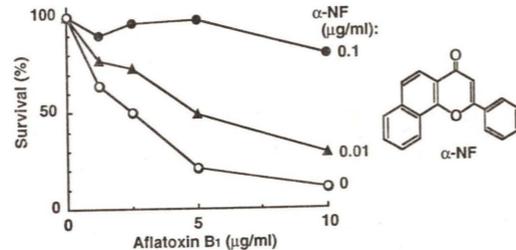


Fig. 3. A-15 細胞株における AFB<sub>1</sub> の細胞毒性に対する α-ナフトフラボン (α-NF) の阻害効果。α-NF を添加して 3 時間後に AFB<sub>1</sub> を加え 48 時間培養して相対的生存率を求めた。

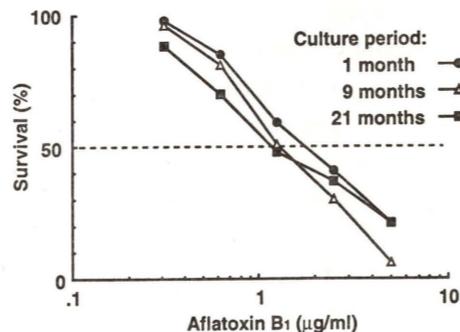


Fig. 4. A-15 細胞株の感受性の長期継代培養における安定性。

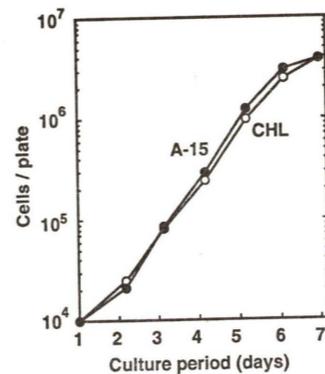


Fig. 5. CHL 細胞と A-15 株の増殖曲線。

果から, A-15 株の高感受性が導入した cDNA によってもたらされたものであること, 換言すれば, 導入した cDNA に由来する P450 タンパクが代謝酵素として細胞内で機能していることは明らかである。

AFB<sub>1</sub> に対する A-15 株の感受性は, Fig. 4 に示したように, G418 を含まない通常の培地中で 21 か月間に渡って継代を繰り返しても変化はみられなかった。従って, 挿入された遺伝子およびそこから転写は極めて安定な状態にあるものと考えられる。また, 遺伝子導入細胞ではしばしば増殖速度の低下が認められる例があるが, A-15 株の増殖速度は親細胞である CHL とほぼ同一であった (Fig. 5)。これらの性質は, 樹立した細胞株を細胞毒性試験や変異原性試験に使用するうえで重要である。

### 3. P450 1A1 発現細胞株を用いる突然変異誘発試験

CHL 細胞と A-15 株を用いて, 6-チオグアニン抵抗性を指標とする AFB<sub>1</sub> の突然変異誘発試験を行なった (Fig. 6)。AFB<sub>1</sub> 処理は 24 時間, 変異発現時間 (expression time) は途中の継代を含め 7 日間とした。CHL 細胞では, 80 µg/ml まで AFB<sub>1</sub> を加えても突然変異頻度の有意な増加が見られなかった。これに対し, A-15 株では低濃度で用量依存的な突然変異頻度の増大が認められ陽性結果が得られた。なお溶媒 (DMSO) 対照値は, CHL 細胞では  $15.3 \times 10^{-6}$ , A-15 株では  $14.3 \times 10^{-6}$  であり, 両者の間に差は認められなかった。

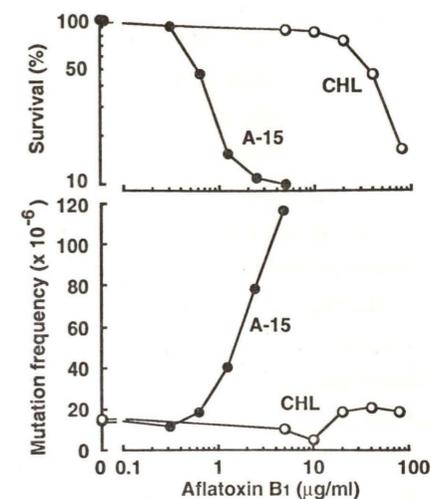


Fig. 6. AFB<sub>1</sub> の突然変異誘発試験。上段のグラフは AFB<sub>1</sub> で 24 時間処理後, 細胞をまき直して, コロニー形成率から相対的生存率を求めたもの。下段はコロニー形成可能な細胞 10<sup>6</sup> 個当たり換算した 6-チオグアニン抵抗性細胞の出現頻度。

これらの結果は, サルの P450 1A1 が AFB<sub>1</sub> を細胞毒性のみならず変異原性をもった代謝物に変換できることを示している。AFB<sub>1</sub> は数種の P450 分子種によって活性化され変異原性を現わすことが知られている (Aoyama et al., 1990; Forrester et al., 1990)。しかし P450 1A1 に関しては, ラットの精製酵素を用いて示唆されているのみで (Ishii et al., 1986), 霊長類の P450 1A1 について明瞭に示したのは本研究が初めてである。また, AFB<sub>1</sub> の代謝産物のうち, DNA との結合性や癌原性に関して, AFB<sub>1</sub>-2,3-epoxide がもっとも強い作用を有していると考えられている (Essigmann, et al., 1977; Campbell and Hayes, 1976)。実際に A-15 細胞中でこのエポキシドが生成しているかどうかについても, 培地中に浸出してくる代謝物を同定することにより今後検討を加えたい。

### 4. P450 還元酵素 cDNA の導入による代謝活性化の亢進

P450 還元酵素は, ミクロゾームにおいて NADPH から P450 への電子の伝達を仲介する重要な酵素である。一般に, P450 の発現が消失した培養細胞株であっても P450 還元酵素活性が完全に

失われることはないと考えられている (Wiebel *et al.*, 1984; Glatt *et al.*, 1990)。CHL 細胞でも P450 還元酵素の活性測定は可能であるが (Sawada *et al.*, 1991), 肝細胞などに比べてかなり低い。そこで, A-15 株の P450 1A1 の機能を十分に発揮させることを目的として, A-15 株にさらにモルモット P450 還元酵素の cDNA (MSr2) を導入した Sawada *et al.*, 1993)。MSr2 は, 3-MC を投与した Hartley 系モルモットの肝 cDNA ライブラリーからクローニングしたもので, 2034 bp の翻訳領域を含んでいる (Ohgiya *et al.*, 1992)。ヒトの P450 還元酵素との相同性はアミノ酸配列のレベルで 91.6% である。P450 還元酵素は, P450 とは異なり, 同一動物種内で複数の分子種が存在するというのではなく, 数多くの P450 分子種のいずれに対しても機能すると考えられている。また, A-15 株の例でもわかるように (チャイニーズハムスターの P450 還元酵素とサルの P450 の組み合わせ), 動物種間の壁を越えて働くことが可能である。

MSr2 の翻訳領域を含む *EcoR* I-*Bgl* I 断片 (約 2.2 kb) を *SR $\alpha$*  プロモーターの下流 (*Pst* I 部位) に挿入して発現プラスミドを作製し, ハイグロマイシン B 耐性遺伝子をもつプラスミド pUC-SV2hmB とともに A-15 株にトランスフェクトした。CHL 細胞にも同様の操作を行なった。次いで, ハイグロマイシン B で選択し, ノーザンブ

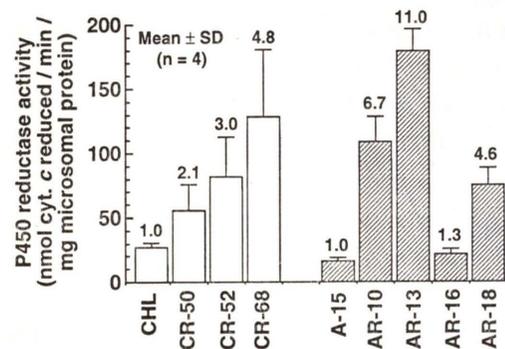


Fig. 7. MSr2 を導入した細胞株における P450 還元酵素活性の増大。

チトクローム c の還元によって活性を測定した。図中の数値はそれぞれの親細胞 (CHL あるいは A-15) の比活性を 1.0 としたときの比率を表す。

ロット分析により P450 還元酵素 mRNA の発現量が顕著に増大した細胞株を選び出し以降の実験に用いた (CHL に MSr2 を導入した株を CR-株, A-15 に MSr2 を導入した株を AR-株と命名した)。

こうして得られた細胞株のマイクロゾームにおける P450 還元酵素活性は, 親細胞に比べて顕著に増大していた (Fig. 7)。ラットの肝マイクロゾームにおける比活性は通常 150 nmol/min/mg protein 程度であり, CR-68 株や AR-13 株の値はそれに匹敵するといえる。また AFB<sub>1</sub> の細胞毒性に対する感受性の増大も明らかであり, AR-10, AR-13, AR-18 の 3 株の感受性は A-15 株の約 9 倍, CHL の約 330 倍に達していた (Fig. 8)。従って, cDNA の導入によって細胞内の P450 還元酵素の活性を高め, それによって P450 1A1 の代謝機能を亢進

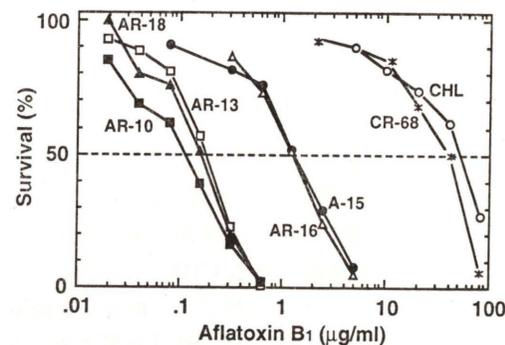


Fig. 8. AFB<sub>1</sub> に対する CHL, A-15, および MSr2 導入株 (CR-68, AR-10, AR-13, AR-16, AR-18) の感受性の比較。AFB<sub>1</sub> 処理は 48 時間。

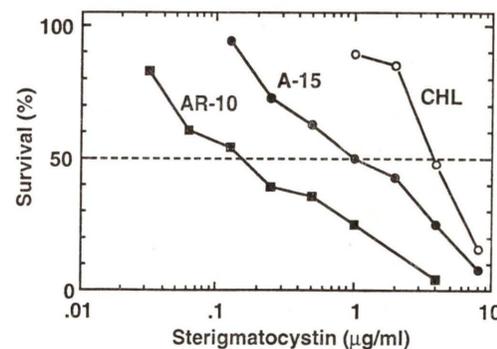


Fig. 9. ステリグマトシスチンに対する CHL, A-15, AR-10 株の感受性の比較。

させるという当初の目的は十分達成されたものと考えられる。なお, 上記 3 株の間で酵素活性に関しては 2 倍の差があるにもかかわらず, AFB<sub>1</sub> に対しほぼ同程度の感受性を示したのは, P450 1A1 の発現量が反応の律速となったためであろうと推測される。

AR-株は, AFB<sub>1</sub> と構造の類似した癌原性マイコトキシンであるステリグマトシスチン (STG) に対しても感受性の増大を示した。Fig. 9 に見られるように, 50% 生存率を示す濃度で比較した場合の CHL と A-15 株の間の感受性の差は 7 倍程度であり, あまり明瞭ではない。しかし, CHL 細胞と AR-10 株の間では約 30 倍の差となり, 感受性の増大は明らかである。STG を代謝的に活性化する P450 分子種として, これまでにヒト P450 3A4 (Brian *et al.*, 1990) とラット P450 2B1 (Black *et al.*, 1992) が知られているが, 我々の結果は, サルの P450 1A1 も STG を代謝してさらに毒性の強い物質に変換できることを示している。しかも, P450 還元酵素の cDNA 導入は STG の場合一層有益であったといえる。

### 5. 染色体異常誘発試験への応用

A-15 株および AR-株を用いて AFB<sub>1</sub> の染色体

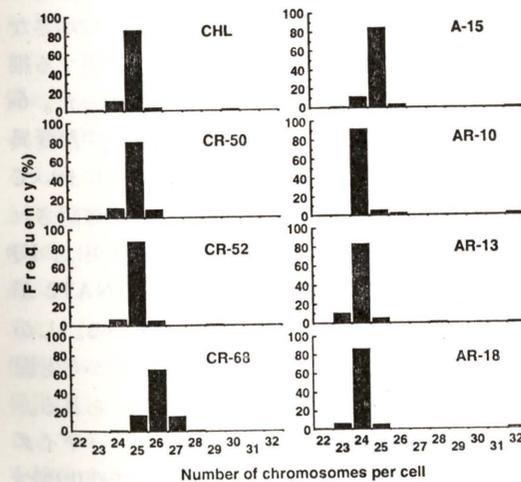


Fig. 10. CHL, A-15, およびモルモット P450 還元酵素発現細胞株における染色体数の分布。各細胞株について, 100 個の分裂中期細胞の染色体数をカウントした。

異常誘発試験を行なった。試験結果に先だって, 無処理の CR-株および AR-株における染色体数の分布を Fig. 10 に示す。CHL 細胞における染色体数モードは 25 であるが, MSr2 導入株の中にはモードが 24 あるいは 26 にシフトしているものが認められた。これらはいずれも微小な染色体に関するものであった。染色体異常試験においては, AFB<sub>1</sub> を加えて 24 時間後に標本を作製し, 染色体異常をもつ細胞の出現率を求めた。その結果, CHL 細胞では高濃度 (40 μg/ml) においてのみ異常が誘発されたが, A-15 株ならびに AR-株では著しく低い濃度で異常の出現が観察された (Fig. 11)。30% の細胞に異常を誘発する濃度によって感受性を比較すると, A-15 株は CHL 細胞の約 40 倍, AR-10, AR-13, AR-18 株はいずれも CHL 細胞の約 450 倍であった。一方, 溶媒 (DMSO) のみを加えた対照プレートでは, いずれの細胞株についても異常細胞の頻度は 5% 未満であった。これらの結果は, P450 1A1 と P450 還元酵素を同時に発現させた AR-株が染色体異常試験における高感受性株として利用できることを示している。なお, 高濃度の AFB<sub>1</sub> で処理した場合, CHL 細胞においても細胞毒性や染色体異常の出現が観察された。これは AFB<sub>1</sub> そのものの作用, あるいは P450 系以外の酵素による活性化の

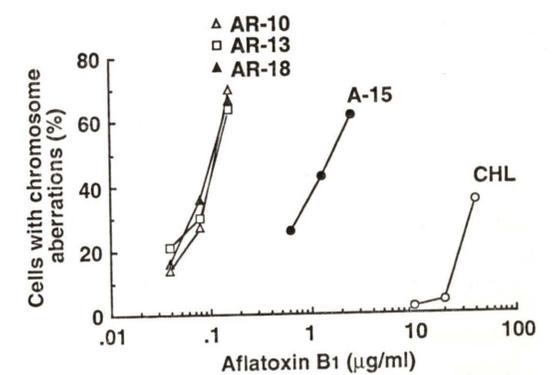


Fig. 11. AFB<sub>1</sub> の染色体異常誘発性に対する感受性の比較。

AFB<sub>1</sub> で 24 時間処理したのち標本を作製し, 100 個の分裂中期細胞について異常をスコアした。溶媒 (DMSO) 対照値は, CHL: 1%, A-15: 1%, AR-10: 3%, AR-13: 1%, AR-18: 0%。

可能性が考えられるが (Liu and Massey, 1992), 詳細は不明である。

## 6. P450 と第 II 相酵素の同時発現系の作製

これまで P450 1A1 を発現する細胞株の樹立とその細胞株を用いた変異原性試験の結果について述べてきた。変異原性物質の代謝的活性化にかかわるヒト P450 分子種の主なものとしては、このほかにも P450 1A2, 2E1, 3A4 などが挙げられている (Guengerich, 1990; Guengerich and Shimada, 1991)。これらは、精製酵素や抗 P450 抗体を用いる従来の方法、あるいは cDNA のトランジェントな発現系を利用する方法などによって解析されたものである。我々は、これらの分子種についても安定的に発現する細胞株の樹立を進めている。また、ヒト胎児の肝に特異的に発現している P450 3A7 の cDNA (Komori *et al.*, 1989) をヒト乳癌由来の細胞 MCF-7 に導入することにもすでに成功しており (Kitamura *et al.*, 1992), 胎児毒性を示す物質の解析に応用可能である。

ある種の変異原性物質が活性化されるためには、P450 によって代謝されたのち第 II 相酵素による抱合化を必要とする。例えば、加熱食品に含まれる癌原性ヘテロサイクリックアミンの多くは、主に P450 1A2 によって N-水酸化体に変換された後、O-ブロリル化、O-アセチル化、O-スルホニル化などを受けることにより究極活性化体になると考えられている (Kato and Yamazoe, 1987)。我々は、こうした活性化経路を解析するため、CR-68 株 (CHL 細胞にモルモット P450 還元酵素 cDNA を発現させた株, Fig. 7) にヒト P450 1A2 の cDNA をトランスフェクトして安定的に発現する細胞株 A2R-5 を樹立し (柳川他, 1992), さらにヒトの N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) の cDNA を A2R-5 株に導入した (柳川他, 1993)。O-アセチル化は NAT によって触媒されると考えられている。ヒトの NAT には遺伝的多型を示さない (monomorphic) NAT1 と遺伝的多型を示す (polymorphic) NAT2 の 2 種類の分子種が知られており、それぞれの cDNA がクローニングされている (Ohsako and Deguchi, 1989)。P450 1A2 の cDNA は米国 NIH の

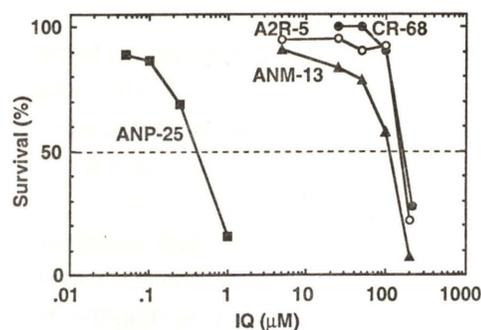


Fig. 12. P450 1A2 および NAT2 同時発現細胞株における IQ 感受性の増大。

A2R-5 は CR-68 株に P450 1A2 cDNA を導入して得られた株。ANM-13 は A2R-5 株に NAT1 cDNA を導入、ANP-25 は A2R-5 株に NAT2 cDNA を導入した株。生存率はコロニー形成率から求めた。

Gonzalez 博士より、また NAT の cDNA および発現プラスミドは東京都神経科学総合研究所の出口武夫博士より分与していただいた。我々の樹立した細胞株を用いて 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) に対する感受性を調べた結果、P450 1A2 と NAT2 をともに発現する細胞株 (ANP-25 株) のみが著しく高い感受性を示すことがわかった (Fig. 12)。A2R-5 株、および、P450 1A2 と NAT1 を同時に発現する細胞株 (ANM-13 株) では、CR-68 株と比べて感受性の増大はほとんど認められなかった。図には示さないが、NAT1 あるいは NAT2 のみを発現する細胞株でも、感受性の増大は認められなかった。6-チオグアニン抵抗性を指標とする IQ の突然変異誘発試験においても、同様に ANP-25 株においてのみ濃度依存的な突然変異頻度の上昇が確認され明瞭な陽性結果が得られた。これらの結果は、IQ の代謝的活性化において P450 1A2 と NAT2 がともに必要であることを明瞭に示している。しかも、細胞内での代謝反応を実証できた点からも樹立した細胞株の有用性は高いものと考えられる。現在、これらの細胞株を用いて他のヘテロサイクリックアミンやアリルアミンの代謝的活性化について検討を重ねている。

## 7. おわりに

本研究で用いた方法論は、2つの観点から有用であると考えられる。第一は、特定の酵素分子の細胞内での機能を解析するのに役立つという点である。例えば、ヒトの P450 はすでに知られているだけで数十種存在し (Nebert *et al.*, 1991), それぞれの基質特異性は重複しながらも少しずつ異なっている。しかし、その詳細については不明であり、また今後もさらに多数の P450 遺伝子が新たに単離されるものと考えられる。特定の P450 分子種と化学物質の関係を明らかにするために、従来は精製した酵素タンパクを用いて解析が行われてきたが、それに加えて、cDNA を導入した発現系の利用は大きな前進をもたらすものと期待できる。また、本稿で示した IQ の例のように、生体内では多段階の代謝的過程によって活性化される場合も多いと考えられる。そうした過程に関与する酵素分子を明らかにし代謝的活性化機構の詳細を解析するうえでも、cDNA 発現系は有力な道具となるものと思われる。

第二は、本稿の表題に掲げたように、変異原性物質に対して高感受性を示す試験細胞株の樹立という観点である。ここに示した結果は、P450 の cDNA を導入した安定的発現細胞株が変異原性試験における試験株として十分利用できることを示している。この方法は、最初の項で述べたような S9 mix 法の欠点として挙げた問題点を克服できるという長所をもっている。しかし、癌原性物質の代謝的活性化に関与することが指摘されている P450 分子種は、主なものだけで 5, 6 種存在するため (P450 1A1 と P450 1A2 もその中に含まれる) (Guengerich, 1990; Guengerich and Shimada, 1991), ひとつの P450 分子種の cDNA の導入によって一般的なスクリーニング系を作製することは困難である。そこで一つの戦略は、癌原性物質の活性化に関わる数種の P450 をそれぞれ発現する細胞株を用意して変異原性試験に供することである。これにより、体系的に変異原性物質を検索することができると考えられる。また別の戦略は、複数の cDNA 発現プラスミドの導入によってこれら数種の P450 を同時に発現する細胞株を樹立することである。これは原理的には可能

であり、こうした観点からの仕事も一部発表されている (Crespi *et al.*, 1991)。また、ある種の癌原性物質の活性化には、P450 のほかにエポキシドヒドロラーゼや NAT, スルフトランスフェラーゼなどの酵素が不可欠である。本稿で示したように、こうした酵素を同時に発現させることも考慮しなければならない。

遺伝子工学的手法を用いて特定の薬物代謝酵素活性を高めた試験株を作製し変異原性試験に利用することは、これまでに細菌 (*Salmonella typhimurium*) を用いる試験系で実用化されてきた (Watanabe *et al.*, 1987, 1989)。哺乳動物培養細胞についても方法的には十分に可能であり、本稿においてその一端を示した。今後も様々な試みがなされ、基礎的な面と応用的な面の双方において変異原性の解明に貢献するものと期待される。

## 参考文献

- Aoyama, T., S. Yamano, P. S. Guzelian, H. V. Gelboin and F. J. Gonzalez (1990) Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B<sub>1</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), 87, 4790-4793.
- Black, S. M., S. Ellard, J. M. Parry and C. R. Wolf (1992) Increased sterigmatocystin-induced mutation frequency in *Saccharomyces cerevisiae* expressing cytochrome P450 CYP2B1. Biochem. Pharmacol., 43, 374-376.
- Brian, W. R., M.-A. Sari, M. Iwasaki, T. Shimada, L. S. Kaminsky and F. P. Guengerich (1990) Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry, 29, 11280-11292.
- Campbell, T. C. and J. R. Hayes (1976) The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxicol. Appl. Pharmacol., 35, 199-222.
- Crespi, C. L., F. J. Gonzalez, D. T. Steimel, T. R. Turner, H. V. Gelboin, B. W. Penman and R. Langenbach (1991) A metabolically competent human cell line expressing five cDNAs encoding procarcinogen-activating enzymes: application to mutagenicity testing. Chem. Res. Toxicol., 4, 566-572.
- Davies, R. L., C. L. Crespi, K. Rudo, T. R. Turner and R. Langenbach (1989) Development of a human cell line by selection and drug-metabolizing gene transfection with increased capacity to activate promutagens. Carcinogenesis, 10, 885-891.

- Doehmer, J., S. Dogra, T. Friedberg, S. Monier, M. Adesnik, H. Glatt and F. Oesch (1988) Stable expression of rat cytochrome P-450IIB1 cDNA in Chinese hamster cells (V79) and metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub>, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **85**, 5769-5773.
- Essigmann, J. M., R. G. Croy, A. M. Nadzan, W. F. Busby, Jr., V. N. Reinhold, G. Buchi and G. N. Wogan (1977) Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B<sub>1</sub> in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **74**, 1870-1874.
- Forrester, L. M., G. E. Neal, D. J. Judah, M. J. Glancey and C. R. Wolf (1990) Evidence of involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism in human liver, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **87**, 8306-8310.
- Glatt, H., I. Gemperline, F. Setiabudi, K. L. Platt and F. Oesch (1990) Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds, Mutagenesis, **5**, 241-249.
- Graham, F. L. and A. V. van der Eb (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA, Virology, **52**, 456-467.
- Guengerich, F. P. (1990) Characterization of roles of human cytochrome P-450 enzymes in carcinogen metabolism, Asia Pacific J. Pharmacol., **5**, 327-345.
- Guengerich, F. P. and T. Shimada (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes, Chem. Res. Toxicol., **4**, 391-407.
- Huang, M.-T., E. F. Johnson, U. Muller-Eberhard, D. R. Koop, M. J. Coon and A. H. Cooney (1981) Specificity in the activation and inhibition of flavonoids of benzo[a]pyrene hydroxylation by cytochrome P-450 isozymes from rabbit liver microsomes, J. Biol. Chem., **256**, 10897-10901.
- Ioannides, C. and D. V. Parke (1990) The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals, Drug Metab. Rev., **22**, 1-85.
- Ishii, K., K. Maeda, T. Kamataki and R. Kato (1986) Mutagenic activation of aflatoxin B<sub>1</sub> by purified cytochrome P-450, Mutation Res., **174**, 85-88.
- Kato, R. and Y. Yamazoe (1987) Metabolic activation and covalent binding to nucleic acids of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrolysates, Jpn. J. Cancer Res., **78**, 297-311.
- Kitamura, R., K. Sato, M. Sawada, S. Itoh, M. Kitada, M. Komori and T. Kamataki (1992) Stable expression of cytochrome P450IIIA7 cDNA in human breast cancer cell line MCF-7 and its application to cytotoxicity testing, Arch. Biochem. Biophys., **292**, 136-140.
- Komori, M., K. Nishio, H. Ohi, M. Kitada and T. Kamataki (1989) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA containing entire coding region for human fetal liver cytochrome P-450, J. Biochem., **105**, 161-163.
- Komori, M., O. Kikuchi, M. Kitada and T. Kamataki (1992) Molecular cloning of monkey P450 1A1 cDNA and expression in yeast, Biochem. Biophys. Acta, **1131**, 23-29.
- Langenbach, R., P. B. Smith and C. Crespi (1992) Recombinant DNA approaches for the development of metabolic systems used in in vitro toxicology, Mutation Res., **277**, 251-275.
- Liu, L. and T. E. Massey (1992) Bioactivation of aflatoxin B<sub>1</sub> by lipoxygenases, prostaglandin H synthase and cytochrome P450 monooxygenase in guinea-pig tissues, Carcinogenesis, **13**, 533-539.
- Nelson, D. R., T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda and D. W. Nebert (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature, DNA and Cell Biol., **12**, 1-51.
- Ohgiya, S., T. Goda, K. Ishizaki, T. Kamataki, and N. Shinriki (1992) Molecular cloning and sequence analysis of mouse NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase, Biochem. Biophys. Acta, **1171**, 103-105.
- Ohsako, S. and T. Deguchi (1989) Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases from human liver, J. Biol. Chem., **265**, 4630-4634.
- Sawada, M., T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1991) Isolation of a menadione-resistant subclone from Chinese hamster lung (CHL) cells in culture, Mutation Res., **249**, 7-17.
- Sawada, M., R. Kitamura and T. Kamataki (1992) Stable expression of monkey P-450IA1 cDNA in Chinese hamster CHL cells and its application for detection of mutagenicity of aflatoxin B<sub>1</sub>, Mutation Res., **265**, 23-29.
- Sawada, M., R. Kitamura, S. Ohgiya and T. Kamataki (1993) Stable expression of mouse NADPH-cytochrome P450 reductase and monkey P450IA1 cDNAs in Chinese hamster cells: establishment of cell lines highly sensitive to aflatoxin B<sub>1</sub>, Arch. Biochem. Biophys., **300**, 164-168.
- Takebe, Y., M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida and N. Arai (1988) SR $\alpha$  promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat, Mol. Cell. Biol., **8**, 466-472.
- Watanabe, M., T. Nohmi and M. Ishidate Jr. (1987) New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes, Biochem. Biophys. Res. Commun., **147**, 974-979.
- Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1989) A sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100, Mutation Res., **216**, 211-220.
- Wiebel, F. J., J. C. Leutz, L. Diamond and H. V. Gelboin (1971) Aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in microsomes from rat tissues: differential inhibition and stimulation by benzoflavones and organic solvents, Arch. Biochem. Biophys., **144**, 78-86.
- Wiebel, F. J., M. Lambiotte, J. Singh, K.-H. Summer and T. Wolff (1984) Expression of carcinogen-metabolizing enzymes in continuous cultures of mammalian cells. In: H. Greim et al. (eds.), "Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis", New York, Raven Press, pp. 77-88.
- 柳川芳毅, 澤田 稔, 北村龍司, 扇谷 悟, F. J. Gonzalez, 鎌滝哲也 (1992) ヒト P-450 の毒性学的評価; ヒト P-450IA2 とマウス P-450 還元酵素を発現する細胞株の樹立とその応用, 第7回日本薬物動態学会年会講演要旨集, p. 128.
- 柳川芳毅, 澤田 稔, 扇谷 悟, 出口武夫, F. J. Gonzalez, 鎌滝哲也 (1993) ヒト CYP1A2 と N-アセチルトランスフェラーゼを同時発現する細胞での加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの代謝的活性化, 第6回日本薬理学会年会講演要旨集.

## 培養細胞を用いる非変異・癌原物質の検出系の開発

(財)食品薬品安全センター 秦野研究所 田中憲穂, 佐々木澄志, 山影康次  
細胞生物部 細胞毒性学研究室

### 1. はじめに

癌原物質の検出は、その大部分が微生物や細胞に突然変異や染色体切断を誘発する事から、変異原性の有無を指標にして検出がなされてきた。しかしながら、ヒトで発癌が予測される化学物質の中には、それ自身もしくは代謝物が突然変異を誘発しない非変異・癌原物質 (nongenotoxic carcinogen) が存在することから、これらのカテゴリーに入る癌原物質の作用機序解明と、その検出系の開発が行われている。これまで非変異・癌原物質として知られているものの中には、(1) 突然変異を起こさず、染色体の数的変化を誘発する物質 (ベンゼン, ジエチルスチルベストロール) (Barrett *et al.*, 1987; 筒井, 1991), (2) 物質によって様々な作用機作が考えられるプロモーション作用物質 (エストロジェン, フェノバルビタール, ダイオキシン) (Barrett *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1989), (3) 遺伝子増幅を生じる可能性がある物質 (ヒ素化合物) (Tlsty *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1988), (4) DNA の前駆体プールの不均衡を生じる物質 (5-フルオロウラシル, 過剰チミン, 葉酸欠乏) (Shaw, 1988) など、細胞に対して様々な作用を有する物質が数多く含まれている。これらの作用は、多段階発癌の複雑なプロセスの中で、細胞の癌化にそれぞれ重要な働きをしている事が示唆され、広義にはこれらの物質も環境変異原と考えられる。

演者らの研究室では、これらの非変異・癌原物質を効率よく検出する系を開発するため、バイオ

テクノロジーの技術を含むいくつかの方法の開発とその評価を試みてきたので、概略を紹介する。

### 2. 単一ヒト染色体を含む雑種細胞を用いる異数性 (aneuploidy) 誘発物質の検出系

癌細胞の染色体解析により、特定の染色体の付加あるいは欠失が、癌の悪性化と密接に関わっている事が知られている (Oshimura and Barrett, 1986)。しかしながら、このような染色体の異数性誘発が、発癌と直結している訳ではない。癌は種々の要因により細胞に遺伝的变化を生じ、多段階的に形成されると考えられ、異数性の誘発はその遺伝的变化の一つとして考えられる。主な標的が DNA である構造異常の場合と異なり、数的異常 (異数性および倍数性) の生成は、紡錘体形成に関連するチュープリン蛋白の重合を阻害したり促進する物質、核酸の代謝を妨害する物質、エネルギー代謝の阻害物質、細胞内ヌクレオチドプールの不均衡を生じるような物質などによって生じる可能性が示唆されている (Liang and Brinkley, 1985; Shaw, 1988; 田中, 1992)。

異数性誘発物質を検出するには、株細胞を用いてその染色体数をカウントする従来の方法は、その染色体数にばらつきがあり判定が困難であると同時に、観察に時間を要す。そこで我々は細胞工学的に作出したヒト染色体を1本含む雑種細胞を用いる事により、細胞中のヒト染色体の数を指標として異数性誘発物質の検出を試みると同時に、倍数性 (polyploidy) および分裂停止 (mitotic

〒257 神奈川県秦野市落合 729-5

Development of detecting systems for nonmutagenic carcinogens using cultured cells

Noriho Tanaka, Kiyoshi Sasaki and Kohji Yamakage

Laboratory of Cell Toxicology, Department of Cell Biology, Hatano Research Institute Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257, Japan

arrest) との関連を調べた。

細胞は、マウス A9 細胞にヒト染色体 (X 染色体の一部が 11 番染色体に転座したもの) を 1 本含む雑種細胞 A9 (GM 3552)-2 を用いた。この細胞は押村ら (Koi *et al.*, 1989) により微小核融合法によって作製されたものである。雑種細胞中のヒト染色体にはヒポキサンチングアニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 遺伝子が存在することから、HAT 培地を用いて継代培養した。3×10<sup>6</sup> 個の細胞を 60 mm ディッシュに播種し、HAT 培地で 24 時間培養後、被験物質で 24 時間処理した。処理終了後、新しい培地に交換し、更に 12~48 時間培養した。培養終了 1~2 時間前にコルセミド (0.1 μg/ml) を加え染色体標本作製した。染色はキナクリン/ヘキスト 2 重染色法により行った。この方法では、ヒト染色体の動原体は蛍光が弱く、容易にヒト染色体を判別できる。そこで、雑種細胞中のヒト染色体の数を分析し、異数性細胞の出現頻度を求めた。すなわち、ヒト染色体の数が 1 本の細胞を正常細胞、0 本又は 2 本の細胞を異数性細胞とし、全細胞あたりの異数性細胞の割合を求めた。また、染色体数が 80 本以上の細胞を倍数性細胞とし、その出現頻度も計数した。分裂停止については、処理終了後に染色体標本作製し、その分裂指数を分析することにより調べた。

その結果、紡錘体毒として知られるビンクリスチン、コルセミド、ポドフィロトキシン、ジエチルスチルベストロールや、癌原性が示唆されるロテノン、エストラジオールでは、異数性、倍数性、分裂停止とも誘発された (Table 1)。一方、テストステロンは倍数性のみを、エチルニトロソウレアは異数性のみを誘発し、代表的な構造異常誘起剤であるマイトマイシン C では、いずれも誘発が見られなかった。本実験系の利点は、欠失又は付加されたヒト染色体を、キナクリン/ヘキスト 2 重染色法により容易に判定できることから、全染色体数をカウントせずに異数性を検出できる事である。異数性と倍数性はその生成機構が異なると考えられているが、本実験の結果は、分裂停止や倍数性を生じる場合には異数性細胞も誘発される可能性が高い事を示唆している。

Table 1. Induction of numerical aberrations using hybrid cell systems

| Chemicals          | Mitotic arrest | Polyploid | Aneuploid |
|--------------------|----------------|-----------|-----------|
| Vincristine        | +              | +         | +         |
| Colcemid           | +              | +         | +         |
| Podophyllotoxin    | +              | +         | +/-       |
| Diethylstilbestrol | +              | +         | +/-       |
| Rotenone           | +              | +*        | +/-       |
| 17-β-estradiol     | +              | +         | +/-       |
| Testosterone       | -              | +*        | -         |
| Ethyl nitrosourea  | -              | -         | +/-       |
| Mitomycin C        | -              | -         | -         |

\*: Endoreduplication was mainly observed.

### 3. 癌遺伝子導入 BALB 3T3 細胞株 (Bhas 42) を用いるプロモーターの検出系

BALB 3T3 細胞は化学物質に極めて感受性が高く、形質転換実験系に用いるには最も信頼性の高い細胞株であると考えられている。形質転換実験系は、1 個の細胞を起点とする細胞癌化の過程を *in vitro* で観察できる唯一の系であり、また、2 段階発癌を再現できることから、イニシエーターのみならずプロモーターの作用をも解析できる。このように、イニシエーションだけでなく多段階の過程を包括した試験系であることが、他の実験系と大きく違う点であり、大きな長所でもある。しかし、細胞播種後、被験物質を処理し、長期間培養するだけの単純な実験系でありながら、実験に習熟しないと再現性や定量性の面などに難しい問題がある。したがって、形質転換試験は癌原性の予知試験の中でも、イニシエーターやプロモーターをスクリーニングできる優れた短期検出系であるにもかかわらず、実際に行っている研究室は少ない。

本研究では、BALB 3T3 細胞に癌遺伝子 v-Ha-ras を導入し、通常の二段階形質転換実験系と比較して、フォーカスの判定が容易で、血清のロットに左右されない安定した結果が得られる発癌プロモーターの検出系を開発した。この Bhas 42 細胞株の開発の詳細は既に報告してあり (Sasaki *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1990a; Sasaki *et al.*, 1990b; 佐々木と田中, 1991)、プロモーター検出法の標準プロトコールについては、代替試験のデータバンクに、INVITTOX Protocol (Number 62) と

Table 2. Transformation frequency of Bhas 42 cells by treatment with various chemicals

| Promoters                             | Concentration | Transformation frequency of Bhas 42 cells (%) |
|---------------------------------------|---------------|---|
| Acetone (control)                     | 0.5% v/v      | 0.5   |
| Anthralin                             | 50 ng/ml      | 11.1  |
| DDT                                   | 10 μg/ml      | 12.0  |
| 1α,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | 5 ng/ml       | 22.6  |
| EGF                                   | 200 ng/ml     | 0.6   |
| FGF                                   | 100 ng/ml     | 3.9   |
| Insulin                               | 10 μg/ml      | 1.7   |
| Mezerein                              | 100 ng/ml     | 21.0  |
| PDGF                                  | 20 ng/ml      | 4.5   |
| Sodium phenobarbital                  | 100 ng/ml     | 8.7   |
| Sodium taurocholate                   | 400 μg/ml     | 5.8   |
| TPA                                   | 1 μg/ml       | 23.9  |

して登録してあるのでそちらを参照いただきたい (Sasaki, 1992)。

Table 2 に、プロモーターとして知られている物質に関して、Bhas 42 細胞を用いた形質転換実験の結果を示した。用いた薬剤の大部分で形質転換が誘導されているが、上皮増殖因子 (EGF) のように一部誘導されない物質もみられた。親細胞株の BALB 3T3 細胞はマウス胎児細胞より樹立された細胞株であり、由来組織の受容体の問題や、癌遺伝子とプロモーターの特異的關係など、誘導されない原因としていくつかの理由が考えられる。

本実験系はプロモーター検出系としては、血清を選ばなく、フォーカス形態も明瞭で、安定した結果が得られるなど様々な利点を有する優れた系である。

### 4. メトトレキサート (MTX) 耐性化細胞の誘導による葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子増幅誘導物質の検出系

近年、癌細胞に見いだされている特定遺伝子の増幅が、癌細胞の悪性化や安定化に重要な役割をしていることが示唆されている。例えば、N-myc や c-myc に代表される腫瘍における癌遺伝子の増幅、さらに MTX 処理に代表される薬剤耐性細胞での遺伝子増幅である。いずれの遺伝子も、その条件下での細胞の生存にとって発現を必要とさ

れる遺伝子が増幅していると考えられる。

先に Schimke ら (Tlsty *et al.*, 1982; Schimke, 1984) のグループは、マウス 3T6 細胞をヒドロキシウレアや紫外線などで前処理し、MTX を含む培地で選択培養すると MTX 耐性細胞が増加し、その細胞では DHFR 遺伝子が増幅していることを報告した。このように細胞をある種の化学物質や変異原物質で処理すると MTX 耐性細胞の誘導が増強されることが示されている。

そこで本実験では、MTX に対して耐性を獲得した細胞にみられる DHFR 遺伝子増幅の実験系を用いて、処理した薬剤が DHFR 遺伝子増幅をともなう MTX 耐性細胞の誘導を増強するかについて実験を行った。

実験にはマウス 3T6 細胞を用いた。細胞を 100 mm ディッシュに 1-5×10<sup>6</sup> 個播種し、翌日被験物質と 250 nM の MTX を加え培養を続けた。2~3 週間後、ディッシュの一部は固定染色し、MTX 耐性コロニーを数えた。残りの細胞はさらに培養し、MTX 耐性クローンのうち、一部は染色体分析を実施した。各クローンから DNA を得、<sup>32</sup>P でラベルした DHFR-cDNA を用いてドット・プロット法によりハイブリダイゼーションを行った。このような実験系で試みた薬剤の中で、代表的なプロモーターである 12-O-テトラデカノイルフォルボール-13-アセテート (TPA)、ヒトで発癌性が疑われているものの動物を用いる発癌実験で陰性となっているヒ素化合物 (Lee *et al.*, 1988) DNA のメチル化阻害剤である 5-アザシチジン、DNA 合成阻害剤であるヒドロキシウレアやアフィディコリン、更に、強力な変異原であるエチルニトロソウレア (ENU) などで MTX 耐性細胞の誘導が増強された (山影と田中, 1988)。

近年の研究によれば、得られた MTX 耐性細胞では、特定塩基の置換によるアミノ酸の変異が生じている例がいくつかの細胞等で報告 (Srimat-kandada *et al.*, 1989) されてきており、DHFR 遺伝子の突然変異により、DHFR の MTX に対する親和性が低下し、耐性化の要因となっていることが示唆されている。変異原物質やヒ素化合物などを前処理することにより、効率よく MTX 耐性細胞が得られることから、これらの前処理が

DHFR 遺伝子に直接又は間接的に作用している可能性が考えられる。

## 5. おわりに

非変異癌原物質を検索する場合の大きな問題は、細胞に対する化学物質の作用機構が多様なため、一つの試験系で検索できない事である。従って多くの方法が考慮されている。ここでは、原理的に異なる3つの実験系を紹介した。雑種細胞を用いる異数性細胞の検出系と Bhas 42 細胞を用いるプロモーター検出系の2つの方法は実用可能な方法であり、研究者間の評価試験 (validation) の段階である。

一方、遺伝子増幅の誘導については、未だそのメカニズムが不明であり (Stark *et al.*, 1989), いくつかの問題点を含んでいる。ここに述べた MTX 耐性細胞を指標とする DHFR 遺伝子増幅の系以外にもいくつかの系が開発されており (Pool *et al.*, 1989; Neft *et al.*, 1992), 癌化と特定遺伝子の増幅は重要な問題であることから今後の研究の進展がまたれる。

## 参考文献

- Barrett, J. C., M. Oshimura, N. Tanaka, and T. Tsutsui (1987) Genetic and epigenetic mechanisms of presumed nongenotoxic carcinogens, In: Bandury Report, Nongenotoxic Mechanisms in Carcinogenesis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, pp. 311-324.
- Koi, M., M. Shimizu, H. Morita, H. Yamada, and M. Oshimura (1989) Constitution of mouse A9 clones containing a single human chromosome (X/Autosome) via micro-cell fusion, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 122-125.
- Lee, T., N. Tanaka, P. W. Lamb, T. M. Gillmer, and J. C. Barrett (1988) Induction of gene amplification by arsenic, *Science*, **241**, 79-81.
- Liang, J. C., and B. R. Brinkley (1985) Chemical probes and possible targets for the induction of aneuploidy, In: V. Dellarco, P. E. Voytek and A. Hollaender (eds.), *Aneuploidy*, Plenum Publishing Corp., New York, New York, pp. 491-505.
- Neft, R. E., A. L. Roe, H. M. Schol, P. P. Fu, R. A. Mittelstaedt, and D. A. Casciano (1992) Nitrobenzo[a]pyrene-induced DNA amplification in SV40-transformed Chinese hamster embryo cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, **19**, 156-

160.

- Oshimura, M., and J. C. Barrett (1986) Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer, *Environ. Mutagen.*, **8**, 129-159.
- Pool, B. L., A. O. Yalkinglu, P. Klein, and J. R. Schlehofer (1989) DNA amplification in genetic toxicology, *Mutation Res.*, **213**, 61-72.
- Sasaki, K., H. Mizusawa, and M. Ishidate (1988) Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 921-930.
- Sasaki, K., H. Mizusawa, M. Ishidate, and N. Tanaka (1990a) Establishment of a highly reproducible transformation assay of a ras-transfected BALB 3T3 clone, In: Y. Kuroda, D. M. Shankel and M. D. Waters (eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II (Basic Life Sciences Vol. 52)*, Plenum Publishing Corp., New York, New York, pp. 411-416.
- Sasaki, K., H. Mizusawa, M. Ishidate, and N. Tanaka (1990b) Transformation of ras transfected BALB 3T3 clone (Bhas 42) by promoters: application for screening and specificity of promoters, *Toxic. in Vitro*, **4**, 657-659.
- Sasaki, K. (1992) Screening system of promoters using ras transfected BALB 3T3 clone (Bhas 42), *INVITTOX Protocol*, No. 62, 1-11.
- 佐々木澄志, 田中憲穂 (1991) 発癌プロモーター一癌遺伝子導入細胞株を用いる検索試験一, 日本組織培養学会編, 細胞トキシコロジー試験法, 朝倉書店, 東京, pp. 263-268.
- Schimke, R. T. (1984) Gene amplification, drug resistance, and cancer, *Cancer Res.*, **44**, 1735-1742.
- Shaw, T. (1988) The role of blood platelets in nucleoside metabolism: regulation of megakaryocyte development and platelet production, *Mutation Res.*, **200**, 67-97.
- Srimatkandada, S., B. I. Schweitzer, B. A. Moroson, S. Dube, and J. R. Bertino (1989) Amplification of a polymorphic dihydrofolate reductase gene expressing an enzyme with decreased binding to methotrexate in a human colon carcinoma cell line, HCT-8R4, resistant to this drug, *J. Biol. Chem.*, **264**, 3524-3528.
- Stark, G. R., M. Debatisse, E. Giulotto, and G. M. Wahl (1989) Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification, *Cell*, **57**, 901-908.
- Tanaka, N., P. Nettesheim, T. Gray, K. Nelson, and J. C. Barrett (1989) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhancement of N-methyl-N'

nitro-N-nitrosoguanidine-induced transformation of rat tracheal epithelial cells in culture, *Cancer Res.*, **49**, 2703-2708.

- 田中憲穂 (1992) 染色体の数的異常, 変異原性試験, **1**, 242-246.
- Tlsty, T. P., C. Brown, R. Johnston, and T. Schimke (1982) Enhanced frequency of generation of methotrexate resistance and gene amplification in cultured mouse and hamster cell

lines, In: R. T. Schimke (ed.), *Gene Amplification*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, pp. 231-238.

- 筒井健機 (1991) 培養細胞による非遺伝毒性癌原物質の発癌試験, 組織培養, **17**, 419-424.
- 山影康次, 田中憲穂 (1988) 薬物によるメトトレキサート (MTX) 耐性コロニーの誘導, 秦野研究所年報, **11**, 91-94.

## トランスジェニックマウスを用いた変異原の高感度解析法の開発

東海大学医学部分子生命科学 権 藤 洋<sup>1\*</sup>  
(財)実験動物中央研究所発生工学研究室 中 尾 和 貴<sup>2\*</sup>  
東海大学医学部共同利用研究室機能形態部門 高 橋 美 千 江<sup>3</sup>  
北里大学衛生学部分子生物学教室 池 田 由 美 子<sup>4</sup>, 茂 手 木 淑 子<sup>4</sup>  
東海大学理学部化学科 竹 下 綾<sup>5</sup>  
九州大学生体防御医学研究所細胞学部門 勝 木 元 也<sup>6</sup>

### 要 旨

プラスミド pHSG664 は、大腸菌系で突然変異を容易に検出できる良いシャトルベクターである。変異原に対する哺乳動物の体細胞突然変異の頻度やその機構を調べることができないかと考え、このベクターをもつトランスジェニックマウスを作成している。この系を用いれば、通常は極めて稀にしか生じない哺乳類個体内での突然変異を迅速大量に解析できる。導入遺伝子 pHSG664 は pUC 由来のベクターに大腸菌の野生型 *rpsL*

遺伝子を、突然変異のモニター遺伝子として持っている。pHSG664 を導入したトランスジェニックマウスは、全細胞に野生型 *rpsL* 遺伝子を持つこととなり、そのようなマウス細胞の各ゲノムに生ずる突然変異は、このモニター遺伝子である野生型 *rpsL* 遺伝子にも同等に蓄積されると期待される。その導入遺伝子部分をマウスゲノムから回収後、大腸菌系に戻し、*rpsL* の発現をみる。野生型の *rpsL* はストレプトマイシン耐性の宿主大腸菌を感受性に形質転換する。もし、*rpsL* に突然変

- 1) 〒259-11 伊勢原市望星台
- 2) 〒213 川崎市宮前区野川 1430
- 3) 〒259-11 伊勢原市望星台
- 4) 〒228 相模原市北里 1-15-1
- 5) 〒259-12 平塚市北金目 1117
- 6) 〒812 福岡市東区馬出 3-1-1

\* 現住所: 九州大学生体防御医学研究所附属発生工学実験施設, 〒812 福岡市東区馬出 3-1-1

Development of hypersensitive *in vivo* test of Carcinogenicity by using Transgenic Mice  
Yoichi Gondo<sup>\*1</sup>, Kazuki Nakao<sup>\*2</sup>, Michie Takahashi<sup>3</sup>, Yumiko Ikeda, Yoshiko Motegi<sup>4</sup>,  
Aya Takeshita<sup>5</sup>, Motoya Katsuki<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Division of Molecular Life Science, Tokai University, School of Medicine, Bohseidai, Isehara 259-11, Japan

<sup>2</sup>Laboratory of Developmental Biotechnology, Central Institute for Experimental Animals, 1430 Nogawa, Miyamae-ku, Kawasaki 213, Japan

<sup>3</sup>Laboratories for Structure and Function Research, Tokai University, School of Medicine, Bohseidai, Isehara 259-11, Japan

<sup>4</sup>Laboratory of Molecular Biology, School of Hygienic Sciences, Kitazato University, 1-15-1 Kitazato, Sagami-hara 228, Japan

<sup>5</sup>Department of Chemistry, Tokai University, 1117 Kitakaname, Hiratsuka 259-12, Japan

<sup>6</sup>Department of Molecular and Cellular Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University 69, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

\* Present address: Laboratory of Embryonic and Genetic Engineering, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University 69, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan

異が生じていると宿主の大腸菌は耐性のままとなる。すなわち、マウスゲノム内でモニター遺伝子に中立に蓄積した突然変異を、ストレプトマイシン耐性の大腸菌コロニーとして検出するわけである。この pHSG664 を導入したトランスジェニックマウスの系が確立されれば、すべての体細胞が検定の対象となり、少ない個体数で、迅速かつ鋭敏に突然変異を検出できる。また、発がん物質などの突然変異誘発因子の個体に及ぼす影響を高精度かつ簡便に解析することが可能になる。さらに、組織別、発生段階別、および、他の遺伝子の影響下での突然変異誘発性の違いなども検定できるなど、応用面も多い。

## 1. 序

様々な環境変異原が我々の遺伝子に影響を及ぼして突然変異を誘発する。また、がんは遺伝子の異常によって起る細胞の異常増殖であることが確実となって以来、発がんにおける突然変異の重要性も認識されている。がんをはじめとする遺伝子疾患の発症機構を研究し予防医学を確立するためには、自然発生のもも含めて、突然変異が、いつ、どこに、どのように生じるかを解明することが研究の基礎となる。しかし、われわれのもつゲノム遺伝子の莫大さと突然変異率の低さから、哺乳動物細胞に生じる体細胞レベルでの突然変異を鋭敏かつ迅速に体系だって検出解析する方法は、未だ確立されていない。一方、単細胞系では Ames Test (Ames ら 1973) を用いて、バクテリア細胞での突然変異誘発率を簡便に検定する方法がある。そこで、真核細胞、とくに、哺乳動物細胞における突然変異をみるために、原核細胞、真核細胞の両方で複製できるシャトルベクターを哺乳動物細胞内にて増殖し、突然変異誘発の後、バクテリア細胞にて検出するという方法が近年開発された。たとえばシャトルベクターの例として、*lacI* (Calos ら 1983; Miller ら 1984; Lebkowski ら 1984, 1985), *galK* (Razzaque ら 1983, 1984), *supF* (Hauser ら 1986, 1987) をふくむプラスミド DNA を哺乳動物由来の培養細胞内で核内プラスミドとして複製させ検定する方法や、レトロウイルスベクターを用いて *gpt* 遺伝子を実際に染色体

に導入させて解析する方法 (Ashman ら 1986) が報告された。しかしながら、近年、腫瘍化に伴う突然変異の解析がすすみ、その頻度および塩基置換の種類が、組織や、他の遺伝子との相互作用によって異なることが示されている。このような知見は、単細胞系を用いて解析する系では全く得られなかったものである。このことから、哺乳動物個体内の各組織で生ずる突然変異を鋭敏かつ迅速に分子レベルで解析する方法の開発が急務となっている。哺乳動物個体内で生じた真の意味での「生体内」での突然変異を解析するには、大腸菌などで簡単に突然変異の有無を検出できるシャトルベクターを導入したトランスジェニックマウスを用いる方法が最適である。マウス受精卵に注入された導入遺伝子は、染色体に組み込まれると、マウスゲノムの一部分として複製され、発生にとともにその個体の全ての細胞に行きわたる。このとき、マウスゲノム DNA が各発生段階や各組織において曝されるのと全く同じ環境下に、その導入遺伝子も曝されることになる。すなわち、特定の組織、発生段階において、このトランスジェニックマウスに変異原を投与した後、各組織から効率よくシャトルプラスミド部分を回収し、宿主大腸菌にて突然変異を検出できれば、これが、生体内で生じた突然変異そのものの同定ということになる。導入遺伝子は生殖細胞にも行きわたり、通常、メンデルの法則に従って安定に子孫へと伝達されるので、トランスジェニックマウスが確立されれば、その系統の維持や繁殖は一般のマウスと同様に行なえる。突然変異の検出にあたっては、確立されたメスのトランスジェニックマウスを交配させたのち、変異原を投与し、母体から胎児への影響を見ることも可能であるし、さらには、他の遺伝的変異をもつ個体や、全く異なる近交系マウスと交配することによって、ほかの遺伝子や突然変異、ポリジーンとの相互作用に基づく突然変異の違いも解析できる。本研究では、大腸菌内で突然変異検出の容易な *rpsL* 遺伝子をもつ pHSG664 (Hashimoto-Gotoh ら 1986) をシャトルプラスミドとして導入したマウスの確立を第一の目的とした。最近、同様の目的で *lacZ* (Gossen ら, 1989) や *lacI* (Kohler ら, 1991) を導入したトランス

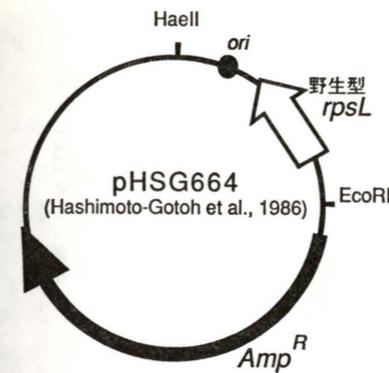


Fig. 1 シャトルベクター pHSG664 の構造。Hashimoto-Gotoh ら (1986) によって開発された全長 2706 bp の大腸菌の環状プラスミドであり、*EcoRI*, *HaeII* によって、線状化できる。アンピシリン耐性遺伝子 *Amp<sup>R</sup>*, ストレプトマイシン感受性遺伝子 *rpsL*, 大腸菌内で働く複製開始点 *ori* をもち、真核細胞で発現される遺伝子は存在しない。全長 375bp の *rpsL* が突然変異のモニター遺伝子である。

ジェニックマウスが開発されており、われわれの系との比較についても論じる。

## 2. 導入遺伝子 pHSG664 の特徴

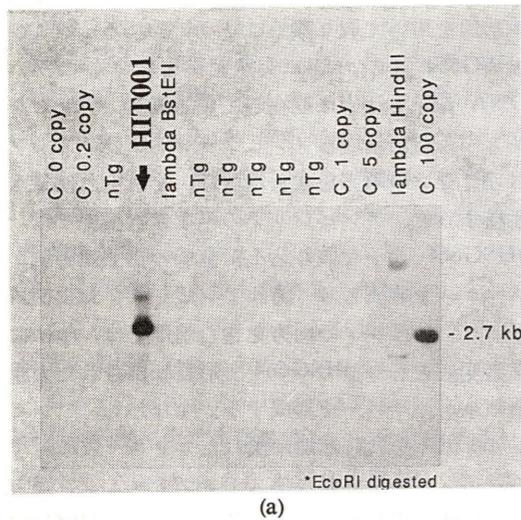
導入遺伝子 pHSG664 は、Hashimoto-Gotoh ら (1986) によって開発された pUC 由来のベクターに大腸菌の野生型 *rpsL* 遺伝子を、突然変異のモニター遺伝子として持っている全長 2706 bp の大腸菌プラスミドである。図 1 に示すように、大腸菌の複製開始点 *ori* とアンピシリン耐性遺伝子 *Amp<sup>R</sup>* とストレプトマイシン感受性遺伝子である野生型の *rpsL* をもち、真核細胞で発現される遺伝子は全く存在しない。HB 101 株のように、リボソームの小サブユニットタンパク質をコードする遺伝子の突然変異の 1 つである *rpsL* (= *strA*) をもつ大腸菌はストレプトマイシン耐性であるが、これを宿主大腸菌として、pHSG664 を導入すると、大腸菌はまず *Amp<sup>R</sup>* のためアンピシリン耐性となるとともにストレプトマイシン感受性に形質転換される。これは、野生型 *rpsL* のもつストレプトマイシン感受性形質が、突然変異型のストレプトマイシン耐性形質に対して優性であるため、大腸菌そのものはストレプトマイシン耐性遺伝子 *rpsL* をもっていても、pHSG664 の野生型

*rpsL* が導入されたために感受性となるのである。すなわち、この大腸菌コロニーは、アンピシリン耐性、ストレプトマイシン感受性として検出できる。ところが、もし、pHSG664 の野生型 *rpsL* に予め突然変異が生じていると、優性形質であるストレプトマイシン感受性は、もはや pHSG664 からはもたらされず、このような pHSG664 で HB101 株を形質転換してもストレプトマイシン耐性のままとなる。この場合の大腸菌コロニーはアンピシリン耐性、ストレプトマイシン耐性として認められることとなる。ところで、この形質転換実験において、プラスミドを導入されていない大腸菌 HB101 は、アンピシリン感受性、ストレプトマイシン耐性となるので、アンピシリンを含む培地を用いて取り除くことができる。さて、pHSG664 の *rpsL* に突然変異をもつものが、DNA 分子集団中に混在している場合、アンピシリンのみを含む培地とアンピシリンおよびストレプトマイシンの両方を含む培地に、それぞれ同量を播種すると、アンピシリンのみを含む培地では、pHSG664 分子を取り込んだ全ての宿主大腸菌がコロニーを形成し、一方、アンピシリンおよびストレプトマイシンの両方を含む培地では、*rpsL* に突然変異をもつ pHSG664 で形質転換された大腸菌のみがコロニーを形成する。すなわち、アンピシリンのみを含む培地に現れたコロニー数に対する、アンピシリンおよびストレプトマイシン両方を含む培地に現れたコロニー数が、その pHSG664 分子集団内で *rpsL* に突然変異をもつものの比となる。また、アンピシリンおよびストレプトマイシンの両方を含む培地に現れたコロニーは、*rpsL* に突然変異をもつ 1 分子の pHSG664 由来のクローンであり、このプラスミド DNA を抽出調製し *rpsL* 部分の塩基配列を決定すれば、既知の *rpsL* 配列と比較して、どこに、どのような突然変異が生じたかも分子レベルで解析できる。*rpsL* のコーディング配列は 375bp と短いので全塩基配列決定も容易である。実際にこの原理を用いて、大腸菌における突然変異のスペクトラムも解析されており、ストレプトマイシン耐性となる *rpsL* の塩基配列置換もかなりわかっている (東大・応微研 真木寿治博士の私信)。以上のように、pHSG

664 は大腸菌系において突然変異を鋭敏迅速に検出できるプラスミド DNA であり, 突然変異を量的, 質的解析の両面において効率よく簡便に解析できる。

### 3. pHSG664 を導入したトランスジェニックマウスの作成

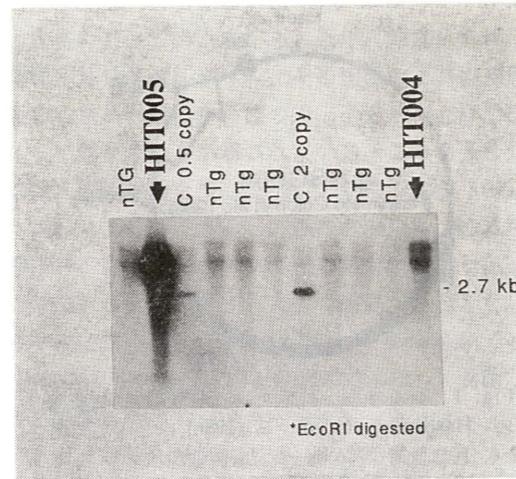
導入遺伝子として用いる pHSG664 を大量に調製し, ユニーク切断部位である *Hae*II (Fig. 1) にて線状化し, マウスゲノムへの導入効率を高めた。遺伝子導入は C57BL/6J 近交系マウスの受精卵に行ない, トランスジェニックマウスの作成および維持は, 実験動物中央研究所にて行なった。



(a)



(b)



(c)

Fig. 2 シャトルベクター pHSG664 を導入したマウス個体のサザンハイブリダイゼーション法による解析。抽出したマウスゲノム DNA 2  $\mu$ g を *Eco*RI にて分解したのちサザンプロットを行ない, pHSG664 をプローブとしてハイブリダイゼーションした。C で示すレーンには, コピー数にて示した分の線状 pHSG664 (2.7 kb) を, *Eco*RI 処理の C57BL/6J DNA 2  $\mu$ g とともにのせている, 例えば, 「C 5 copy」のレーンには, 5 コピー導入されたゲノムの 2  $\mu$ g に存在するはずの pHSG664 と, 同量の線状 pHSG664 が含まれている。「C 0 copy」レーンには pHSG664 は全く含まれず, ネガティブコントロールである。太字と↓で示すレーンがトランスジェニックマウスであり, nTg で示すレーンがトランスジェニックマウスでないことが判定されたものである。lambda *Bst*EII および lambda *Hind*III はサイズマーカーである。

通常, 導入遺伝子はタンデム (重連) に重複してゲノムにはいることが多く, 得られたマウス DNA 2  $\mu$ g を *Eco*RI にて切断後, サザン法によって解析した。Fig. 1 に示すように, *Eco*RI 認識部位も pHSG664 に 1ヶ所のみ存在し, もし, pHSG664 がタンデムに導入されていれば, *Eco*RI で線状化した pHSG664 と同一の DNA 断片が, ゲノムより制限酵素断片として現れるはずである。また, 1 ゲノムより切り出される pHSG664 断片数は, タンデムに 2 回重複していると 1 分子, さらに重複数が 1 つ増す毎に 1 分子ずつ増加することになり, サザン解析に適切な濃度標準を設定すれば, 導入遺伝子のタンデム重複の回数 (導入

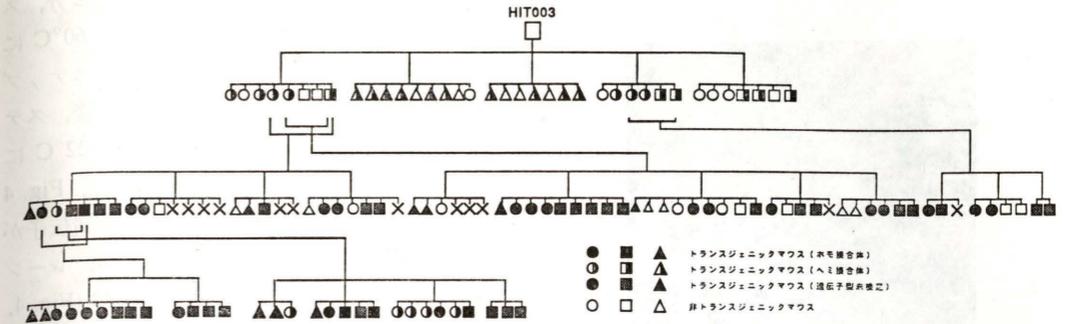


Fig. 3 トランスジェニックマウス HIT003 の家系図。○はメス, □はオスを示す。△および×は性別検定以前に死亡した個体で, ×はトランスジェニックマウスかどうかの検定以前に死亡したものである。

コピー数) も推定できる。Fig. 2 に示すように, サザンプロット解析の結果, pHSG664 がゲノム中に存在することが確認された個体は 5 系統認められ HIT001, HIT002, HIT003, HIT004, HIT005 と呼ぶ。導入遺伝子のコピー数は, それぞれ, 100, 5, 2, 2, 100 と推定された。ただし, HIT002, HIT003 の制限酵素処理は部分分解となっており, 実際の導入コピー数はこれより若干多いと思われる。また, HIT004, HIT005 においては, *Eco*RI 処理にて, pHSG664 の線状化分子に相当するシグナルが認められなかったため, pHSG664 のゲノムへの導入の際, 何らかの DNA 再配列が生じたものと推測される。このようにして得られた pHSG664 導入の初代マウス 5 系統を C57BL/6J に戻し交雑を行ない, 継代を試みたところ, 最終的に HIT003 のみ継代に成功した。Fig. 3 に示すように, 現在, F3 世代まで得られており, F2 世代以降に期待通りホモ接合体の存在も確認された。HIT003 系統では, 導入遺伝子 pHSG664 は安定にメンデル遺伝しており, 導入遺伝子の個体への影響は, 初代マウス, ヘミ接合体, ホモ接合体いずれにも認められない。このことは, pHSG664 は真核細胞内で活性を示す塩基配列を持っていないので, やはり発現されていないということを示唆している。また, 遺伝子導入に際して, 少なくともマウスゲノムの 1ヶ所を切断し挿入されているはずであるが, その切断および挿入による生体機能への影響もないものと推測できる。すなわち, 導入遺伝子は, マウス個体には, 全く中立に働いていると思われる。このことは, 突然変

異を解析する系として最適である。なぜなら, 突然変異がこの導入遺伝子の *rpsL* 部分に生じてもやはりマウス個体内では中立で, 何等選択を受けることなく保たれると思われる, ゲノム中にランダムに生じてくる突然変異をそのまま蓄積するモニター遺伝子として優れているからである。

### 4. トランスジェニックマウスゲノムより導入遺伝子 pHSG664 の回収

突然変異モニター遺伝子であるトランスジェニックマウスゲノム中の *rpsL* に生じた突然変異を鋭敏かつ迅速に解析するため最大の課題は, いかにか効率よく導入遺伝子をゲノムより回収し, *rpsL* の発現を宿主大腸菌においてどれだけ数多く検定できるかという点にある。そのためには, まず, 導入遺伝子を最大限に回収しなければならない。その方法として, PCR を用いて導入遺伝子部分を特異的に増幅する方法と, *Eco*RI にて切断後, 導入遺伝子部分を直接抽出する方法の二つを検討した。PCR を用いると, わずかな量のゲノム DNA から短時間で導入遺伝子のみを増幅できる。もし, pHSG664 全長の 2.7 kb を増幅できれば, それ以上の精製やクローニングは必要ない利点があり解析が早い。そのうえ, サイクル数などを調節して導入遺伝子を大量に増幅すれば, 大腸菌の形質転換も大規模に行なうことが可能で, 多数の形質転換コロニーに基く量的解析が可能である。しかし, PCR の過程における塩基置換がかなりの頻度で生じるという報告がある (Tindall と Kunkel 1988; Lundberg ら 1991)。もし, 得られ

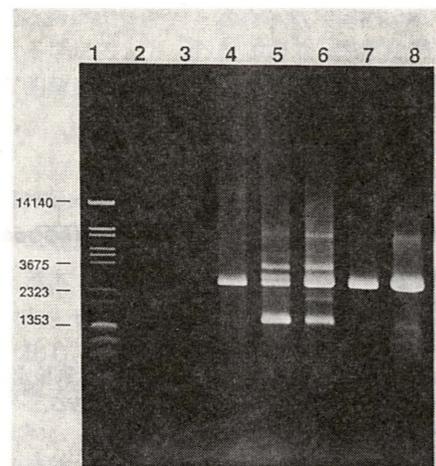


Fig. 4 トランスジェニックマウスのゲノム内の導入遺伝子 pHSG664 の PCR による増幅. トランスジェニックマウスのゲノム DNA 1  $\mu$ g をテンプレートとして, Taq DNA ポリメラーゼ (Stratagene 社) と DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer-Cetus 社) にて 100  $\mu$ l の反応容量で行なった (Saiki ら, 1985). レーン 1:  $\lambda$ BstEII と  $\phi$ X174HaeIII (サイズマーカー), レーン 2: HIT005 DNA の PCR 産物 5  $\mu$ l, レーン 3: HIT004 DNA の PCR 産物 5  $\mu$ l, レーン 4: HIT003 DNA の PCR 産物 5  $\mu$ l, レーン 5: HIT002 DNA の PCR 産物 5  $\mu$ l, レーン 6: HIT001 DNA の PCR 産物 5  $\mu$ l, レーン 7: pHSG664 プラスミド DNA 0.5  $\mu$ g の PCR 産物 5  $\mu$ l, レーン 8: pHSG664 プラスミド DNA 300  $\mu$ g の PCR 産物 5  $\mu$ l. レーン 7, 8 は, ポジティブコントロールである.

る突然変異のなかで, ゲノム中でおきたものではなく, その後の PCR 誤差によるものがかかりをしめるようになると, 高精度の解析はできなくなる。その点, 直接, 切り出して回収する方法では, ゲノムそのものの導入遺伝子を検定するために, 解析過程における誤差は最小にできる。ただし, 導入遺伝子を回収するのに手間がかかり, また, 回収量も限られるので, 形質転換にて十分な数の大腸菌コロニーを得られるかどうかは鍵となる。

[PCR による回収] 既に得られている HIT001, HIT002, HIT003, HIT004, HIT005 の初代マウスゲノム DNA の PCR 増幅を試みた。用いたプライマー対は, pHSG664 の EcoRI 認識部位から全長を増幅するように設計した。塩基配列は, それぞれ, 5'-TTCCCGGTTTGAC TGGTCAA-3' と 5'-TTCGTCAGGTGGCACTTTTC-3' であり,

PCR の条件は, ステップ 1: 92°C にて 2 分, ステップ 2: 92°C にて 1 分, ステップ 3: 60°C にて 0.5 分, ステップ 4: 72°C にて 3 分, ステップ 2 からステップ 4 を 35 サイクル回した後, ステップ 5: 72°C にて 12 分, ステップ 6: 22°C にて 2 分という条件にて行なった。結果は, Fig. 4 に示すとおり, タンデムに重複して導入遺伝子が入ったものとみられる HIT001 (Fig. 4, レーン 6), HIT002 (Fig. 4, レーン 5), HIT003 (Fig. 4, レーン 4) からは PCR 増幅が効率良く観察され, また, 増幅された量も導入コピー数と正の相関が見られる。すなわち, 導入コピー数の最も高かった HIT001 の増幅量が一番多く, 2 コピー程導入されたときとみられる HIT003 が最も少ない。しかし, pHSG664 特異的な PCR 増幅は, HIT003 をテンプレートにした場合が最も高く, 期待される 2.7 kb のみに PCR の増幅産物が観察された。HIT003 のゲノム DNA 1  $\mu$ g をこの方法で PCR した場合, 100  $\mu$ l の反応にて, およそ 1  $\mu$ g の pHSG664 導入遺伝子の増幅が得られた。一方, DNA 再配列が生じたと思われる HIT004, HIT005 からは PCR 増幅が全くみられなかった。いずれにしても, 継代に成功した HIT003 ゲノムから効率よく, しかも, 特異的に pHSG664 全長を PCR 増幅できたので, リガーゼ処理によって環状プラスミドに還元した後, Hanahan (1983) の方法で調製された宿主大腸菌 HB101 株を形質転換した。その結果, 1 ng の環状化した PCR 産物から, 1830 個のアンピシリン耐性コロニーを得た。そのうち, 大部分はストレプトマイシン感受性を示し, 導入された pHSG664 は確かに期待通り, 野生型の *rpsL* をもつものと判定された。ただし, アンピシリン耐性コロニー数のうち, ストレプトマイシン耐性を示すものの割合, すなわち, *rpsL* に突然変異が生じたものの割合は, 約 20% と高く, その後, 新たに PCR 反応条件やリガーゼ反応の条件などを変えて行なってみたところ, ストレプトマイシン耐性の率は 1% 以下から数 10% とばらついた。例えば, 後述するエレクトロポレーション法にて, 0.5  $\mu$ g の環状化した PCR 産物を大腸菌 HB101 株に導入したところ, アンピシリン耐性コロニーが 833 個得られ, そのうち

6 個 (0.72%) がストレプトマイシン耐性であった。また, 得られたストレプトマイシン耐性コロニーから, pHSG664 を回収し制限酵素にて切断してアガロースゲル電気泳動で解析したところ, その多くの場合, 小さな欠失を伴っていたり, EcoRI 認識部位が失われていたりすることがわかった。これは, マウス体細胞内で生じたというより, おそらく PCR の過程やリガーゼ反応の段階において生じた突然変異と思われる。PCR の条件及びその後のリガーゼ反応によっては, ストレプトマイシン耐性コロニーの割合が 10<sup>-2</sup> 以下になる場合もみられたので, PCR のサイクル数を減らすなど最適条件を検索し, また, われわれが使用した Taq DNA ポリメラーゼ (Chien ら 1976; Saiki ら 1985) より複製忠実度の高いといわれている Pfu DNA ポリメラーゼ (Lundberg ら 1991) を用いることなどを検討すれば, ある程度の精度において, PCR にて回収した導入遺伝子を用いた突然変異の解析も可能と思われる。さらに, PCR によって, 導入遺伝子が容易に増幅検出できたということから, トランスジェニックマウスの検定にも用いることが可能で, 実際に HIT003 系統の維持保存のための判定にも現在用いている。

[EcoRI 切断断片の電気泳動ゲルからの回収] 直接ヘミ接合体のゲノム DNA から pHSG664 を回収する場合, その最大回収率は, pHSG664 の大きさ (2706 bp) と導入コピー数から 1 を引いた値 (切り出される pHSG664 分子数は, タンデム重複数より 1 少ない。) との積の, ゲノム全体の大きさ (6 $\times$ 10<sup>9</sup> bp) に対する比となる。言い替えると, HIT003 のヘミ接合体ゲノムにおいて切り出し可能な導入遺伝子の占める割合は:

$$\frac{\{2706 \text{ bp} \times (2 \text{ コピー} - 1)\} + (6 \times 10^9 \text{ bp})}{6 \times 10^9 \text{ bp}} = 4.5 \times 10^{-7} \quad (1)$$

となり, PCR と比べ極めて効率は悪い。しかし, 上述したように, PCR を用いて増幅した pHSG664 を突然変異解析に用いるには, 現在のところ, さらに検討を要する。そこで直接切り出してくる方法も試み, HIT003 の F1 マウスのうち生後まもなく死亡した個体より, ゲノム DNA を抽出し, その 200  $\mu$ g を EcoRI にて切断後, アガロー

スゲル電気泳動を行ない, 2.7 kb に相当する領域を切り出した。この切り出した分画には, 全ゲノムのおよそ 1% から 2% が含まれると推定され, 200  $\mu$ g からは, 約 2~4  $\mu$ g の EcoRI 断片が 1 つの切り出したゲルの切片に含まれていると思われる。一方, 200  $\mu$ g の HIT003 全ゲノムから切り出される pHSG664 は (1) より:

$$200 \mu\text{g} \times 4.5 \times 10^{-7} = 90 \text{ pg} \quad (2)$$

となる。言い替えると, もともと 200  $\mu$ g 中 90 pg あった導入遺伝子が, ゲル電気泳動後の切り出しにより 50 倍から 100 倍に濃縮されて, 2~4  $\mu$ g 中に 90 pg の状態で回収されるわけである。実際のゲルからの DNA の回収にはバイオトラップ (Schleicher & Shuell 社) を用いるエレクトロロリユージョン法にて行なった。バイオトラップ法では, ゲル内の DNA を数時間で回収できるうえ, 回収率もほぼ 100% に近く, また, 回収後, フェノール抽出による精製なしにエタノール沈殿だけで, その後の酵素反応を行い得る利点がある。このようにして濃縮抽出された HIT003 の導入遺伝子を含む EcoRI 断片をリガーゼで自己環状化し, ストレプトマイシン感受性の大腸菌を形質転換して, 突然変異を検出するわけだが, このとき鍵となるのはその形質転換効率である。通常用いられている Hanahan (1983) の方法が, コンピテント大腸菌を形質転換する場合, 最も効率がよいといわれており, 純粋に精製された 1  $\mu$ g の超らせんプラスミド DNA から 10<sup>8</sup> 程度の形質転換コロニーが得られる。この計算でいくと, 90 pg の pHSG664 からは, 9000 個の形質転換コロニーが期待されるが, 実際は, 回収効率, リガーゼ反応効率, さらに, ショトルプラスミド DNA が超らせん構造でないことや, 2~4  $\mu$ g の他の DNA 断片中にわずか 90 pg のみ存在していることなど考慮すると, 形質転換効率は少なくとも 100 倍以上悪くなると思われる, 200  $\mu$ g の HIT003 ゲノムからは, 90 個以下のコロニーしか得られない計算となり, とっても高感度の突然変異解析は行なえない。そこで, さらに高い形質転換効率を得る方法として, 最近, エレクトロポレーション法による大腸菌の形質転換法 (Dower ら 1988; Calvin と Hanawalt 1988; Smith ら 1990) が開発されて,

純粋に精製された 1 µg の超らせんプラスミド DNA から 10<sup>10</sup> 以上の形質転換コロニーが得られるといわれているので、これを用いることとした。上述のように HIT003 ゲノム DNA 200 µg からゲルの切り出しにて濃縮精製された pHSG664 導入遺伝子を含む分画の、40 分の 1 の DNA を用いてエレクトロポレーション法にて宿主大腸菌 HB101 株を形質転換したところ、162 個のアンピシリン耐性コロニーを得た。すなわち、この分画全体を用いれば、6000 個以上の形質転換コロニーが得られる計算になる。また、主要臓器から得られるゲノム DNA が普通 1 mg のオーダーにて抽出されることから、HIT003 の 1 臓器 DNA より、30,000 個以上のコロニーが得られることになり、1 個体に生じる突然変異の解析のためには、まずは必要最小限の数を達成したといえる。

## 5. 考察

大腸菌系で突然変異の検出が容易な野生型 *rpsL* をもつシャトルプラスミドを導入したトランスジェニックマウス HIT003 の作成および系統確立に成功した。この突然変異モニター遺伝子であるトランスジェニックマウスゲノム中の *rpsL* に生じた突然変異を鋭敏かつ迅速に解析するための最大の課題は、いかに効率よく導入遺伝子をゲノムより回収し、*rpsL* の発現を宿主大腸菌においてどれだけ数多く検定できるかという点にある。このために、1) 導入遺伝子をモニター遺伝子を含んだシャトルプラスミド全体とする、2) 制限酵素処理にて線状化した導入遺伝子を電気泳動後エレクトロエリクション法にて最大限に回収する、3) リガーゼで環状に復元した導入遺伝子をエレクトロポレーション法を用いて大腸菌に導入し、高効率の形質転換を行なう、という方針にて開発した。シャトルプラスミド全体を導入遺伝子としているため、モニター遺伝子である *rpsL* はトランスジェニックマウスのゲノムから回収後、ベクターへのクローニングは不必要で、ただ、自己環状化のみ行なうことで、大腸菌内で複製し、*rpsL* の発現を観察しうる分子構造となる。また、エレクトロエリクション法はバイオトラップ法を用いることで、短時間での DNA 回収および調製を可能

とし、エレクトロポレーション法で形質転換を行なったので、Hanahan (1983) の方法による形質転換にくらべ約 100 倍以上の形質転換コロニーを得ることができた。現在、この HIT003 系統マウスに放射線や化学発がん剤を投与してその突然変異を解析することを検討している。また、この pHSG664 を用いたトランスジェニックマウスによる体細胞突然変異の解析能をさらに高めるため、さらに、導入コピー数の高いトランスジェニックマウス作成を行なっている。得られた HIT003 は 2 コピーほどしか導入されていないため、式 (1) および (2) に示したように 1 ゲノムあたり回収できる導入遺伝子も限られている。トランスジェニックマウス作成にあたっては、数百コピー導入された例もすでに報告されているので、試みる価値がある。なぜなら、もし、100 コピー導入されたトランスジェニックマウスが得られれば、切り出すこともなしに全ゲノムを抽出したそのままの状態が、HIT003 から 100 分の 1 の導入遺伝子分画を切り出して濃縮したのと同じ状態となるからである。また、同じ量のトランスジェニックマウスのゲノム DNA を用いても、100 コピー導入されている場合は、形質転換コロニー数も 100 倍得られることが期待される。例えば、HIT003 では、1 臓器の DNA から 30,000 個以上の形質転換コロニーが得られることがわかったが、100 コピー導入のトランスジェニックマウスが確立されれば、1 臓器あたり、3×10<sup>6</sup> 個以上の形質転換コロニーが得られる計算になる。これは、λ ベクターと *in vitro* パッケージングを用いて既に報告されている *lacZ* (Gossen ら 1989) や *lacI* (Kohler ら 1991) を導入したトランスジェニックマウスの系で得られる臓器当りの検定数とほぼ同じとあってよい。*in vitro* パッケージングを用いないため、われわれの系の方が安価とあってよいであろう。また、もっと多くの独立な pHSG664 を導入したトランスジェニックマウスを作成する利点として、導入箇所的位置効果、例えば、ヘテロクロマチン部位とユークロマチン部位にある場合の突然変異率の違いを見ることができ点があげられる。

さて、*rpsL* を突然変異モニター遺伝子として

用いた場合、最大の利点は突然変異をストレプトマイシン耐性として検出できることである。このために、突然変異検出が極めて容易鋭敏となる。*rpsL* に誘発される突然変異率は、分母としてストレプトマイシンを含まないアンピシリンのみを含む培地に生じる大腸菌コロニー数、分子としてストレプトマイシンとアンピシリン両方を含む培地に生じる大腸菌コロニー数として、その比から推定する。すなわち、突然変異率の推定に必要な分母のコロニー数と分子のコロニー数を別のプレート上で行なうため、大腸菌の希釈度を変えて播種するだけで、少ないプレート数にてどのように微少な突然変異率でも検出できるはずである。ところが最終的に β-ガラクトシダーゼの発現で突然変異を検出する *lacZ* (Gossen ら 1989) や *lacI* (Kohler ら 1991) を導入したトランスジェニックマウスの系では、1 枚のプレート上の Xgal 染色の違いで突然変異をみるため、1 枚のプレートあたりスクリーンできるコロニー数によって検定数が限られ、精度の高い値を得るために多数のプレートと多量の Xgal を必要とする。また、モニター遺伝子 *rpsL* は全長 375 bp と小さく、*lacZ* (3 kb) や *lacI* (1 kb) よりも全塩基配列決定が容易で突然変異のスペクトラム解析にも利点がある。

[付記] 本論文完成投稿後、350, 750 コピーの導入遺伝子をもつトランスジェニックマウスが得られ、以上述べてきた全ての実験を、この新しく得られたトランスジェニックマウス系統を用いて実施中である。

## 1) 導入遺伝子の調製

大腸菌プラスミド pHSG664 は、京都府立医大の橋本保博士より戴いた。この DNA を用いて、ストレプトマイシン耐性株である大腸菌 HB101 株 (*strA=rpsL* をもつ) のコンピテント細胞 (宝酒造) を形質転換し、アンピシリン寒天培地から単一コロニーを得て、pHSG664 プラスミドを大量に調製し、このプラスミドに単一の認識部位をもつ *HaeII* にて線状化したのち、C57BL/6J の受

精卵に注入し遺伝子導入マウスを作製した。

## 2) トランスジェニックマウスの作成

*HaeII* にて線状化した pHSG664 を C57BL/6J 近交系の受精卵にマイクロインジェクションを行なったのち、偽妊娠のメスマウスに移植し発生成長させ、個体を得た。導入遺伝子 pHSG664 をゲノムにもつかどうかの検定は、得られた各個体の尾の断片から DNA を抽出して、pHSG664 をプローブとするサザン・ハイブリダイゼーション法によって行なった。導入遺伝子部分をゲノムから PCR で増幅する方法を確立した後は、PCR による検定も併用した。

## 3) 遺伝子導入マウスからのゲノム DNA の抽出

生後約 1 カ月の時点で、トランスジェニックマウスの可能性のある個体から尾の一部を切断し、ゲノム DNA を抽出した。まず、300 µg プロテナーゼ K (Boehringer Mannheim 社) と 2 mg プロナーゼ E (科研薬) を含む 2 ml の消化溶液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS) で、1 検体の尾を 50°C、16 時間反応後、フェノール抽出、RNase 処理、エタノール沈殿を用い、DNA を回収し、最終的に TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。

## 4) サザンハイブリダイゼーション法(サザン法)

pHSG664 に 1 ケ所認識部位をもつ *EcoRI* で処理したマウスゲノム DNA 2 µg を 0.7% アガロースゲル電気泳動後、Gene Screen Plus メンブレン (DuPont 社) にトランスファーした。ハイブリダイゼーションは、Church と Gilbert の改法 (Church と Gilbert 1984; Brilliant ら 1991) を用いて、66°C でハイブリダイゼーション後、60°C、2×SSC、0.1% SDS で洗浄し、X 線フィルム (Kodak 社) に感光した。

## 5) 大腸菌の形質転換

コンピテント細胞法は、Hanahan (1983) の方法で調製された大腸菌 HB101 株 (宝酒造) を用いて行なった。大腸菌へのエレクトロポレーショ

ンは, Smith ら (1990) による Cell-Porator *E. coli* System (BRL 社) を用いて行ない, 指数増殖期にある大腸菌 HB101 株を遠心後, 10% glycerol (BRL 社) にて  $1 \times 10^{11}$  の濃度に調製した細胞を用いた。

#### 謝 辞

pHSG664 の理論, 実験両面において, 東京大学応用微生物研究所の真木寿治先生に御教示頂くとともに, 大腸菌における *rpsL* の突然変異スペクトラムを教えてくださいました。トランスジェニックマウスの作成には, 実験動物中央研究所の横山峯介先生および長谷川孝徳先生に多大な御援助を頂きました。また, 京都府立医科大学の橋本保先生にも貴重な御意見を頂きました。ここに感謝します。本研究は文部省科学研究費補助金がん特別研究 (2), 重点領域研究 (1), 厚生省がん補助金および東海大学医学部研究助成金の援助によるものです。

#### 参 考 文 献

- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki and F. D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285.
- Ashman, C. R., P. Jagadeeswaran and R. L. Davidson (1986) Efficient recovery and sequencing of mutant genes from mammalian chromosomal DNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3356-3360.
- Brilliant, M. H., Y. Gondo and E. M. Eicher (1991) Direct molecular identification of the mouse pink-eyed unstable mutation by genome scanning, Science, 252, 566-569.
- Calos, M. P., J. S. Lebkowski and M. R. Botchan (1983) High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3015-3019.
- Calvin, N. M. and P. C. Hanawalt (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation, J. Bacteriol., 170, 2796-2801.
- Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*, J. Bacteriol., 127, 1550-1557.
- Church, G. M. and W. Gilbert (1984) Genomic sequencing, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81,

1991-1995.

- Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, Nucleic Acids Res., 16, 6127-6145.
- Gossen, J. A., W. J. F. de Leeuw, C. H. T. Tan, E. C. Zwarthoff, F. Berends, P. H. M. Lohman, D. L. Knook and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7971-7975.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, J. Mol. Biol., 166, 557-580.
- Hashimoto-Gotoh, T., A. Kume, W. Masahashi, S. Takeshita and A. Fukuda (1986) Improved vector, pHSG664, for direct streptomycin-resistance selection: cDNA cloning with G: C-tailing procedure and subcloning of double-digest DNA fragments, Gene, 41, 125-128.
- Hauser, J., M. M. Seidman, K. Sidur and K. Dixon (1986) Sequence specificity of point mutations induced during passage of a UV-irradiated shuttle vector plasmid in monkey cells, Mol. Cell. Biol., 6, 277-285.
- Hauser, J., A. S. Levine and K. Dixon (1987) Unique pattern of point mutations arising after gene transfer into mammalian cells, The EMBO J., 6, 63-67.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, J. A. Sorge, D. L. Putman and J. M. Short (1991) Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lacI* gene in transgenic mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7958-7962.
- Lebkowski, J. S., R. B. DuBridg, E. A. Antell, K. S. Greisen and M. P. Calos (1984) Transfected DNA is mutated in monkey, mouse, and human cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1951-1960.
- Lebkowski, J. S., S. Clancy, J. H. Miller and M. P. Calos (1985) The *lacI* shuttle: rapid analysis of the mutagenic specificity of ultraviolet light in human cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8606-8610.
- Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, M. W. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge and E. J. Mathur (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, Gene, 108, 1-6.
- Miller, J. H., J. S. Lebkowski, K. S. Greisen and M. P. Calos (1984) Specificity of mutations induced in transfected DNA by mammalian cells, The EMBO J., 13, 3117-3121.
- Razzaque, A., H. Mizusawa and M. M. Seidman (1983) Rearrangement and mutagenesis of a shuttle vector plasmid after passage in mamma-

lian cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3010-3014.

- Razzaque, A., S. Chakrabarti, S. Joffee and M. Seidman (1984) Mutagenesis of a shuttle vector plasmid in mammalian cells, Mol. Cell. Biol., 4, 435-441.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic

sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science, 230, 1350-1354.

- Smith, M., J. Jessee, T. Landers and J. Jordan (1990) High efficient bacterial electroporation:  $1 \times 10^{10}$  *E. coli* transformants/ $\mu$ g, Focus, 12, 38-40.
- Tindall, K. R. and T. A. Kunkel (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase, Biochem., 27, 6008-6013.

## 環境変異原学会の役割—その歴史的展望のこころみ

近畿大・原研 近藤 宗平

### 1. 設立の由来

Alexander Hollaender いわく。「われわれが生きている間に、環境放射線による遺伝的傷害の危険が起こる心配はないだろう。それよりも、化学的環境変異原の危険のほうがはるかに心配だ。とくに、薬物の変異原性は深刻である。これを防ぐために、世界中の研究者が協力する国際的な変異原学会 (EMS) をつくろう。」この趣旨に従って、国際環境変異原学会が 1973 年に成立された。従って、欧米では国別の EMS はない。しかし、欧米以外では、そうはいかない。

### 2. 国際的協力体制

国内 EMS の充実速度を上回る速度で、国際的な環境変異原研究の協力がつぎつぎと積み重ねられた。

### 3. 日本 EMS の特色

癌研究・基礎医学・薬学などの分野の研究者が遺伝学者より多い。微生物・培養細胞などによる短期変異原性テストと、マウス・ラットによる癌原性テストが、変異原研究体制の両輪となり、相互に協力して進行した。この両輪研究体制は、実際の飲食物・大気中の環境変異原・癌原の検出で成功をおさめた。

### 4. 未来の展望

#### 1) 脳の老化

これからの最大の体内環境問題。アルツハイマー病の内因の中に、変異原があるかもしれない。もしあれば、その予防は大事な環境 (人間社会環

境) テーマになるように思われる。

#### 2) 遺伝子は変わるべくして変わる

恐竜の滅亡による空白の新環境が出現したので、原始哺乳類は、遺伝子を新環境に適応するように変異させて、現生哺乳類に大進化した。生物は変わるべくして変わった (今西錦司, 1964)。

J. Cairns ら (Nature, 1988) は、「突然変異の起源」と題して、つぎのような発表をし、世界的波紋を起こした。大腸菌は、増殖を止めた定常状態のまま、増殖に不利な特殊な栄養環境で培養していると、不利な環境に適した特性を、突然変異で獲得し、その仲間を増やすものがでてくる。この有益変異は、適応変異とよばれ、その発生頻度は、時間に比例して増加する。

癌化を起こす変異も、細胞の増殖力をふやすので、有益変異に属する。従って、進化の原動力となった有益変異と類似している。

事実、大腸癌の発生過程は、次のようにして起こるようである。数個の遺伝子 (*APC*, *ras*, *p53*, *DCC* 等) に、有益変異がつぎつぎと発生し、優秀な細胞に変化し、だんだん増殖力が強くなり、ついには癌細胞に進化する。このような有益 (適応) 変異は、従来の変異 (DNA 複製依存型) より、数桁高い頻度で起こる。この適応変異は、例えば、大腸粘膜層の細胞のように、分化した細胞に、それは分裂していないのに、時間に比例して好発するようである。このとき有害変異はほとんど付随していない。

以上のことについては、「遺伝子は変わるべくして変わる—がん化と進化の接点」と題して発表した (近藤 1992) ので、詳細を省く。ここでは、大

〒577 東大阪市小若江

The Environmental Mutagen Society of Japan—past and future perspectives Sohei Kondo  
Atomic Energy Research Institute, Kinki University, Higashiosaka 577, Japan

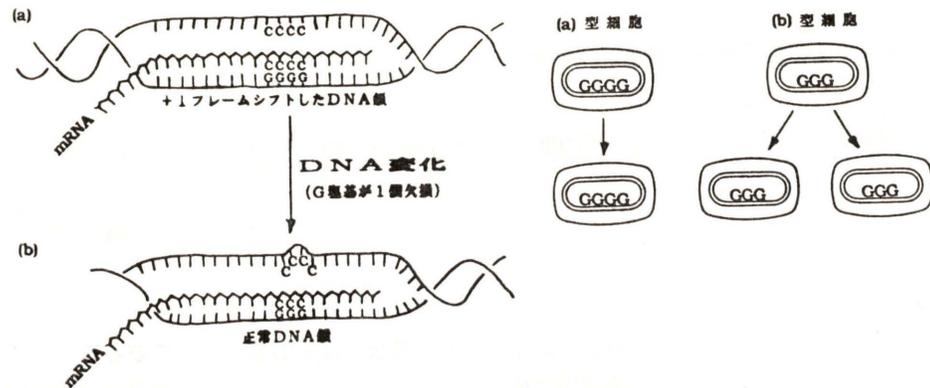


Fig. 1. 適応突然変異の模式図

腸菌を使って Cairns and Foster (1991) が見つけた「適応型突然変異」の機構に関するモデルを述べて、読者の興味に訴えるにとどめる。

#### (i) 適応型突然変異の発生モデル

図1の(a)は、大腸菌  $Lac^-$  (乳糖を利用しての増殖不能) 株が、自分の融合遺伝子  $lacI-lacZ$  を転写しているときの模式図である。これは、Cairns と Foster (1991) が用いた株であって、 $lacI$  遺伝子には、+1 のフレームシフト変異をした CCCC 配列が存在する。乳糖を含む培地で転写される  $lac$  遺伝子の mRNA は、C 塩基が1個過剰という欠陥があるので、菌は乳糖があっても、それを代謝して生きるためのエネルギーにすることができない。すなわち、 $Lac^-$  型になる。

図1の(b)は、DNA 鎖に適応的の化学変化が偶発した場合である。筆者はこの DNA 変化が、つぎのようにして起こると想像している。転写される側の DNA 鎖には傷が自然に多発して、DNA 変化が多発する。それが転写・翻訳されても、ほとんどは不活性産物になるだけで、非増殖期の菌にはほとんど無害である。そもそも、転写される DNA 鎖の傷には修復酵素などが好んで働くことが知られている。長期間、DNA が転写されると、図のように、GGGG が GGG に変化した DNA 鎖が偶然に発生しても、不思議ではない。この有用な DNA 変化 ( $lac^+$  遺伝子の DNA と同じものへの復帰) は、すぐ正常な mRNA ( $Lac^+$  菌の mRNA と同じ) に転写されて、菌は  $Lac^+$  (乳糖を利用して増殖可能) 型に非遺伝的に

変身する。非転写 DNA 鎖は、もとの  $Lac^-$  株のままである。やがて菌は DNA 複製を開始し、偶然に発生した適応的 DNA 変化は、 $lac^+$  遺伝子を生みだし、それは子孫に伝えられる。

#### (ii) 適応変異と生物の進化

前節の説明は、1つの作業仮説にすぎない。実際に、適応変異がどうやって起こるのか分かっていない。機構が不明だから、適応変異は存在するはずがない、と考えている研究者が少なくない。しかし、それは研究者の思い上がりではなからうか？

生物進化の歴史は 30 数億年の長さである。この長い歴史を生き抜いた生物—微生物からヒトまで現存する全ての生物—はその保有している無数の遺伝子の中にわれわれが想像もできないような能力を、太古の時代に発揮したものが含まれているはずである。この考えは、今西や Cairns などが提唱しているもので、私もそう思う。

今西進化論の要点は次の通りである。環境が激変したとき、その新環境に好都合な方向に、適応変異を連発できた原始生物が、新しい生物に進化し、現存生物の先祖となった。この時働いた遺伝子群の子孫遺伝子は、現存生物の保有する遺伝子プールの中に、まだ残っているだろう。それが目をさますとき、あるものは細胞をがん化させる力を現わすと私は考えている (近藤 1989)。

今西仮説を、発がん性変異にあてはめると、「発がんの根本原因は、人体内環境の変化である」ということになる。事実、大腸癌の発生率は、肉の

摂取量と腸内細菌に関連しているといわれている (Cairns 1978)。従来の変異原テスト法で検出できない突然変異が、人癌の重要な要因であると思われる。

#### (iii) 今後の課題

適応突然変異が癌化の主役の1つになるだろうと思われる。従って、適応変異の検出系の創作が、EMS 会員に与えられた大きな課題となるように思われる。

#### 追記

適応変異は、1988 年以来最近まで、Nature や Science 誌上で議論沸騰している課題である。がんの多段階仮説とその中の適応変異の役割については、下記の拙著に詳述した。この本に述べた「適応変異の分子機構」のモデルは、英国の Bryn Bridges との 5 回の fax 討論で改良したものである。John Cairns に見て貰ったら絶対に明快なモデルと言ってくれた。米国 Genetics 誌編集長 John Drake は、このモデルを納得しなかったが、7 回の質疑応答でやっと納得した。従って適応変異機構に関し一応検討に値するモデルを提唱できたと愚考している。

Kondo, S. (1993) *Health effects of Low-level Radiation*. Kinki University Press, Osaka; Medical Physics Publishing, Madison, Wisconsin.

#### 参考文献

- 近藤宗平 (1989) 突然変異の機構—日本遺伝学会木原賞受賞講演—遺伝学雑誌, 64 巻, 137-163.  
 近藤宗平 (1992) 遺伝子は変わるべくして変わる—がん化と進化の接点—蛋白質・核酸・酵素 37 巻, 1615-1628.  
 今西錦司 (1964) 進化の理論について—正統派的進化論に対する疑義—人文学報, 京大人文科学研究 所, 20 号 (創立 35 周年記念論集) pp. 1-13.  
 Cairns, J. (1975) Mutation, selection and the natural history of cancer. *Nature* 255: 197-200.  
 Cairns, J. (1978) *Cancer: Science and Society*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.  
 Cairns, J., Overbaugh, and Miller, S. (1988) The origin of mutants. *Nature* 335: 142-148.  
 Cairns, J. and Foster, P. L. (1991) Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* 128: 695-701.

## Ames 試験のガイドライン化の経緯について

日本バイオアッセイ研究センター 松島 泰次郎

環境変異原物質に対する関心が 1960 年代後半から 1970 年前半にかけて高まって来ている。我が国でも AF-2 の問題が騒がれたのは 1973~4 年であった。本学会が研究会として発足したのが 1972 年であり、その翌年には国際環境変異原学会連合 (IAEMS) が組織されている。環境化学物質の遺伝毒性あるいは癌原性 (遺伝子毒性発癌性) を動物を用いる試験で調べるには、経費・設備・日数等を考えると大変なことである。これに代わる方法として種々の短期検索法が、変異原性や DNA 損傷性を指標にして細菌・酵母・培養・細胞・昆虫・植物・実験動物を用いて開発された。それらの方法のなかで世界中で広く用いられているのが、カリホルニア大学の B. N. Ames 教授が開発したサルモネラ変異原性試験 (エームス試験) である。

1971 年に Ames 教授が発表したサルモネラ変異原性試験が世界中で広く用いられるようになった背景は、1) 取扱いが容易でかつ感受性の高いサルモネラ試験菌株を開発して用いたこと。2) 従来用いられた変異原性誘発率を調べる方法とは異なって、変異原物質で処理したあと生存菌数を測定しないで生育阻害が発現しない濃度範囲での復帰突然変異株の出現数を調べる簡便法を用いたこと。3) 化学物質は哺乳動物体内で代謝活性化を受けて DNA 損傷性を発現するものがあるが、微生物にはこの代謝機能が欠損しているため薬物代謝酵素系を誘導したラット肝臓の 9,000×g 上清 (S9) に助酵素を添加した代謝活性化系 (S9 mix) を試験系に加えたことである。この結果多数の癌原性物質がエームス試験で変異原性を示した。癌

原性物質の多くが哺乳動物の体内で代謝活性化を受けて DNA と反応する形になり発癌性を発現するので、以前の多くの試験法では代謝活性化を必要としない直接反応型の癌原性物質だけが変異原性を示していたのに過ぎなかったのが、S9 mix を用いるエームス試験では癌原性と変異原性の相関が高く、癌原性物質のスクリーニング法として広く用いられるようになった。

我が国で AF-2 の変異原性が問題にあったとき、AF-2 と同じ構造をもつ数多くの癌原性ニトロフラン化合物がその当時のエームス試験菌株 (TA 1535~1538) には陰性であった。このことが Ames 教授によってより感受性の高い試験菌株として薬物耐性因子 pKM 101 プラスミドを導入した TA 98, TA 100 を開発し、エームス試験と精度を高めることになり、Aflutoxin をはじめとする多くの癌原性物質の変異原性を検知できるようになった。またエームス試験技法の簡便な改良法である preincubation 法の開発は、Dimethylnitrosamine などの代謝活性化を必要とする物質の検索をより効率よく実施できる様にすることが出来た。アメリカの NTP ではサルモネラ試験は preincubation 法で実施されている。

世界労働機構 (ILO) が 1974 年に職業癌の予防を目的として 139 号条約を決めた。我が国では 1977 年 7 月 1 日に労働安全衛生法 (安衛法) を改正し、ILO 139 号条約を批准した。職業癌の予防を目的として化学物質の有害性調査制度を発足させた。1979 年 6 月 30 日以前に用いられていた化学物質は既存化学物質名簿に登録し、これに登録されていない化学物質を製造・輸入・使用する

〒257 神奈川県秦野市平沢 2445

Utility and problems of short-term assay—Microbial mutation assay—

Taijiro Matsushima

Japan Bioassay Laboratory, 2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257, Japan

るときには、新規化学物質として事前に届出する様にした制度である。新規化学物質の名称・物理化学的性質・生産方法・生産使用量・従事労働者数などを届出するときに、その化学物質の癌原性試験結果または癌原性を予測できるスクリーニング法としての変異原性試験結果を届出することにした。変異原性試験としては微生物を用いる変異原性試験を実施することとして、微生物変異原性試験の基準（ガイドライン）と具体的試験手法が1979年に公表された。我が国で最初の微生物変異原性試験ガイドラインである。その後1983年にはOECDのガイドラインが公表され、1984年に薬事法、1985年に農薬取締法、1986年に化審法、1988年に動物用医薬品の試験ガイドラインとして、安衛法と同様の微生物変異原性ガイドラインが公表されている。

我が国の微生物変異原性試験ガイドラインの特色はテスト菌株としてサルモネラ試験菌株（最初はTA 98, 100, 1535, 1537, 1538の5菌株であったが、現在はTA 98, 100, 1535, 1537の4菌株）に加えて大腸菌のwp2uvrA 1菌株を併せて使用することである。当初は癌原性の重金属化合物のいくつかはサルモネラ試験菌株には変異原性が陰性であるのに大腸菌試験菌株には陽性であったので、労働環境では重金属化合物の使用も多いため、大腸菌wp2uvrAを加えたわけである。然しサルモネラ試験菌株がDNA塩基配列のGC部位に突然変異を起す変異原物質を検出できるのに、大腸菌wp2系はAT部位に突然変異を起す変異原物質を検出できる性質を持っているため、この両試験菌株で検出できる変異原物質の範囲が広がっていることである。大腸菌だけに陽性を示す変異原物質がいくつか見出されている。

S9 mixに添加する助酵素としてNADPHに加えてNADHを使用する様に具体的手法で明示してある。ニトロソ化合物の変異原性検出にNADHを加えた場合に変異原性が増強することが知られていたためNADHを添加したわけであるが、化学物質の代謝活性化酵素系には電子供与体としてNADPHを利用するもののほかにNADHを利用するものもあり、化学物質の代謝活性化をより広範囲の化学物質に対して効率よ

く実施できる様になっている。最近の報告ではNADHの添加は、代謝活性化の促進だけでなく代謝不活性化の阻害も認められている。従って我が国での試験は外国での試験に比べて精度が高く信頼性が良いことになる。

1979年に安衛法の有害性調査制度が発足して以来、既に5500以上の新規化学物質について微生物変異原性試験を実施した結果が報告されている。安衛法で規定している化学物質は労働環境に存在して労働者が曝露を受ける可能性のある総ての化学物質を含んでいるので、化学合成の原料・最終生産物・製造工程の中間物・副生物・廃棄物が含まれている。化学合成の原料・中間物を含んでいるので、そのなかには化学反応性を持っているものもあり、変異原性の強弱はあるが全新規化学物質の約13%が微生物変異原性試験に陽性であり、DNA損傷性が示されている。全変異原物質の約7%が大腸菌wp2uvrAだけに陽性でサルモネラ試験菌株には陰性である。外国での試験ではこの種の変異原物質は見落していることになる。変異原性の強さを計算して化学物質1mg当り1000以上の復帰突然変異を誘発する比変異原活性の強い物質全体の約4%である。これ等の変異原物質については更に哺乳動物培養細胞を用いる染色体異常試験が実施されている。強い変異原性を示した化学物質については安全な取扱いの指針が名称の公表とともに公表されている。既存化学物質について生産量の多い、従って曝露する可能性のある労働者の数も多い化学物質について、この両変異原性試験で有害性が調べられている。毎年安全取扱い指針が変異原物質の名称と共に公表されている。

エームス試験は簡単に誰もが試験を実施できるという利点があるが、簡便法であるがために試験手法を正しく実施しなければ正確な信頼度の高い結果を得ることが出来ない。癌原物質のスクリーニング法として広く利用される様になって、当初の単なる陽性・陰性の定性的判定から、現在では比変異原性を求める定量的評価が行われるようになってきている。試験を正しく実施していないと変異原性の強さが大きく異なって来る。微生物変異原性試験の精度管理が1986年以来実施されて来て

いるが、同じ物質について試験機関による差異が変異原性の強さに大きくあることが判って来た。陽性でなければいけない物質の試験結果が陰性である極端な場合も試験機関によっては報告されている。信頼性の高い結果を報告するためには試験手法を正しく実施する必要がある。微生物変異原性試験連絡協議会が実施している共同研究の結果、試験技法の問題点が明らかにされ、改善が進

んでいる。

試験機関が具備すべき基準（GLP基準）の制定と試験の精度管理が相伴って、我が国での微生物変異原性試験の水準は世界に比べて非常に高いと云っても過言ではなく、試験を実施している研究者の努力によって信頼性の高い、精度の高い試験結果が報告されている。

シンポジウム「なぜ変異原性試験を行うのか」

## 染色体異常試験とマウス小核試験の ガイドライン化の経緯

オリンパス光学工業株式会社 染色体研究センター 石 館 基

### 1. はじめに

本シンポジウムの表題「なぜ変異原性試験を行うか」は、「なぜ環境変異原学会が存在するのか」に通ずる問題であり、今さら何をという感じもしないわけでもないが、再び原点に戻って考え直す時期にきているのかも知れない。

変異原性試験が我が国で重要視され始めたのは、今から約 20 年前、食品添加物 AF-2 に強い変異原性があり、その後、動物に対しても発がん性の実証されたことによる。当時、動物の発がん性試験法ガイドラインは国際的に確立されてはいたが、環境中に存在する全ての化学物質について、検索することは殆ど不可能である。簡便な短期スクリーニング法によって、まず、疑わしい物質だけを選別し得る手法の開発が急務であった。

我が国では 1979 年、世界に先駆けて、労働省労働安全衛生法（安衛法）の中に、微生物を用いる Ames テストが採用されたことについては、前演者の松島先生が既に紹介された。労働省の場合にはあくまでも職業がんの予防を目的としている。しかし、ヒトへの有害性は、がんのみではない。広く、子孫への遺伝学的影響を考慮すべきであろう。当時、遺伝学者による警告は注目に値する。1982 年、厚生省は新薬のための変異原性試験法ガイドラインを作製するため、専門家より成る研究班を組織した。その委員には、元国立衛生試験所安全性試験研究センターの大森義仁先生をはじめ、国立遺伝学研究所の故賀田恒夫先生、故土

川清先生、前演者の松島泰次郎先生、製薬協の代表として武田薬品の菊池康基氏、および、当時国立衛生試験所変異原性部を担当していた私が加わった。数回にわたる委員会が開催されたが、ドラフトの作製にあたっては、我が国における従来の蓄積データを基に、既に公表されている OECD ガイドライン (1981)、英国 EMS ガイドライン (1983) など諸外国の試験法基準も参考とした (石館, 1991)。

1983 年 8 月に公表された薬事法ガイドラインでは、Ames テストおよび培養細胞を用いる染色体異常試験をまず行い、その結果変異原性が疑われた場合には、げっ歯類を用いる小核試験を実施することが望ましいとされた。その後、1989 年の改正によって、上記 3 種の試験が同時に要求されるようになった。これは、新薬の安全性を確保する上で、製薬企業側から強い要望があったためである。哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験は、1985 年に公布された農薬用ガイドライン、および、1986 年に制定された化審法ガイドラインの中にも起用されているが、その内容は医薬品の場合と矛盾するものではない。(Table 1)

### 2. 培養細胞を用いる染色体異常試験

#### 1) 意義と有用性について

従来、医薬品の安全性の評価の一つとして、げっ歯類、特にラットの骨髄を用いる染色体異常試験が広く用いられてきた。生体内で比較的細胞分裂が盛んに行われており、他の臓器と比較して、

〒192 東京都八王子市久保山町 2-3

Motoi Ishidate, Jr.  
Director, Chromosome Research Center, Olympus Optical Co., Ltd., 2-3 Kuboyama-cho, Hachioji,  
Tokyo 192, Japan

Table 1. 変異原性試験ガイドライン

|                                  |  | (試験法)      |
|----------------------------------|--|------------|
| 1. 労働省: 安衛法 (労安法)                | 基発第 107 号 (昭和 54 年 3 月 8 日)                              | —Ames テスト  |
|                                  | 基発第 261 号 (昭和 60 年 5 月 18 日)                             | —(染色体異常試験) |
|                                  | 基発第 143 号 (昭和 62 年 3 月 18 日)                             |            |
| 2. 厚生省: 薬事法 (医薬品の毒性試験)           | 薬審第 118 号 (昭和 59 年 2 月 15 日)                             | —Ames テスト  |
|                                  | 薬審 1 第 24 号 (平成元年 9 月 11 日)                              | —染色体異常試験   |
|                                  |  | —小核試験      |
| 3. 環境庁, 厚生省, 通産省: 新規化学物質のスクリーニング | 環保業第 700 号, 薬発第 1039 号, 61 基局第 1014 号 (昭和 61 年 12 月 5 日) | —Ames テスト  |
|                                  |  | —染色体異常試験   |
| 4. 農水省: 農業取締法                    | 59 農蚕第 4200 号 (昭和 60 年 1 月 28 日)                         | —Ames テスト  |
|                                  |  | —Rec-assay |
|                                  |  | —染色体異常試験   |

染色体の観察に最も適しているためである。しかし、培養細胞を用いると、同じ被験物質でも、その効果をより低濃度で感度良く検出することができる。従って、OECD の遺伝毒性ガイドラインの項目の中に、*in vitro* 細胞遺伝学的手法が採用された。

染色体の異常は、構造的異常と数的異常に大別される。構造異常はさらに、ギャップを含める切断型の異常と、交換型の異常に分けられる。その異常が不安定型 (unstable type) の場合には、異常を持つ細胞の大部分は増殖し得なくなるが、安定型 (stable type) の場合には、細胞は生き伸びて、異常な核型を持つ細胞として増殖してくる。がん細胞の多くは、染色体の異常を伴っているため、染色体の変化が、細胞のがん化に関連している可能性は極めて高い。染色体の構成が変われば、多くの場合遺伝子の配列に混乱を生じ、その結果、遺伝子の活性化あるいは非動化が起こるかも知れない。一方、細胞ゲノムの変化は、染色体の数の異常によっても起こり得る。この場合には、DNA 損傷よりも、むしろ、細胞分裂阻害による染色体不分離 (non-disjunction) に起因するものと考えられている。染色体の数の異常は、ヒトの場合、流産あるいは種々の遺伝性疾患につながる重要な課題である。

Table 2. Ames テストで検出されにくい化合物 (48 種類) の分類

| 化合物の種類                             | 化合物数 | (%)   |
|------------------------------------|------|-------|
| Polychlorinated aliphatic/aromatic | 16   | (33%) |
| Carbamates/amides/ureas            | 5    | (10%) |
| Azo-compounds                      | 4    | (8%)  |
| Vinyl-compounds                    | 4    | (8%)  |
| Aniline compounds                  | 2    | (4%)  |
| Hydrazine compounds                | 2    | (4%)  |
| Imino-compounds                    | 2    | (4%)  |
| Metals                             | 2    | (4%)  |
| Others                             | 11   | (23%) |

2) Ames テストの補足試験としての役割

既知発がん性物質の多くのものは、Ames テストでも染色体異常試験でも陽性となる。しかし、そのうちのいくつかのものは、Ames テストでは検出されないが、培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性となる。1982 年に発足した WHO/IPCS の国際共同研究 (CSSTT) (Ashby, *et al.*) では、8 種類の発がん性物質 (acrylonitrile, benzene, diethylhexylphthalate, diethylstilbestrol, hexamethylphosphoramide (DEHP), phenobarbitone, safrole, *o*-toluidine) について、Ames テスト以外の試験を行ったところ、DEHP を除き、全てのものが染色体異常を誘発することが分かった。発がん性がありながら Ames テストにかかりにくい

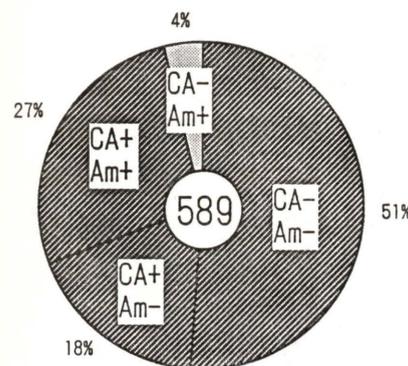


Fig. 1 Ames テストと染色体異常試験結果の定性的比較

48 種類の化合物を分類すると表 2 の如くなる。

国立衛生試験所で Ames テストおよび染色体異常試験を同時に行った 589 化合物について、定性的に比較した結果を図 1 に示す。また、染色体異常試験で陽性となった化合物のうち、代表的と思われるものの活性値を比較した場合を Fig. 2 に示す。Fig. 2 では、左側に Ames テストの活性値 (特定な菌株で得られた最高変異コロニー数/ $\mu\text{g}$ ) を、右側には CHL/IU 細胞を用いた時の最低の  $D_{20}$  値 (20% の中期細胞に異常を示す時の用

量,  $\text{mg/ml}$ ) を逆数で示してある。染色体異常試験で高い値を示す場合には、Ames テストでも高い値を示し、両者の活性にある程度の相関が見られる。ただし、左側が空白の化合物では染色体異常試験では陽性であるが、Ames テストでは陰性であることを示している (石館, 1988, 1991)。

3) 細胞の選択について

我が国のガイドラインでは、哺乳類の初代あるいは、株細胞を使用することになっている。諸外国でも同様であるが、前者の場合はヒトリンパ球が多く、後者では、染色体の観察が容易なことから、チャイニーズ・ハムスターの線維芽細胞が好んで用いられる。後者の場合には、諸外国では CHO 細胞 (卵巣由来) が、我が国では CHL/IU 細胞が広く用いられている。背景のデータの蓄積によるものと思われる。1964 年から約 20 年間に公表された合計 951 化合物、および、用いられた細胞系についての総説があるので参考とされたい (Ishidate, *et al.*, 1988)。これらの結果を一覧すると、ヒトの細胞とチャイニーズ・ハムスターとはかなり感受性が異なるようである。一般に前者の方が感度が低い傾向にあるが、化合物によって逆転する場合もある。

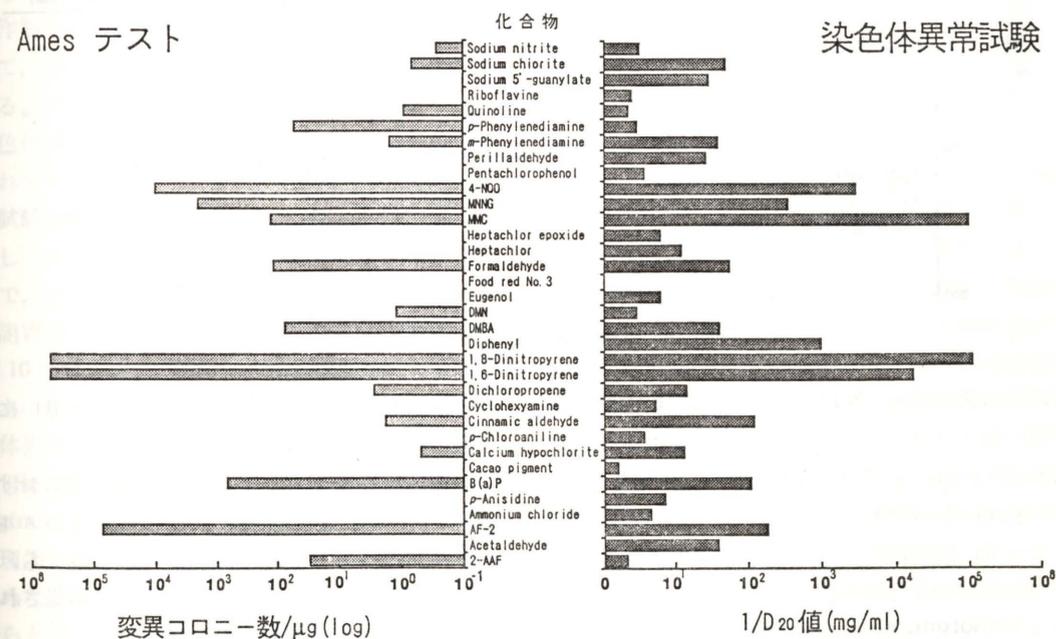


Fig. 2 Ames テストおよび染色体異常試験での活性値の比較

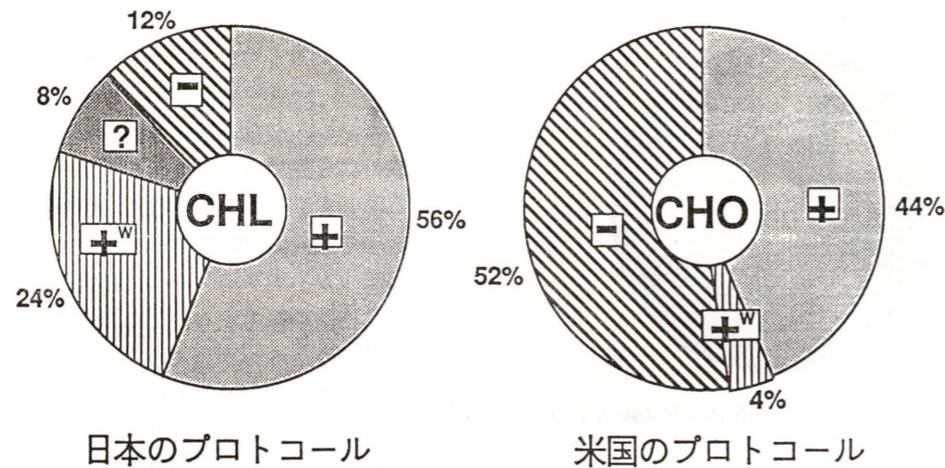


Fig. 3 米国 NTP 化合物 25 種類による結果の比較

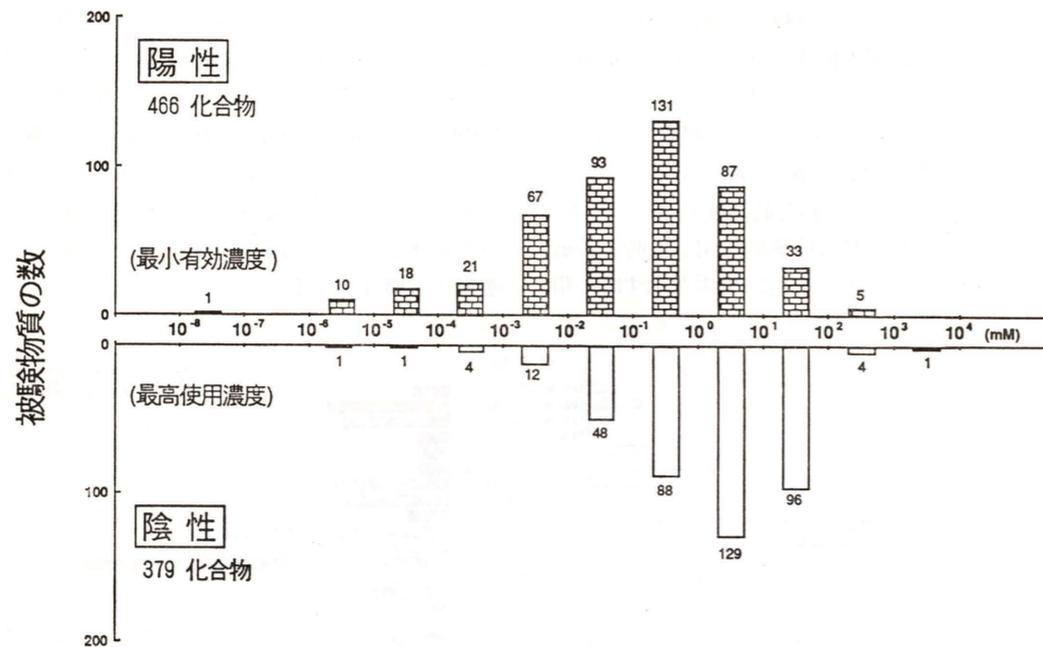


Fig. 4 培養細胞を用いる染色体異常試験

米国の毒性計画 (NTP) では、主に CHO 細胞を用いるスクリーニングが行われてきた。そのプロトコルは、米国の Galloway らの方法 (Galloway, *et al.*, 1985) によっているが、同じ化合物について、我が国のプロトコルを用いて追試してみると、かなり異なる結果が得られることが分かった (Sofuni, *et al.*, 1990) (Fig. 3)。種々検討を加えた結果、その相違は細胞の感受性というよ

りも、むしろ適用されたプロトコルの違いによるものであった。

現在、試験法プロトコルの国際間における調整が行われている。また、今年の2月のメルボルンにおける第6回国際環境変異原学会でも、プロトコルに関するワークショップが開催され、各国間で、活発な意見交換があった。

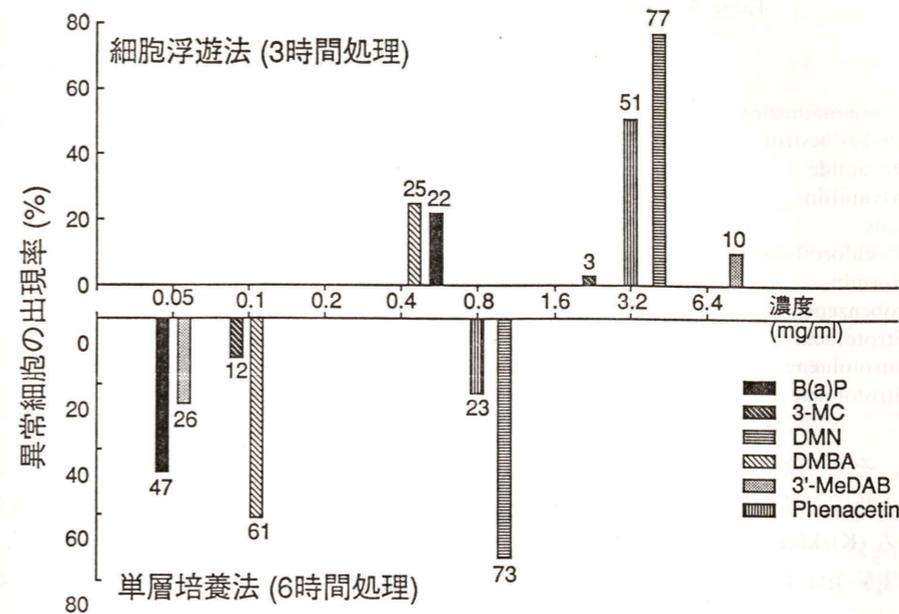


Fig. 5 染色体異常試験における代謝活性化法の比較

#### 4) 被験物質の最高濃度について

OECD では最高濃度を溶解限界としているが、物質の種類によっては、殆ど溶解しないものもある。我が国では、水あるいは DMSO に溶解しないものは、CMC ナトリウムなどを用いて懸濁液を作製するよう指導されている。細胞は細菌と違って、微粒子を取り込む作用を持っているためである。アスベストは不溶であるにもかかわらず、染色体異常を誘発するのはそのためであると考えられている。

試験の結果を陰性と判定するためには、細胞に対して十分な濃度を作用せしめる必要がある。そこで、まず、細胞に対する致死濃度を定める (分裂阻害あるいは細胞数)。但し、水溶性の場合は、約 10 mM 以上で培地の浸透圧が上昇する可能性があり、また、pH が極端に変化した場合にも染色体異常が出現する可能性があるため注意を要する (Scott, *et al.*, 1991)。また、不溶の場合でも 5 mg/ml を限界とすべきである。細胞に対する、非生理的な影響によって偽陽性となることを避けるためである。但し、細胞毒性 (致死作用) があるからと言って、必ずしも異常が出現するとは限らない。Fig. 4 の下段は、試験結果が陰性と判定さ

れた 379 種の化合物につき、最高濃度の分布を示したものである。

#### 5) 処理時間、標本作製時期について

諸外国では、被験物質を短時間 (1~3 h) のみ作用させた後に、細胞の分裂を待って標本作製する機会が多い。代謝活性化のために S9 を加える方法 (S9 法) を同時に平行して行える利点はある。我が国のガイドラインでは、代謝活性化を併用しない場合 (直接法) と併用する場合 (S9 法) とを別のシリーズとして行うようになっている。前者では、細胞の周期全体に連続的に作用させることを目的とするため、当然、作用する濃度は低くなる。被験物質によって細胞周期が延長する可能性があるため、24 時間と 48 時間目の 2 回に分けて標本作製する。化合物によっては 48 時間目に多く異常が出現する可能性があるからである (石館, 1988)。

S9 法には、細胞を浮遊状態にした上、1~3 時間 S9mix とともに作用させる方法 (suspension 法) と、単層培養のまま 3~6 時間作用させる方法 (plate 法) とがあるが、後者の方が感受性が高く、より低濃度で異常が出現する傾向にある。(Fig. 5) 英国のガイドラインでは、直接法で、まず 1 回

Table 3. 倍数体を主に誘発する化合物 (非代謝活性化)

| 化合物                    | 濃度 (mg/ml) | 倍数体 (% 48時間目) | 構造異常 | Ames テスト |
|------------------------|------------|---------------|------|----------|
| Bendroflumethazide     | 0.2        | 41.0          | +    | -        |
| Diethylstilbestrol     | 0.015      | 81.0          | -    | -        |
| Ethenzamide            | 0.5        | 15.0          | +    | -        |
| Ethylvanillin          | 0.25       | 43.0          | -    | -        |
| Hexane                 | 0.5        | 10.0          | -    | -        |
| Hydrochlorothiazide    | 0.5        | 12.0          | +    | -        |
| Metformin              | 2.0        | 27.0          | +    | -        |
| Nitrobenzene           | 0.5        | 12.0          | -    | -        |
| <i>o</i> -Nitrotoluene | 0.25       | 14.0          | -    | -        |
| <i>m</i> -Nitrotoluene | 0.25       | 23.0          | -    | -        |
| <i>p</i> -Nitrotoluene | 0.25       | 53.0          | -    | +        |

細胞を回収し、そこで陰性であった場合には、第2回目にもっと時間を延長した実験を追加するようになっている (Kirkland, 1990) が、我が国の手法の方が同じ実験条件下で1回ですむため、より合理的と思われる。

諸外国では、倍数体の記録は要求されていない傾向にあるが、2回目の回収時 (細胞分裂2回目) に観察することは容易であり、意味のあることと思われる。

我が国では、S9法で同じ条件でS9mixを加えない群を設けているが、S9mixの影響を見る上で極めて重要な対照群の1つと考えられる。この点も、今後国際的な調整が必要であろう。ある種の化合物、例えば、2-amino-9H-pyrido[2,3-B]indole acetate (AAC) では、直接法では、倍数体が顕著に出現するが、S9mixを加えるとその作用はなくなり、構造異常が出現してくるようになる。主に倍数体を出現させる化合物をTable 3に示す。このうちには発がん性を示す diethylstilbestrol (DES) も含まれているが、これらの多くは Ames テストでは検出されない。倍数体あるいは異数性を誘発する物質の安全性については今後に残された課題である。

### 3. 小核試験

#### 1) 意義と有用性について

培養細胞を用いる試験は感受性が高いが、生体内の事象を全て反映しているわけではない。そこで、もし陽性となった場合には *in vivo* 系でその作用を確認する必要がある。*in vivo* 系小核試験

は、比較的感受性の高い手法として国内外で広く用いられている。その遺伝学的指標は、あくまでも染色体の異常 (数および構造) にあるが、現在のところ、これに代わり得る簡便な手法はない (林, 1990)。本試験で陽性となった場合には、被験物質あるいはその代謝活性物質が骨髄に達し、染色体を損傷したことになるが、同時に、他の臓器、例えば生殖細胞にも危害を及ぼしている可能性は高い。但し、陰性に終わった場合には、骨髄に到達していない場合も考えられるため、さらに別の臓器組織を標的とする *in vivo* 法 (例えば肝のUDSなど) を追加すべきであろう。

#### 2) 投与経路、回数、標本作製時期について

投与経路は、被験物質の用途によって変わってくるかも知れない。医薬品の場合も、臨床経路を主張する向きもあるが、まず、試験系として比較的感受性の高い経路 (腹腔内) を選択すべきであろう。

投与回数の問題は、国内外で議論の多いところである。1回投与で十分な効果が得られなくとも、2~3回の投与によって、陽性となる場合も知られている。回数は標本作製時期と密接な関係にあるが、繰り返して投与することによって効果が加算される場合もある。現在では1日1回、2日間投与した後、24~30時間目に1回標本作製する方法が一般化されつつある。我が国では、EMS-MMS 分科会を通じて、使用動物の系統、性差、投与経路、標本作製時期、などに関する広汎な共同研究がなされ、その業績は諸外国でも高く評価されている。

Table 4. 哺乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の強さ  $D_{20}$  (値) とマウス小核試験結果との比較

| Compound tested        | Chromosome test $D_{20}$ (mg/ml) | Micronucleus test Dose (mg/kg, i.p.) |
|------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Mitomycin C            | 0.00001                          | 3                                    |
| 4-NQO                  | 0.00032                          | 80                                   |
| 5-FU                   | 0.00038                          | 100                                  |
| MNNG                   | 0.0028                           | 50                                   |
| ENU                    | 0.063                            | 50                                   |
| Potassium bromate      | 0.071                            | 100                                  |
| Sodium nitrite         | 0.32                             | 200                                  |
| Fast Green FCF (crude) | 2.0                              | 2,000                                |
| Potassium bromide      | 3.7                              | 500                                  |
| Acid Red               | 4.7                              | 1,600                                |
| Propylene glycol       | 20.0                             | 15,000                               |

### 3) 小核試験の限界

小核は染色体自体を見ていないという批判もあるが、理論的には染色体の切断によって生ずる小核は小型であり、染色体の不分離によって生ずる小核は大型である。この両者の関連は、間接的ではあるが、DNA量を比較することによって実証されている。また、発がん性物質のすべてが本試験で陽性となるとは限らない。骨髄に作用して白血病を発生するような物質では当然陽性となるが、他に標的臓器を持つような物質、あるいは、骨髄に到達する以前に分解、解毒されてしまうような物質では、当然陰性に終わる。特に *in vitro* の染色体異常試験でかなり高い値 (例えば  $D_{20}$  値が 0.1 mg/ml 以下) が得られた場合には、たとえ、小核試験が陰性であっても、その被験物質の安全性が保証されたわけではない。前記した如く、他の試験を追加する必要がある。

### 4. 結果の総合的評価

#### 1) 定量的評価の重要性について

米国では、NTPあるいはGene-Tox計画で得られたデータを単に陽性、陰性という具合に定性的に把握し、その結果をヒトあるいは動物に対する発がん性の有無とを比較し、変異原性試験法の感受性、信頼性、などを議論している。しかし、果たしてこれでよいのであろうか。実際、変異原性試験のデータを見ると、Amesテストでも、染色体異常試験でも、弱いものと強いものがあり、その間には極端な場合  $10^7$  倍もの開きがある。(図

4上段参照)。例えば、CHL細胞を用いた染色体異常試験の場合、カラメルは8 mg/mlで13%、mitomycin Cは0.04  $\mu$ g/mlで42%の異常を誘発する。Table 4に他の例を示す。染色体試験で弱いもの ( $D_{20}$  値の高いもの) は、小核試験で陰性となり、発がん性試験でも陰性となる確立は高い。

我が国のガイドラインでは、得られた結果について、可能な限り、定量的な評価も行うよう指導されている。

#### 2) 試験法の組み合わせ

どのような試験を組み合わせ (バッテリー) として行うかという問題は、各国の事情や、対象物質の種類、使用目的などによって、必ずしも統一見解に至っていない。

最近、米国EPAは化学物質の規制 (FIFRA, OPP) に関する基本的な考え方を公表した (Dearfield, et al., 1991)。ここでは、培養細胞を用いる染色体異常試験の代わりに、マウス・リンパ腫を用いる突然変異試験があげられている。この試験のうち、小型のコロニーは染色体異常に関連して出現するためであるという。この考え方が、我が国をはじめ、他の諸外国でどの程度受け入れられるかは極めて疑問である。著者は著者なりのコメントを公表しておいたので参考とされたい (Ishidate, 1992)。

我が国のガイドラインの作製時における基本的な考え方は、UKあるいはEECとあまり大差はない。即ち、

(1) *in vitro* 試験として、Amesテストおよび

染色体異常試験を行う。

- (2) その結果、共に陰性であった場合は、一応変異原性はないものとする。但し、医薬品や食品添加物その他のヒトによって暴露量が高いと思われるものについては、さらに *in vivo* 試験として小核試験を追加する (3 点セット)。
- (3) もしも、どちらか一方が陽性であった場合 (定量的評価を含む) は、小核試験を行う。
- (4) 両者が共に陽性であった場合は、発がん性の可能性があると考えられる。
- (5) 小核が陰性であった場合は、他の *in vivo* 試験 (肝臓を用いる UDS その他) を追加することが望ましい。この際、被験物質の生体内動態を考慮に入れる。
- (6) 小核が陽性であった場合は、発がん性あるいは遺伝毒性のある可能性がより高くなる。
- (7) 他の *in vivo* 試験が陰性であった場合は、“*in vitro* 変異原” であっても生体内では変異原性はないと考えられる。
- (8) 他の *in vivo* 試験で陽性となった場合は、(6) と同じように考える。

参考までに Fig. 6 に Tweat らのチャートを示す。

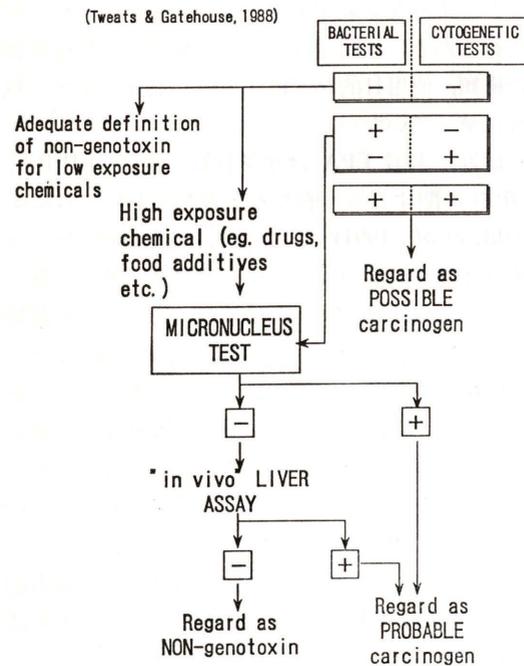


Fig. 6

## 5. おわりに

ガイドラインおよび試験法プロトコールは、必ずしも固定したものではない。新しい学問の発展によって、その内容と考え方は変わって行くことがむしろ自然と思われる。問題は、ガイドラインはあくまでも基本的な基準であり、その内容にはある程度の幅 (flexibility) を持たせるべきであろう。例えば陽性対照の選択などは、研究者の判断に委ねるべきである。

次に、ガイドラインに示された試験項目は最少単位であるということ認識すべきである。これだけやればよいという考え方は間違いである。特に、その物質の安全性を実施するためには、試験項目が多ければ多いほど信頼性が増してくる。今は、生産者側の責任が問われる時代に入っているためである。

ガイドラインにそって、染色体異常試験あるいは小核試験を行う場合には、当然のことながら、各官庁で定める GLP 基準を満たす研究施設と人材が要求される。本学会会員の大半は企業人であり、大学、あるいは国立研究機関に属する先生方の中には GLP という言葉さえ知らない方がおられる。ガイドラインの作製にあたって最も重要なことは、その内容が理論上のものではなく、しっかりした学術的基盤の上にたっているかということであろう。英国では、環境変異原学会 (UK-EMS) のもとに専門委員会が組織され、基本的な考え方、並びに試験法ガイドラインが作製された。残念ながら我が国においては、研究は学術的なものであり、行政の問題は別であるという風潮がある。このためには、企業はもとより、民間の試験受託機関の質的向上と人材の養成が必要なのかも知れない。

## 参考文献

- Ashby, J., F. J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B. H. Margolin, B. E. Matter and M. D. Shelby (1985) Evaluation of short-Term Tests for Carcinogens, Prog. in Mutat. Res., 5, Elsevier Sci., Pub., Amsterdam.
- Dearfield, K. L., A. E. Auletta, M. C. Cimino and M. M. Moore (1991) Mutat. Res., 258, 259-283.
- Galloway, S. M., A. D. Bloom, B. H. Margolin,

F. Nakamura, P. Archer and E. Zeiger (1985) Development of a standard protocol for *in vitro* cytogenetic testing with Chinese hamster ovary cells: Comparison of results for 22 compounds in two laboratories, Environ. Mutagen., 7, 1-51.

林 真 (1991) 小核試験, 医薬安全性研究会モノグラフシリーズ, No. 2 サイエントリスト社.

Ishidate, M. Jr., M. C. Harnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures, Mutat. Res., 195, 151-213.

石館 基 (監修) (1988): *in vitro* 染色体異常試験データ集, LIC.

石館 基 (1991) 規制に関する国内外の動向, 続医薬品の開発, 第 11 巻, 医薬品の変異原性・遺伝毒性 (石館基監修), PP. 386-394.

石館 基 (監修) (1991): 微生物を用いる変異原性試験データ集, LIC.

Ishidate, M. Jr. (1992) Comment on the US EPA recommendation for genotoxicity guidelines on chemicals, Mutat. Res., 272, 79-80.

Kirkland, D. J. (Ed.) (1990) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, Cambridge Univ. Press Cambridge.

Scott, S. M., S. M. Galloway, R. R. Marshall, M. Ishidate, Jr., D. Brusick, J. Ashby and B. C. Myhr (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions, A report form ICPEMC Task Group 9, Mutat. Res., 257, 147-204.

Sofuni, T., A. Matsuoka, M. Ishidate, Jr., E. Zeiger and M. D. Shelby (1990) A comparison of chromosome aberration induction in the CHO and CHL cell systems by 25 compounds, Mutat. Res., 241, 175-213.

シンポジウム 「なぜ変異原性試験を行うのか」

## 変異原性試験のハーモナイゼーションの 必要性について

武田薬品工業・医薬開発本部 菊池 康基

### 1. はじめに

医薬品の製造、輸入承認には申請のため膨大な資料が必要とされるが、日米欧の間では品質、有効性、安全性に関する基準や試験方法に違いがある。医薬品の輸出入に当たっては、その国の規制に合った資料を用意せねばならず、このため科学的には意味がなくても、同種試験を繰り返したり、追加試験を実施せざるをえない。これを避けるためには、申請資料の世界的共用や試験方法の統一、あるいは異なる方法で実施された試験データの相互受け入れが重要となる。

試験の繰り返しや追加が不要になれば、世界中でその分の労力、経費、時間の節約になり、優れた医薬品を速やかに各国の患者に提供することが可能となる。また、臨床試験の削減は患者の人権擁護の上からも好ましく、動物実験の減少は動物愛護の面から、海外では強く求められている。

このように、各国の毒性試験に関するガイドライン等を、科学的な原則に基づいて調和させることは、世界的な重点課題となってきている。JEMS News No. 38 (1992) の巻頭言にも書いたように、医薬品の分野でもガイドラインの国際調和(ハーモナイゼーション)が強く叫ばれ、最近、薬事規制の調和のための国際会議、International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) が開催される運びとなった。

### 2. ICH について

ICH では、医薬品の品質、有効性(臨床試験)及び安全性の3分野について、種々の課題が検討されている。安全性に関しては、第1回 ICH (1991年11月)で、一般毒性、癌原性、生殖毒性試験等について討議され、各国の規制の調和に向けて勧告が採択された。1993年10月の第2回会議では新たにトキシコキネティクスと遺伝毒性とが取り上げられる。

そこで、これらの会議における議論をベースに、ガイドラインのハーモナイゼーションの問題点とガイドラインに対する考え方について述べてみたい。

まず、調和(harmonisation)の意味について、ICHでは、各国の自主性を尊重しつつ、規制の相違を認識し、その解釈を明確にして、相互受け入れの可能性や統一ガイドラインの作成を図る、としている。

筆者は日本製薬工業協会(製薬協)の代表として ICH に参加している。製薬協としては、

- 1) 国際調和には積極的に対応する
- 2) そのためのプロジェクト委員会を設置する
- 3) さらにトピック毎に専門家による supporting group を設置する
- 4) 日本の現状を可能な限り正確に把握し、好ましい調和への方策を立案する、また各種阻害要因についても検討する
- 5) 行政との連絡を密にし、意志の疎通を図ると共に、ガイドラインへ適切に反映させる

〒532 大阪市淀川区十三本町 2-17-85

Necessity of International Harmonisation of Mutagenicity Testing Yasumoto Kikuchi  
Pharmaceutical Development Division, Takeda Chemical Industries Ltd. 17-85 Jusohonmachi 2-chome,  
Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

表1 国内各省庁のガイドラインと変異原性試験の種類

| 省庁<br>関係法令               | 試験の種類       |              |    |            |
|--------------------------|-------------|--------------|----|------------|
|                          | 微生物         | In vitro 染色体 | 小核 | その他        |
| 厚生省                      |             |              |    |            |
| 薬事法                      |             |              |    |            |
| 人用医薬品                    | ◎           | ◎            | ◎  |            |
| 動物用医薬品                   | ◎           | ◎            | ○  |            |
| 食品衛生法                    | ◎ (微生物 2 種) | ○            |    | ○(カイコ, ハエ) |
| 労働省                      |             |              |    |            |
| 労働安全衛生法                  | ◎           | ○            |    |            |
| 農水省                      |             |              |    |            |
| 飼料安全法                    | ○           | ○            |    | ◎(DNA 修復)  |
| 農薬取締法                    | ◎           | ◎            |    | ◎(DNA 修復)  |
| 厚生省<br>通産省<br>環境庁<br>化審法 | ◎           | ◎            | ○  |            |

◎: 実施試験, ○: 前者のいずれかで陽性の場合に実施,

表2 主要各国の医薬品毒性試験ガイドラインで要求される変異原性試験の種類

| 国, 地域 | 試験の種類  |      |              |    |
|-------|--|------|--------------|----|
|       | 微生物  | 培養細胞 | In vitro 染色体 | 小核 |
| 日本    | ◎  |      | ◎            | ◎  |
| EC    | ◎  | ◎    | ◎            | ◎  |
| アメリカ  | No guidelines, but required several tests.                     |      |              |    |
| 北欧    | A small number of well established in vitro and in vivo tests. |      |              |    |
| カナダ   | Several tests should be used.                                  |      |              |    |

◎: 実施試験

6) 会議の場では常に建設的な提言をするという姿勢でこの会議に臨んでいる。

遺伝毒性試験についても、この原則に基づいて討議されることになる。細目については数回の子備会議で検討されているが、minimal test battery, timing, validation of in vivo test results, in vitro mammalian cell mutation tests 等について調和の方策が探られる事になる。

### 3. 変異原性試験のガイドラインについて

米国においては 1969 年に、変異原性試験として優性致死試験、宿主経由試験、及び in vivo 染色体試験の、3 試験を実施することが提唱された (DEHW, 1969)。この勧告は農業に対してのものであったが、翌年 FDA から医薬品についても同じ内容の勧告が提出された (FDA, 1970)。これらは筆者が 1970 年に武田薬品に入社して、変異原性試験を開始したときのバイブル役であり、これ

らの試験を実施するため、今は亡き賀田、土川両先生に種々ご指導を受けた。その後の研究の技術的進展と規制科学の整備とともに、国あるいは国際機関において変異原性試験ガイドラインの制定が進み、また日本においても各省庁から変異原性試験に関するガイドラインが制定されるようになった。表1には各省庁のガイドラインで要求している変異原性試験の種類を示した。表2には主要な国及び地域の医薬品毒性試験ガイドラインで要求される変異原性試験をまとめた。変異原性試験ガイドラインに見られる、これらの相違を克服するためには、国内的には当学会がイニシャティブをとっていただくことが、国際的には日米欧3極の行政と業界との協力による国際会議の場で解決を図ることが、どうしても必要となる。ICH はまさにそのために開催されている。

このような国際調和は、医薬品に限られた問題ではない。広く諸種の化学物質に関する規制につ

いても調和が進むことが望まれている。その意味でも、1933年2月に開催される6th ICEMにおける、規制ガイドラインのオーバービューや、試験手法の国際的標準化などに関するシンポジウムに期待したい。

ICH等の国際会議において、変異原性試験の問題点としてしばしば取り上げられるのは、

- 1) 日本における大腸菌の使用
- 2) In vitro mammalian cell mutation assay の有用性
- 3) GLP (Good Laboratory Practice) に関する日本の省庁間の相違
- 4) ガイドラインに対する基本認識

等である。このうち、1, 2) については、ICHの結論を待ちたい。3) の問題は国際調和をするよりも、もっと難しいと言われており、時間をかけて小さなことから一つずつ解決するより方法がないと思われる。そこで、4) について、考え方を述べてみることにする。

### 4. ガイドラインについて—その考え方と対応—

ICHに代表される国際調和の推進は、ガイドラインについて共通の正しい理解と認識をもつことによって、初めて可能となる。

そのためには、ガイドラインとは何か? という質問に正しく答えなければならない。

しばしば言われることは、欧州各国のガイドラインは basic principle を述べているのに対し、日本のガイドラインは minimum requirement である、ということである。Minimum requirement の意味は、最小限の要求事項と理解していたが、どうもそうではなく、欧米では“書かれたことだけやればよい”という意味に用いているようである。

そこで、厚生省の医薬品のための毒性試験法ガイドライン (厚生省, 1989) について検証してみよう。以下の記述は日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会第66回総会 (1991年) パネル討論“ガイドラインとは”における柳田知司先生 (実中研) と高橋道人先生 (国立衛試) の講演から引用させていただいたことをお断りしておく。

まず、ガイドラインについてであるが、“ガイド

ラインは薬事法に基づく行政指導の一つであり、指針として自由度を与え、原則を示すことが望まれる”と位置付けられている (柳田, 1991)。

次に、行政指導は、その拘束力によって下記の4つに分けられる。

方針: 趣旨に沿えばよく、具体的な方法には制約されない

手引き: 従うことが望まれるが、制約されない

原則: 理由が無い限り、従わねばならない

規則: 書かれていることには、従わねばならない

ガイドラインはこのうちの、「原則」に相当する<sup>4)</sup>。ということは、正当な理由があれば、必ずしもガイドラインに記された方法に従わなくてもよい事を意味している。

しかしながら、実際問題としてはガイドラインを「規則」と解釈している向きが多いことも事実であろう。例えば、ガイドラインには“~することが望ましい”という言葉がしばしば用いられる。この「望ましい」の意味が立場によって異なることが指摘されている (高橋, 1991)。即ち、ガイドラインの策定者側は、これを「必ずしもしなくてもよい (may be)」の意味で使っているのに対し、行政側では「したほうがよい (be better)」の意味になるらしい。更に、企業側、特に開発業務に携わっているサイドに至っては「せねばならぬ (must)」と解釈して、自らの手足を縛っていることなどは、その現れである。

厚生省のガイドライン (厚生省, 1989) の前文には「~本来、すべての医薬品について一律の試験方法を定めることは合理的ではなくまた、試験の進展に応じて新たな試験を追加する必要が起ることも少なくない。したがって、得られた所見が臨床上の安全性評価に資することができるものである限り、必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものではない。」と書かれており、この主旨を十分に尊重することが大切である。

このようにみえてくると、厚生省のガイドラインは、決して従来言われているような「書かれたことだけをやればよいもの」ではなく、「試験の原理、原則を示すもの、あるいは basic package を提示するもの」であり、欧米のガイドラインと全

く同等の主旨で制定されていることが、お解りいただけよう。

### 5. 理想的なガイドライン

ガイドラインの理想像について述べる前に、ガイドラインの得失要因について触れてみたい。先ず、利点としては、

- 1) 試験の統一化
- 2) 評価の統一化
- 3) 必要な試験の特定

などが挙げられる。これにより、個々の試験の科学的水準を維持すると共に、無駄な(意味の無い)試験を排除することができる。また、共通の尺度での毒性評価が可能となり、公正な審査も期待できる<sup>5)</sup>。

一方、欠点としては次のことが挙げられる<sup>6)</sup>。

- 1) 異なる化合物に同一試験を要求すること
- 2) 試験方法が硬直化すること
- 3) 本当に必要な試験が実施されない場合があること

どんなによく作られたガイドラインでも、画一的な取り扱いをすれば、このような欠点が浮き彫りにされる危険性があるので、柔軟な対応の重要性が理解されよう。

国際調和が叫ばれている今日、これからの理想的なガイドラインとしては、

- 1) 普遍性 (consensus)
- 2) 明解性 (specification)
- 3) 柔軟性 (flexibility)
- 4) 国際性 (harmonisation)

の4要素を有することが、必須条件となる<sup>7)</sup>。

これに反し、

- 1) 偏った言説に基づく独善的手法
- 2) 科学的根拠のない事項
- 3) 柔軟性に欠け、選択の余地がない
- 4) 評価の定まっていない方法の実施

などの事項を含んだりあるいは強要する場合には、不適切なガイドラインと言わざるをえない<sup>8)</sup>。

そこで、より好ましいガイドラインとするためには、

- 1) ガイドラインの定期的な見直しをすること
  - 2) 特定(例外的)なケースに対し、科学的基盤に基づいた対応をとること
  - 3) 例外的なケースの情報収集と、それらの普遍化を図ること
- などについて、常に心掛けなければならない<sup>9)</sup>。

### 6. 結論

ガイドラインは試験手法の原理・原則を示すものである。従って、個々の化合物について、安全性評価のために最も適切な試験を実施するにはどうしたらよいか、ということを経験者は常に考えなければならない。単に、ガイドラインに書いてあることを実施するだけならば、研究者は不要である。毒性試験法ガイドラインの前文は飾りではない。その主旨を十分に理解して、柔軟に対応することが求められる。

毒性試験の国際調和が進展することによって、統一ガイドラインの作成、あるいは試験データの相互承認が行われるようになる。そして、ガイドラインに対する共通認識と、それに基づく統一的な評価系が構築され、世界各国に通用する質の高い試験データが求められるようになる。それに伴い、研究者の責任は今後ますます増加するとともに、研究者の資質についてもより一層の向上が求められることになる。

### 参考文献

- Food and Drug Administration Advisory Committee on Protocol for Safety Evaluation (1970) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 16, 264-296.
- 厚生省薬務局 薬審 1 第 24 号 (1989).
- "Report of the Secretary's Commission on Pesticides and Their Relationship to Environmental Health", U.S. Department of Health, Education, and Welfare, (1969).
- 高橋道人 (1991) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会第 66 回総会, パネル討論 "ガイドラインとは".
- 柳田知司 (1991) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会第 66 回総会, パネル討論 "ガイドラインとは".

### シンポジウム: 「なぜ、変異原性試験を行なうのか」

及び「変異原性試験で何がわかるか: 問題点と展望」

### アンケート調査による企業からの提言

武田分析研究所 坂本 豊<sup>1</sup>  
山之内製薬・研開総括本部 大島 稔彦<sup>2</sup>  
資生堂 安全性・分析センター 杉山 千代美<sup>3</sup>  
大塚製薬・徳島研究所 柴原 俊一<sup>4</sup>

### 1. はじめに

「変異原性試験で何がわかるか」と問われて、どう答えようかと考える人、「候補化合物の安全性が分かる」という人、「癌原性物質が分かる」という人もいるだろう。

次々と新たな試験法や検出系が工夫され、多数の変異原性物質が検出されて、食品や焼けこげや環境中の化学物質の変異原性が人々の日常の会話でも話題となる時代となった。しかし、変異原の作用や毒性は正当に評価されているだろうか。

さて、新規化学物質の有害性調査に変異原性試験が採用されて (1979, 労働省基発第 107 号) 以来、国内外で変異原性試験は安全性試験として不可欠となり、それに伴いいくつかの試験法ガイドラインが制定され、企業及び試験研究機関に所属する変異原研究者の多くがこの試験にかかわってきた。

ところで、日本環境変異原学会は創立後 20 年を経過し、一つの節目を迎えた。この機会に、本大会組織委員会は企業の研究者の意見も入れて、シンポジウムの一部に従来のものとは異なるテーマを選んだ。「なぜ変異原性試験を行なうのか」と「変異原性試験で何がわかるか: 問題点と展望」の二つである。一見地味だが総合的でとても重要な問題をシンポジウムのテーマにした、意外性というか先見性は、一部の参加者に戸惑いを感じさせることになったかもしれない。

これらのシンポジウムの企画に際し、安全性評価のために変異原性試験を実施されている企業・組織・試験研究機関の方々の、日頃の変異原性試験に対する考えやいくつかの問題、例えば研究者・試験従事者の置かれている現状と抱えている問題、変異原性試験のもつ意義と問題点、企業における変異原性試験実施状況とガイドラインの影

- 1) 〒532 大阪市淀川区十三本町 2 丁目 17-85
  - 2) 〒174 東京都板橋区小豆沢 1 丁目 1-8
  - 3) 〒223 横浜市港北区新羽町 1050
  - 4) 〒771-01 徳島市川内町加賀須野 463-10
- A Proposal Conveyed in Questionnaire about Problems around Mutagenicity Tests and Guidelines: Voice of The Researchers in Corporate and Contract Laboratories. Yutaka SAKAMOTO<sup>1</sup>, Toshihiko OSHIMA<sup>2</sup>, Chiyomi SUGIYAMA<sup>3</sup> and Toshikazu SHIBAHARA<sup>4</sup>.
- <sup>1</sup>Takeda Analytical Research Laboratories, Ltd. 17-85 Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi 532, Japan
- <sup>2</sup>R & D Planning & Coordination Division, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., 1-8 Azusawa 1-chome, Itabashi-ku, Tokyo 174, Japan
- <sup>3</sup>Shiseido Safety & Analytical Research Center, 1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohamashi 223, Japan
- <sup>4</sup>Tokushima Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. 463-10, Kagasuno Kawauchi-cho, Tokushima-shi 771-01, Japan

響、さらには学会への要望を含む変異原研究の将来への展望などについての意見を聞くために、大会組織委員会により本アンケート調査は実施された。

対象は変異原性試験を実施あるいは外部に依頼している企業・試験研究機関（国公立機関は除く）の300施設で、その中には学会員のいない機関も98含まれ、また、同一機関の複数部門（遠隔地に独立して試験部門がある場合や、組織が大きくて全員の意見を反映しにくい場合など）に送付したのが34含まれていた。回収は学会員のいる機関91（回収率45%、同一機関の別組織が回答したのは3機関だけなので、重複発送分を除外すると53%を越える）、学会員のいない機関は18（回収率18%）の合わせて110通であった。なお、回答者の年代は五十代5、四十代37、三十代47、二十代17、不明4であり、事務系の回答者は従事者のいない企業も含めて数名以下で、後は中堅的な研究者・試験従事者と考えられる。

ここではアンケート集計結果の概略の紹介とまとめを行なうが、本報告で省略した設問も含め、集計結果の詳細は別掲を参照していただきたい。

## 2. 変異原性試験従事者の現状と問題点

設問 1, 6, 5, 13~17, 10

回答機関を実験従事者数で分けると、企業で従事者なし14企業（全回答機関の13%、以下同じ）、従事者1~2名26企業（24%）、3~4名32企業（29%）、5~16名20企業（18%）の合計92企業（84%）、受託機関では従事者2~3名7機関（6%）、5~13名11機関（10%）の合計18機関（16%）であった。

所属している従事者の経験年数は、女性では企業と受託機関とで大差はなく、8年以上11~12%、8年以下7~9%、5年以下36~37%、2年以下21~24%、1年以下20~21%であった。男性ではベテランが多く、8年以上の経験者は企業で22%、受託機関では35%で、8年以下15~16%、一方新人を含めた5年以下は企業で61%、受託機関で50%弱であった。また、企業、受託機関を問わず他部門と兼務の方も数%おられた。

試験毎の従事者数は企業と受託機関との差よりも試験機関の規模を示す従業員数の違いによる差の方が大きかった。

実験者の現状では、「質量とも十分/需要相応の体制が整っている」に対し、「質量とも不十分/人数不足/人材不足/他試験・他業務との兼務」の回答を順に表示すると、企業研究所では10/1及び42/14/6/2の合計75であり、受託機関では4/0及び3/6/4/1の合計18で、満足に対する不満足割合は4~6倍であったが、従事者が多くなる（企業の規模も大きくなる）に従い、不満足割合は減っていった。

試験従事者の試験技術習得は企業・受託機関合わせて自機関内習得よりも国公立機関・他機関・大学など外部での習得が多く、その回答数はエイムス試験で39:53、染色体異常試験で24:59、小核試験で38:43であったが、経験者の採用もそれぞれの試験で9/10/6の回答があった。

3 試験以外の試験については、回答していない機関の方が多いのではないかと考えられ、明白な特徴はつかめなかった。

技術習得後の教育・訓練では、いずれの試験でも少数の自己啓発を含めて自機関内学習が一番多かったが、ついで学会参加、講習会派遣と続き、教育不実施はごくわずかであった（複数回答）。

研究発表の機会では、業務上実施不可能という回答が企業の試験機関のみで7.5%あり（業務上制限6.3%、特に方針なし23.8%についても企業の試験機関の方が受託機関よりも多かった）、一方、企業活動の宣伝のために奨励の回答が受託機関で20%もあったが、それ以外の項目では企業と受託機関で回答率は比較的類似しており、レベル維持のために奨励がいずれも35%、自主的判断に任せているが25~26%であった。

研究の機会では企業の試験機関で基礎研究実施33.3%、日常業務の結果を学会発表18.9%、国内外の留学・派遣合わせて8.1%など比較的機会があるケースと、企業研でも人手不足で研究の余裕なし12.6%、業務上実験結果の発表不可10.8%、試験分析部門だから研究困難5.4%、ふさわしい研究課題なし3.6%、担当者の経験年数不足で研究困難2.7%など恵まれない場合もあった。

受託機関でも同様に基礎研究実施36.7%、日常業務の結果を発表6.7%、国内外留学・派遣合わせて16.7%など機会があるケースと、試験分析部門だから研究困難13.3%、人手不足で研究の余裕なし6.7%、業務上実験結果の発表不可6.7%、試験担当者の経験年数不足で研究困難3.3%など恵まれない場合もあった。興味深いのは、企業でも受託機関でも、Ames test 連絡会やMMS研究会の共同研究なら参加できるケースが小数例あることで、これらの会が情報交換や教育の場だけではなく、研究の機会も作り出していることを示していた。

試験従事者の現状に対する満足度は、企業の試験部門では①製品開発などに貢献しやりがいがあり18、②基礎研究や社外発表容易13、③新技術や新手法の導入容易11、④技術に自信9、⑤今後発展する業務8、⑥試験依頼者からの信頼あり6、⑦学べる同僚・先輩あり4、など合わせて73あった。しかし、不満足な点も117あり、内容は①設備不十分24、②基礎研究の時間がない23、③人員増加要求不承認21、④人材拡充要求不承認20、⑤新技術の導入困難9、⑥将来性を感じられない5、などであった。

受託機関の従事者の現状に対する満足度は、①新技術や新手法の導入容易5、②技術に自信4、③基礎研究や社外発表容易3、④依頼者からの信頼あり3、⑤今後発展する業務2、⑥学べる同僚・先輩あり2、⑦他機関にない技術保有2、⑧親企業の庇護が十分にある2、など合わせて23であった。一方、不満足な点は40あり、内容は①多忙だが収益・収入が少ない8、②価格競争が厳しい7、③人員増加要求不承認7、④基礎研究の時間がない5、⑤設備不十分3、⑥新技術の導入困難3、⑦人材拡充要求不承認2、⑧将来性を感じられない2、⑨得意技術が活かさない2、⑩依頼者との交流なし1、などであった（いずれも複数回答）。

一例だけあった試験機関を持たない企業からの現状に対する不満足は、国内で試験が実施できないというもので、海外でのデータを国内申請用に改めるだけの作業ではせっかくの知識や技術が十分活かせないと疑問を感じているようであった。

あらためて新手法の導入状況や基礎研究の実施状況を問うと、企業ではどちらの場合も同じパターンで、容易と答えたのは従事者5人以上の企業は2人以下の企業の2倍であった。受託機関でもこの傾向は認められたが、新手法の導入よりも基礎研究実施において機関格差が顕著であった。

これらのことが困難な理由を問うと、企業ではルーチン作業が多忙など時間不足、人材不足、人員不足、さらには会社・業務へのメリットなし、設備不十分、専任でない、などを挙げたが、受託機関では、さらに収益性が低いので経費がかかれない、受託機関だから基礎研究は無理だ、などの回答も見られた。なお、新手法の導入が困難な理由として、「ガイドラインがあるためその枠に縛られ、それ以外を実施することは認めてもらえない」などの回答が企業で合わせて6例もあったのが注目される。

なお、化学物質の安全性評価を行なう変異原性試験部門が企業や組織全体の安全性対策に貢献しているか、との質問に対しては、企業・受託機関を合わせて役立っている17%、少し役立っている39%、今後役立てたい3%、役立っていない41%で、とてもそれまで手が回らないのか、あるいは自分たちの業務ではないという感じでもあった。

## 3. 実施している変異原性試験

設問 7

日常的に実施されている試験は企業・受託機関ともに、いわゆる3点セット（エイムス試験・in vitro 染色体異常試験・マウス小核試験）が圧倒的に多いが、研究的に実施している試験は企業・受託機関を含めて末梢血小核試験、姉妹染色分体交換試験、in vivo 染色体異常試験、細菌修復試験、培養細胞遺伝子突然変異試験など広範囲であった。他方、現在中止した試験は、農薬取締法のガイドラインでは必須の細菌修復試験、姉妹染色分体交換試験、医薬品の安全性試験として初期に多用された優性致死試験、その他umu test、in vitro 染色体異常試験、in vivo 染色体異常試験、我が国のガイドラインでは必須でない培養細胞

遺伝子突然変異試験, マウススポット試験, などであった。必要性や需要だけでなく技術上や結果の明確性の問題もあろう。

#### 4. 変異原性試験の目的

設問 8, 9, 3, 18

92 企業についての試験目的は①安全性確認・受託 82, ②ガイドラインで要求 61, ③新製品探索研究 46, ④基礎研究 33, ⑤化学構造と活性相関 19, ⑥試験法の開発 16, ⑦代謝研究 8, などの順だった。18 の受託機関では①安全性確認・受託 18, ②基礎研究 8, ③ガイドラインで要求 6, ④試験法の開発 6, などであった。

検出対象や目的は, 企業で①癌原性予測 81, ②遺伝毒性 72, ③環境変異原 50, ④抗変異原 21, ⑤胎児毒性 18, などであり, 受託機関では①癌原性予測 16, ②環境変異原 16, ③遺伝毒性 11, ④抗変異原性 5, などであった。

ただし 6 章以下で示すように, 変異原性試験が癌原性の予測や遺伝毒性の検出にどの程度貢献しているか疑問を持ちながらの実施と考えられる。

試験する被験物質は, 企業では①医薬品 69, ②新規化学物質と製造中間体 56, ③代謝物 22, ④化成品 20, ⑤バイオ製品 19, ⑥農薬 18, ⑦生薬・植物製品 18, ⑧食品添加物 17, ⑨化粧品 13, ⑩動物用医薬品 13, ⑪食品 9, ⑫金属化合物 7, ⑬飼料添加物 4, などであった。

受託機関では①医薬品 15, ②新規化学物質と製造中間体 14, ③農薬 9, ④食品添加物 6, ⑤食品 4, ⑥化粧品 4, ⑦化成品 4, ⑧動物用医薬品 3, ⑨生薬・植物製品 3, ⑩代謝物 2, などで, 企業で比較的多数が実施している代謝物やバイオ製品は受託機関での実施例は少なかった (いずれも最大 5 までの複数回答)。

なお, 自機関における変異原性試験の重要度を尋ねると, 企業では高いあるいは高いと思いたいと答えたのは 51 (61%) であったが, 受託機関では (12%) しかなかった。

#### 5. 変異原性試験外部委託の状況

設問 12

企業の 6 割が外部委託をしており, その理由としては①自社処理能力を越えた時, ②社内は GLP 未対応, ③人手不足, などが多かった。また, 依頼先は国内機関だけでなく国外機関も相当含まれているようだが, 国外機関のみという企業は少なかった。受託機関に対する満足度は高く不満足は 8 倍以上あり, しかも受託機関に対する不満の中で質的不満はわずかのようであった。

#### 6. 変異原性試験を癌原性予測に用いる意義

設問 21

回答数を, 意義あり/意義なし/どちらともいえない/分からないの順で並べると (無記入は省略), エイムス試験については, 従事者のいない企業 (14) は 0/0/2/1 であり, 従事者のいる企業 (78) は 52/1/7/0, 受託機関 (18) では 9/1/4/0 で, 回答の 79% が意義ありであった。染色体異常試験については, 従事者のいない企業は 0/1/1/0 であり, 従事者のいる企業は 33/3/16/1, 受託機関では 5/1/7/0 で, 回答の 56% だけが意義ありと答えた。マウス小核試験については, 従事者のいない企業は 2/0/0/0 であり, 従事者のいる企業では 34/1/14/2, 受託機関では 7/0/6/0 で, 回答の 65% が意義ありと答えた。

変異原性と癌原性の関係で, 正の相関あり, あるいは相関性が高いと答えた機関 (企業+受託) は, エイムス試験で 62 (83%), 染色体異常試験で 37 (55%), マウス小核試験で 40 (62%) であった。結果として, エイムス試験は癌原性との相関性が高いという回答が一番多かった。

変異原性と癌原性の関係は定量的よりも定性的という回答が多く, 企業と受託機関を合わせるとエイムス試験では 44 (59%), 染色体異常試験では 37 (55%), 小核試験では 39 (60%) で, いずれも同程度の率であった。

#### 7. 3 点セットの問題点

設問 20, 24

薬事法ガイドラインのいわゆる三点セット (エイムス試験, in vitro 染色体異常試験, マウス小

核試験) を中心とした評価系に対する反応は, 企業と受託機関を合わせて, ①問題点あり 58, ②分からない 21, ③現状でよい 19, ④満足している 2, ⑤必要条件だ 1, ⑥無記入 9 で, 現状肯定は合計しても 22 (回答者の 22%) であった。

3 点セットの問題点のより詳細な結果は別掲を見ていただくことにして, ここでは大まかに分類すると①3 点セットは完璧なセットではなく補完試験を必要とするのにそれが重要視されていない 20, ②個々の結果が異なるときの総合評価 (試験方法のバリデーションと位置付けを含む) の検討が不十分 17, ③小核試験結果を in vivo 試験というだけで過大評価していないか? 10, ④染色体異常試験関連 6, ⑤エイムス試験・その他 5, の合わせて 58 であった。

#### 8. 実施試験とガイドライン

設問 34, 35, 33, 37

関係あるガイドラインは国内外, 医薬品から飼料添加物まで多岐にわたったが, ①医薬品 (薬事法) 83, ②新規化学物質 (安衛法) 73, ③同新規化学物質 (化審法) 60, ④農薬 (農薬取締法) 41 の 4 ガイドラインで全体の 86.8% を占め, ⑤OECD 15, ⑥EPA 8, ⑦動物用医薬品 5, ⑧EEC 4 までを含めると全体の 97.6% であった。

業務とガイドラインの関係では, それぞれのガイドラインごとに企業と受託機関を合わせた合計で見ると, ①医薬品 (薬事法) ガイドラインでは, GLP 基準対応 46, 業務上従わざるを得ない 30, 全面的に従う 13, クリアすれば十分 9 など総計 102 の回答があり, ②安衛法ガイドラインでは GLP 基準対応 36, 業務上従わざるを得ない 17, 全面的に従う 12, クリアすれば十分 12 など総計 84 の回答があり, ③化審法ガイドラインでは GLP 基準対応 27, 業務上従わざるを得ない 9, 関係ないが参考にする 7, 全面的に従う 6, クリアすれば十分 6 など総計 57 の回答があり, ④農薬取締法ガイドラインでは GLP 基準対応 15, 業務上従わざるを得ない 9, 全面的に従う 5, クリアすれば十分 3 など総計 38 の回答があり, ⑤OECD ガイドラインでは GLP 基準対応 6, 関係ないが参考にする 3, 業務上従わざる

を得ない 3, など総計 13 の回答があった。

ガイドラインで規定された試験の目的は何だと思ふかの質問では, それぞれのガイドラインごとに企業と受託機関を合わせた合計で見ると, ①医薬品 (薬事法) ガイドラインでは, 定性的な評価方法 31, 定性的なスクリーニング 20, 定量的なスクリーニング 10, 定量的な評価方法 9, どれだとは言えない 7, の合わせて 77 回答あり, ②安衛法ガイドラインでは, 定性的なスクリーニング 19, 定量的なスクリーニング 15, 定性的な評価方法 13, 定量的な評価方法 12, どれだとは言えない 5, の合わせて 64 回答あり, ③化審法ガイドラインでは, 定性的なスクリーニング 15, 定性的な評価方法 10, 定量的なスクリーニング 8, 定量的な評価方法 7, どれだとは言えない 4, の合わせて 44 回答あり, ④農薬取締法ガイドラインでは, 定性的なスクリーニング 11, 定性的な評価方法 7, 定量的なスクリーニング 4, どれだとは言えない 4, 定量的な評価方法 3, の合わせて 29 回答あり, ⑤OECD ガイドラインでは, 定性的なスクリーニング 4, 定性的な評価方法 4, 定量的なスクリーニング 1, 定量的な評価方法 1, どれだとは言えない 1, の合わせて 11 回答あり, いずれの場合も定性的が定量的より多く, 特に医薬品ガイドライン以外は「定性的なスクリーニング」が一番多かった。

ただし, 興味深かったことは, 医薬品ガイドラインで定性的スクリーニング (定性的評価) を選んだ機関の一部が安衛法ガイドラインでは定量的スクリーニング (定量的評価) を選んだことで, 「定量的」のついた項目を全体で割った % は医薬品/安衛法/化審法/農薬の順に計算すると 25/42/34/24 となり, 安衛法で比活性の計算を要求していることの反映かもしれない。

試験実施方法では, 「ガイドラインの通り」というのがいずれの国内ガイドラインでも全体の 6 割前後で多いのは当然であるが, 「一部修飾している」という回答の全体に対する % を求めると医薬品/安衛法/化審法/農薬/OECD の順に計算すると 23/18/19/16/43 となり, OECD ガイドラインでは多いことが目立った。

ガイドライン関連の情報をどのようにして入手

しているかの質問には、「加入業界団体から」、「官公庁からの通達で」、「ガイドブック・解説書等で」、「講習会・セミナーで」、などそれぞれの機関が複数の手段で入手していることを窺わせたが、中には「担当者の個人的ルートで」とか「自社独自のルートで」、「顧客を含む他社に問い合わせる」、などととも「十分に入手できていないように思う」も少なからず見られた。

ガイドラインに関する自由意見を求めると、企業研究所では 34、受託機関では 18 の回答が得られた。回答は多様なので、詳細は別掲を見ていただきたい。別の設問においてガイドライン関連で充実して欲しいことを尋ねた質問の回答（企業 389、受託機関 93）と合わせて見てみると、ハーモニゼーション関連、個々の試験の有用性の統一的評価、評価方法の標準化、推奨される補完試験の紹介、安衛法ガイドラインへの要望、試験の選択や試験方法の自由度の増加、逆に均質なデータを得るための精度管理の強化、ガイドライン改訂に先立ち試験従事者等からの要望を反映させる公式ルートの確立、などが目立った。ガイドラインには従うが、上から与えられたものとして盲従せず、安全性評価試験従事者としての責任において、どのような内容が望ましいか、をそれぞれが切実に考えていることを窺わせた。

## 9. 新製品の開発中止と変異原性試験

設問 31

企業が、製品の開発を中止するときの判断に変異原性試験をどのように利用しているかを尋ねたところ、変異原性試験だけでは中止しない 22、総合的な判断 7 と、変異原性試験結果だけで判定しないケースも多かったが、エイムス試験 (A) 陽性だけで中止 13、マウス小核試験 (M) 陽性だけで中止 13 のように単独の試験結果だけで判定する場合もかなりあった。ただし、染色体異常試験 (C) 陽性だけで中止するとの回答は 0 であった。

組み合わせた場合は、AM 陽性で中止 5、AC 陽性で中止 3、CM 陽性で中止 2、ACM 陽性で中止 2、他の変異原性試験 (in vivo UDS 試験、培養細胞遺伝子突然変異試験、他の小核試験、シ

ョウジョウバエ翅毛スポット試験など) の結果も加えて判断 2、などであった。

## 10. 各試験法の手法上の問題点

設問 22

エイムス試験では、①前培養方法と実験までの菌液保管条件関連 14、②復帰変異コロニー数のバラツキ関連（許容範囲、管理方法、基準値からはずれた場合の処置について）13、③生育阻害の判定・抗菌性物質の試験関連 13、④ガイドライン関連 8、⑤溶媒・試薬関連 6、⑥菌株関連 6、⑦その他 8、の合計 68 であった。

In vitro 染色体異常試験では、①観察・分類方法関連 15、②プロトコル関連 7、③高濃度や沈澱の出る濃度での処理への疑問 6、④モノセレクター関連 4、⑤溶液調製・処理関連 3、⑥代謝活性化関連 3、⑦用量関連 3、⑧その他 3 の合わせて 44 であった。

マウス小核試験では、①使用動物関連 5、②投与経路と投与スケジュール関連 5、③標本作成時期などプロトコル関連 4、④被験物質が骨髄に到達していることの確認方法 3、⑤末梢血法関連 3、⑥用量関連 3、⑦溶媒・調製方法関連 2、⑧その他 5 の合計 30 であった。

その他の変異原性試験関連では①ショウジョウバエ翅毛スポット試験関連 6、②in vivo UDS 関連 3、③細菌修復試験関連 2、④姉妹染色分体交換 (SCE) 関連 2、⑤培養細胞遺伝子突然変異試験関連 2、⑥MutaMouse 関連 1、の合計 16 であった。これらの問題点の中には、既に Ames test 連絡会や MMS 研究会で検討されているものもあるが、情報が関係者に限定されて部外に伝わっていない可能性も考えられよう。

## 11. 各試験結果の判定・評価上の問題点

設問 23, 25, 30

エイムス試験では①判定基準関連（2 倍法の妥当性、用量依存性があるが 2 倍未満、用量依存性がないが 2 倍以上、再現性がない場合など）70、②統計学的処理法関連（採用すべき統計学的判定方法が不明、バラツキの影響、バラツキの管理基準、平板枚数、背景データの利用方法）46、③結

晶析出条件での判定の信頼性 7、④生育阻害条件下で復帰変異コロニー数が増加した場合の評価 4、⑤比活性を求める妥当性 4、⑥不安定な化合物の判定 2、⑦その他 9 の合わせて 142 であった。

In vitro 染色体異常試験では①統計学的手法を含む判定基準関連 25、②非生理的条件や沈澱析出時の評価 17、③疑陽性時の評価 17、④偽陽性が多い 12、⑤数的異常の評価方法 9、⑥判定・評価関連 7、⑦その他 5、の合計 92 であった。

マウス小核試験では①採用すべき統計学的手法や判定方法関連 42、②疑陽性の評価 11、③特定条件時の結果の評価 8、④その他 11、の合計 72 であった。

その他の試験では①姉妹染色分体交換関連 2、②細菌修復試験関連 2、③ショウジョウバエ翅毛スポット試験関連 2、④ショウジョウバエ修復試験関連 1、の合わせて 7 であった。

なお、試験結果が文献や他機関での結果と不一致の経験（答えたくないは除く）を尋ねると企業では、エイムス試験 26 (36%)、染色体異常試験で 14 (25%)、小核試験では 8 (15%) あり、やり直して一致したのはエイムス試験で 8 (31%)、染色体異常試験で 2 (14%)、小核試験で 2 (25%) であったが、受託機関では、エイムス試験 11 (61%)、染色体異常試験で 6 (40%)、小核試験では 4 (29%) あり、やり直して一致したのはエイムス試験で 2 (18%)、染色体異常試験で 4 (67%)、小核試験で 3 (75%) で、受託機関におけるエイムス試験の不一致の経験が目立っていた。

## 12. 判定・評価に組み合わせる試験

設問 26, 19, 27, 28

変異原性試験の結果に他の変異原性試験結果を反映させる評価システムの有無では、あり/なし/無記入の順で、試験部門のある企業 (78) では 29/45/4、従事者のいない企業 (14) は 1/5/8、受託機関 (18) では 2/16/0 であった。試験従事者の多い機関ほどシステムを持ち、受託機関でも従事者 5 人以上の 2 機関がありと答えた。

また、企業においては自主的に他の変異原性試験等を追加して総合評価するルールを持っている

ところがあり（「自主的試験追加ルールあり」は、試験部門のある企業/従事者のいない企業の順で 37/2）、追加実施試験は、培養細胞遺伝子突然変異試験、UDS 試験 (in vivo, in vitro)、in vivo 染色体異常試験、姉妹染色分体交換試験、優性致死試験、培養細胞形質転換試験、末梢血及びその他の小核試験、ショウジョウバエ翅毛スポット試験、細菌修復試験、RDS 試験、代謝物のエイムス試験や S9 Mix 中の S9 量を変化させたエイムス試験、細菌を用いるマウス宿主経路試験、誘発突然変異頻度試験、P<sup>32</sup>-post label 法、アルカリ溶出法、などであった。

変異原性試験結果に他の安全性試験結果を反映させる評価システムの有無では、あり/なしの順で、試験部門のある企業では 25/49、従事者のいない企業は 1/5、受託機関では 2/16 であった。制度としての担当部門の存在は、システムの存在よりいずれも少なかった。

変異原性試験結果の評価に組み合わせている他の安全性試験系は、企業研究所では、①薬物動態試験（代謝物の動物種差検討、toxicokinetics 等を含む）22、②薬効・薬理 5、③単回投与（急性）毒性試験 5、④反復投与（慢性）毒性試験 3、⑤生殖・発生毒性試験 2、⑥臨床用量 2 などの合計 48 であった。受託機関でも総合的評価を実施している例が従事者 5 人以上の機関で複数見られ、①他の毒性試験 2、②薬効薬理 1、③薬物物性 1、の合わせてであった。

## 13. 癌原性と変異原性試験の不一致の経験

設問 32

癌原性試験を実施あるいは依頼した経験のある機関で、変異原性試験結果との不一致のケースを尋ねたところ、受託機関の 1 例を含め回答は予想以上にあり、16 機関から 19 例の回答があった。

変異原性試験陽性で癌原性試験陰性のケースは 11 例あり、染色体異常試験単独との不一致が 6 例で一番多かった。逆に変異原性試験陰性で癌原性陽性のケースは 8 例あり、3 点セットの試験すべて陰性だが癌原性ありのケースが 6 例で一番多かった。この 6 例の中には、3 試験陰性ととも in vivo UDS 陰性で癌原性陽性の場合が

2例あった。用いられた動物の種差や腫瘍発生臓器の問題もあるので簡単には結論できないが、3点セットを中心とした変異原性試験が癌原性予測にどの程度有効なのか、あるいはこれらの例で見られた実験動物での癌原性結果の信頼性やヒトでの発癌との相関性の程度についてなど、今後このような実例からの詳細な検討も必要であろう。

#### 14. 変異原性試験で改良・充実して欲しいこと

設問 29, 38

試験系の改良について総計で見ると、①ヒトへ外挿可能な試験系の希望が圧倒的に多く 74, ②発癌における臓器特異性を評価できる試験法 46, ③機械化・自動化への改良 41, ④より短期間でできる試験法 32, ⑤DNAレベルの変化を検出できる使い易い生物系 32, ⑥S9 Mix 以外の効果的な代謝活性化法 31, ⑦動物を使わない試験法 24, ⑧検出スペクトラムのもっと広い試験系 21, ⑨エイムス試験同様の高感度で使い易い試験系 18, ⑩癌以外の疾病との関係の評価できる試験系 18, ⑪より少量の被験物質でできる試験法 17, ⑫染色体レベルの変化を検出できる生物系 16 などが続き、総数は 380 あった。

充実して欲しいことをまとめると、所属する試験機関が企業か受託機関かにより順位に相違が見られたが本質的な差は感じられなかった。全機関の合計では、①我が国の試験結果を集積した公表データベースの整備 57, ②癌原性と変異原性の相関関係の単なる数字ではない質的明確化 53, ③判定を明確にする統計学的評価方法の充実 33 (特に受託機関において最多であった。別に安全性試験専門の統計家育成 4 あり), ④知識ベースによる構造活性相関推定法の開発 33, ⑤癌原性試験回数を減らしその代替ができる試験法の開発 27, ⑥染色体異常と aneuploidy の関係の明確化など基礎研究の発展 25, ⑦日英変異原性試験用語解説集 22, ⑧有用性が高く統一な培養細胞遺伝子突然変異試験系の紹介 21, ⑨公開講座・シンポジウムの拡充 20, ⑩国内変異原性試験関連学術雑誌の充実 19, ⑪問題が起きた時に相談できる専門家の紹介 18, ⑫企業実験者の養成・訓練機関 18, ⑬国内外公的機関と企業を結ぶ情

報ネットワークの開発・整備 15, ⑭企業間、企業と公的機関間の共同研究を計画・支援・推進する機関 14, ⑮通常では実施しにくい実験を行なう設備・技術レベルの高い公的試験機関の設立 9, ⑯大学・公的機関・企業の研究者募集の紹介をする機関 6, など総計 394 あった。これらの中には研究の進歩を待たねばならないものも含まれるが、一部のものは他の学会では既に実施している制度もあり、本学会への要望とも考えられる。

#### 15. 変異原性試験に関する問題点指摘と意見

設問 43

長文の意見も多く、グループ分けは必ずしも楽ではないが、①バッテリー試験システム 14, ②ガイドラインのハーモナイゼーションやガイドラインと研究者の関わり 13, ③遺伝毒性や機構など変異原性関連の基礎研究の充実 5, ④ヒトの安全性を確保しうる試験系・評価方法 4, ⑤complete carcinogen を検出する短期癌原性試験の開発 3, ⑥変異原性試験関連の情報伝達手段 3, ⑦変異原性試験の意義の確立 3, ⑧変異原性試験結果の総合評価 2, ⑨変異原性と癌原性との相関関係の質的数量化 2, ⑩データベースの整備 2, の合わせて 51 であった。

#### 16. 日本環境変異原学会への期待と要望

設問 40

項目別にまとめると①ガイドライン見直しへのリーダーシップ 25, ②情報収集・配布活動 11, ③共同研究・基礎研究の推進 8, ④教育活動 6, ⑤日米欧ガイドラインのハーモナイゼーション 4, ⑥国内試験結果データベース構築の推進 3, ⑦その他 6, の計 63 であった。なお、分科会に関しての要望や今大会への希望、データベース構築、などは本報告では割愛したので別掲を見ていただきたい。

#### 17. アンケートへの意見

設問 44

最後の設問であったせいか回答はやや少なかったが、まとめると①アンケート結果の公表及び集約された要望について実行可能なものから解決へ

と踏み出して欲しい 10, ②項目が多い・設問が細か過ぎる・重複設問ありなど 6, ③詳細で核心に迫る内容であり、考える機会を与えられたなど 5, ④設問の不備 4, ⑤その他 9 など総数 34 であった。

#### 18. まとめ

このようなアンケートは従来なかったものであったため、回答には苦勞されたようである。今回のアンケートの対象が日頃からガイドラインの影響の下に業務を行なっている企業の研究者、試験従事者であったこと、設問の一部はガイドラインについてであったこと、などからガイドラインが回答者の意識に大きなウエイトを占めていたことが考えられる。しかし、逆に大学や公的機関の研究者は、企業におけるガイドラインの影響の実情を知らなさ過ぎる可能性も高いので、このアンケート結果から少しでも現状を理解していただければ幸いである。また、企業の研究者、試験従事者にとっても参考になる内容ではないかと思う。

このアンケート結果から導かれた以下に提起する問題への回答を得るのはそれほど容易だとは思われず、今回のシンポジウムはその第一歩のきっかけに過ぎないであろう。従って、今後も継続して検討されるべき問題ではないかと考えられる。

①安全性確認のために変異原性試験を実施する目的 (対象とする毒性は癌原性なのか遺伝毒性なのか、あるいは検出なのか評価なのか) や位置付けが必ずしも明確ではないため、試験従事者が十分納得できていないのに、ガイドラインの存在だけが強調されて企業や試験従事者を拘束し、しかも、それらの不明確さが企業内で従事する研究者の立場を不安定にしているのではな

いだろうか?

②いわゆる薬事法 3 点セットを中心とした試験は、変異原性試験実施黎明期の試験従事者にとって道標として大いに役立ち、背景データも蓄積されてきた。しかし、従事者の人数や時間に余裕が少ないという事情もあり、また、申請に不必要な試験は敢えて実施しないという多くの企業の姿勢もあって、他の補完試験の実施を避けてしまい、あたかも 3 点セットを万能のように扱い、「その変異原性試験で分かることと分からないことがある」という当り前のことが忘れられていなかったであろうか。しかも、3 点セット自体においても、個々の試験法の手法や判定方法のバリデーションが不十分のままガイドラインに取り入れられ、それが問題を複雑にしているのではないだろうか?

③これらの反省の上に立って、現時点で変異原性試験の意義や目的を明確にし、今何を為すべきかの方針を示せるのは、専門知識の豊富な種々の分野の会員で構成されている本学会ではないだろうか?

④さらに、実施すべき試験や補完すべき試験の内容の検討、総合評価のシステム構築、国内外のガイドラインのハーモナイゼーションなどに学会が主導的役割を果たせないだろうか?

⑤従来のように、新試験法や新試験系の探索・確立あるいはバリデーションを個々の研究者の努力だけに頼らず、必要ならば学会が共同研究を推進したり、正確で統一的な情報を普及させたりすべきではないだろうか?

⑥提起されたこれらの問題の検討に学会がどのように取り組むかの議論がもっとなされてもよいのではないだろうか?

以上

## Ames 試験の問題点

住友化学工業(株)生物環境科学研究所 小木 曾 重 文<sup>1</sup>

塩野義製薬(株)研究所神崎川分室 三宅 幸 雄<sup>2</sup>

### 1. はじめに

医薬品、農薬あるいは食品添加物などの新規化学物質の開発において、安全性の評価は近年ますます重要な位置を占めている。有用な生理活性を有する新規化学物質の開発を目指す多くの企業においては、開発の初期の段階から、急性毒性、慢性毒性、催奇形性、および発がん性など各種毒性についての評価試験が実施される。その中で、特に変異原性試験は、いわゆる「遺伝毒性」を評価するというより、むしろ発がん性を予測するための短期スクリーニング試験として実施されている。そうした初期評価試験の成績に基づいて開発候補化合物が選抜されることが多いことから、その試験成績の予測性の確からしさは極めて重要な意味をもつ。

*Salmonella* 菌を材料とし、遺伝子突然変異を指標とする Ames 試験は、その名の示すように B. N. Ames 教授(カリフォルニア大学)とその共同研究者により 1970 年代に開発され (Ames ら, 1973; Ames ら, 1975; Maron and Ames 1983), 試験系と試験方法について有用性が十分に評価された変異原性試験である。この試験系では「発がん物質は変異原物質である」として発表され、またその後、発がん性を予測する短期スクリーニング試験としての評価も高かったことから、多くの国々で採用され、毒性試験ガイドライ

ンの中の必須な試験のひとつとして採用されてきた。

ここでは、化学物質の発がん性を予測する変異原性試験のひとつとして、Ames 試験を取り上げ、その有用性と問題点について述べてみたい。

### 2. 化学発がん過程

化学物質による発がん過程(化学発がん過程)は多段階であると言われている(多段階説, Fig. 1)。その初期の過程では、遺伝物質である DNA

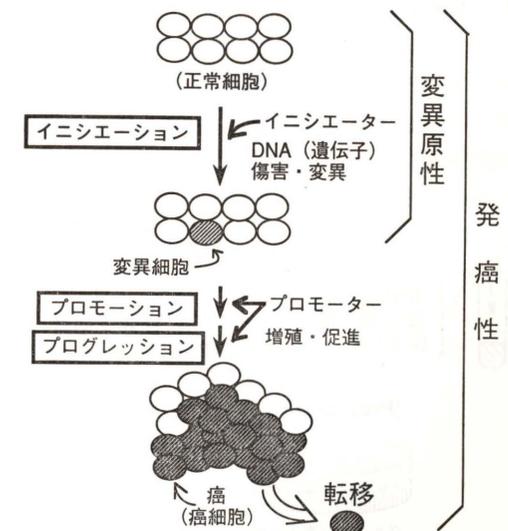


Fig. 1. 化学発がん過程(多段階説)

1) 〒554 大阪市此花区春日出中 3-1-98

2) 〒561 豊中市二葉町 3-1-1

Present Status of Ames Test

<sup>1</sup>Shigefumi Kogiso

Environmental Health Science Laboratory, Sumitomo Chemical Co., 3-1-98, Kasugadenaka, Konohana, Osaka 554, Japan

<sup>2</sup>Yukio Miyake

Kanzakigawa Laboratory, Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., 3-1-1, Futabacho, Toyonaka 561, Japan

に対する傷害が起き、その傷害に起因して DNA 上に変異が起き、変異細胞が生成して来る。その変異細胞が細胞増殖を繰り返し、さらに増殖が促進されてがん細胞が生成して来ると考えられている。

この DNA に傷害が起き、変異細胞が生成する過程はイニシエーション (Initiation) と呼ばれ、化学発がんにおいて最も重要な過程であると考えられている。微生物、哺乳動物の培養細胞、および動物を用いた変異原性試験ではこのイニシエーションの過程を検出することができる。

変異細胞ががん細胞・癌になっていく過程には種々の因子が関与していると考えられており、これらの過程はプロモーション (Promotion)、およびプログレッション (Progression) と呼ばれている。発がんプロモーター、各種の増殖因子およびホルモンなどがこれらの作用を有することが知られており、検出試験系についても精力的に研究が続けられている。

### 3. Ames 試験

Ames 試験では材料としてヒスチジン要求性のサルモネラ (TA98, TA100, TA1535, TA1537 株など) を用い、ヒスチジン非要求性への復帰突然変異を指標として、DNA への傷害性を調べている。日本の試験ガイドラインでは試験菌株の一

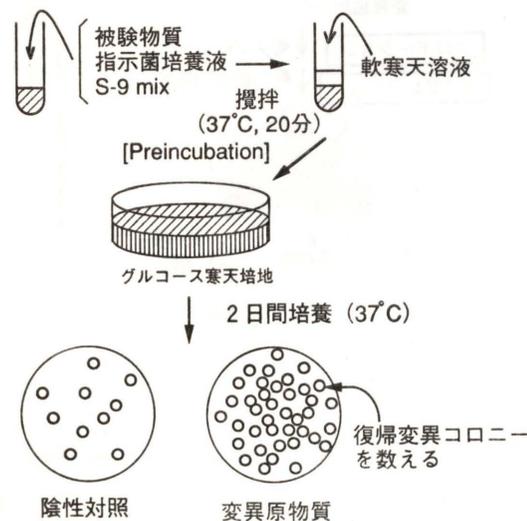


Fig. 2. Ames 試験の操作方法

種にトリプトファン要求性の大腸菌 (WP 2 uvrA 株など) を用いることも要求している。試験操作法を Fig. 2 に示した。プレインキュベーション法 (矢作, 1975) では被験物質を指示菌と共に薬物代謝酵素系 (S-9 mix) の存在下、非存在下の条件で、37°C、20 分間振盪した後、少量のヒスチジンを含む軟寒天溶液と混和し、グルコース寒天培地上に播く。2 日間培養した後、出現してくる復帰変異コロニーを自動コロニーカウンターなどを用いて計数する。試験にかかる日数は 3 日間程であり、操作法も簡便で、再現性にも優れている。従って、沢山の化合物をスクリーニングする方法としては望ましい。試験に用いる指示菌株、菌株の前培養条件、およびその他の試験条件が適切に設定されている場合には再現性の良い結果を安定して得ることができる。

サルモネラ TA100 株について、陽性対照およ

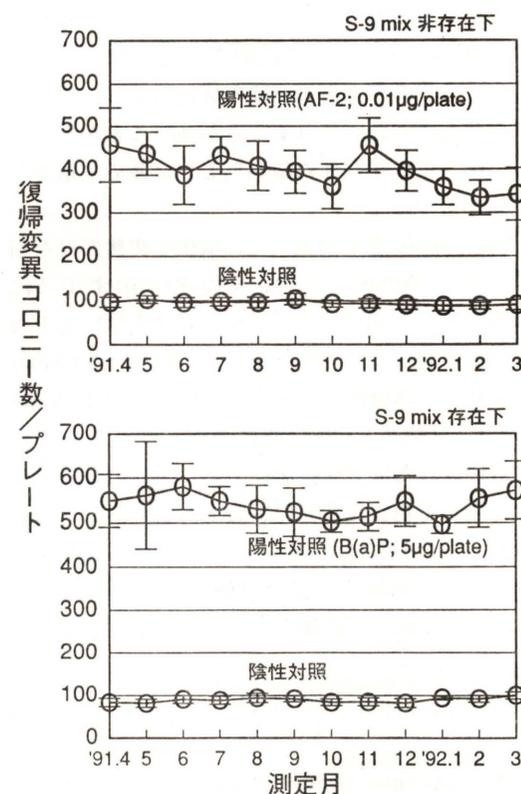


Fig. 3. サルモネラ TA100 株における陰性対照および陽性対照群の復帰変異コロニー数の月間変動

び陰性対照における復帰変異コロニー数の月間変動を 1 年間に渡って調べた結果を示した。(Fig. 3)。陰性対照 (主に水および DMSO) および陽性対照 (S-9 mix 非存在下, AF-2; S-9 mix 存在下, ベンゾピレン) の月間平均値はほぼ安定した値を示し、年間を通して見てもあまり大きな変動は示さない。こうしたデータをもとに復帰変異コロニー数の許容範囲を設定し、日々のデータをモニターすることによって、再現性の確認と共に、弱い活性をもつ化合物の検出も可能となり、信頼性の高い結果を安定して得られるものと考えられる。

1986 年以来労働省が実施してきた精度管理のための委託試験結果では、同一ロットの被験物質に対する比変異原性の値に試験実施機関の間で大きな差のあることが明らかにされ、その原因とし

て前培養条件の違いが推測されている (松島, 1991)。変異原性試験としては確立された試験系と考えられている Ames 試験であるが、定性的評価に加え、定量的評価を充実させるためには試験系の標準化に関する検討が重要であろう。

### 4. 発がん性と変異原性の相関

発がん性試験の結果と変異原性試験の結果との定性的相関性 (Table 1) について、これまでに多くの研究者が解析を試みている。発がん性試験の結果と Ames 試験の結果の定性的相関性について解析された結果を示した (Table 2)。

McCann ら (1975) は約 300 化合物について解析し、感受性 90%、一致性 89% と高い割合で相関していることを報告した。それ以降、いろいろ

Table 1. 発がん性と変異原性との組合せ

| 発がん性 | 変異原性 | 化合物数 |
|------|------|------|
| +    | +    | A    |
| +    | -    | B    |
| -    | +    | C    |
| -    | -    | D    |

+: 陽性, -: 陰性  
 感受性 (発がん物質であって、変異原性を示すもの)  
 $= A / (A+B)$   
 特異性 (非発がん物質であって、変異原性を示さないもの)  
 $= D / (C+D)$   
 一致性 (発がん性と変異原性が一致するもの)  
 $= (A+D) / (A+B+C+D)$   
 陽性予測率 (変異原性陽性物質の中の発がん物質)  
 $= A / (A+C)$

Table 2. 発がん性と変異原性 (Ames 試験) との定性的相関

| 報告者                     | 感受性 (%)     | 特異性 (%)    | 一致性 (%)     | 陽性予測率 (%)   |
|-------------------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| McCann et al (1975)     | 90(157/175) | 87(94/108) | 89(251/283) | 92(157/171) |
| Purchase et al (1978)   | 91(53/58)   | 97(60/62)  | 94(113/120) | 96(53/55)   |
| Nagao et al (1978)      | 85(136/160) | 74(60/81)  | 81(196/241) | 87(136/157) |
| Bartch et al (1980)     | 76(62/82)   | 57(4/7)    | 73(66/89)   | 97(63/65)   |
| Upton et al (1984)      | 61(104/170) | 80(24/30)  | 64(128/200) | 75(69/92)   |
| Zeiger & Tennant (1986) | 53(69/130)  | 71(57/80)  | 60(126/210) | 75(69/92)   |
| Tennant et al (1987)    | 45(20/44)   | 86(25/29)  | 62(45/73)   | 87(20/24)   |
| Piegorsch & Hoel (1988) | 44(28/63)   | 84(41/49)  | 62(69/112)  | 78(28/36)   |
| Auletta & Ashby (1988)  | 79(175/223) | 62(29/47)  | 76(204/270) | 91(175/193) |
| Zeiger et al (1990)     | 52(12/23)   | 100(18/18) | 73(30/41)   | 100(12/12)  |

( )内の数は化合物数を示す

Table 3. 化学構造上の DNA 反応性と発がん性および Ames 試験との相関

| Carcinogenic status        | %Salm. positive(No. in group)       |   |
|----------------------------|-------------------------------------|---|
|                            | Structurally alerting (SA) positive | Structurally non-alerting (SA) negative |
| All chemicals (301)        | 78 (154)                            | 4 (147)                                 |
| All carcinogens (162)      | 84 (105)                            | 4 (57)                                  |
| Two-species carcinogens    | 93 (58)                             | 5 (22)                                  |
| Single-species carcinogens | 72 (47)                             | 3 (35)                                  |
| Equivocal evidence (39)    | 69 (16)                             | 4 (23)                                  |
| Non-carcinogens (100)      | 66 (33)                             | 5 (67)                                  |

(Ashby & Tennant, 1991)

なグループによって解析がなされ、1985~1990 にまとめられた結果では、感受性の値が 50% 前後、一致性の値が 60~70% 強であり、Ames 試験では検出できない発がん物質が多くあることが明らかとなってきた。

一方、Ames 試験の「陽性予測率」(Ames 試験が陽性の化合物の中の発がん物質の割合)を調べてみると、1975 以降、1990 までその値は高く、75%~100% (平均 88%) の値が得られている。この結果は、Ames 試験が陽性の場合には発がん物質である可能性が高いことを示唆している、といえる。

Ashby and Tennant (1991) は米国 NTP (National Toxicology Program) で発がん性試験の実施された 301 化合物について、化学構造とサルモネラの試験成績を解析した (Table 3)。化学構造上、DNA との反応性を警戒すべき (alerting) 化合物 (154) とそうでない (non-alerting) 化合物 (147) とに分けた場合、化学構造とサルモネラ菌の試験成績は高い相関を示した。即ち、DNA との反応性の高い化合物では、発がん物質 (105) の 84% が陽性を示し、その内ラットおよびマウスの両種に発がんした化合物 (58) の 93% が陽性であった。しかしながら、非発がん物質 (33) においても 66% が陽性であった。一方、DNA との反応性の低い化合物では、発がん物質 (57) の内 4% のみが陽性を示し、ラット、マウスの 2 種に発がんする化合物 (22) でも 5% の陽性率であった。これらの結果は、化学構造上での DNA との反応性とサルモネラの試験結果との間では高い

相関性があるが、サルモネラの結果と発がん性との間には低い相関しか認められなかったことを示している。

これらの知見は、相関性の解析においても化学構造を考慮に入れることが必須であることを示唆している。

### 5. おわりに

Ames 試験が開発されてから、約 20 年が経過し、その間に Ames 試験に対する評価は大きく変化してきている。特に、最近の 4、5 年間では、Ames 試験を含めて、染色体異常試験および小核試験などの変異原性試験が陰性となる発がん物質 (Non-genotoxic carcinogens) が多く存在することが明らかになってきた。したがって、Ames 試験についても発がん性の検出能に関する検討が加えられ、信頼性が見直しが行われている。

しかしながら、発がん物質の 1 次スクリーニング試験として実施されている従来の試験系のなかでは Ames 試験は最も信頼性が高く、発がん性との定性的相関性は 60~70% と考えられている。特に、Ames 試験の陽性予測率が約 90% であることから、False positive の結果 (陽性化合物の 10%) を考慮しても、有用な知見であるといえる。化学物質の発がん性を予測するための短期スクリーニング試験の一つとして、Ames 試験が世界的にも広く活用されていることの根拠になると考えられる。

したがって、有用な点を要約すれば、Ames 試験は:

- 1) 突然変異を指標とした、DNA 傷害性を検出できる簡便な試験法であり、再現性に優れる。
- 2) 微量 (ppm レベル) に含まれる変異原物質の検索、モニタリングに活用できる。
- 3) 遺伝子毒性発がん物質 (Genotoxic carcinogens) の予測には有効である。

しかし、前に述べたごとく、Ames 試験で検出されない発がん物質も多く知られている。したがって、Ames 試験が陰性の化合物については、補完試験が必要であり、動物の培養細胞あるいは動物を用いた試験系と共に、発がんメカニズムを考慮した種々の試験と組み合わせる検討することが望ましい。

一方、Ames 試験は方法が簡便であるが、試験実施上の技術的な問題点があることも指摘されている。特に、データのばらつきが大きく、再現性に乏しいなど、試験管理が充分でないことに起因する場合は問題が多い。したがって、試験菌株の性質 (感受性) の確認、前培養条件の検討など試験系の基礎的検討を実施し、基礎データを蓄積して、試験管理に役立てていくべきであろう。

Ames 試験は今後も広く活用され、たくさんのデータが取得・蓄積されていくと思われる。従来からの知見に加えて、そうしたデータを蓄積し、解析することによって、

- ① 化学構造に着目した分類、および構造活性相関についての解析、

- ② 遺伝子毒性発がん物質については、変異原性と発がん性との定量的相関性の解析が行われ、Ames 試験の有用性と限界が一層明らかになっていくことが望まれる。

### 参考文献

- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki and F. D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **70**, 2281-2285.
- Ames, B. N., J. McCann and H. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutation Res., **31**, 347-364.
- Ashby, J. and R. W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, Mutation Res., **257**, 229-306.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutation Res., **113**, 173-215.
- 松島泰次郎 (1991) 短期検索法の有用性と問題点—微生物変異原性試験—環境変異原研究, **13**, 279-283.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), **72**, 5135-5139.
- 矢作多貴江 (1975) 環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について, 蛋白質・核酸・酵素, **13**, p. 1178-1189.

## 染色体異常試験の問題点

日本グラクソ(株)筑波研究所 森 田 健<sup>1</sup>  
雪印乳業(株)生物科学研究所 矢 嶋 信 浩<sup>2</sup>

### 1. はじめに

厚生省より昭和 59 年 2 月 15 日に通知された「医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」により、変異原性試験の試験法の 1 つとして「哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験」が採用されて以来、多くの製薬企業がこの試験を実施するようになった。さらに労働省、農林水産省、通商産業省および環境庁の各省庁から示されたガイドライン等においても染色体異常試験のデータが必要となり、多数の化学物質関連企業がこの試験に関係するに至った。以来、*in vitro* 染色体異常試験は化学物質の安全性を評価するための多くの情報を提供してきたが、反面、種々の知見が集積するにつれこの試験法が抱える問題点が明かとなり、同時にその有用性についても一部で疑問視される状況となってきた。ここでは日本環境変異原学会第 21 回大会組織委員会が実施した変異原性試験に関するアンケート調査によって示された *in vitro* 染色体異常試験に関する問題点を挙げ、その対応について考える。

なお種々の問題点についての詳細な解説は優れた総説があるので参照されたい(石館, 1991; Kirkland, 1992; Scott *et al.*, 1991)。

### 2. 染色体異常試験の問題点

アンケート調査の結果、各企業の変異原性試験担当者より示された問題点は、非常に多岐に渡っ

- 1) 〒300-42 茨城県つくば市和台 43
  - 2) 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町下石橋 519
- Problems of chromosomal aberration test *in vitro*  
Takeshi Morita<sup>1</sup> and Nobuhiro Yajima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tsukuba Research Laboratories, Nippon Glaxo Ltd., 43 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-42, Japan

<sup>2</sup>Research Institute of Life Science, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., 519 Shimoishibashi, Ishibashi-mati, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-05, Japan

ていた。提示された主な問題点を Table 1 に挙げるが、判断・評価に関する事項が多く挙げられた。これら以外にも各国ガイドラインとの相違の問題や観察に熟練や時間がかかるといった問題点も示された。

#### 1) 非生理的環境における異常誘発と評価

非生理的環境による異常は、試験物質を高濃度で処理した場合や、酸性、アルカリ性物質を用いた場合に培養液の高浸透圧化、イオンバランスの変化あるいは pH 変化の結果生じることがある。また、著しい細胞毒性状況下においても異常

Table 1 染色体異常試験の問題点

1. 非生理的環境における異常誘発と評価
  - ・高濃度での処理意義と陽性結果の評価
  - ・沈殿析出濃度での処理意義と陽性結果の評価
2. 細胞毒性と染色体異常の関係
  - ・モノセレーターと分裂指数との相違
  - ・適切な細胞毒性の指標
  - ・細胞毒性(致死濃度)付近での異常の評価
3. 疑陽性の評価
  - ・安全性に対する評価
  - ・処理時間による異なった結果
4. 癌原性予測における false positive
  - ・False positive が多い
  - ・陽性結果に対する評価が難しい
5. 統計処理
  - ・統計学的手法と経験則との相違
  - ・適切な統計処理方法
6. その他
  - ・数的異常の検出と評価
  - ・ギャップの取扱い

(21th JEMS アンケート調査より, 1992)

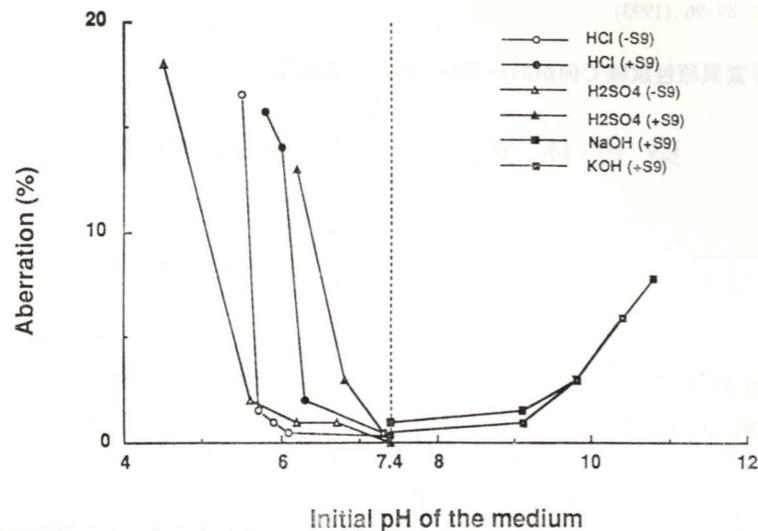


Fig. 1 pH 変化による染色体異常誘発 (無機強酸, 強アルカリの場合)  
CHO-K 1 細胞を用い, S9 非存在下では 24 時間, S9 存在下では 6 時間処理した.

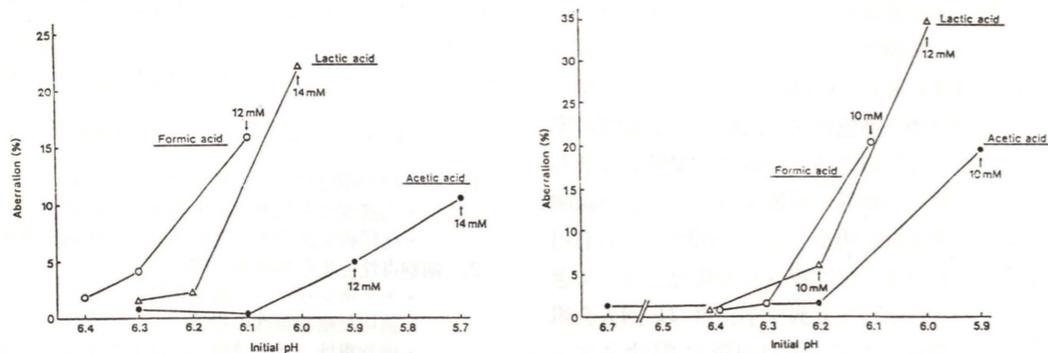


Fig. 2 低 pH による染色体異常誘発 (有機酸の場合)  
CHO-K 1 細胞を用い, 蟻酸, 酢酸および乳酸について検討した.  
図左: S9 非存在下, 図右: S9 存在下.

が誘発される場合もある。Fig. 1 に培養液の pH 変化が染色体異常を誘発する例を示した (Morita *et al.*, 1989)。塩酸あるいは硫酸は S9 非存在下において, それぞれ pH 5.5 あるいは pH 4.5 で異常を誘発し, S9 存在下では異常を誘発した pH は, それぞれ pH 6.0 あるいは pH 6.2 にシフトした。一方, 水酸化ナトリウムあるいは水酸化カルシウムは, S9 存在下においてのみそれぞれ pH 10.8 あるいは pH 10.4 で異常を誘発した。これら無機強酸あるいは強アルカリばかりでなく, 蟻酸, 酢酸および乳酸などの有機酸も Fig. 2 に示すように同様に染色体異常を誘発した (Morita *et*

*al.*, 1990)。このように培養液 pH が変動した培養環境や高浸透圧環境下で試験を実施すべきではなく, たとえ実施したとしてもそこで得られた結果は, 化学物質の染色体異常誘発性を正しく評価しているものではない。そのため日本あるいは UKEMS (Scott *et al.*, 1990) のガイドラインでは高浸透圧および高濃度による影響を考慮して, 細胞毒性を示さない水溶性物質の最高用量を 10 mM までとしている。pH 変化については特に記載されていないが, 培養液 pH が 1 以上変化した環境では, 試験を避ける必要がある (Scott *et al.*, 1991)。有機酸による染色体異常は約 10 mM

以上の濃度による約 pH 6.2 以下で認められたことから (Fig. 2), pH 変化に対しても 10 mM が一つの目安となるかも知れない。pH 変化に対しては, 培養液の緩衝能の増強あるいは緩衝系の変更により, 適切な環境で試験を実施することができる (Morita *et al.*, 1990)。培養液の浸透圧や pH をあらかじめ測定しておくことも非生理的要因による影響を排除するには有効である。

沈殿析出濃度における処理に関する問題点も多く挙げられた。UKEMS ガイドラインをはじめ現行の OECD および EEC ガイドラインでは, 不溶性物質の最高用量は溶解限界となっている。一方, 日本のガイドラインでは細胞毒性を示さない不溶性物質の最高用量は 5 mg/ml とされ, 懸濁あるいは沈殿析出状態においても試験を実施している。最近出された OECD ガイドラインの改訂案 (須藤, 1992) および EC, PMA (米製薬協) の ICH (International Conference on Harmonization) 関連専門委員会の提案では, 溶解限界濃度以上の処理も必要との立場をとっているが, case by case の意味合いが強く, 一律ではないようである。沈殿析出状態あるいは懸濁液での処理の必要性については国際的にも議論がなされているが, 合意には至っていない。

## 2) 細胞毒性と染色体異常の関係

染色体異常試験の最高用量は, 原則として細胞毒性に基づき選択される。日本のガイドラインで

は 50% 以上の細胞増殖抑制あるいは分裂阻害が指標とされ, UKEMS ガイドラインでは 75% の分裂指数 (mitotic index, MI) 抑制あるいは細胞数, コロニー形成率などにおける 50-75% の減少が指標となり, OECD ガイドライン改訂案では 75% の MI 抑制が指標となっている。また, EEC ガイドラインは 50% の MI 抑制となっている。このように細胞毒性が濃度選択の基準となっているが, 推奨される指標ならびに抑制頻度はそれぞれ異なっている。

染色体異常試験で主に用いられる細胞毒性の指標としては, モノセレーターによる生育阻害, 生細胞数のカウント, コロニー形成率あるいは MI の測定が挙げられる。Armstrong ら (1992) は, いくつかの化合物について 3 時間処理した後, 7 時間および 21 時間後の生細胞数, コロニー形成率, MI を含む細胞毒性について検討した。2-アミノビフェニルでは, これらの指標はほぼ同様の傾向を示したが, アドリアマイシンでは MI に影響が認められず, コントロールレベル以上の MI が観察された (Fig. 3)。これらの結果は MI の 50-75% の抑制は過度な毒性用量となる場合があること, また選択される最高用量は用いる指標により異なる可能性があることを示唆している。ここに示した回復時間を設けた短時間処理の場合だけでなく, 長時間の連続処理における各細胞毒性の指標の関連性も検討する必要がある。

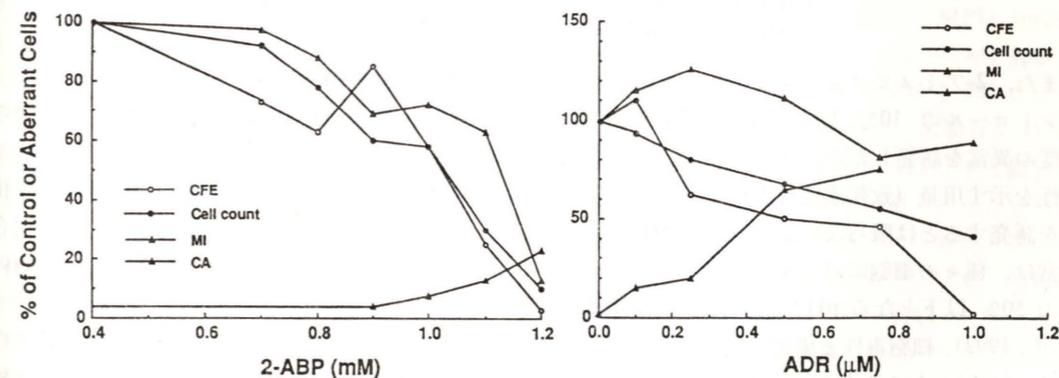
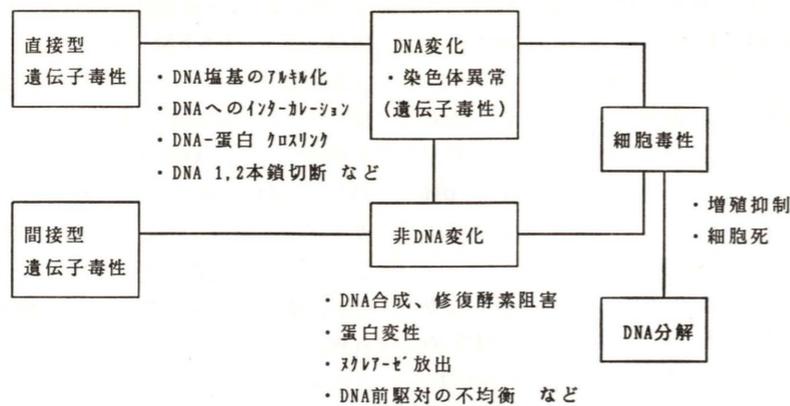


Fig. 3 細胞毒性と染色体異常  
CHO 'WBL' 細胞を用い, 3 時間処理後 21 時間で測定した.  
2-ABP; 2-aminobiphenil, ADR: adriamycin, CFE: colony forming efficiency, MI: mitotic index, CA: chromosomal aberration



Scott et al., (1991)を一部改変

Fig. 4 直接および間接型遺伝子毒性と細胞毒性・染色体異常との関係

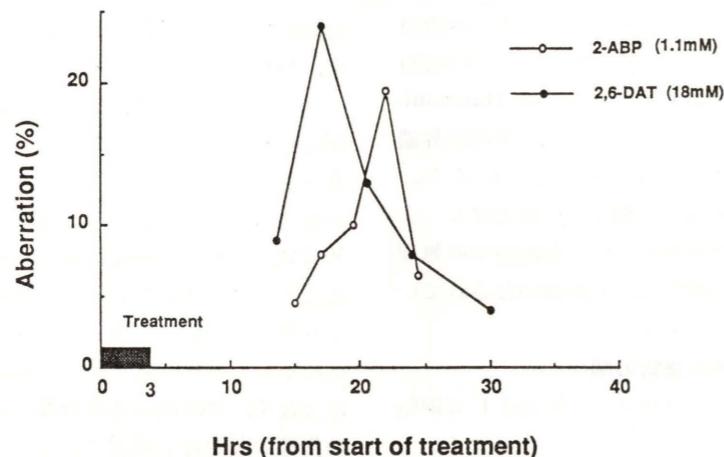


Fig. 5 異常頻度におよぼす標本作製時期の影響  
CHO 'WBL' 細胞を用い、3時間処理後経時的に標本作製した。  
2-ABP; 2-aminobiphenyl, 2,6-DAT; 2,6-diaminotoluene

また、2-アミノビフェニルは種々の細胞毒性がコントロールの10%以下となった濃度で20%程度の異常を誘発したが、すべての化合物が細胞毒性を示す用量(致死濃度付近)で常に染色体異常を誘発するとは限らない。一方、低pHによる異常は、種々の細胞に対し生細胞数がコントロールの50%以下となるpHで認められた(Morita et al., 1992)。細胞毒性と染色体異常の関係は、一般的にはFig. 4に示すように考えられるが(Scott et al., 1991)、詳細は説明されておらず今後の検討課題といえる。

### 3) 疑陽性の評価

疑陽性とはCHL細胞における5-10%未満の異常頻度の誘発を意味するが、一般的には極めて弱い陽性反応と考えられる。弱い反応性を示す化合物では、用量依存性や再現性も明確でない場合もある。疑陽性を示す化合物の割合は少ない(林, 1992)といっても、実際にこのような結果を得ると判断・評価に苦慮する。こうした場合、標本作製時期や用量など実験条件を考慮して用量依存性や再現性の確認試験を行うことも必要となる。Beanら(1992)は、いくつかの化合物について染色体異常頻度に及ぼす標本作製時期の影響を検討

Table 2 染色体異常試験の癌原物質感受性と偽陽性率  
( )内は化合物数

| 感受性 <sup>1)</sup> | 偽陽性 <sup>2)</sup> | 文献                      |
|-------------------|-------------------|-------------------------|
| 55% (24/44)       | 31% (9/29)        | Tennant et al., 1987    |
| 93% (91/98)       | 90% (18/20)       | Ishidate et al., 1988   |
| 55% (84/152)      | 29% (23/80)       | Ashby and Tennant, 1991 |

<sup>1)</sup> (染色体異常陽性/癌原性陽性)

<sup>2)</sup> (染色体異常陽性/癌原性陰性)

Table 3 癌原性に対する各試験の認識  
(回答機関数/有効回答機関数)

| 試験法     | 実施意義あり      | 相関性あり       |
|---------|-------------|-------------|
| 染色体異常試験 | 56% (38/68) | 56% (38/68) |
| Ames試験  | 79% (61/77) | 83% (62/75) |
| 小核試験    | 65% (43/66) | 58% (40/67) |

(21th JEMS アンケート調査より, 1992)

した結果、標本作製時期が異なると異常頻度は大きく異なることを示した。2-アミノビフェニルあるいは2,6-ジアミノトルエンを3時間処理した後の至適な標本作製時期では、両化合物とも20%程度の異常を誘発したが、処理後21時間では7%程度であった(Fig. 5)。この例は3時間のパルス処理だが、24あるいは48時間の連続処理あるいは代謝活性化法の6時間処理においても同様の問題が生ずる可能性がある。

確認試験においても弱い反応を示す場合は、*in vitro*における染色体異常誘発性は疑陽性あるいは弱陽性と判断するのが妥当と思われるが、安全性の評価は異常誘発濃度、細胞毒性状況などを考慮し総合的に行う必要があるだろう。

### 4) 癌原性予測における false positive

染色体異常試験における最大の問題は、染色体異常試験では陽性を示すが発癌性試験では陰性の物質、いわゆる false positive (偽陽性)が多いとされることである。用いたデータベースにより異なるが(Table 2)、最近のAshbyおよびTennant(1991)の報告では感受性は55%、偽陽性率は29%とされている。しかし、この数字以上に企業において染色体異常試験のみ陽性で、発癌性陰性の化合物を経験していることがこの試験に疑問を投げかける一因となっている。したがって、アンケート調査においても、染色体異常試験は癌原性予測としての実施意義があると回答した機関、あるい

は癌原性との相関性があると回答した機関は、ともに有効回答の半数余りしかなく、Ames試験あるいは小核試験と比べ低いものであった(Table 3)。

False positiveが多いとされる原因としては、染色体異常は直接的なDNA変化の結果生じるだけでなく、DNA合成や修復酵素阻害、タンパクの変性、ヌクレアーゼ放出、DNA前駆体の不均衡など非直接的な機構による非DNA変化からも結果的にDNA変化(染色体異常)が誘発されることが挙げられる(Scott et al., 1991)(Fig. 4)。また、*in vitro*特有の高い試験濃度や解毒、排泄機構を再現できないことも関係している。したがって、染色体異常試験の結果のみを癌原性予測に直接あてはめることは難しく、余計な陽性反応をうまく排除しなければならない。この問題に対してKirkland(1992)はHTC(High Toxicity Clastogen)およびLTC(Low Toxicity Clastogen)の概念の導入を提案している。これはMIのコントロールに対する%と異常頻度をプロットし、5%の異常を誘発した濃度をMPD(minimum positive dose)と考え、50%のMI抑制を示す濃度M150と比較する。MPDとM150が離れている場合をLTC、接近している場合をHTCと評価する(Fig. 6)。すなわち、HTCとは細胞毒性が強く現れる濃度で異常を誘発する化合物であり、このような化合物の生体内での影響は弱いのではなからうかというものである。LTCとHTCの実際的な区別は難しく、またHTCとされる化合物の生体内における評価も充分に行う必要があるが、以前から指摘されている定量的評価の重要性を改めて認識しなければならない。

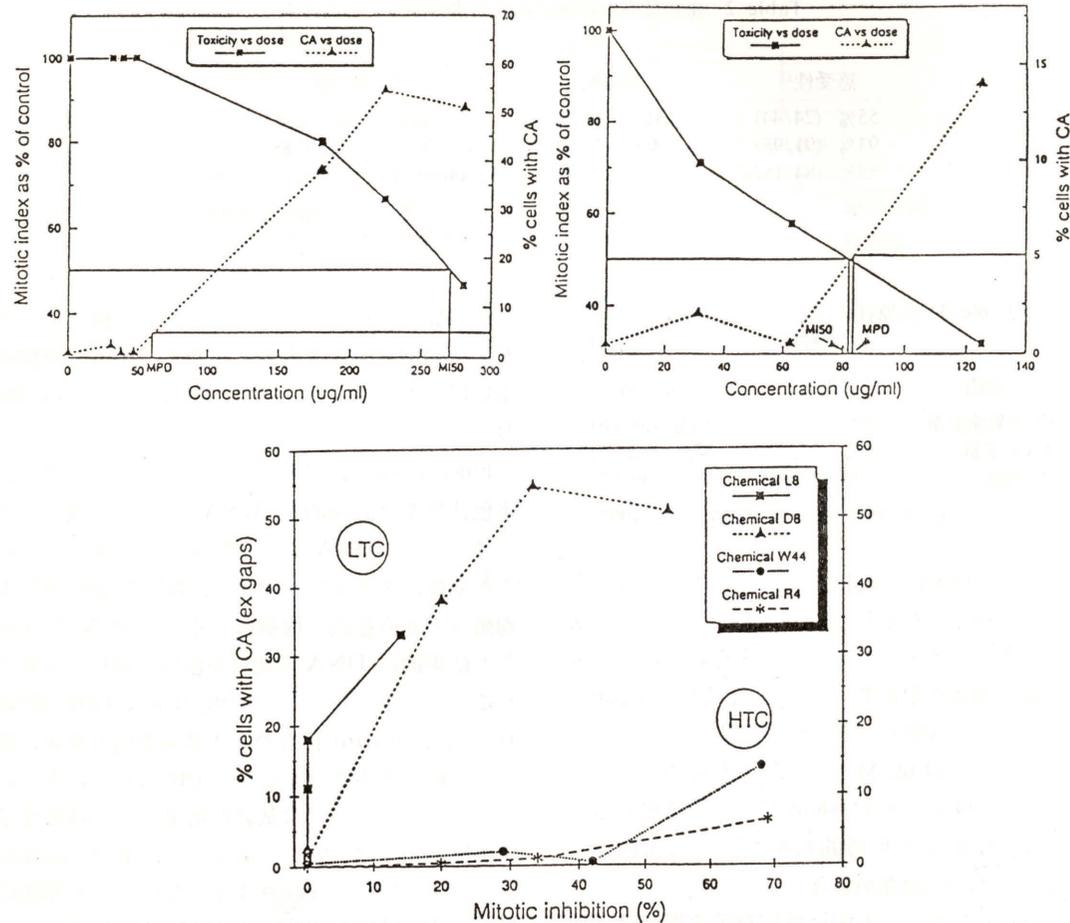


Fig. 6 染色体異常誘発性評価における HTC, LTC の概念の導入  
ヒト末梢リンパ球を用いた。  
HTC; high toxicity clastogen, LTC; low toxicity clastogen

### 5) 統計処理

適切な統計処理方法の開発を望む意見も挙げられた。これには統計学的手法と経験則 (10% 法) による判定との相違や、陰性対照の異常頻度が極めて低い場合に、処理群に簡単に有意差がついてしまうといった問題を含んでいる。Fisher's exact test,  $\chi^2$  検定, Trend test など様々な統計処理方法が用いられており, UKEMS (Richardson *et al.*, 1989) では Fisher's exact test を推奨しているが, 多重比較の問題もあり決定的なものではない。国内においても, 最近新しい統計処理方法の提案がなされている (林, 1992)。その中で林は, 統計はばらつきを持つデータを評価するうえで大事な手法であるが, データの質を評価するもので

はなく, 統計学的评价に耐え得る質の高いデータをとることが重要と述べている。

### 3. 染色体異常試験に関する最近の動向

様々な問題点を解決するために, いくつかの共同研究が行われている。CHO 細胞と CHL 細胞を用いた試験方法の相違点に関する検討は日, 米, 英の研究機関が参加し, 試験結果の違いは細胞の感受性の差によるばかりでなく, プロトコルの違いが関与していることなどが明らかとなった (Sofuni *et al.*, 1990)。IGG (Industrial Genotoxicology Group, UKEMS の下部組織的グループ) では, ヒトリンパ球における細胞周期の解析から至適標本作製時期の検討を試みている。また

日本のガイドラインにおける 48 時間処理の有効性に関する共同研究も現在計画中である。これらの共同研究は, 基本的な問題点を解明する上で有益な情報を提供するものと考えられる。

また, 試験方法の国際的ハーモナイゼーションに向けての動きも活発となってきた。遺伝毒性試験の標準的試験法の確立のための国際ワークショップが 1992 年 12 月に東京で開催され, 問題点の確認が行われた。これらは第 6 回国際環境変異原学会のサテライトシンポジウム (1993 年 2 月, メルボルン) においても引き続き討議され, 各ガイドライン間の相違点の統一あるいは調整を行い, ハーモナイズされた単一の 'recommendation' の作成を試みる。これらの会議の成果は ICH-2 (1993 年 10 月, オランダ) にも反映し, 行政サイドにおいても国際的な調和が図られる予定である。

### 4. おわりに

染色体異常試験には, 方法や評価に関するいくつかの問題点があり, その意味では染色体異常試験はまだ改良の余地のある試験といえる。様々な技術の進歩により, クロモゾームペインティング (chromosome painting) やキネトコアステイニング (kinetochore staining) といったこれまでの染色体異常試験では容易に検出することができなかった転座や異数性の異常を検出する新しい方法も考案されてきている。新しい手法や基礎的な共同研究ならびに国際的なハーモナイゼーションは, 染色体異常試験を単にスクリーニング試験にとどめるだけでなく, その精度の向上ならびに安全性評価の上でも新たな展開をもたらすものと期待される。

### 参考文献

Armstrong, M. J., C. L. Bean and S. M. Galloway (1992) A quantitative assessment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cell, *Mutation Res.*, 265, 45-60.  
Ashby, J. and R. W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP, *Mutation Res.*, 257,

229-306.

Bean, C. L., M. J. Armstrong and S. M. Galloway (1992) Effect of sampling time on chromosome aberration yield for 7 chemicals in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Res.*, 265, 31-44.  
林 真 (1992) 染色体異常試験データの統計学的処理, *変異原性試験*, 1, 255-261.  
Ishidate M. Jr., M. C. Harnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in cultured mammalian cell cultures, *Mutation Res.*, 195, 151-213.  
石館 基 (1991) 短期検索法の有用性と問題点—染色体異常試験—, *環境変異原研究*, 13, 285-294.  
Kirkland, D. J. (1992) Chromosomal aberration tests in vitro: problems with protocol design and interpretation of results, *Mutagenesis*, 7, 95-106.  
Morita, T., Y. Watanabe, K. Takeda and K. Okumura (1989) Effects of pH in the in vitro chromosomal aberration test, *Mutation Res.*, 225, 55-60.  
Morita, T., K. Takeda and K. Okumura (1990) Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 240, 195-202.  
Morita, T., T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura (1992) Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.  
Richardson, C., D. A. Williams, J. A. Allen, G. Amphlett, D. O. Chanter, B. Phillips (1989) Analysis of data from in vitro cytogenetic assays, In: UKEMS Sub-committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, D. J. Kirkland (Ed.), 141-154. Cambridge Univ. Press, Cambridge.  
Scott, D., B. J. Dean, N. D. Danford and D. J. Kirkland (1990) Metaphase chromosome aberration assays in vitro, In: Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, D. J. Kirkland (Ed.), 62-86. Cambridge Univ. Press, Cambridge.  
Scott, D., S. M. Galloway, R. R. Marshall, M. Ishidate Jr., D. Brusick, J. Ashby and B. C. Myhr (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions, A Report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-204.  
Sofuni, T., A. Matsuoka, M. Sawada, M. Ishidate Jr., E. Zeiger and M. D. Shelby (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHL and CHO) systems in culture, *Mutation Res.*, 241, 175-254.  
須藤鎮世 (1992) 国内外のガイドライン, *変異原性*

試験, 1, 228-234.

Tennant, R. W., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger, J. K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, B. Anderson

and R. Monor (1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays, Science, 236, 933-941.

環境変異原研究 15: 97-101 (1993)

シンポジウム 「変異原性試験で何がわかるか: 問題点と展望」

## マウス小核試験の問題点

山之内製薬・安全性研究所 若田明裕<sup>1</sup>

大鵬薬品・安全性研究所 大内田昭信<sup>2</sup>

大正製薬・総合研究所 鈴木洋<sup>3</sup>

### 1. はじめに

マウス小核試験は、マウスを化学物質に暴露した時に起こる染色体異常を幼若赤血球中に観察される小核として検出する試験である。この試験は、主に骨髓細胞を用いて行われるが、*in vivo*での化学物質の染色体異常誘発性を調べる試験として世界中で広く行われている。わが国の厚生省の毒性試験ガイドラインでも前回の改正(1989年)で、変異原性試験の一つとして Ames 試験、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験と共に必須の試験となった。そのため、近年この試験に対する関心が益々高くなっている。

変異原性試験の最大の目的の一つは、化学物質の発癌性を検索することである。そこでマウス小核試験の問題点を、化学物質の発癌性とマウス小核試験での小核誘発性との相関性を中心に論じる。

### 2. マウス小核試験の立場

マウス小核試験の主な特徴として、1) *In vivo*試験である、2) 造血細胞(赤芽球)での染色体異常を観察する試験である、という二つの点を挙げることができる。一つ目の *in vivo* 試験であると

いうことはこの試験の最も重要な点である。それは、現在わが国のガイドラインで必須とされている変異原性試験の中で唯一の *in vivo* 試験であるという点で更に重要視される。

今回のシンポジウムのために行われた変異原性試験に関するアンケートより、わが国で日常的に行われている *in vivo* 変異原性試験とその実施施設数を調べてみると、*in vivo* 変異原性試験はマウス小核試験の他にも、マウス、ラットの骨髓細胞などを用いた染色体異常試験、肝臓などを用いる *in vivo* 不定期 DNA 合成試験、あるいは優性致死試験など多数あるが、日常的に *in vivo* の変異原性試験を行っているという回答であった 55 施設のうち小核試験以外の試験を日常的に行っているのは 8 施設(のべ 9 施設)であった(Table 1)。これは、約 85% の施設では *in vivo* 変異原性試験としてはマウス小核試験以外ほとんど行われていないという結果であった。この様にマウス小核試験がわが国で行われているほとんど唯一の *in vivo* 変異原性試験になったのは、ガイドラインがマウス小核試験を必須試験にしたことが大きな要因の一つだと考えられる。実施すべき試験を決めることにより、試験を行う側は試験系を選択する

1) 〒174 東京都板橋区小豆沢 1-1-8

2) 〒771-01 徳島市川内町平石夷野 224-2

3) 〒330 大宮市吉野町 1-403

Problems of the mouse micronucleus test

Akihiro Wakata<sup>1</sup>, Akinobu Ohuchida<sup>2</sup> and Hiroshi Suzuki<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Safety Research Laboratories, Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., 1-1-8 Azusawa, Itabashi-ku, Tokyo 174, Japan

<sup>2</sup>Drug Safety Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., 224-2 Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

<sup>3</sup>Research Associate Department of Toxicology Research Center, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., 1-403 Yoshino-cho, Ohmiya, Saitama 330, Japan

Table 1. 日常的に実施されている *in vivo* 変異原性試験と機関数

| 小核 | <i>In vivo</i> 染色体異常 | <i>In vivo</i> UDS | <i>In vivo</i> RDS | 優性致死 |
|----|----------------------|--------------------|--------------------|------|
| 55 | 2                    | 4                  | 2                  | 1    |

(アンケートより)

手間はなくなり、いつも同じ試験を行うことで技術的に向上する事が期待され、効率的に試験を行えるという利点があると考えられる。しかし、敢えてそれ以外の試験を実施することは希になる (Table 1)。これは変異原研究の発展という点ではマイナスと思われる。また、決められた数少ない試験で、その化合物の変異原性を評価する事になり大きな誤りを犯す可能性があると考えられる。特に、マウス小核試験は実際行われている唯一の *in vivo* 試験であることから、化学物質の *in vivo* での変異原活性をこの試験の結果に委ねがちであり、偽陽性あるいは偽陰性の場合には大きな問題を残すことになる。

Table 2. 小核試験陰性の発癌物質の標的臓器

| Organs               | Chemicals  |
|----------------------|--|
| Liver                | Benzo[a]anthracene, Vinyl bromide, Auramine, Carbon tetrachloride, <i>p</i> -Cresidine, 2,4-Diaminotoluene Di(2-ethylhexyl)phthalate, 1,4-Dioxane, Hexachlorocyclohexans, 4,4'-Methylenedianiline, <i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -butylamine, <i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -propylamine, <i>N</i> -Nitrosopiperidine, <i>N</i> -Nitrosopyrrolidine, Phenazopyridine, Phenytoin, Trypan blue, Hexachlorocyclohexans, 5-Nitroacenaphthene |
| Esophagus            | <i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -butylamine, <i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -propylamine, <i>N</i> -Nitrosopiperidine   |
| Stomach              | Acrylonitrile, Ethylene dibromide, Styrene oxide, $\beta$ -butyrolactone   |
| Intestine            | Phenazopyridine  |
| Lung                 | Benzo[a]anthracene, Ethylene dibromide, Formaldehyde, Beryllium compounds, 4,4'-Methylenedianiline, Metronidazole, 1,1-Dimethylhydrazine, 5-Nitroacenaphthene  |
| Skin                 | Benzo[a]anthracene, Epichlorohydrin, Ethylene oxide, Styrene oxide, $\beta$ -butyrolactone, 2,4-Diaminoanisole, 5-Nitroacenaphthene  |
| Mammary gland        | Acrylonitrile, 2,4-Diaminotoluene, Metronidazole, 3,3'-Dimethylbenzidine, 5-Nitroacenaphthene  |
| Kidney               | <i>o</i> -Anisidine, Lead compounds  |
| Bladder              | <i>o</i> -Anisidine, <i>p</i> -Cresidine, <i>N</i> -Nitrosodi- <i>n</i> -butylamine  |
| Thyroid gland        | Acrylamide, <i>o</i> -Anisidine, Methylthiouracil, 2,4-Diaminoanisole  |
| Zymbal's gland       | Vinyl bromide, 2,4-Diaminoanisole  |
| Adrenal gland        | Acrylamide   |
| Hormonal organ       | Medroxyprogesterone acetate  |
| Uterus               | Testosterone   |
| Brain                | Acrylonitrile  |
| Hematopoietic system | Chloramphenicol, Cyclosporin, 2,4-Diaminotoluene, Dichloromethane, 4,4'-Methylenedianiline   |

(Benigni, 1990; Tomatis and Bartsch, 1990; Tennant and Ashby, 1991)

### 3. 臓器特異性に関して

二つ目の特徴である赤芽球で起こる染色体異常を幼若赤血球中の小核として観察している点は、小核試験を大変簡便で定量的な試験にしている。核の無い赤血球中にある小さな核様のものを観察するので判別が容易であり、染色体を観察するほどの熟練も必要ない。また、幼若赤血球を観察することは化学物質が作用した間の変化を定量的に把握できることである。このことが小核試験を普及させ最も多く実施される *in vivo* 変異原性試験とした。近年、骨髄だけではなく末梢血液の幼若赤血球中の小核を観察する方法が行われるようになってきた (Mavournin *et al.*, 1990; CSGMT, 1992) が、これも赤血球を観察するものである以上、赤芽球中に起こった染色体異常を観察していることには変わりはない。

発癌物質に臓器特異性があることが知られているように、化学物質の作用には臓器特異性があり赤芽球に生じた染色体異常しか観察していない小

Table 3. IARC 発癌物質の標的臓器と小核試験での反応性 (化合物数)

|    | 標的臓器 |    |    |
|----|------|----|----|
|    | 造血組織 | 局所 | 肝臓 |
| 陽性 | 23   | 14 | 19 |
| 陰性 | 5    | 13 | 23 |

(Benigni, 1990; Tomatis and Bartsch, 1990; Tennant and Ashby, 1991)

核試験のみで生体内での化学物質の活性を総て把握できるものではないことは明白である。

国際癌研究機構 (IARC) によってヒトに対する発癌物質として挙げられている物質の中でマウス小核試験の結果が陰性であった物質の発癌部位 (Benigni, 1990; Tomatis and Bartsch, 1990; Tennant and Ashby, 1991) を調べてみると、肝臓に特異的に癌を起こす物質の中に小核試験で検出できない物質が多い (Table 2)。また、肺に特異的な化合物の中にも小核試験で検出できないものもある。この様に発癌物質の臓器特異性による小核試験に対する反応性の違いは明かである。

同様に IARC 発癌物質の発癌標的部位と小核試験での反応性 (Benigni, 1990; Tomatis and Bartsch, 1990; Tennant and Ashby, 1991) をみてみると、特に、造血組織、局所あるいは肝臓について興味深い結果がえられた (Table 3)。ここで局所あるいは肝臓が標的臓器であるとしたものは造血組織には癌を起こさないとされているものに限ってある。その結果、当然のことながら骨髄

Table 4. *In vitro* 変異原性試験で陽性の発癌物質の *in vivo* 変異原性試験での反応性

| Chemicals               | Activity <i>in vitro</i> | Mouse MN assay | Liver UDS assay | Carcinogenicity |
|-------------------------|--------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Dimethylnitrosamine     | +                        | +*             | +               | +               |
| Diethylnitrosamine      | +                        | -              | +               | +               |
| 2,4-Dinitrotoluene      | +                        | -              | +               | +               |
| 3'-MeDAB                | +                        | -              | +               | +               |
| 6BT (DAB analogue)      | +                        | -              | +               | +               |
| Dimethylhydrazine       | +                        | +*             | +               | +               |
| Cyclophosphamide        | +                        | +              | -               | +               |
| Benzo[a]pyrene          | +                        | +              | -               | +               |
| Hexamethylphosphoramide | +                        | +              | -               | +               |
| Dimethylbenzanthracene  | +                        | +              | -               | +               |
| 2-Acetylaminofluorene   | +                        | +              | +               | +               |
| Benzidine               | +                        | +              | +               | +               |
| MNNG                    | +                        | +*             | -               | +               |

+, positive; -, negative; \*, 6th CSGMT (1992)

(Ashby, 1986)

に代表される造血組織が標的臓器である発癌物質は 80% 以上小核試験で陽性の結果となる。しかし、投与部位あるいは皮膚の塗布部位などの局所が標的である発癌物質では陽性率が 50% に下がり、肝臓が標的臓器の発癌物質では陽性率が 45% であるという結果となった。このことから、発癌物質の標的臓器によって小核試験の信頼性が大きく違ってくることがわかる。この中でも、発癌に関して重要とされている肝臓発癌物質の検出力が低いのはこの試験の大きな問題であると考えられる。しかし、逆の考え方をすれば、骨髄細胞が標的でない発癌物質でも半数近くは検出できると見られることもできる。これが小核試験をオールラウンダーの様に錯覚させている原因であると考えられるが、小核試験の陰性の結果は、その物質の臓器特異性のため検出されない可能性があることを十分に考慮しなければならないことがわかる。

*In vitro* で変異原性を示す発癌物質のマウス小核試験と肝臓の UDS 試験の結果 (Ashby, 1986; 小核共同研究グループ, 1991, 1992) を比べてみると、両方の試験で陽性を示す物質もあるが、小核試験のみあるいは肝臓の UDS 試験のみで陽性を示す発癌物質が多くあることがわかる (Table 4)。この様に *in vivo* の試験では観察する臓器によって物質の反応性が明らかに違ってくる。このことから、小核試験のみでその物質の生体内での活性を判断するのは問題が多い。

#### 4. 発癌性との相関について

一般的に、*in vivo* 試験は *in vitro* 試験に比べて、感度は低い、偽陽性の結果がでることも少ないと考えられている。小核試験についても多くの人がそう考えている。しかし、小核試験の National Toxicology Program のデータベースを用いた調査結果 (Mavournin *et al.*, 1990) では発癌性がないとされている 14 化合物のうち半数にあたる 7 化合物が陽性あるいは陽性と疑われる結果であった (Table 5)。この 7 化合物の変異原性と発癌性試験に対する反応 (Waters *et al.*, 1988) をみてみると、これらの物質は、全て *in vitro* で哺乳類培養細胞に染色体異常を起こす物質で、Ames 試験と哺乳類培養細胞の突然変異試験ではそれぞれ 4 化合物が陽性となる (Table 6)。また、全ての変異原性試験で陽性である物質もある。発癌性試験の結果にも疑問の余地があるが、*in vivo* 試験、小核試験、を偽陽性のない試験であると盲信するのは危険であるという結果である。

Table 5. 小核試験の結果と発癌性データの比較 (化合物数)

| Carcinogenicity | Micronucleus Test Results |    |     |       |
|-----------------|---------------------------|----|-----|-------|
|                 | + or +u                   | -  | I   | Total |
| + or +L         | 51                        | 5  | 33  | 89    |
| - or -L         | 7                         | 1  | 6   | 14    |
| I of E          | 9                         | 3  | 8   | 20    |
| no data         | 121                       | 27 | 142 | 290   |
| Total           | 188                       | 36 | 189 | 413   |

+, positive; +L, limited positive; +u, unconfirmed positive; -, negative; -L, limited negative; I, inadequate test; E, equivocal results (Mavournin *et al.*, 1990)

Table 6. 小核試験陽性の非発癌物質の変異原性試験結果

| Chemicals                   | MN | CAR | Ames | <i>In vitro</i> Cytogenetics | Mammalian cell mutation |
|-----------------------------|----|-----|------|------------------------------|-------------------------|
| Caffeine                    | +  | -L  | -    | +                            | +                       |
| Dimethoate                  | +u | -   | +    | +                            | ND                      |
| Hycanthone methanesulfonate | +  | -L  | +    | +                            | +                       |
| Malathion                   | +  | -   | -    | +                            | ND                      |
| Methotrexate                | +  | -L  | -    | +                            | +                       |
| Methyl parathion            | +  | -   | +    | +                            | ND                      |
| 1-Naphthylamine             | +u | -L  | +    | +                            | +                       |

MN, Micronucleus; test; CAR, Carcinogenicity

+, positive; +u, insufficient positive; -, negative; -L, limited negative; ND, No data

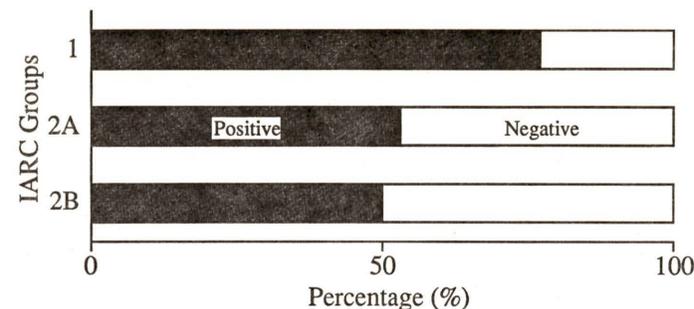
(Waters *et al.*, 1988)

IARC 発癌物質のマウス小核試験に対する反応性 (Mavournin *et al.*, 1990; 小核共同研究グループ, 1991, 1992) をみてみると、IARC では発癌性の確からしさの高いものから 1, 2A, 2B とグループ分けしているが、最も発癌性が確からしいグループ 1 の物質では 70% 以上が小核試験で陽性になり、以下グループ 2A, 2B の化合物と小核試験での陽性率が低くなり、グループ 2B では 50% が小核試験で検出できないことがわかった (Fig. 1)。発癌物質であることが確かな物質ほど小核試験で陽性になる確率が高いという結果であった。

また、これらの発癌物質の構造と小核試験の反応をみてみると、代謝活性化を必要とする芳香族アミン類、ニトロソアミン類、ハロゲン化合物、ホルモン類、ニトロ化合物、金属類などの発癌物質は小核試験で陰性になるものが多いことがわかった (Fig. 1)。これらの化合物は Ames 試験や *in vitro* の染色体異常試験で強い活性を示すものも多い。この様に、小核試験で陰性の結果であったとしても、発癌物質であるものが多数ある。その化学物質の構造が上記のような小核試験で検出されにくいものであれば、小核試験の結果が陰性であっても、他の試験の結果を考え合わせて生体内での変異原活性の評価に注意を払わなければならない。

#### 5. 最後に

これまで述べてきたように、マウス小核試験の結果が生体内での化学物質の変異原活性を全て反映しているとする考えは間違いであることは確か



- | Sensitive   | Insensitive                        |
|---|------------------------------------|
| • Antineoplastic agents (15/15) <sup>a</sup>                        | • Agents need metabolic activation |
| • Direct-acting alkylating agents (14/18) (Nitrogen mustard deriv.) | Aromatic amines (8/24)             |
| • Epoxides (2/4)  | Nitrosoamines (2/11)               |
|   | • Halogenated compounds (2/12)     |
|   | • Hormones (0/5)                   |
|   | • Nitro- compounds (0/4)           |
|   | • Urea and Thioureas (0/4)         |
|   | • Inorganic compounds (2/14)       |

a: (小核試験陽性化合物数/化合物数)

(Mavournin *et al.*, 1990; 6th CSGMT, 1992)

Fig. 1. IARC 発癌物質の小核試験における反応性

である。ゆえに、*in vitro* の染色体異常試験で陽性となった結果を小核試験の陰性の結果で即座に否定することは危険である。その物質が骨髄細胞に確かに作用しているか、構造的に小核試験で検出されにくいものではないか、また他の試験での結果はどうかなどを考慮して判断すべきであると考えられる。小核試験の陰性結果は信頼できないものではないが、Fig. 1 の結果が示すようにその陽性結果に重きを置いて考える試験であると思われる。

また、変異原性研究あるいは変異原性試験の今後の発展のためには、マウス小核試験に匹敵あるいは補足する *in vivo* 変異原性試験の開発およびその様な試験の積極的な実施が望まれる。

#### 参考文献

- Ashby, J. (1986) The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens, *Mutagenesis*, **1**, 3-16.
- Benigni, R. (1990) Rodent tumor profiles, *Salmonella* mutagenicity and risk assessment, *Mutation Res.*, **244**, 79-91.
- CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS, *Mutation Res.*, **278**, 83-98.
- Mavournin, K. H., D. H. Blakey, M. C. Cimino, M. F. Salamone and J. A. Heddle (1990) The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, **239**, 29-80.
- Nersisians, A. K. (1992) Activity of human carcinogens in the *Salmonella* and rodent bone marrow cytogenetic tests, *Mutation Res.*, **281**, 239-243.
- 小核共同研究グループ (JEMS・MMS 分科会) (1991) マウス小核試験とヒト癌原性との相関—第1報—, 第20回日本環境変異原学会 (東京) 講演要旨集, p. 233.
- 小核共同研究グループ (JEMS・MMS 分科会) (1992) マウス小核試験とヒト癌原性との相関—第2報—, 第21回日本環境変異原学会 (札幌) 講演要旨集, p. 129.
- Tennant, R. W. and J. Ashby (1991) Classification according to chemical structure, mutagenicity to *Salmonella* and level of carcinogenicity of a further 39 chemicals tested for carcinogenicity by the U. S. National Toxicology Program, *Mutation Res.*, **257**, 209-227.
- Tomatis, L. and H. Bartsch (1990) The contribution of experimental studies to risk assessment of carcinogenic agents in human, *Exp. Pathol.*, **40**, 251-266.
- Waters, M. D., H. B. Bergman and S. Nesnow (1988) The genetic toxicology of Gene-Tox non-carcinogens, *Mutation Res.*, **205**, 139-182.

シンポジウム「変異原性試験で何がわかるか：問題点と展望」

## 遺 伝 毒 性 試 験

近畿大学原子力研究所 藤 川 和 男<sup>1</sup>  
ファイザー製薬(株)新薬開発センター 佐々木 有<sup>2</sup>  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所 長尾 哲二<sup>3</sup>

### 1. はじめに

ヒトの遺伝的障害の原因となりうる物質を遺伝毒物、ある物質がこのような性質を有しているかどうかを調べる試験を遺伝毒性試験と定義する。私たちの知る限り、現在わが国の企業は、この種の試験をルーチン試験として実施していない。にもかかわらず、日本環境変異原学会第21回大会のシンポジウム「変異原性試験で何がわかるか：問題点と展望」の準備のために、企業の変異原性試験担当者にむけて実施されたアンケート調査で、このメインタイトル通りの問いに対して、癌原性と並んで遺伝毒性という回答が比較的高頻度で得られている。

このような現状をふまえて、上記シンポジウムで遺伝毒性試験に関する特別発言を行った。本稿はこの発言内容を骨子にして草した。

### 2. 遺伝毒性試験の特色とガイドラインにおける位置づけ

変異原は必ずしも遺伝毒物ではない (Russell, 1984, Table 3 参照)。性細胞に特異的な変異原は存在しない (Adler and Ashby, 1989)。これらの経験則も考慮すると、遺伝毒性試験の特色は次のようになる。

(1) 変異原を被験物質とする。

(2) 哺乳動物性細胞の突然変異を指標とする。  
(3) ヒトの遺伝的障害を誘発する危険性を評価するために実施する。

特色 (1) は、試験を効率的に実施するための戦略である。特色 (2) は試験の目的、即ち、特色 (3) から当然なことで、試験系としてはマウス、時にはラットが用いられる。特色 (3) は、遺伝毒性試験がマウス、ラットによる長期癌原性試験や催奇形性試験と同列の最終試験であることを意味する。

実際、イギリスのガイドライン (DOH, 1989) では、Stage I の *in vitro* 変異原性試験、Stage II の *in vivo* 変異原性試験に引き続く最終段階 Stage III に遺伝毒性試験を位置づけている。これは、遺伝毒性試験はヒトに対する遺伝的リスクを評価する必要性が生じた場合に実施する試験であって、変異原性の有無を調べる試験としては不要であるという判断に基づく。

しかし、イギリスのガイドラインは例外的なもので、わが国のガイドラインを含む他の公的ガイドラインでは、遺伝毒性試験を変異原性の短期検索試験と区別して特別扱っていない (Berry and Litchfield, 1985 参照)。

### 3. 遺伝毒性試験のいろいろ

現在まで多種多様な遺伝毒性検出法が開発され

1) 〒577 東大阪市小若江 3-4-1

2) 〒470-23 愛知県知多郡武豊町 5

3) 〒257 秦野市落合 729-5

Tests of chemicals for heritable genotoxicity; status quo and perspective

Kazuo Fujikawa<sup>1)</sup>, Yū F. Sasaki<sup>2)</sup> and Tetsuji Nagao<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Atomic Energy Research Institute, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashiosaka, Osaka 577

<sup>2)</sup>New Product Development Center, Pfizer Pharmaceuticals, Inc., Taketoyo 5, Chita-gun, Aichi 470-23

<sup>3)</sup>Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Hadano, Kanagawa 257, Japan

Table 1. 遺伝毒性試験のいろいろ

|                                |
|--------------------------------|
| 性細胞を対象とする試験                    |
| 精原細胞/精母細胞染色体異常試験 <sup>a)</sup> |
| 精母細胞小核試験 <sup>b)</sup>         |
| 精母細胞/精子細胞 UDS 試験 <sup>c)</sup> |
| 精子形態異常アッセイ <sup>d)</sup>       |
| 次世代を対象とする試験                    |
| 優性致死試験 <sup>e)</sup>           |
| 特定座位試験 <sup>f)</sup>           |
| 遺伝性転座試験 <sup>g)</sup>          |
| 優性突然変異試験 <sup>h)</sup>         |
| 多指標試験 <sup>i)</sup>            |

- a) 細胞遺伝学的相互転座試験を含む (一ツ町, 1991 参照).  
 b) *Tates et al.* (1983).  
 c) *Sega* (1974).  
 d) *Wyrobek and Bruce* (1975).  
 e) 佐々木 (1991) 参照.  
 f) 渋谷 (1991) 参照.  
 g) 田中 (1991) 参照.  
 h) 遺伝性骨格異常あるいは白内障を指標にする試験 (*Ehling*, 1991 参照).  
 i) 7 座位の劣性可視突然変異, 約 30 座位の優性白内障突然変異, 23 座位のタンパク変異, 12 座位の酵素活性変異を同時に調べる試験 (*Ehling*, 1991 参照).

ている。それらを性細胞を対象とする試験と次世代を対象とする試験に大別して, Table 1 に列挙している。

性細胞を対象とする試験は, 処理を受けた世代で性細胞の DNA あるいは染色体に損傷が生じた証拠を UDS, 染色体異常, 小核あるいは精子の形態異常を指標にして観るもので, 次世代を対象とする試験よりはるかに簡便に, 性細胞に対する変異原性の有無を明らかにする。この種の試験の信頼できる陰性結果は, 被験物質が遺伝毒性を有する可能性が非常に低いことを教える。しかし, 陽性結果は遺伝毒性の証拠とはみなせない。細胞遺伝学的試験の相互転座や異数体を除いて, 性細胞試験のいずれの指標も継代遺伝性ではないからである。相互転座も異数体も, どの程度が遺伝するかは推定は容易ではない。

最近話題になっている MutaMouse では, 処理した世代で性細胞の遺伝子突然変異が検出できる (加藤他, 1992)。この種のトランスジェニックマウスの応用研究が進めば遺伝的リスクの定量的評

価に有用な短期試験系が開発できるかもしれない。

次世代を対象とする試験は, 親の性細胞で継代遺伝性の突然変異が生じた証拠を検索する。そのため, 繰り返し交配を行って, 処理時にいろいろな発育段階にあった性細胞を F<sub>1</sub> 子孫として採取しなければならない。当然, 長期試験になる。比較的簡便に実施できるのはマウス優性致死試験で, この試験は遺伝毒性のスクリーニングに適している。イギリスのガイドラインでは, 表示した試験以外に, 受精卵の染色体異常試験や F<sub>1</sub> 胚の異数性試験も挙げている。これらの試験は, 遺伝性の染色体異常の証拠を検索する。ヒトに対する危険度の定量的推定には, マウスの劣性可視突然変異を指標にする特定座位試験, 白内障を指標にする優性突然変異試験, 遺伝性転座試験が重要視されている (*Narod et al.*, 1988; *Ehling*, 1991)。

次世代試験のニューフェイスとしては, F<sub>1</sub> 奇形試験が注目されている (*Narod et al.*, 1988; *Douglas*, 1990)。この試験は, 優性致死試験で妊娠子宮の剖検を交配後 18 日目に行い, 死亡胚に加えて異常生存胎児を調べるようなもので, *Nomura* (1975) の発見「親世代性細胞の変異原処理で次世代の先天異常や癌を誘発することができる」に基づいている。今まで調べられた限り, マウス精原幹細胞処理で特定座位突然変異を誘発する物質はいずれも, 同様な処理で F<sub>1</sub> 奇形をもたらす (Table 3 参照)。試験の指標はヒトの先天異常と対応させることができる。ヒトの遺伝的リスクの評価系としてどの程度有用かは, 今後の研究に待ちたい。

#### 4. 遺伝毒性試験の問題点

*Brewen and Preston* (1975) は, ヒトの睾丸に X 線を局所照射した後, しばらく待って, バイオプシーで精母細胞を得た。彼らは, その細胞の染色体を観察して, 精原幹細胞期に生じた相互転座を検出した。その結果, Fig. 1 に示すような明瞭な線量効果関係を得た。図にはマウスで得られた結果も示している。図示した線量範囲内では, 精原幹細胞における相互転座の誘発率 (/細胞/rad) はヒトの方がマウスより約 2 倍高い。*Martin et al.*

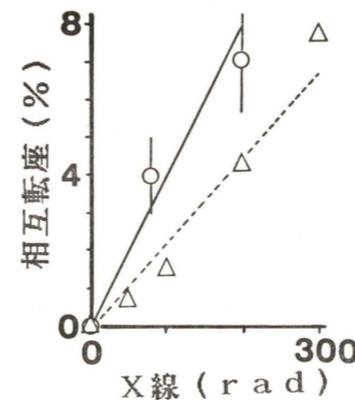


Fig. 1. ヒト (○) とマウス (△) の精原幹細胞における X 線誘発相互転座の出現様相 (*Brewen and Preston*, 1975 より作成)

Table 2. 原爆放射線の遺伝的影響 (*Kondo*, 1993 を改写)

| 調査した遺伝的異常           | 親の平均被曝量 (rem) | 出現頻度の相対値 (被曝/対照) <sup>a)</sup> |
|---------------------|---------------|--------------------------------|
| 周産期異常 <sup>b)</sup> | 36            | 1.0                            |
| 早期死亡 <sup>c)</sup>  | 40            | 1.0                            |
| 平衡型染色体再配列           | 60            | 0.7                            |
| 染色体の異数性             | 60            | 0.8                            |
| 突然変異 <sup>d)</sup>  | 41            | 0.8                            |
| 白血病 <sup>e)</sup>   | 43            | 1.0                            |

- a) 被曝者の子供集団/被曝していない人の子供集団  
 b) 死産, 奇形, 新生児死亡  
 c) 生後から 17 歳までの死亡  
 d) 血液タンパクの変異  
 e) 20 歳までに発病したもの

(1986) は, 癌の X 線治療を受けた患者の精子をハムスターの未受精卵に媒精した後, 受精卵の染色体を観察し, 精子に染色体異常が誘発された証拠を得た。これらのデータは, ヒト性細胞に対する放射線の染色体損傷効果を証明する。しかし, 遺伝毒性は証明していない。

この証明が得られるとしたら, 原爆放射線の遺伝的影響の疫学的研究において他にない。Table 2 に放射線影響研究所の研究陣による調査結果をまとめている。表中の値は, いずれも約 1 で, 被爆二世集団での各種遺伝的障害の出現頻度は非被爆対照群以上に増加していないことを示す。染色体異常も突然変異も同様に対照レベルにある。*Russell and Kelly* (1982) の X 線誘発特定座位突然変異のデータに基づくと, 親の被曝量 40-60 rem

は, マウスでは F<sub>1</sub> 変異体頻度を対照群の約 2 倍に上昇させる線量に相当する。

原爆放射線の人体影響は, 発癌 (*Shimizu et al.*, 1991), 先天異常 (*Otake et al.*, 1991), 体細胞突然変異 (*Akiyama et al.*, 1991), 体細胞染色体異常 (*Awa*, 1991) のいずれでも証明されているが, 遺伝的効果は認められていない。同様に, 化学制癌剤による治療を受けた患者で, 二次癌が発生したり体細胞染色体異常が生じたケースは古くから知られている (*Sieber and Adamson*, 1975 参照) が, その治療のため遺伝的障害が発生した証拠は今のところ, 得られていない (*Green et al.*, 1991)。精巣癌の治療を受けた患者の子供においてさえもそうである (*Senturia et al.*, 1985)。

放射線や制癌剤に関わらず, 環境因子とヒトの遺伝的障害の因果関係が明瞭に示された例がないことは, 遺伝毒性試験を実施するうえで最大の問題である。現行の癌原性試験や催奇形性試験は, ヒト発癌物質や催奇形性物質は実験動物でも癌や奇形をもたらすという経験則によって, その意義が認められているが, 同じ最終試験であっても, 遺伝毒性試験はこのような経験によって評価されていないからである。極言すれば, マウスが試験に適した実験動物かどうかはわかっていない。実際, 放射線の遺伝的リスクの推定法と絡めて, この問題が論議されている (*Neel and Lewis*, 1990; *Ehling*, 1991)。

遺伝毒性試験の必要性を支持する唯一の論理は「実験動物の遺伝毒物はヒトで遺伝的障害をもたらすおそれがある」である。この論理は, ヒトが環境因子の遺伝的影響に抵抗性である証拠と, それを説明するメカニズムが明らかにならない限り正当である。原因は不明でも遺伝的障害をもつ子供が稀ではない頻度で生まれている (例えば, *Baird et al.*, 1988)。ヒトで生ずる異常と同様な障害を変異原投与を受けたマウスの子孫で発生させることができる (*Nomura*, 1975; *Nomura*, 1982; *Nomura et al.*, 1990)。従って, *in vivo* 変異原/癌原物質であっても, 生殖年齢あるいはそれ以前のヒトに使わざるをえない薬物については, 遺伝毒性試験は必要となるかもしれない。問題は, 陽性結果が得られた場合, 当該薬物の遺伝的リスク

Table 3. 各種変異原/癌原物質のマウス精原細胞遺伝毒性試験と骨髄小核試験の結果の比較

| 変異原                                    | 処理: | 精原幹細胞              |                                 | 骨髄               |
|--|-----|--------------------|---------------------------------|------------------|
|  | 指標: | 劣性可視 <sup>a)</sup> | F <sub>1</sub> 奇形 <sup>b)</sup> | 小核 <sup>c)</sup> |
| EthylNitrosourea (ENU)                 |     | +                  | +                               | +                |
| MethylNitrosourea (MNU)                |     | +                  | +                               | +                |
| Propyl methanesulfonate                |     | +                  | +                               | +                |
| Mitomycin C                            |     | +                  | +                               | +                |
| Triethylenemelamine                    |     | +                  | +                               | +                |
| Procarbazine                           |     | +                  | +                               | +                |
| Urethan                                |     | -                  | +                               | +                |
| Acrylamide                             |     | +                  | ND                              | -                |
| 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) |     | -                  | -                               | +                |
| Benzo(a)pyrene                         |     | -                  | ND                              | +                |
| 1, 2-Dibromo-3-chloropropane           |     | -                  | ND                              | +                |
| Ethylene oxide                         |     | -                  | ND                              | +                |
| Hycanthone                             |     | -                  | ND                              | +                |
| Myleran                                |     | -                  | ND                              | +                |
| Furylfuramide (AF-2)                   |     | ND                 | -                               | -/+              |
| Diethylnitrosamine                     |     | -                  | ND                              | -                |
| Ethylene dibromide                     |     | -                  | ND                              | -                |

+, 陽性。-, 陰性。ND, 未定。

<sup>a)</sup> 特定座位突然変異; MNU (Ehling and Neuhäuser-Klaus, 1991), acrylamide (Ehling and Neuhäuser-Klaus, 1992) 以外は Ressel *et al.* (1981) と Russell (1984) による。

<sup>b)</sup> ENU (Nomura, 1988; Nagao, 1988), MNU (Nagao, 1987), DMBA, urethan, AF-2 (Nomura, 1988) 以外は Nagao and Fujikawa (1991) による。

<sup>c)</sup> Acrylamide (CGMT/MMS, 1992; Dearfield *et al.*, 1988), AF-2 (CGMT/MMS, 1992) 以外は Mavournin *et al.* (1990) による。AF-2 の陽性は Ms/Ae マウス, 陰性は ICR マウスによる試験結果。

をどのように推定するかである。方法はいろいろ提唱されている (ICPEMC, 1983; Rhomberg *et al.*, 1990; Ehling 1991)。ガイドラインもある (USEPA, 1986)。しかし, 確立されたものはない。

### 5. 遺伝毒性試験と体細胞変異原性試験

リスク推定を目的としない毒性試験の意義は, スクリーニングと安全性確認に限られる。この意味で, 遺伝毒性試験として性細胞 UDS 試験や染色体異常試験を推奨する意見 (Ashby, 1986) はうなづける。実際問題, 企業の変異原研究の目的はリスク推定にはない。大事なことは, 特殊なケース以外は, 遺伝毒物を世に出さないことである。遺伝毒物は体細胞でも変異原性を示すので, 体細胞変異原をふるい落とせばいい。

Table 3 に各種変異原/発癌物質のマウス精原幹細胞処理による遺伝毒性試験と骨髄細胞を対象とする小核試験の結果をまとめている。精原幹細胞を重視するのは, この細胞で生じた突然変異は, 個

体が生殖年齢にある限り, 次世代に伝わりうるからである。現在までに 8 種の変異原が精原幹細胞処理で遺伝毒性を示している。これらの遺伝毒物は, acrylamide 以外, すべて小核試験で変異原性を示す。Acrylamide の「性細胞で陽性/体細胞で陰性」の結果は, この物質をマウスに i.p. 注射あるいは経口投与後, 精原細胞と骨髄細胞で染色体異常を調べた Shiraishi (1978) の報告と一致する。Acrylamide は, ショウジョウバエでは, 性細胞でも体細胞でも明瞭な変異原性を示す (Tripathy *et al.*, 1991)。マウスにおける acrylamide の体細胞変異原性は組織特異性を示すものと思われる。このような遺伝毒物が稀な例外である保証はない。現行のマウス小核試験のみで, 遺伝毒物を含む *in vivo* 変異原をふるい落とすには不安がある。

### 6. おわりに

マウス精原幹細胞処理で遺伝毒性を示す物質は発癌物質でもある。現在, 企業における変異原研

究は発癌性の予備検索を主目的としている。癌原物質を世に出さない努力は環境因子による遺伝的障害を未然に防ぐことにもなる。*In vivo* 試験系の充実も含めて, このような努力が続く限り, 遺伝毒性試験はルーチン試験としては不要である。

薬物の遺伝的リスクの定量的評価に関しては, 企業の変異原研究がスクリーニングに偏重していることが, 確立された方法論が無いこと以上に問題である。変異原のリスク評価ができる研究基盤を固めた後, 改めて, 遺伝毒性試験の問題を考えた遅くはない。

以上, 2 点を指摘して本稿のまとめとする。

### 謝辞

吉川邦衛博士にはシンポジウムで発言する機会を与えていただいた。青儀巧, 柴原俊一, 中島由弥, 原巧の各氏には文献収集で助けていただいた。原博士からは有益な助言も得た。記して深謝する。

### 参考文献

- Adler, I.-D. and J. Ashby (1989) The present lack of evidence of unique rodent germ-cell mutagens, *Mutation Res.*, 212, 55-66.
- Akiyama, M., N. Nakamura, M. Hakoda, S. Kyozumi, J. Kushiro, Y. Hirai and Y. Kusunoki (1991) Somatic cell mutations in atomic bomb survivors, *J. Rad. Res.*, 32, Suppl., 278-282.
- Ashby, J. (1986) The prospects for a simplified and internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens, *Mutagenesis*, 1, 3-16.
- Awa, A. A. (1991) Persistent chromosome aberrations in the somatic cells of A-bomb survivors, *J. Rad. Res.*, 32, Suppl., 265-274.
- Baird, P. A., T. W. Anderson, H. B. Newcombe and R. B. Lowry (1988) Genetic disorders in children and young adults: A population study, *Am. J. Human Genet.*, 42, 677-693.
- Berry, D. J. and M. H. Litchfield (1985) A review of the current regulatory requirements for mutagenicity testing, in: Ashby, J. et al. (Eds.), *Progress in Mutation Research*, 5, 727-740.
- Brewen, J. G. and R. T. Preston (1975) Analysis of X-ray-induced chromosomal translocations in human and marmoset spermatogonial stem cells, *Nature*, 253, 468-470.
- CGMT/MMS, Collaborative Study Group for the

Micronucleus Test of Mammalian Mutagenesis Study Group (1992) Evaluation of mouse micronucleus assay to screen carcinogens, *Mammalian Mutagenicity Study Group Commun.*, No. 6, 1-55.

Douglas, G. R. (1990) The inclusion of an assay for inherited congenital malformations in the assessment of mutagenicity, *Mutagenesis*, 5, 421-423.

Dearfield, K. L., C. O. Abernathy, M. S. Ottley, J. H. Brantner and P. F. Hayes (1988) Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity, *Mutation Res.*, 195, 45-77.

DOH, Department of Health (1989) Guidelines for the Testing of Chemical Mutagenicity, Her Majesty's Stationary Office, London.

Ehling, U. H. (1991) Genetic risk assessment, *Ann. Rev. Genet.*, 25, 255-280.

Ehling, U. H. and N. Neuhäuser-Klaus (1991) Induction of specific-locus and dominant lethal mutations in male mice by 1-methyl-1-nitrosourea (MNU), *Mutation Res.*, 250, 447-456.

Ehling, U. H. and N. Neuhäuser-Klaus (1992) Reevaluation of the induction of specific-locus mutations in spermatogonia of the mouse by acrylamide, *Mutation Res.*, 283, 185-191.

Green, D. M., M. A. Zevon, G. Lowrie, N. Seigelstein and B. Hall (1991) Congenital anomalies in children of patients who received chemotherapy for cancer in childhood and adolescence, *New Eng. J. Med.*, 325, 141-146.

一ツ町晋也 (1991) 染色体試験, 石館 基(編), 毒性試験講座 12「変異原性, 遺伝毒性」, 地人書館, 東京, pp. 189-195.

ICPEMC, International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (1983) Estimation of genetic risks and increased incidence of genetic disease due to environmental mutagens, *Mutation Res.*, 115, 255-291.

加藤基恵, 猪股智夫, 石原尚古, 鈴木文子, 信田卓男, 石岡邦明, 渋谷 徹 (1992) Muta™ Mouse 雄生殖細胞のX線照射による遺伝子突然変異, 日本環境変異原学会第 21 回大会 (札幌) プログラム・要旨集, p. 66.

Kondo, S. (1993) Health Effects of Low Level Radiation, Kinki Univ. Press, Osaka.

Martin, R. H., K. Hildebrand, J. Yamamoto, A. Rademaker, M. Barnes, G. Douglas, K. Arthur, T. Ringrose and I. S. Brown (1986) An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy, *Mutation Res.*, 174, 219-225.

Mavournin, K. H., D. H. Blakey, M. C. Cimino, M. F. Salamone and J. A. Heddle (1990) The

in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, 29-80.

Nagao, T. (1987) Frequency of congenital defects and dominant lethals in the offspring of male mice treated with methyl nitrosourea, *Mutation Res.*, 177, 171-178.

Nagao, T. (1988) Congenital defects in the offspring of male mice treated with ethyl nitrosourea, *Mutation Res.*, 202, 25-33.

Nagao, T. and K. Fujikawa (1990) Genotoxic potency in mouse spermatogonial stem cells of triethylenemelamine, mitomycin C, ethyl nitrosourea, procarbazine, and propyl methanesulfonate as measured by F<sub>1</sub> congenital defects, *Mutation Res.*, 229, 123-128.

Narod, S. A., G. R. Douglas, E. R. Nestmann and D. H. Blakey (1988) Human mutagens: Evidence from paternal exposure?, *Environ. Mol. Mutagen.*, 11, 401-415.

Neel, J. V. and S. E. Lewis (1990) The comparative radiation genetics of human and mice, *Ann. Rev. Genet.*, 24, 327-362.

Nomura, T. (1975) Transmission of tumors and malformations to the next generation of mice subsequent to urethan treatment, *Cancer Res.*, 34, 264-266.

Nomura, T. (1982) Paternal exposure to X-rays and chemicals induces heritable tumors and anomalies in mice, *Nature*, 296, 575-577.

Nomura, T. (1988) X-ray and chemically induced germ-line mutation causing phenotypical anomalies in mice, *Mutation Res.*, 198, 309-320.

Nomura, T., H. Gotoh and T. Namba (1990) An examination of respiratory distress and chromosomal abnormalities in the offspring of male mice treated with ethyl nitrosourea, *Mutation Res.*, 229, 115-122.

Otake, M., W. J. Schull and H. Yoshimaru (1991) Brain damage among the prenatally exposed, *J. Rad. Res.*, 32, Suppl., 249-264.

Rhomberg, L., V. L. Dellarco, C. Siegel-Scott, K. L. Dearfield and D. Jackson-Kram (1990) Quantitative estimation of the genetic risk associated with the induction of heritable translocations at low-dose exposure: Ethylene oxide as an example, *Environ. Mol. Mutagen.*, 16, 104-125.

Russell, W. L. (1984) Dose-response, repair, and no-effect dose levels in mouse germ-cell mutagenesis, in: Tazima, Y., S. Kondo and Y. Kuroda (Eds.), *Problems of Threshold in Chemical Mutagenesis*, The Environmental Mutagen

Society of Japan, Tokyo, pp. 153-160.

Russell, W. L. and E. M. Kelly (1982) Mutation frequencies in male mice and the estimation of genetic hazards of radiation in men, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 542-544.

Russell, L. B., P. B. Selby, E. von Hall, W. Sheridan and L. Valcovic (1981) Use of the mouse spot test in chemical mutagenesis: interpretation of past data and recommendations for future work, *Mutation Res.*, 86, 355-379.

佐々木 有 (1991) 優性致死試験, 石館基 (編), 毒性試験講座 12「変異原性, 遺伝毒性」, 地人書館, 東京, pp. 205-210.

Sega, G. A. (1974) Unscheduled DNA synthesis in the germ cells of male mice exposed *in vivo* to the chemical mutagen ethyl methanesulfonate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 4955-4959.

Senturia, Y. D., C. S. Peckham and M. J. Peckham (1985) Children fathered by men treated for testicular cancer, *Lancet*, Oct. 5, 766-769.

渋谷 徹 (1991) マウス特定座位試験, 石館基 (編), 毒性試験講座 12「変異原性, 遺伝毒性」, 地人書館, 東京, pp. 211-218.

Shimizu, Y., H. Kato and W. J. Schull (1991) Mortality among atomic bomb survivors, *J. Rad. Res.*, Suppl., 212-230.

Shiraishi, Y. (1978) Chromosome aberrations induced by monomeric acrylamide in bone marrow and germ cells of mice, *Mutation Res.*, 57, 313-324.

Sieber, S. W. and R. H. Adamson (1975) Toxicity of antineoplastic agents in man: chromosomal aberrations, antifertility effects, congenital malformations, and carcinogenic potential, *Adv. Cancer Res.*, 22, 57-155.

田中憲穂 (1991) マウス相互転座試験, 石原基 (編), 毒性試験講座 12「変異原性, 遺伝毒性」, 地人書館, 東京, pp. 197-203.

Tates, A. D., A. J. J. Dietrich, N. de Vogel, I. Neuteboom and A. Bos (1983) A micronucleus method for detection of meiotic micronuclei in male germ cells of mammals, *Mutation Res.*, 121, 131-138.

Tripathy, N. K., K. K. Patnaik and M. J. Nabi (1992) Acrylamide is genotoxic to the somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.*, 259, 21-27.

USEPA, U. S. Environmental Protection Agency (1986) Guidelines for mutagenicity risk assessment, *Fed. Register.*, 51 (185), 34006-34012.

Wyrobek, A. J. and W. R. Bruce (1975) Chemical induction of sperm abnormalities in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 4425-4429.

シンポジウム「変異原性試験で何がわかるか: 問題点と展望」

三点セットから補完試験まで

第一製薬(株) 開発研究所安全性研究センター 島田 弘 康

1. 緒言

我国の変異原性試験ガイドラインに復帰突然変異試験, 染色体異常試験ならびに小核試験が導入されて久しい。当初変異原性試験に十分な対応が取れていなかった企業も, この間に試験技術の導入および専門家の育成を積極的に行い, その結果, 変異原性試験に従事する研究者の裾野が広がったことは本シンポジウムに先だてて実施されたアンケート調査の結果からも明らかであり, その意味でガイドラインの果たした役割は大きい。反面当初から懸念されていた通り, 企業における変異原性研究が上記の3試験に固定化され, さらに詳細に規定されたプロトコールと厳しい精度管理により発展性が少なくなってきたのも残念ながら事実のようである。ところで, 発癌メカニズムに対する研究のめざましい進展により, 発癌過程における遺伝的変化の持つ意義が大きくクローズアップされてきており, 変異原性試験の役割についても再認識されようとしている。しかし一方では, 初発に遺伝的変化を伴わない癌原物質の存在も多数知られてきており, 現行の試験法だけでは対応しきれなくなっているのも事実である。また遺伝毒性に対する検出系の不備を懸念する声も依然として多い。ここでは, 我国で代表的な上記の3つの変異原性試験のもつ意味およびその可能性と限界について総括するとともに, これらの3試験を補完する試験についても展望する。

企業における変異原性試験担当者が日常的に直面する問題に, 上記3試験の個々のあるいは組み

合わせた場合の癌原性に対する予測性がある。具体的には, ある特定の試験で陽性になった場合の対応である。変異原性試験をスクリーニングとして hazard identification に使うのか, あるいは評価として risk assessment に用いるのかでその対応は異なってくるが, いずれにしてもこの3試験だけで判断するには情報が少なすぎる。どんな情報が不足しているのか, それにはどんな試験を追加すれば良いかを見極める必要がある。最近のテクノロジーの進歩は, 発癌機構とより密接に結びついた変異原性試験を可能にしつつあり, また現行の試験法でもプロトコールの変更により相当の情報が得られる場合がある。さらに一般的に言えることは, 生体内での変異原性評価に必要な情報として toxicokinetics は不可欠の要素であり, 最近改訂された英国のガイドラインにもその考えが一部盛り込まれている (DOH, 1989)。筆者の経験もふまえ, 主として実務的な観点から変異原性試験陽性の場合のアプローチ法について論ずる。

2. 変異原性試験の意義

変異原性試験の評価対象を癌原性だけに限るのか, あるいは遺伝毒性まで含めるのかによって変異原性試験のもつ意味合いが大分異なってくる。復帰突然変異試験, 染色体異常試験ならびに小核試験のいわゆる薬事法3点セットだけでは癌原性のスクリーニングとしての位置づけが妥当であると考えられるが, それではスクリーニングのバックグラウンドとして癌原性予測の評価に耐え得るデ

〒134 東京都江戸川区北葛西 1-16-13

Mutagenicity Test Battery for Toxicity Studies of Drugs: Status quo and perspective

Hiroyasu Shimada

Drug Safety Research Center, Developmental Research Laboratories, Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd.,

16-13, Kita-kasai 1-Chome Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan

データベースはあるのか。また、現在のような過酷なプロトコールで実施されている変異原性試験で陽性結果が得られたとしても、その作用が本当に生体内でも発現するのか。たとえ生体内で発現しても発癌や遺伝毒性にどこまで関与しているのか。つきつめていくと、変異原性試験ほどその評価について曖昧にされている毒性試験はないように思える。

変異原性試験で陽性になっても、この化合物は例えば 75% の確率で発癌性をもつ可能性があるとは言えない。それではこの化合物に本当に発癌性があるのかという問いに対しては、残念ながら現在の変異原性試験からはその答えは期待できず、あとは長期の発癌性試験にその評価を委ねるしかない。

Table 1. 開発を中止する根拠となる変異原性試験

| 項目       | 回答数(%)    | 備考   |
|----------|-----------|--|
| 復帰突然変異試験 | 25 (33.2) | (Drosophila, Spot test, UDS, SCM)<br>(用量, 強度, その他) |
| 染色体異常試験  | 9 (12.6)  |  |
| 小核試験     | 24 (32.4) |  |
| その他の試験   | 2 (2.7)   |  |
| 総合評価     | 11 (14.9) |  |
| 中止しない    | 23 (31.1) |  |
| 無回答      | 36        |  |

(アンケート調査1992, N=110社)

Table 2. 変異原性試験と発癌性試験の結果の不一致

| 復帰    | 染色体 | 小核 | その他         | 発癌性試験 | 頻度 |
|-------|-----|----|-------------|-------|----|
| +     |     |    |             | -     | 2  |
|       | +   |    |             | -     | 6  |
|       |     | +  |             | -     | 1  |
| +     | +   |    |             | -     | 1  |
|       | +   | +  |             | -     | 1  |
| ----- |     |    |             | +     | 4  |
| -     | -   | -  | -vivo UDS   | +     | 2  |
| -     | -   | -  |             | +     | 1  |
| -     | -   | -  | -Drosophila | +     | 1  |

(アンケート調査, 1992)

しかし、実際には変異原性試験の結果により開発を中止している例も多く、アンケート調査の結果によれば、変異原性試験結果を開発可否の評価ポイントに加えているところが回答全社の 7 割近くにもなる (Table 1)。これほどまでに重要視されている割にはその根拠となるバックグラウンドがあまり明確でない。また、3 割近くが中止しないと答えているのも気になる。いったい各企業において変異原性試験は正しく理解されているのか、正当に評価されているのか疑問になる。

現在の薬事法 3 点セットが発癌性予測にしろ遺伝毒性の予測にしろ不完全であることは今更言うまでもないことである。実際、変異原性試験を実施して発癌性との不一致に悩む例は多い。アンケート調査の結果でも、変異原性は陽性でも発

癌試験で陰性の結果が得られているもの、またその逆に変異原性が陰性なのに発癌試験で陽性になるものが報告されている (Table 2)。前者のケースでは染色体異常試験での陽性例が若干多いようであるが、これは細胞毒性と絡んで起きた染色体異常を検出しているためではないかと推察される。一方、変異原性が陰性なのに発癌性が陽性となるものには、いわゆるプロモーターと呼ばれているものが多く含まれているものと推測される。

### 3. 3点セットと発癌性との相関性

1990 年に発表された米国 NTP Program では全部で 114 の化合物につき Ames test, 染色体異常試験, 姉妹染色分体交換 (SCE) 試験ならびにマウスリンパ腫試験の 4 つの *in vitro* 変異原性試験を実施し、同時に実施したラットとマウスでの 2 年間の発癌性試験の結果との相関性について検討している。発癌性試験を同時に実施しているので、変異原性と発癌性の相関を検討するには信頼性の高いデータベースといえよう (Table 3)。Sensitivity すなわち発癌物質のうち変異原性試験で陽性になる割合は、この 4 つの試験のなかではマウスリンパ腫試験が一番高い。試験を 2 つ組み合わせた場合は SCE 試験とマウスリンパ腫試験、3 つ組み合わせた場合はこれに Ames test を加えた場合が sensitivity は一番高くなる。Sensitivity が高いだけで falsepositive が増えては意味がない。Specificity は非発癌物質が陰性になる割合、すなわちこの値が高いほど falsepositive

は少ないわけだが、単独の場合には Ames test が一番高く、2 つ組み合わせた場合には Ames test と染色体異常試験、3 つ以上組み合わせた場合はどの組み合わせでも極端にその値が下ってくる。Sensitivity と specificity の関係を図で示すと、発癌物質と 1:1 の対応がとれていれば理想的な試験法と言えるがどれもそれにはほど遠い。Ames test と染色体異常試験の組み合わせが、その値は若干低い唯一 sensitivity, specificity 両者のバランスがとれた組み合わせといえる (Fig. 1)。

我国の変異原性試験 3 点セットと発癌性との相

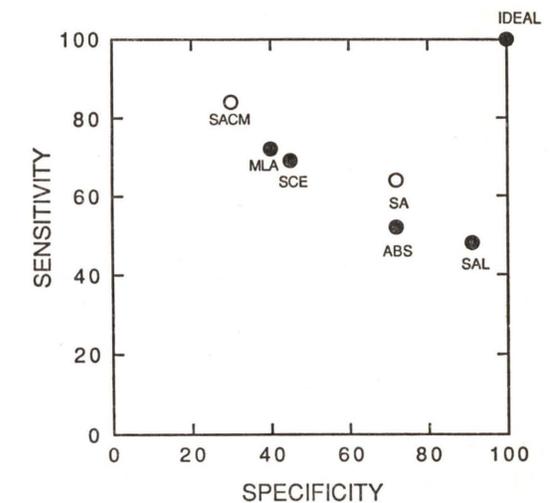


Fig. 1. 変異原性と発癌性の相関性: NTP Program (1990) 114 化合物における sensitivity と specificity の関係 (Table 3 参照)。

Table 3. 変異原性試験と発癌性の相関性 (NTP Program, 1990)

|                 | SAL | ABS | SCE | MLA | SA | SC | SM | AC | AM | CM | SAC | SAM | SCM | ACM | SACM |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|------|
| Sensitivity     | 48  | 52  | 69  | 72  | 64 | 78 | 75 | 73 | 76 | 79 | 79  | 79  | 82  | 81  | 84   |
| Specificity     | 91  | 72  | 45  | 40  | 72 | 45 | 40 | 43 | 32 | 32 | 43  | 32  | 32  | 30  | 30   |
| Predictivity(+) | 89  | 73  | 64  | 63  | 75 | 67 | 64 | 64 | 61 | 62 | 66  | 62  | 63  | 62  | 63   |
| Predictivity(-) | 55  | 52  | 50  | 50  | 58 | 58 | 53 | 53 | 48 | 52 | 59  | 52  | 56  | 52  | 56   |
| Concordance     | 66  | 61  | 59  | 59  | 67 | 64 | 61 | 61 | 58 | 60 | 64  | 60  | 61  | 60  | 61   |

化合物数: NTP Program で実施した 114 の化合物

発癌性: F344ラット、B6C3F1マウス (2年)

変異原性: Ames試験 (SAL, S), 染色体異常試験 (ABS, A), 姉妹染色分体交換試験 (SCE, C)

マウスリンパ腫試験 (MLA, M)

Table 4. ガイドライン3試験と癌原性との相関性

|           | A  | B | C  | D | E  | F | G  | H  |
|-----------|----|---|----|---|----|---|----|----|
| 復帰突然変異試験  | -  | + | -  | - | +  | + | -  | +  |
| 染色体異常試験   | -  | - | +  | - | +  | - | +  | +  |
| 小核試験      | -  | - | -  | + | -  | + | +  | +  |
| 癌原性証拠十分有り | 14 | 5 | 11 | 2 | 20 | 0 | 4  | 37 |
| 証拠不十分     | 2  | 1 | 3  | 1 | 2  | 0 | 2  | 6  |
| 証拠不適切     | 5  | 0 | 2  | 1 | 4  | 1 | 6  | 5  |
| 無し        | 1  | 0 | 1  | 2 | 0  | 0 | 0  | 0  |
| 合計 138    | 22 | 6 | 17 | 6 | 26 | 1 | 12 | 48 |

IARC Monographs (Vol.1-54;1992), NTP Program (1990,1992), Gene-Tox Program (1990), Data Book of Chromosomal Aberration Test In Vitro (Ishidate,1987), A Comparative Analysis of Data on the Clastogenicity of 951 Chemical Substances Tested in Mammalian Cell Culture (Ishidate et al.,1988), CSGMT/JEMS.MMS (1986-1992), 微生物を用いる変異原性試験データ集(石館ら,1991)

SENSITIVITY

| SAL | ABS | MNT | SA | SM | AM | SAM |
|-----|-----|-----|----|----|----|-----|
| 65  | 77  | 47  | 83 | 73 | 80 | 85  |

(N=110)

関性について、実験動物での癌原性評価が確実なものを中心に Table 4 にまとめた。癌原性のデータは主として IARC モノグラフと NTP Program から抽出し、それに米国 Gene-Tox Program, 石館らのデータ集, JEMS. MMS 分科会の小核試験共同研究さらに MEDLINE 等の二次文献資料から補足して変異原性に関するデータを集めた。全部で 750 近い化合物の中で、3つの試験が揃っていた化合物は 138 であった。

3つの試験がともに陽性になるものが癌原物質として一番多く、次に復帰突然変異試験と染色体異常試験の両方で陽性になるもの、染色体異常試験単独で陽性になるものの順であった。癌原物質で3試験全てが陰性のものも全体の 15% 程あった。これはいわゆる non-genotoxic carcinogen とよばれるものに相当すると思われる。癌原性が報告されている物質をもとに sensitivity を算出すると、単独の試験では染色体異常試験が一番高く、2つ組み合わせた場合は復帰突然変異試験と染色

体異常試験の組み合わせが一番高かった。これに小核試験を加えても sensitivity はそれほど高くなる訳ではなかった。

1982 年の IARC のデータ集 (IARC, 1982) および 1988 年の石館らの報告 (Ishidate et al., 1988) を同じようにまとめて、今回調べた 138 化合物のデータと併せて Fig. 2 に示した。年代が上がるにつれて化合物数が増えるだけで、どのデータベースもほぼ同じような傾向を持つことがわかった。今回の集計結果が従来のものと異なる点は、3試験いずれも陰性すなわち non-genotoxic carcinogen に分類される部分が増えたことである。今回の集計ではこの部分が約 15% 程であったが、将来データが蓄積されてくると更に増える可能性がある。変異原性試験を癌原性のスクリーニングとして位置づけるなら、この non-genotoxic carcinogen を検出する試験系を早く確立すべきであろう。

以上述べたように、変異原性試験 3 点セットは

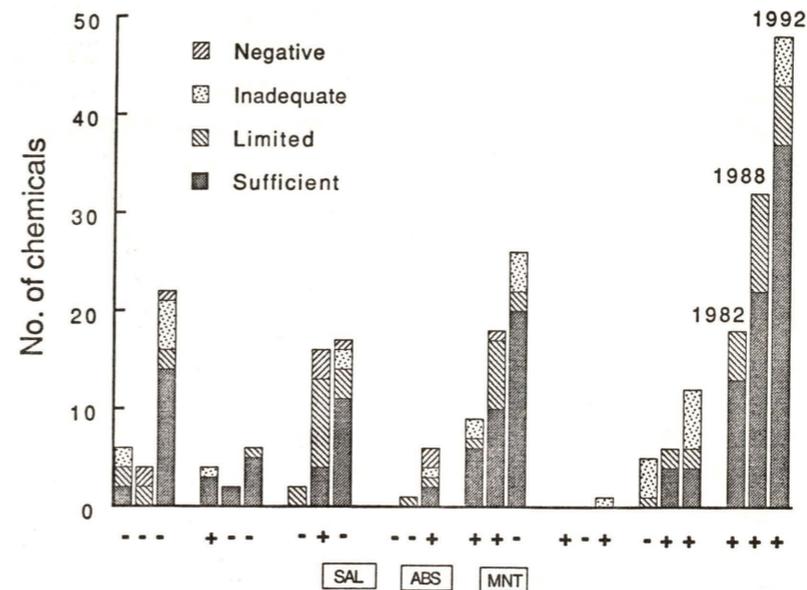


Fig. 2. 業事法 ガイドラインの変異原性 3 試験と癌原性の関係。

癌原性のスクリーニングとしてもいまだ不完全であるが、hazard identification のためのスクリーニングとしては、この組み合わせの感受性は相当高いといっても差し支えないであろう。しかし、われわれは変異原性の検出を最終目的としている訳ではなく、ヒトでの発癌や遺伝的障害のリスクの予測をたて、環境中からこれらのファクターを減らす為の努力をしている訳である。しかるに現時点ではそのリスクの予測性があまりに頼りない。構造活性相関にしても作用強度の比較にしても部分的には説明が可能なのだが、全体を包括するような公式が見つかっていない。膨大なデータはあるのだが、的確な癌原性予測に役立つようなデータベースが未だ構築されていないことに問題がある。

4. 変異原性試験で陽性になった場合の対応

ところで企業内の研究者なら誰でも一度は経験したことがある筈であるが、開発品あるいはその候補品が変異原性試験で陽性になった場合、いったいどう対処しているのか。データベースを探ってみても、類縁化合物を調べてみても、所詮何%の確率で発癌の可能性があるとしか言いようがない。しかるに、当該化合物の癌原性の有無につい

ては的確な判断を求められる。そういう場合どうしたら良いのか。当社での経験を例にして示すが、大切なことは当該物質の性質を見極めた上で、生体内での作用について総合的に判断することである。

3つの事例について示す。はじめに構造活性相関ということで、利尿降圧薬の例を示す。この薬はイソフラボン誘導体で、比較的高濃度で染色体異常が発現するが、代謝研究の結果より肝臓に高濃度に移行し、しかも長期に連用するということが、どの程度安全かを検討したものである。つぎに不純物ということで、抗アレルギー用薬の例について示す。復帰突然変異試験で陽性だったものが、純度を上げていくとその作用がなくなるという事例である。最後に組織内濃度との関連でその安全性を検討したものとして合成抗菌薬の例を示す。この薬は topoisomerase II 阻害剤で、一般に Topo II 阻害剤は染色体異常を誘発するものが多いが、この場合は、開発候補品の中に小核試験で陽性になるものがあり、toxicokinetics の観点から候補検体を選出しその安全性を検討したものである。

1) 構造活性相関

この利尿降圧薬の開発コードを仮に A01 とす

る。イソフラボン骨格を持ち、類縁化合物に変異原性を持つものがあり、しかも肝臓に高濃度に移行することから、染色体異常は 1000  $\mu\text{g/ml}$  以上という比較的高い濃度でしか出現しなかったが、慎重を期して各種の検討を行った。はじめに R1, R2, R3 の置換基をいろいろ変えて検討すると、染色体異常誘発作用が無くなる化合物がでてきたが、薬理活性も同時に無くなることがわかった。R1 のオキソ酢酸, R2 の塩素が薬理活性に重要な基であることがわかっており、これと染色体異常誘発作用がどうしても分離できない。薬理活性と変異原作用が相関している訳である (Table 5)。そこで置換基を変えるのはあきらめて、A01 の変異原作用がどの程度のものかを各種追加検討した。

その結果, *in vitro* では 2000  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で UDS 試験およびアルカリ溶出試験で陽性反応

が得られたが、肝臓を標的にした *in vivo* 試験ではどれも陰性だった。ヒト臨床予想量の約 80 倍に相当する 800 mg/kg をラットに経口投与した場合の肝臓での  $C_{\text{max}}$  は 800  $\mu\text{g/g}\cdot\text{tissue}$  程度であったことから、*in vitro* で発現した染色体異常誘発作用および DNA 損傷作用は、その組織内濃度から考えても生体内では発現しないものと判定した。なお確認のため、ラットの肝臓を標的にした中期発癌試験を実施したが陰性であった (Table 6)。従って、この薬物は開発を先へすすめることになった。

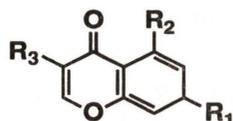
## 2) 不純物

2 番目の事例として、抗アレルギー薬でみられた不純物の例を示す。

このものは、開発初期の実験室レベルでの合成検体 X では復帰突然変異試験で陽性であったが、開発がすすんで大量合成をするようになるとこの

Table 5. 構造活性相関と変異原性

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| 復帰突然変異試験 | -                                 |
| 染色体異常試験  | + (1000 $\mu\text{g/ml}$ $\leq$ ) |
| 小核試験     | -                                 |



| 検体番号  | R 1                   | R 2 | R 3   | 利尿降圧作用 | 染色体異常 |
|-------|-----------------------|-----|---|--------|-------|
| A 0 1 | OCH <sub>2</sub> COOH | Cl  | C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> | +      | +     |
| A 0 2 | OCH <sub>2</sub> COOH | Cl  | C <sub>6</sub> HCl                            | +      | +     |
| A 0 3 | OCH <sub>2</sub> COOH | Cl  | CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> | +      | +     |
| A 0 4 | OCH <sub>2</sub> COOH | Cl  | CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>             | +      | +     |
| A 0 5 | OCH <sub>2</sub> COOH | Cl  | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                 | +      | +     |
| A 0 6 | OCH <sub>2</sub> COOH | H   | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                 | -      | -     |
| A 0 7 | OCH <sub>3</sub>      | Cl  | C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> | -      | -     |

Table 6. 利尿降圧薬 (A01) の追加検討

|           |              |                                  |
|-----------|--------------|----------------------------------|
| In vitro: | SOS repair試験 | -                                |
|           | SCE(D-6)試験   | ±                                |
|           | UDS(D-6)試験   | +(1000 $\mu\text{g/ml}$ $\leq$ ) |
|           | UDS(ラット肝)試験  | +(2000 $\mu\text{g/ml}$ $\leq$ ) |
|           | アルカリ溶出(D-6)  | +(2000 $\mu\text{g/ml}$ $\leq$ ) |
|           | アルカリ溶出(ラット肝) | -                                |
| In vivo:  | 小核(マウス胎児肝)試験 | -                                |
|           | UDS(ラット肝)試験  | -                                |
|           | 中期発癌(ラット)試験  | -                                |

Table 7. 抗アレルギー薬 (B01) の各種ロットによる変異原性

| 合成ロット         | 純度 (%)    | Conc. ( $\mu\text{g/plate}$ ) | Revertans/plate <sup>1)</sup> |       |
|---------------|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
|               |           |                               | TA97                          | TA100 |
| 初期合成検体[X]     | 98 $\leq$ | 625                           | 90                            | 165   |
|               |           | 1250                          | 197                           | 259   |
|               |           | 2500                          | 371                           | 367   |
|               |           | 5000                          | 628                           | 571   |
| 初期合成検体[Y]     | 98.8      | 625                           | 34                            | 0     |
|               |           | 1250                          | 31                            | 0     |
|               |           | 2500                          | 40                            | 0     |
|               |           | 5000                          | 0                             | 0     |
| 大量合成品[Z]      | 99.4      | 625                           | 4                             | 0     |
|               |           | 1250                          | 0                             | 0     |
|               |           | 2500                          | 0                             | 0     |
|               |           | 5000                          | 0                             | 0     |
| 初期合成検体[X]の精製品 |           | 625                           | 0                             | 3     |
|               |           | 1250                          | 2                             | 0     |
|               |           | 2500                          | 0                             | 0     |
|               |           | 5000                          | 0                             | 0     |
| 大量合成品[Z]の未精製品 |           | 625                           | 48                            | 21    |
|               |           | 1250                          | 91                            | 1     |
|               |           | 2500                          | 162                           | 43    |
|               |           | 5000                          | 275                           | 67    |

1) Control values were subtracted.

陽性反応が消失した。純度を調べると僅かではあるが高くなっていった。また、変異原性のみられた初期合成検体 X を精製すると陽性反応は消えたが、陰性であった大量合成品 Z の未精製品では陽性であった。これらのことから、初期合成検体 X での陽性反応には不純物が関与しているものと判定した (Table 7)。市場に流通する大量合成品 Z では変異原性がみられなかったことから、これでは一件落着かと思われたが実はそうではなかった。

大量合成品 Z について染色体異常試験を実施したところ、それほど強くはないが、染色体異常頻度が用量依存的に増加した。復帰突然変異試験で陽性だった初期合成検体 X では異常誘発率ももっと高くなった。そこで更に精製してみたが、染色体異常誘発率作用はどうしても残る。不純物とい

うのは通常合成過程で混入することから、合成経路を変えた別途合成品で試験してみたが、それでも弱い染色体異常誘発作用が残った (Fig. 3)。

これらのことから、この化合物の構造自体が変異活性に関与していると判定して、置換基を変えた各種の検体について変異原性を調べ、復帰突然変異および染色体異常が陰性のものを開発候補品として選出した。

B01 が最初の検体であるが、興味深いことに置換基の一部のアルキル基を 2 個から 3 個にすると、復帰突然変異試験での陽性反応が再び出現する。いろいろ置換基を変えていくと、薬理作用が B01 より強く、しかも変異原性のない検体が見つかった。開発候補品としては、この中から B05 という検体を選んだ (Table 8)。

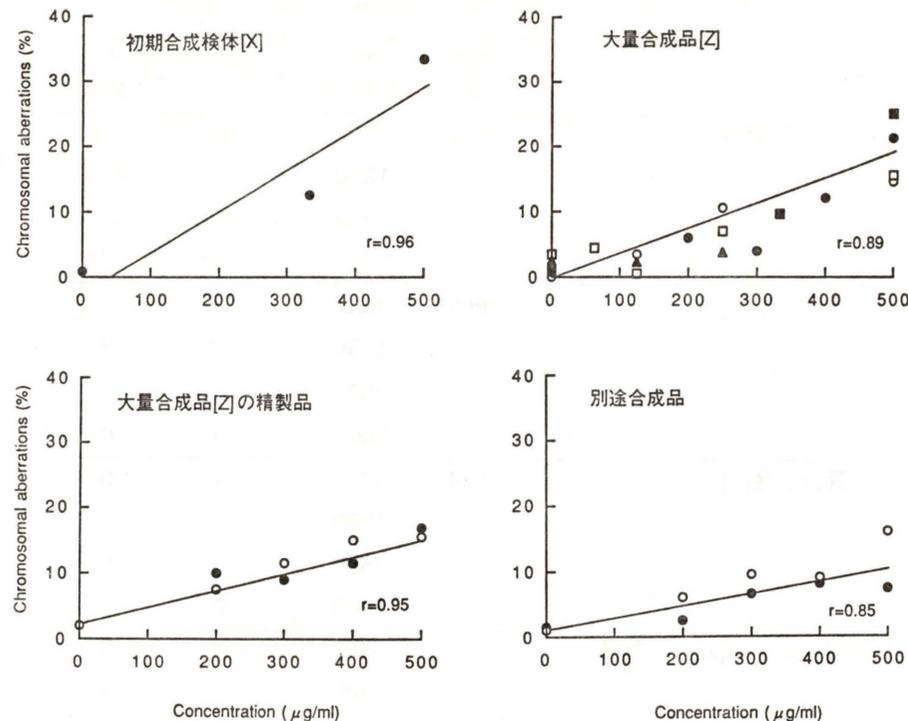


Fig. 3. 抗アレルギー用薬開発候補品の染色体異常試験 (24 時間処理).

Table 8. 抗アレルギー用薬開発候補品の変異活性

| 化学構造 | R  | 検体番号 | 復帰突然変異 | 染色体異常 |
|------|--|------|--------|-------|
|      | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>  | B01  | —      | +     |
|      | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> | B02  | +      | +     |
|      | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>  | B03  | +      | +     |
|      | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | B04  | —      | —     |
|      | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> | B05  | —      | —     |
|      | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>  | B06  | —      | —     |

### 3) Toxicokinetics

3 番目に合成抗菌薬の例を示す。Topo II 阻害剤はその作用が強くなると薬理作用と関連して染色体異常誘発作用が発現する。ラセミ体である OFLX は染色体異常を誘発しないが、Topo II 阻害作用が強い *l*-体では染色体異常がみられる (島田ら, 1984; Shimada *et al.*, 1991)。興味あることに、Topo II 阻害作用が弱い *d*-体には染色体異常誘発作用も認められない (Fig. 4)。

C01, C02 ならびに C03 は開発候補品であるが、C01 は *l*-OFLX より染色体異常誘発作用が

強く、C02 および C03 に至っては 20 μg/ml 程度で強い染色体異常誘発作用がみられる。そこでこれら開発候補品について小核誘発作用を検討したところ、*in vitro* での染色体異常誘発作用が中程度であった C01 および *l*-OFLX では小核試験で陰性であったが、C02 および C03 ではあきらかな小核誘発作用が認められた (Table 9)。

なぜ C01 では小核誘発作用がみられなくて、C02 および C03 ではみられたのか。これについて生体内での暴露形態を意識した *in vitro* での染色体異常試験と組織内濃度の点から検討した。

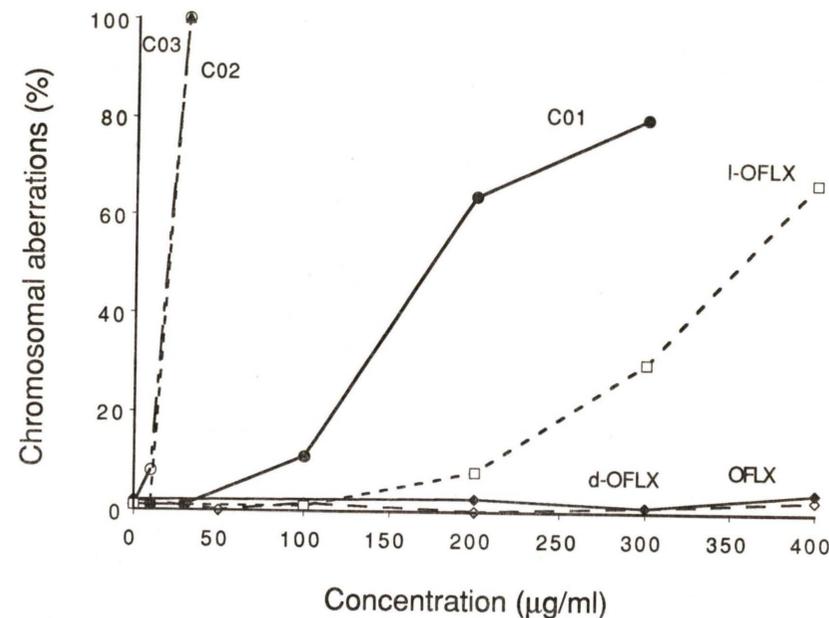


Fig. 4. 合成抗菌薬開発候補品の染色体異常試験 (24 時間処理).

Table 9. 合成抗菌薬開発候補品の小核試験

| Compound           | i.v. injection |                              | i.p. injection |                               |
|--------------------|----------------|------------------------------|----------------|-------------------------------|
|                    | Dose (mg/kg)   | %MNPCE (range) <sup>1)</sup> | Dose (mg/kg)   | %MNPCEs (range) <sup>1)</sup> |
| C01                | 100            | 0.03 (0-0.1)                 | 300            | 0.10 (0-0.2)                  |
|                    | 150            | 0.03 (0-0.1)                 | 400            | 0.10 (0-0.2)                  |
|                    | 200            | 0.13 (0-0.3)                 | 500            | 0.27 (0.1-0.5)                |
| C02                | 50             | 0.20 (0-0.4)                 | Not tested     |                               |
|                    | 100            | 1.20* (0.9-1.6)              |                |                               |
|                    | 150            | 2.20* (1.6-2.9)              |                |                               |
| C03                | 50             | 0.17 (0.1-0.3)               | 200            | 0.87* (0.8-1.0)               |
|                    | 100            | 0.33 (0.2-0.5)               | 300            | 1.40* (1.3-1.5)               |
|                    | 150            | 1.43* (1.3-1.6)              | 400            | 1.33* (1.2-1.5)               |
| I-OFLX             | 100            | 0.18 (0.1-0.3)               | 150            | 0.23 (0.1-0.5)                |
|                    | 150            | 0.12 (0-0.3)                 | 300            | 0.17 (0.1-0.3)                |
|                    | 200            | 0.10 (0-0.3)                 | 600            | 0.37 (0.2-0.6)                |
|                    | 250            | 0.12 (0-0.3)                 |                |                               |
| Cumulative control |                | 0.12 (0-0.2)                 |                | 0.15 (0-0.4)                  |

\*P<0.05

MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocytes

<sup>1)</sup>1000 PCE per animal were analyzed.

3 to 6 mice in each treatment were used.

生体内での暴露形態に近づけるために、1 時間処理による *in vitro* での染色体異常誘発作用を調べた。その結果、C01 では 1000 μg/ml の高濃度でも 20% 程度の異常誘発率であったのに対し、C02 では 50 μg/ml でも 60 から 100% 近い異常

誘発率がみられた (Fig. 5)。一方、マウスに MTD の用量で静脈内投与した場合の骨髄での C<sub>max</sub> は C01, C02 ならびに C03 いずれも 90 μg/g tissue 程度であった。

さらに肝臓に対する影響を調べるために、ラッ

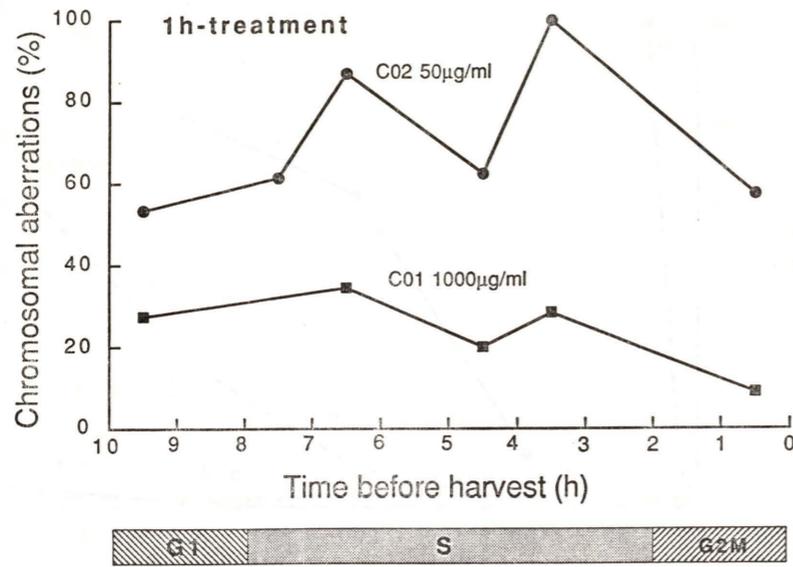


Fig. 5. 合成抗菌薬開発候補品の染色体異常試験 (1 時間処理).

Table 10. 合成抗菌薬開発候補品の HPC/UDS 試験

| Exp. No. | Compound    | Dose (mg/kg) | Sampling time (h) | Net nuclear grains (NG) ± S.E. | % cells with ≥5NG |
|----------|-------------|--------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|
| 1        | Control     |              | 3                 | -0.23 ± 0.03                   | 8.0               |
|          | C01 (po)    | 2000         | 3                 | -1.20 ± 0.37                   | 5.3               |
|          | C02 (iv)    | 150          | 3                 | 0.44 ± 0.48                    | 16.7*             |
| 2        | Control     |              | 3                 | -3.75 ± 0.39                   | 1.3               |
|          | I-OFLX (po) | 300          | 3                 | -5.11 ± 0.56                   | 2.3               |
|          |             | 600          | 3                 | -4.35 ± 0.39                   | 2.5               |
| 3        | Control     |              | 4                 | -0.80 ± 0.18                   | 1.2               |
|          | OFLX (po)   | 20           | 4                 | -0.61 ± 0.23                   | 1.7               |
|          |             | 200          | 4                 | -0.77 ± 0.29                   | 1.2               |

\*P < 0.05  
Cells with ≥5NG are considered to be in repair.  
3 to 4 rats in each treatment were used.

Table 11. 合成抗菌薬開発候補品の変異原性試験のまとめと骨髄内濃度

| Compound | D50(24h) | D50(1h) | MED  | UDS | Max. conc. in B.M. |
|----------|----------|---------|------|-----|--------------------|
| C02      | 17       | <50     | 100  | ±   | 88.7 <sup>1)</sup> |
| C03      | 17       | *       | 150  | *   | 86.5 <sup>2)</sup> |
| C01      | 170      | 1000<   | N.E. | —   | 87.8 <sup>3)</sup> |
| I-OFLX   | 400      | 1000<   | N.E. | —   | 293 <sup>4)</sup>  |
| OFLX     | N.E.     | N.E.    | N.E. | —   | *                  |

D50: 50% effective dose for induction of chromosomal aberration (µg/ml).  
MED: Minimum effective dose for micronuclei induction (mg/kg).  
N.E.: No effect at the maximum tolerated dose (MTD).  
\*: Not tested.

1) 150 mg/kg(iv) 0.25h, 2) 150 mg/kg(iv) 0.25h, 3) 200 mg/kg(iv) 0.25h, 4) 600 mg/kg(ip) 0.25h

ト肝を用いた *in vivo* UDS 試験を行った。C01, I-OFLX, OFLX ではその作用は全くみられなかったのに対し、C02 では細胞内の UDS の平均誘発量はあまり変わらなかったが repair をしているとみなされる細胞の出現頻度が有意に増加した。従って、C02 は肝臓に対しても弱い DNA 損傷作用が疑われた (Table 10)。

今までの成績の総括を Table 11 にまとめた。強い染色体異常誘発作用がみられた C02 および C03 では、染色体異常を 50% 誘発する濃度 (D50) が 24 時間処理では 20 µg/ml 前後、1 時間処理では 50 µg/ml 以下だった。一方、骨髄内の薬物濃度は最高 90 µg/g・tissue 近くになり、生体内でも染色体異常が発現するのに十分な濃度に達していることがあきらかになった。実際のこの 3 つの薬物は骨髄で小核誘発作用を示した。

一方、中程度の染色体異常誘発作用がみられた C01 および I-OFLX では、1 時間処理の D50 値は 1000 µg/ml 以上であり、また骨髄内の薬物濃度も染色体異常を誘発する濃度まではとても到達しないことが明らかになった。従って C01 は生体内で Topo II 阻害作用に絡んだような変異原作用は発現しないであろうと判断し、これを開発候補品として選定した。

なお、C01 の生体内での安全性を確認するためにトランスジェニック・マウスを用いた遺伝子突然変異の検出系 (Muta Mouse 法) を実施し、生体内での遺伝子突然変異誘発作用について検討した。その成績の一部を Table 12 に示したが、骨

髄・肝臓ともに陰性の成績が得られており、C01 が生体内で遺伝子突然変異誘発作用を持たない可能性が強く示唆されている。

以上我が社での経験した事例について示したが、例えスクリーニングといえど変異原性試験で一度陽性結果が得られると、その時点から生体内でその作用が発現するの否かという変異原性自体の評価が必要になってくる。しかし今まではそれを評価できる手段があまりなかったのが現状である。最近のテクノロジーの進歩により、新しい試験系が考案されそれが可能になりつつあるのは心強い限りである。

#### 4. 3点セットを補完するもの

現在の変異原性試験 3 点セットに一番不足しているものは、生体内での情報である。In vitro 染色体異常試験で陽性でも小核試験が陰性ならよしとしているような風潮があるが、本当にそれでよいのだろうか。今回のアンケート調査でもこの点の指摘が結構多かったようである。

先ほどのデータベースの項でも指摘したように non-genotoxic な作用が検出できないのも 3 点セットに不足している点である。また遺伝毒性という意味では残念ながら現在のガイドラインはその方向性さえも示していない (Table 13)。

最近のテクノロジーの進歩には著しいものがあり、新しい試験系が数多く考案されている。試験系自体の評価がまだそれほど進んでおらず、一般的な試験法と言われるほどには至っていないが、

Table 12. 合成抗菌薬開発候補品の MutaMouse による遺伝子突然変異試験

| Compound           | Dose (mg/kg) | No. of animals | Plaques analyzed | No. of Mutants | Mutant frequency (x10 <sup>-6</sup> ) |
|--------------------|--------------|----------------|------------------|----------------|---------------------------------------|
| <b>Bone Marrow</b> |              |                |                  |                |                                       |
| Control            |              | 3              | 1,005,516        | 29             | 28.8                                  |
| C01                | 600          | 2              | 580,230          | 8              | 13.8                                  |
| I-OFLX             | 600          | 2              | 597,984          | 14             | 20.1                                  |
| ENU                | 200          | 1              | 86,400           | 105            | 1215.3                                |
| <b>Liver</b>       |              |                |                  |                |                                       |
| Control            |              | 3              | 1,004,217        | 36             | 35.8                                  |
| C01                | 600          | 2              | 462,711          | 17             | 36.7                                  |
| I-OFLX             | 600          | 2              | 602,301          | 24             | 39.8                                  |
| ENU                | 200          | 1              | 211,008          | 38             | 180.1                                 |

Expression time : 14 days

Table 13. 変異原性試験3点セットに不足しているもの

|                       |  |
|-----------------------|--|
| 1. 生体内での予測<br>(臓器特異性) | Toxicokinetics、標的臓器での検索                              |
| 2. 癌原性の予測・評価          | Non-genotoxicな発癌作用の検出、プロモーター<br>発癌に特異的な遺伝的・非遺伝的変化の検出 |
| 3. 遺伝毒性の予測・評価         | 生殖細胞での作用の検出、異数性                                      |
| 4. ヒトでの予測・評価          | ヒトでの影響との相関性、データベース<br>ヒトでの直接的影響                      |

Table 14. 補完試験—これからの変異原性試験は如何にあるべきか

1. 変異原性全般を補完するもの
  - 生体内での発現の予測  
Toxicokinetics (組織内濃度)  
Vivo/vitroの差を考慮した実験系: 処理時間、暴露形態
  - ヒトでの予測: ヒト代謝酵素導入細菌(細胞)
  - 生体内での遺伝子突然変異の検出: トランスジェニックマウス
  - 染色体変異の検出: クロモソームペインティング、FISH、雑種細胞法
  - ラジカルの検出: 8-OH-dG、活性酸素消去系欠損細菌(細胞)
2. 癌原性検出を補完するもの
  - プロモーターの検出: RDS、形質転換、生化学的パラメータ
  - 癌遺伝子導入細胞・動物
3. 遺伝毒性検出を補完するもの
  - トランスジェニックマウス、異数性
  - 優性・劣性致死、相互転座、特定座位

変異原性研究の新しい方向性を示すものとして、それぞれ注目に値する。特に生体内でのオキシラジカルは発癌ばかりでなく、老化や各種の疾患とも深い関係があり、発癌という観点からみると、現在 non-genotoxic carcinogen と呼ばれているものの多くがこの範疇に入ることが予想される。また各種遺伝子を導入した細胞や個体を用いた試験系も、変異原性の新しい方向を示す試験法として注目に値する (Table 14)。

ところでここで紹介した新しい試験法は、その評価も定まっておらず、これをすぐに変異原性の評価に適用するには難しいところもある。しかし癌原性予測のために現在できることがあって、それをしていないとしたら問題である。現段階では変異原性試験3点セットが癌原性予測のための試験であるにもかかわらず、的確な予測が可能な信頼できるデータベースがない。これを可能とする正確なデータベースの構築が是非とも必要である。

またそのためのプロトコールの見直しも必要で

ある。ICH 等の国際間の協調も重要であるが、ほんとの意味の変異原性、例えば「毒性とからむような作用まで検出したためにデータベースの正確さが損なわれてしまう」ということがないようなプロトコールの見直しをする必要がある。また、癌原性の予測という意味では、Fig. 2 で全体の 15% を占める non-genotoxic carcinogen やオキシラジカルのような secondary genotoxic carcinogen の検索法を確立・導入する必要もある。また生体内での作用の予測という意味では、変異原性試験にも toxicokinetics の考えを導入する必要がある。

以上、オーバービューというには不十分な内容であるが、当社での経験も踏まえ、変異原性試験を用いて物質を評価する上で何が問題かを2, 3問うたつもりである。最近の技術革新により、発癌性や遺伝毒性とより密接に結びついた評価が可能に成りつつあるが、変異原性試験が現在抱えているいくつかの問題点を着実に解決していけば、新しい評価系と相まって、変異原性試験の未来は

明るく開けているものと信じている。

#### 謝辞

本稿に紹介した実験結果は研究室の伊東悟、服部千春、佐藤利之、恵比根豊、佐武左知子、松浦由美子の各諸氏との共同研究により得られたものです。ここに協力を感謝します。

#### 参考文献

- CSGMT (1992) Evaluation of mouse micronucleus assay to screen carcinogens, MMS Communications, 6, 1-56.
- DOH (1989) Guidelines for the testing of chemicals for mutagenicity, Department of Health Report on Health and Social Subjects No. 35, HMSO, London.
- Haseman, J. K. and A.-M. Clark (1990) Carcinogenicity results for 114 laboratory animal studies used to assess the predictivity of four in vitro genetic toxicity assays for rodent carcinogenicity. Environ. Mol. Mutagen. 16: Suppl. 18, 15-31.
- Haseman, J. K., E. Zeiger, M. D. Shelby, B. H. Margolin and R. W. Tennant (1990) Predicting rodent carcinogenicity from four in vitro genetic toxicity assays: An evaluation of 114 chemicals studied by the National Toxicology Program, J. Amer. Statist. Assoc. 85, 964-971.
- IARC Working Group (1987) IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans IARC Monograph Suppl. 7, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- 石館 基 編 (1987) 染色体異常データ集, エル・アイ・シー, 東京.
- Ishidate Jr., M., M. C. Marnois and T. Sofuni (1988) A comparative analysis of data on the

clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell culture, Mutat. Res., 195, 151-213.

- 石館 基 (1991) 微生物を用いる変異原性試験データ集, エル・アイ・シー, 東京.
- Kim, B. S. and B. H. Margolin (1991) Issues in the evaluation of short-term tests performance and testing strategies, Int. Biostatistics Conference, Tokyo.
- Mavournin, K. H., D. H. Blakey, M. C. Cimino, M. F. Salamone and J. A. Heddle (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res., 239, 29-80.
- 島田弘康, 恵比根豊, 黒沢裕美子, 荒内龍夫 (1984) 新合成抗菌剤 DL-8280 の変異原性に関する検討, Chemotherapy, 32, 1162-1170.
- Shimada, H., S. Itoh, C. Hattori, S. Tada and Y. Matsuura (1992) Mutagenicity of the new quinoline antibacterial agent levofloxacin, Arzneim.-Forsch., 42, 378-385.
- Tannant, R. W., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger, J. K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, and R. Minor (1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays, Science, 236, 933-941.
- Zeiger, E., J. K. Haseman, M. D. Shelby, B. H. Margolin, and R. W. Tennant (1990) Evaluation of four in vitro genetic toxicity test for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. Environ. Mol. Mutagen. 16: Suppl. 18, 1-14.
- Zeiger, E., B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor and K. Mortelmans (1992) Salmonella mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals, Environ. Mol. Mutagen, 19, Suppl. 21, 2-141.

## 非変異・がん原物質による酸化的 DNA 傷害について

——特に 8-OH-deoxyguanosine の測定——

国立衛生試験所・安全性生物試験研究センター毒性部 佐井君江

### 1. はじめに

近年数多くの環境化学物質についての発癌性試験が実施され、その結果が蓄積するにともない、DNA と直接反応せず、Ames テストでは検出されないいわゆる非変異原性発癌物質の存在が問題視されるようになってきた。一方、活性酸素と発癌との関連が近年注目されはじめ、この活性酸素による DNA の酸化的傷害が突然変異を引き起こし最終的に発癌に関係するものと考えられている。この活性酸素種による酸化的 DNA 傷害はある種の非変異原性発癌物質の発癌過程にも大きく関わっている可能性が疑われている。DNA 塩基の酸化的損傷物には *in vitro* では既に 20 種以上が検出されているが、*in vivo* においては主に 5-ヒドロキシメチルウラシル、チミングリコール、5-ホルミルウラシル、8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OH-dG) について分析定量が進められてきた。これらの塩基損傷物の突然変異の誘発に関しては、最近、チミングリコールは AT→GC トランジションを誘発することが報告されているが (Basu *et al.*, 1989)、5-ヒドロキシメチルウラシルは変異原性が認められないとの報告がある (Levy & Teebor, 1991)。一方、8-OH-dG は HPLC に接続した電気化学検出器によりチミングリコール等よりも比較的簡便に検出できることから、*in vivo* における酸化的 DNA 傷害の指標

として注目されはじめ、その生物学的意義、特に発癌における役割について多方面から研究が進められてきた。

実際に、ラットに腎発癌剤である臭素酸カリウムを単回経口投与すると、標的臓器の腎において特異的に 8-OH-dG の生成が認められたのに対し、非標的臓器の肝では生成がみられないことが明らかとなり、8-OH-dG と発癌との関連性が初めて示唆された (Kasai *et al.*, 1987)。それ以後、発癌剤投与による標的臓器中の 8-OH-dG レベルの増加が確認されたという実験結果が、相次いで報告された (Umemura *et al.*, 1990a; Takagi *et al.*, 1990a; Kasai *et al.*, 1989; Fiala *et al.*, 1989; Hussain *et al.*, 1990; Kasprzak *et al.*, 1990; Masuda *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 1991; Faux *et al.*, 1992)。

8-OH-dG の生物学的意義を示唆することとして、8-OH-dG に特異的な修復酵素の存在がある。初めは大腸菌からこの 8-OH-dG に特異的なエンドヌクレアーゼ活性が検出されたが (Chung *et al.*, 1990)、その後の研究で、この酵素は開環グアニンを除去修復する Fapy glycosylase と同一であることが示された (Tchou *et al.*, 1991)。さらに哺乳動物細胞にもこのエンドヌクレアーゼ活性が検出されており、切断箇所は大腸菌の場合と異なることも明らかとされた (Yamamoto *et al.*,

〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

国立衛生試験所 毒性部

佐井君江

Kimie Sai

Division of Toxicology,

National Institute of Health Sciences

1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158

1992)。

また、発癌に深く関係すると考えられる突然変異の誘発に関しても調べられている。In vitro (Shibutani *et al.*, 1991) 及び大腸菌を用いた in vivo での実験により (Wood *et al.*, 1990), 8-OH-dG は GC→TA へのトランスポージョンを誘発することが示された。このような点突然変異の誘

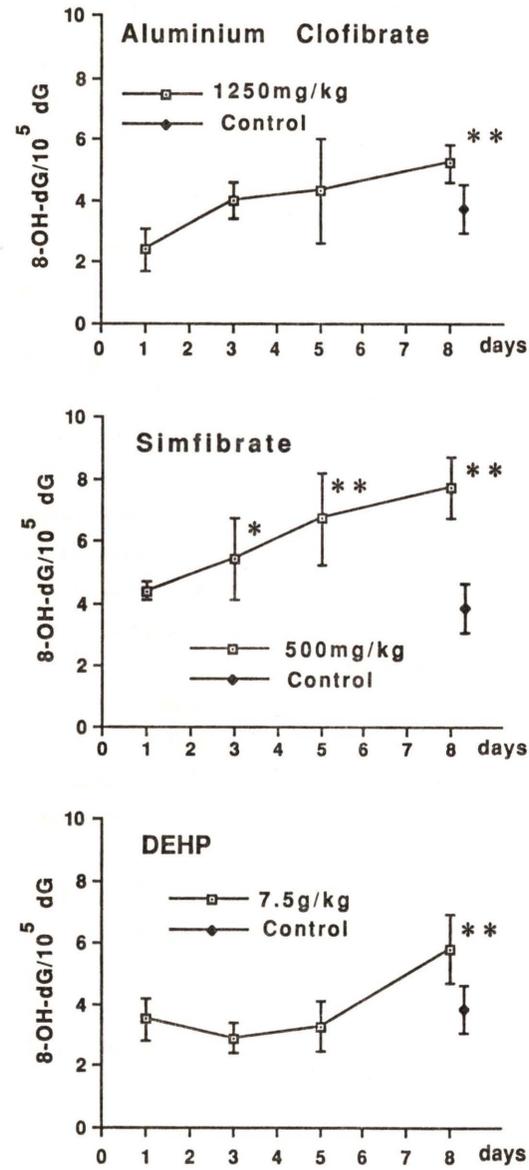


Fig. 1 ペルオキシソーム増殖剤の8日間連続経口投与による肝8-OH-dGレベルの変化。各値は6匹の平均値±標準偏差を示す。\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs 対照群。

発は、ある種の癌遺伝子の活性化あるいは癌抑制遺伝子の不活性化に関与し、結果的に発癌に関与する可能性が考えられる。実際に、ニッケル化合物の投与による K-ras 遺伝子のコドン 12 (Higginbotham *et al.*, 1992), またヒトの肝癌や肺癌の p53 癌抑制遺伝子において (Hollstein *et al.*, 1991), GC→TA トランスポージョンが高頻度で起きているとの報告があり、これらの変異にも 8-OH-dG 生成の関与が疑われている。

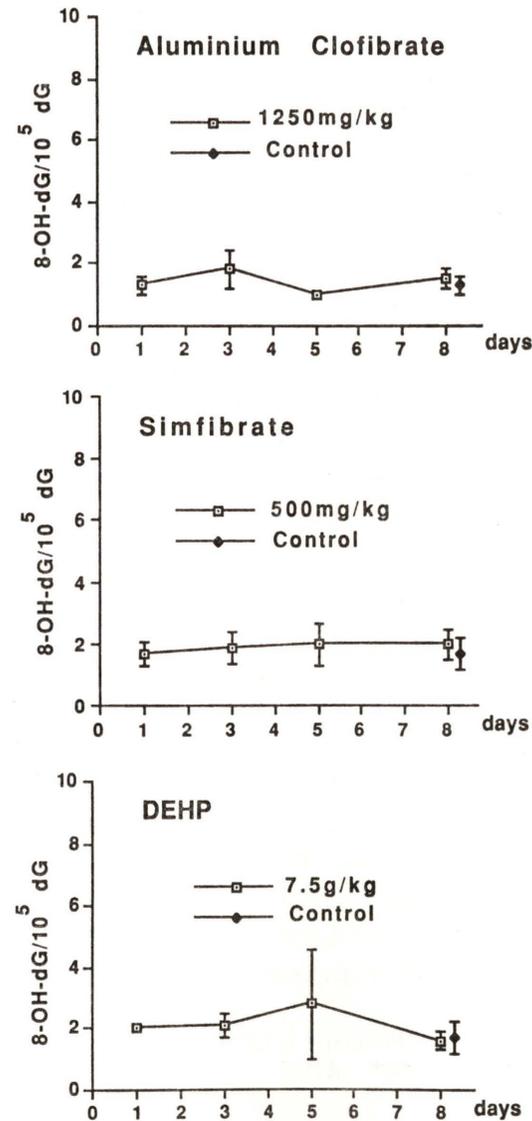


Fig. 2 ペルオキシソーム増殖剤の8日間連続経口投与による腎8-OH-dGレベルの変化。各値は6匹の平均値±標準偏差を示す。

以上のような事実から、発癌過程における 8-OH-dG の重要性が予測されるが、以下ではそれらを支持する例として、筆者らが行った実験の中で非変異原性発癌物質の投与による標的臓器中の 8-OH-dG レベルの検索結果について紹介し、8-OH-dG レベルの短期検索試験法の有用性に関して考察する。

## 2. ペルオキシソーム増殖剤による肝 8-OH-dG レベルの変化

げっし類の肝発癌を誘発するペルオキシソーム増殖剤の発癌メカニズムの1つに、ペルオキシソーム増殖に基きペルオキシソーム内の脂肪酸β-酸化系酵素活性が上昇して脂肪酸の代謝が高まり、その間に発生する過酸化水素が核内の DNA を酸化的に傷害することが一因であるという説がある。そこで筆者らは、ペルオキシソーム作用を有する脂質低下薬クロフィブレート (Clo) の誘導体であるアルミニウムクロフィブレート (Al-Clo)

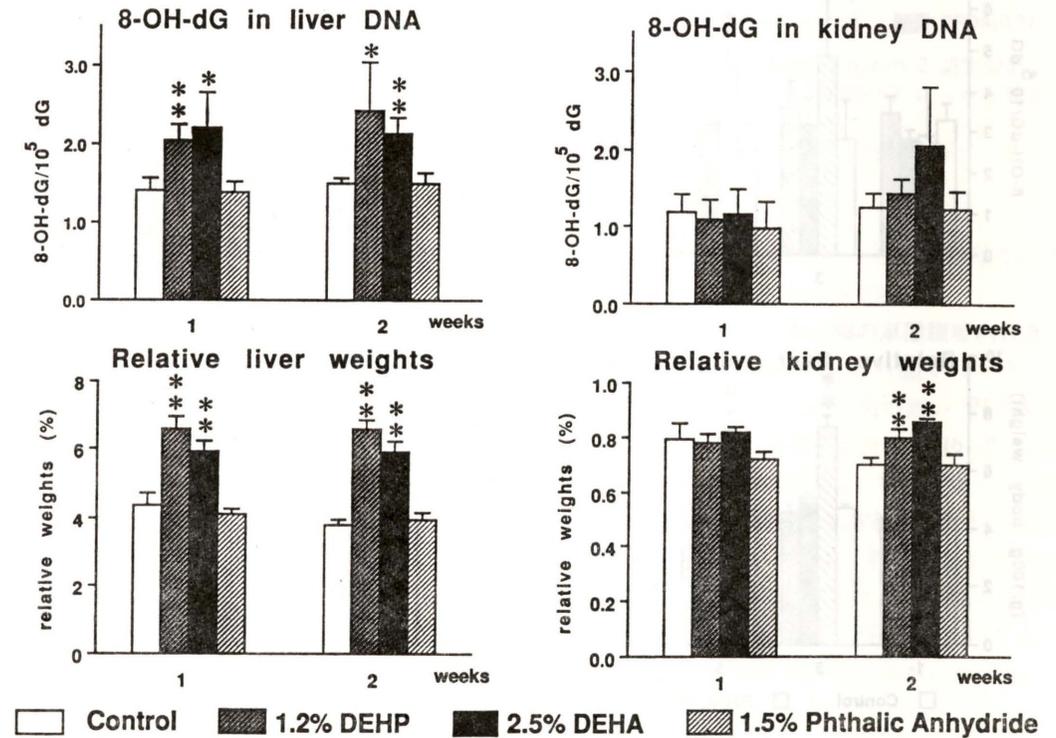


Fig. 3 プラスチック可塑剤の2週間混餌投与による肝及び腎の8-OH-dGレベルと臓器重量の変化。各値は5匹の平均値±標準偏差を示す。\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs 対照群。

及びシンフィブレート (Sim) またプラスチック可塑剤であるフタル酸エステル化合物のジエチルヘキシルフタレート (DEHP) 及びジエチルヘキシルアジペート (DEHA) をラットに投与し、標的臓器中の 8-OH-dG レベルを検索した。

## 1) アルミニウムクロフィブレート, シンフィブレート及びジエチルヘキシルフタレートの8日間強制経口投与

Al-Clo, Sim, DEHP をそれぞれ LD<sub>50</sub> の約 1/4 量を F344 ラットの雄 (6 週令) に 8 日間経口投与し、肝 8-OH-dG レベルを測定した。その結果 Al-Clo は 8 日後に、Sim は 3 日以降に、DEHP は 8 日目に有意な増加が認められた (Fig. 1)。一方、腎では何れの検体の投与によっても有意な増加はみられなかった (Fig. 2) (高木ら, 1989)。

## 2) ジエチルヘキシルフタレート及びジエチルヘキシルアジペートの2週間混餌投与

肝発癌性を有する DEHP 及び DEHA をそれぞれ 1.2% 及び 2.5%, また発癌性のない無水フ

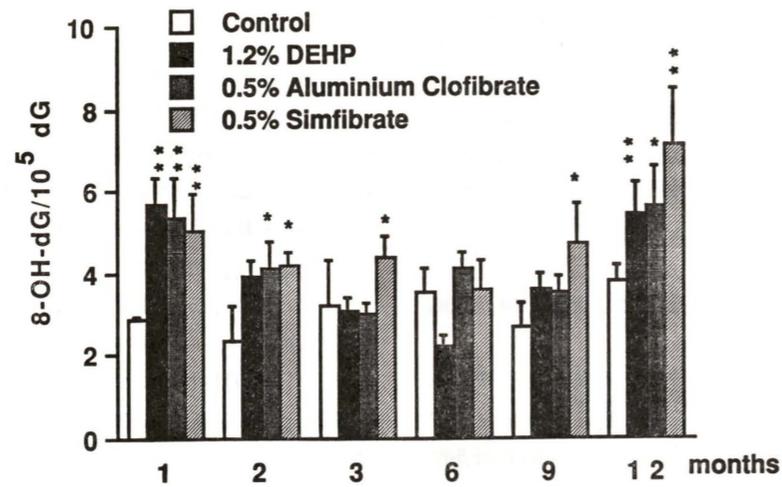


Fig. 4 ペルオキシソーム増殖剤の12ヶ月間混餌投与による肝8-OH-dGレベルの変化  
各値は3または6匹の平均値±標準偏差を示す。  
\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs 対照群。

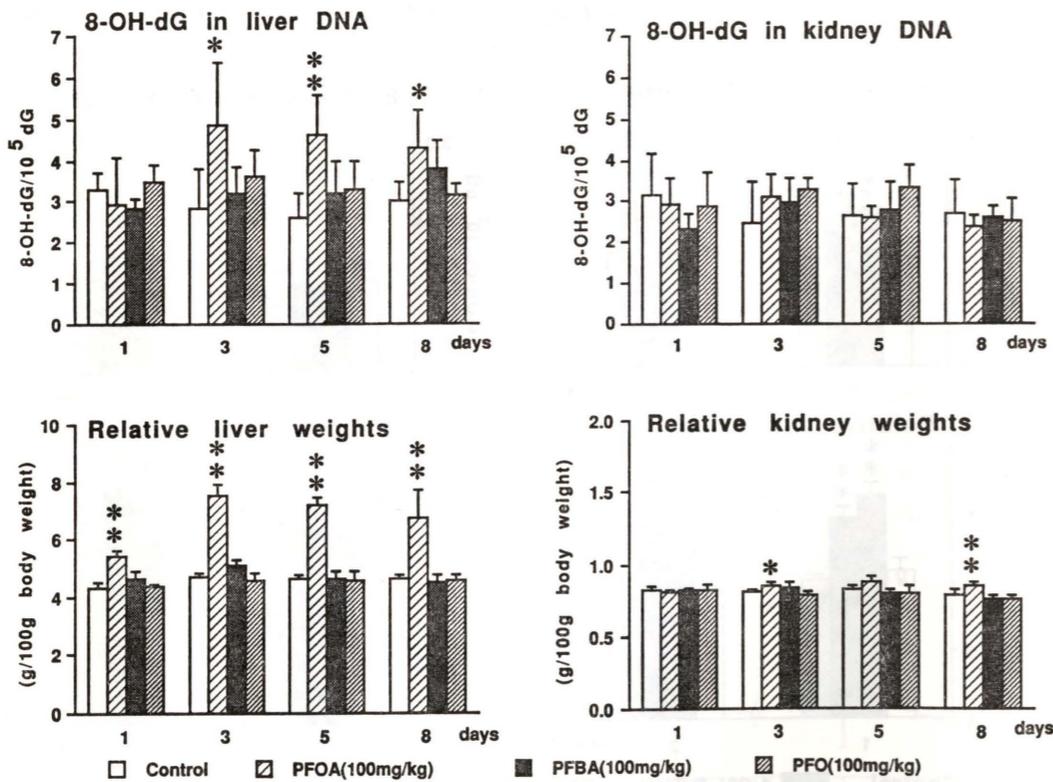


Fig. 5 過フッ素化脂肪酸誘導体の単回腹腔内投与による肝及び腎の8-OH-dGレベルと臓器重量の変化  
各値は5匹の平均値±標準偏差を示す。  
\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs 対照群。

タル酸は1.5%をF344ラット雄(6週令)にそれぞれ2週間混餌投与し肝及び腎での8-OH-dGレベルを検索した。その結果、DEHP、DEHAの投与によりペルオキシソーム増殖に由来すると思われる肝比重量の増加が1及び2週目共に認められ、肝8-OH-dGレベルも有意に増加した。しかし無水フタル酸の投与ではいずれも増加が認められなかった。一方、腎に関しては、いずれの検体も腎の比重量及び8-OH-dGレベル共に明らかな変化はみられなかった (Fig. 3) (Takagi *et al.*, 1990a)。

### 3) アルミニウムクロフィレート, シンフィレート及びジエチルヘキシルフタレートの12ヶ月間混餌投与

F344ラット雄にAl-Clo, Simは5ヶ月目までそれぞれ0.5%, その後は0.35%を12ヶ月目まで混餌投与し、またDEHPは1.2%を12ヶ月間混餌投与した。その結果、肝8-OH-dGレベルは3検体とも投与期間を通して対照群よりも有意な増加或いは増加傾向を示した (Fig. 4)。尚、肝ペルオキシソーム中のPalmitoyl CoA活性は、投与期間を通して全ての検体の投与により、著しく上昇していた (Takagi *et al.*, 1990b)。

以上の肝発癌性ペルオキシソーム増殖剤の短期及び長期投与により標的臓器肝の8-OH-dGレベルの増加が認められたことから、これらペルオキシソーム増殖剤の肝発癌過程に、活性酸素による酸化的DNA傷害の関与が推測された。

### 3. 過フッ素化脂肪酸誘導体投与による肝8-OH-dGレベルの変化

過フッ素化脂肪酸誘導体は潤滑油や腐食防止剤に使用されているが、これらはCloよりもペルオキシソーム増殖作用が数十倍強いことが知られている。そこでこれらの化合物による酸化的DNA傷害作用について検討した。以下では、Leydig cell adenoma また肝発癌のプロモーター作用の知られるペルフルオロオクタン酸 (PFOA), 発癌性は未知であるが強力なペルオキシソーム増殖作用のあるペルフルオロデカン酸 (PFDA), また単回投与ではペルオキシソーム増殖作用が認められないペルフルオロ酪酸 (PFBA) 及びペルフルオ

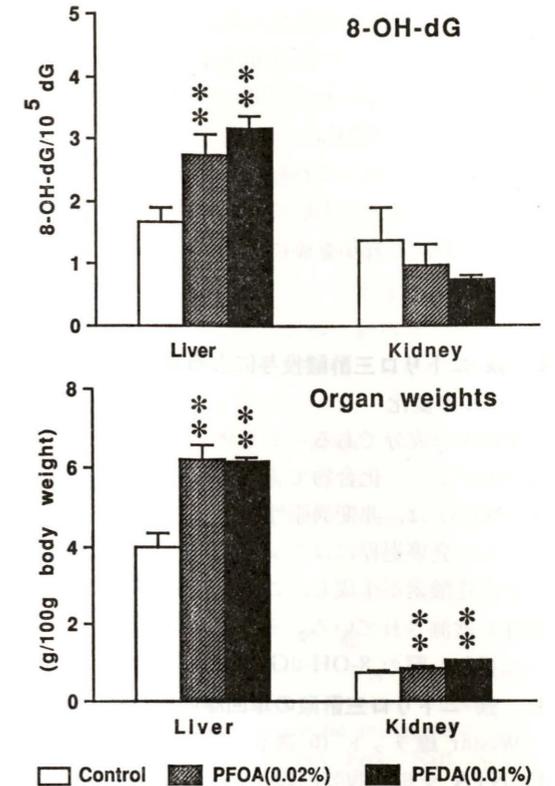


Fig. 6 過フッ素化脂肪酸誘導体の2週間混餌投与による肝及び腎の8-OH-dGレベルと臓器重量の変化  
各値は5匹の平均値±標準偏差を示す。  
\*\* P<0.01 vs 対照群。

ロオクタン (PFO) の投与による肝及び腎での8-OH-dGレベルの変化について示す。

#### 1) ペルフルオロオクタン酸の単回腹腔内投与

ペルオキシソーム増殖作用の強いPFOAまた、ペルオキシソーム増殖作用の無いPFBA及びPFOをそれぞれF344雄ラット(6週令)に100mg/kg単回腹腔内投与し、肝及び腎の臓器比重及び8-OH-dGレベルを測定した。その結果、PFOAの投与においてのみ、肝比重量の増加が起り、肝8-OH-dGレベルは3日以降から有意な増加が認められた。しかし腎臓ではいずれの検体においても影響がみられなかった (Fig. 5) (Takagi *et al.*, 1991)。

#### 2) ペルフルオロオクタン酸及びペルフルオロデカン酸の2週間混餌投与

0.02% PFOA または 0.01% PFDA を、F344

雄ラットに2週間混餌投与した。その結果、両検体ともに肝臓においてのみ比重量の増加と 8-OH-dG レベルの有意な上昇が認められた (Fig. 6) (Takagi *et al.*, 1991)。

以上の結果から、これらの過フッ素化脂肪酸誘導体の投与によっても肝での酸化的 DNA 傷害が誘発され、それが発癌に関与する可能性が考えられた。

#### 4. 鉄-ニトリロ三酢酸投与による腎 8-OH-dG レベルの変化

洗剤中の成分であるニトリロ三酢酸 (NTA) と鉄とのキレート化合物である鉄-ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) は、非変異原性のラット腎発癌剤である。その発癌過程にはフェントンタイプの反応により活性酸素が生成し、これが発癌に関与する可能性が推測されている。そこで Fe-NTA をラットに投与し腎の 8-OH-dG レベルを解析した。

##### 1) 鉄-ニトリロ三酢酸の単回腹腔内投与

Wistar 雄ラット (6 週令) に 15 mg Fe/kg の Fe-NTA を単回腹腔内投与し、1, 6, 24 及び 48 時間後の腎での 8-OH-dG 及び過酸化脂質レベル (TBA 法) を測定した。その結果、腎 8-OH-dG レベルは投与 1 時間後より有意に増加し、48 時間後にはコントロールレベルに減少した。過酸化脂質レベルは一時間後に著しく上昇し、その後急速に減少した (Fig. 7) (Umemura *et al.*, 1990b)。

##### 2) ニトリロ三酢酸化合物の単回腹腔内投与

以下に Fe-NTA 及び Fe 以外の NTA 化合物による酸化的 DNA 傷害について検討した結果を示す。Wistar 雄ラット (6 週令) に、Fe-NTA (15 mg Fe/kg), また非発癌性の FeCl<sub>3</sub> (15 mg Fe/kg), 腎発癌性の知られる NTA の Na 塩である Na<sub>2</sub>NTA (252 mg/kg), 及び Al とのキレート化合物である Al-NTA (7 mg Al/kg) をそれぞれ単回腹腔内投与し、1, 3, 6 及び 24 時間後の腎 8-OH-dG レベルを測定した。その結果、Fe-NTA の投与においてのみ一時間後から有意な 8-OH-dG レベルの上昇が認められ、そのほかの化合物の投与では変化がみられなかった (Fig. 8) (Umemura *et al.*, 1990a)。

以上の結果から Fe-NTA による発癌過程には

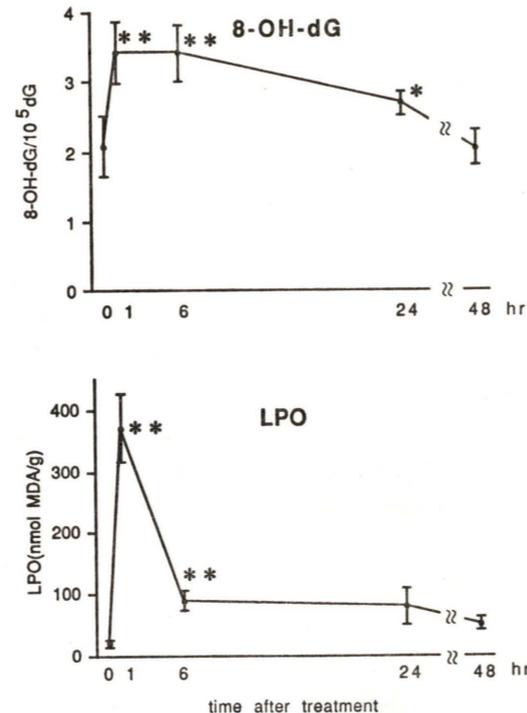


Fig. 7 鉄-ニトリロ三酢酸の単回腹腔内投与による腎 8-OH-dG と過酸化脂質レベルの変化。各値は 5 匹の平均値±標準偏差を示す。  
\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs 対照群 (0 hr)。

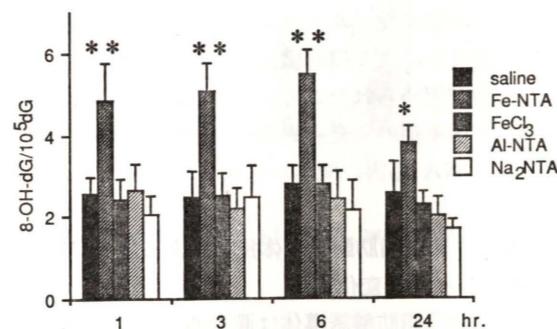


Fig. 8 ニトリロ三酢酸化合物の単回腹腔内投与による腎 8-OH-dG レベルの変化。各値は 6 匹の平均値±標準偏差を示す。  
\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs 対照群。

活性酸素種による酸化的 DNA 傷害に関与している可能性が示唆された。

##### 3) 鉄-ニトリロ三酢酸による 8-OH-dG 生成に対する抗酸化剤投与の効果

Fe-NTA による腎 8-OH-dG 生成に対し、酸化的傷害の防御に重要である GSH 及びその前駆対

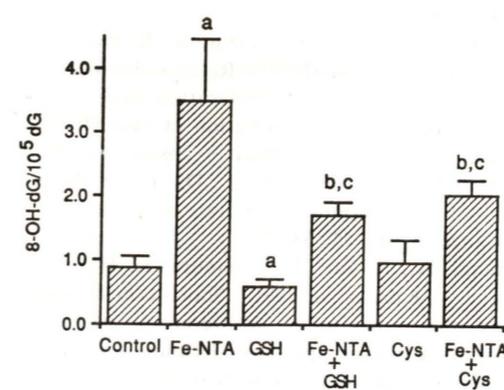


Fig. 9 鉄-ニトリロ三酢酸投与の腎 8-OH-dG レベルに対する抗酸化剤の効果。各値は 5 匹の平均値±標準偏差を示す。  
\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs 対照群。  
<sup>a</sup> P<0.05 vs Fe-NTA 群。

のシステイン (Cys) の影響について検討した。Wistar 雄ラット (6 週令) に 15 mg Fe/kg の Fe-NTA を単回腹腔内投与し、800 mg/kg の GSH または 400 mg/kg の Cys をそれぞれ Fe-NTA 投与の 30 分前と 30 分後の前後 2 回腹腔内投与し、Fe-NTA 投与の 1 時間後における腎 8-OH-dG レベルを測定した。腎 8-OH-dG レベルは Fe-NTA の単独の投与による上昇が、活性酸素のスカベンジャーである GSH または Cys の処置により有意に抑制されることが明らかとなった (Fig. 9)。このことから Fe-NTA の酸化的 DNA 傷害に活性酸素が関与していることが強く示唆された (Umemura *et al.*, 1991)。

#### 5. おわりに

8-OH-dG は電気化学検出器により比較的簡便にしかも高感度に測定できるため、酸化的 DNA 傷害の *in vivo* のマーカーとして広く解析されるようになり、酸化的 DNA 傷害と発癌との関係を探る手段として、多方面から研究されてきた。大腸菌及び哺乳動物細胞にも 8-OH-dG の修復酵素が存在することが確認され、実際に細胞内で 8-OH-dG が生成し、生体はこれを除去する機構を備えていると考えられる。このことは測定値として得られた 8-OH-dG レベルは生成と除去とのバランスの結果である事をも意味する。さらに

8-OH-dG は点突然変異を誘発することが明らかとなり、これが癌遺伝子の活性化にも関与する可能性が考えられる。筆者らの行なった実験において、Ames テストでは陰性である非変異原発癌物質の投与により、標的臓器中で 8-OH-dG の生成が確認され、発癌性との関連が認められた。このことから、*in vivo* における 8-OH-dG の測定は、発癌過程に活性酸素が関与する非変異原性発癌物質の短期スクリーニング試験に利用できる可能性が考えられる。また、活性酸素による酸化的 DNA 傷害が発癌のイニシエーション、プロモーションまたはプログレッションの過程にどのように関与しているかを解明する研究においても、酸化的 DNA 傷害のマーカーとしての有用性が期待できるものと考えられる。

#### 参考文献

- Basu, A. K., E. L. Loechler, S. A. Leadon and J. M. Essigmann (1989) Genetic effects of thymine glycol: Site-specific mutagenesis and molecular modeling studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7677-7681.
- Chung, M. H., H. Kasai, D. S. Jones, H. Inoue, H. Ishikawa, E. Ohtsuka and S. Nishimura (1990) An endonuclease activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA, *Mutation Res.*, 254, 1-12.
- Faux, S. P., J. E. Francis, A. G. Smith and J. K. Chipman (1992) Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in Ah-responsive mouse liver by iron and Aroclor 1254, *Carcinogenesis*, 13, 247-250.
- Fiala, E. S., C. C. Conaway and J. E. Mathis (1989) Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane, *Cancer Res.*, 49, 5518-5522.
- Higinbotham, K. G., J. M. Rice, B. A. Diwan, K. S. Kasprzak, C. D. Reed and A. O. Perantoni (1992) GGT to GTT transversion in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcoma induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA, *Cancer Res.*, 52, 4747-4751.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris (1991) p53 mutation in human cancers, *Science*, 253, 49-53.
- Hussain, N. S., C. C. Conaway, N. Guo, W. Asaad and E. S. Fiala (1990) Oxidative DNA and RNA damage in rat liver due to acetoxime;

- similarity to effects of 2-nitropropane, Carcinogenesis, 11, 1013-1016.
- Kasai, H., S. Nishimura, Y. Kurokawa and Y. Hayashi (1987) Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA, Carcinogenesis, 8, 1959-1961.
- Kasai, H., Y. Okada, S. Nishimura, M. S. Rao and J. K. Reddy (1989) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator, Cancer Res., 49, 2603-2605.
- Kasprzak, K. S., B. A. Diwan, N. Konishi, M. Misra and J. M. Rice (1990) Initiation by nickel acetate and promotion by sodium barbital of renal cortical epithelial tumors in male F 344 rats, Carcinogenesis, 11, 647-652.
- Levy, D. D. and G. W. Teebor (1991) Site directed substitution of 5-hydroxymethyluracil for thymine in replicating  $\phi$  X-174 am 3 DNA via synthesis of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate, Nucleic Acids Res., 19, 3337-3343.
- Masuda, T., N. Miyasaka, T. Kato and Y. Ueno (1991) Formation of the 8-hydroxydeoxyguanosine moiety in hepatic DNA of mice orally administered with luteoskyrin, a bis-anthraquinoid mycotoxin, Toxicol. Lett., 58, 287-295.
- Roy, D., R. A. Floyd and J. G. Liehr (1991) Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of diethylstilbestrol-treated Syrian hamsters: covalent DNA damage by free radicals generated by redox cycling of diethylstilbestrol, Cancer Res., 51, 3882-3885.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific base during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxo-dG, Nature, 349, 431-434.
- 高木篤也, 佐井君江, 梅村隆志, 長谷川隆一, 黒川雄二, 葛西 宏 (1989) ペルオキシゾーム増殖剤経口投与によるラット肝 DNA 中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシンの生成, 医学のあゆみ, 149, 65-66.
- Takagi, A., K. Sai, T. Umemura, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990a) Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di (2-ethylhexyl) phthalate and di (2-ethylhexyl) adipate, Jpn. J. Cancer Res., 81, 213-215.
- Takagi, A., K. Sai, T. Umemura, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990b) Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators; Di (2-ethylhexyl) phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate, Cancer Lett., 53, 33-38.
- Takagi, A., K. Sai, T. Umemura, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1991) Short-term exposure to the peroxisome proliferators, perfluorooctanoic acid and perfluorodecanoic acid causes significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats, Cancer Lett., 57, 55-60.
- Tchou, J., H. Kasai, S. Shibutani, M. H. Chung, J. Laval, A. P. Grollman and S. Nishimura (1991) 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4690-4694.
- Umemura, T., S. Sai, A. Takagi, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990a) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA), Carcinogenesis, 11, 345-347.
- Umemura, T., K. Sai, A. Takagi, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1990b) Oxidative DNA damage, lipid peroxidation and nephrotoxicity induced in the rat kidney after ferric nitrilotriacetate administration, Cancer Lett., 54, 95-100.
- Umemura, T., K. Sai, A. Takagi, R. Hasegawa and Y. Kurokawa (1991) The effects of exogenous glutathione and cysteine on oxidative stress by ferric nitrilotriacetate, Cancer Lett., 58, 49-56.
- Wood, M. L., M. Dizdaroglu, E. Gajewski and J. M. Essigmann (1990) Mechanistic studies of ionizing irradiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of single 8-hydroxyguanine (8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome, Biochemistry, 29, 7024-7032.
- Yamamoto, F., H. Kasai, T. Bessho, M. H. Chung, E. Ohtsuka, T. Hori and S. Nishimura (1992) Ubiquitous presence in mammalian cells of enzymatic activity specifically cleaving 8-hydroxyguanine containing DNA, Jpn. J. Cancer Res., 83, 351-357.

## 発癌プロモーター *In Vitro* 試験について

国立衛生試験所衛生微生物部 酒井綾子<sup>1</sup>  
 横浜市立大学木原生物学研究所 梅田 誠<sup>2</sup>  
 静岡県立大学薬学部衛生化学教室 中村好志<sup>3</sup>  
 食品薬品安全センター-秦野研究所細胞毒性学研究室 佐々木澄志<sup>4</sup>  
 三菱化成(株)総合研究所 岩瀬裕美子<sup>5</sup>

### 1. はじめに

化学発癌の過程は大きくイニシエーションとプロモーションの2段階に分けられることは、よく知られているが、*in vivo*での発癌プロモーションの機構の解明が十分に進んでおらず、発癌プロモーションには複数の経路の存在も考えられることが、理論的な発癌プロモーターの *in vitro* 試験の開発を困難にしている。現在のところ、発癌プロモーターが有する生物学的、生化学的特性を指標として、*in vitro* 試験が行われている。主なものを以下に記す。

- 細胞トランスフォーメーションの促進
- 細胞間連絡の阻害
- 細胞分化の促進または抑制
- Epstein-Barr ウイルスの早期抗原の誘導
- 活性酸素の産生

- オルニチン脱炭酸酵素活性の上昇
- プロテインキナーゼ C の活性化またはプロテインホスファターゼ 1 と 2A の阻害

本稿では、BALB3T3 細胞, C3H10T1/2 細胞を用いるフォーカス法および JB6 細胞を用いる軟寒天コロニー法による細胞トランスフォーメーション試験と、V79 細胞を用いる細胞間連絡阻害試験 (代謝協同阻害試験) を中心に、著者らの研究室での結果と文献調査の結果を併せて報告する。これらの方法は、IARC の癌原性物質長期・短期試験法評価特別委員会の報告 (Barrett *et al.*, 1986) でも、発癌プロモーターの検出に有望な *in vitro* 試験として取り上げられている。また、著者の 1 人、佐々木らが行っている Bhas42 細胞を用いるトランスフォーメーション試験 (Sasaki *et al.*, 1990) も、新しい方法として紹介する。

- 1) 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1
- 2) 〒232 横浜市南区中村町 2-120
- 3) 〒422 静岡市谷田 52-1
- 4) 〒257 神奈川県秦野市落合 729-5
- 5) 〒227 横浜市緑区鴨志田町 1000

#### *In Vitro* Assays for Tumor Promoters

Ayako Sakai<sup>1</sup>, Makoto Umeda<sup>2</sup>, Yoshiyuki Nakamura<sup>3</sup>, Kiyoshi Sasaki<sup>4</sup> and Yumiko Iwase<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Division of Microbiology, National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan

<sup>2</sup>Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University, Nakamura-cho, Minami-ku, Yokohama 232, Japan

<sup>3</sup>Laboratory of Health Science, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka-shi 422, Japan

<sup>4</sup>Laboratory of Cell Toxicology, Department of Cell Biology, Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257 Japan

<sup>5</sup>Toxicology Laboratory, Life Science Sector, Research Center, Mitsubishi Kasei Co., 1000 Kamoshida-cho, Midori-ku, Yokohama 227, Japan

## 2. 細胞トランスフォーメーションの促進

### 1) 細胞トランスフォーメーションについて

細胞トランスフォーメーション試験は、試験管内発癌とも言われるように、細胞の悪性化に伴う形質の変化を指標とする方法である。悪性化に伴う細胞の形質として、コロニーの形態の変化を観察するコロニー法、細胞が増殖の接触阻止能を失うのを観察するフォーカス法、足場依存性を失うのを観察する軟寒天コロニー法がある。実験動物での2段階発癌に類似した2段階トランスフォーメーションの現象も認められるので、細胞や実験手順の選択の仕方、発癌イニシエーター、プロモーターのどちらをも試験することができる。ただし、コロニー法で実際に試験された発癌プロモーターの数は少ない。

### 2) BALB3T3 細胞または C3H10T1/2 細胞を用いる2段階トランスフォーメーション試験

BALB3T3 細胞と C3H10T1/2 細胞は、それぞれ BALB/c マウスと C3H マウスの胎児から樹立された細胞株である (Aaronson and Todaro, 1968; Kakunaga, 1973; Reznikoff *et al.*, 1973)。両細胞とも増殖の接触阻止能を保持しているの

で、重なり合って増殖することはない。しかし、十分量の癌原性物質で処理を行ったり、低濃度の癌原性物質で処理を行った後、発癌プロモーターによる処理を加えると、トランスフォームした細胞が重なり合い増殖を起し、細胞の形態も変わったフォーカスを形成する (Mondal *et al.*, 1976; Hirakawa *et al.*, 1982; Sakai and Sato, 1989)。

2段階トランスフォーメーション試験の手順の細部は、研究者により異なるが、プロモーターの検出を行うには、播種した翌日、細胞を閾値に近い濃度の既知癌原性物質で短期間 (通常は1-3日間) イニシエーション処理する。3, 4日通常培地で培養後、一定期間 (通常は2週間) 被験物質を含む培地でプロモーション処理を行い、さらに培養を続けて、悪性形態フォーカスを計数する。全体の培養期間は、BALB3T3 細胞で4-6週間、C3H10T1/2 細胞で6-8週間である。

悪性形態フォーカスの判定には、若干の経験を要する。BALB3T3 細胞、C3H10T1/2 細胞ともに、トランスフォーメーション試験のために特別に選択されたクローン (それぞれ、クローン A31-1-1, クローン8) を用いて試験を行うが (Kakunaga Crow, 1980; Reznikoff *et al.*, 1973), それでも細胞の継代数や、継代の経緯、実験条件によって

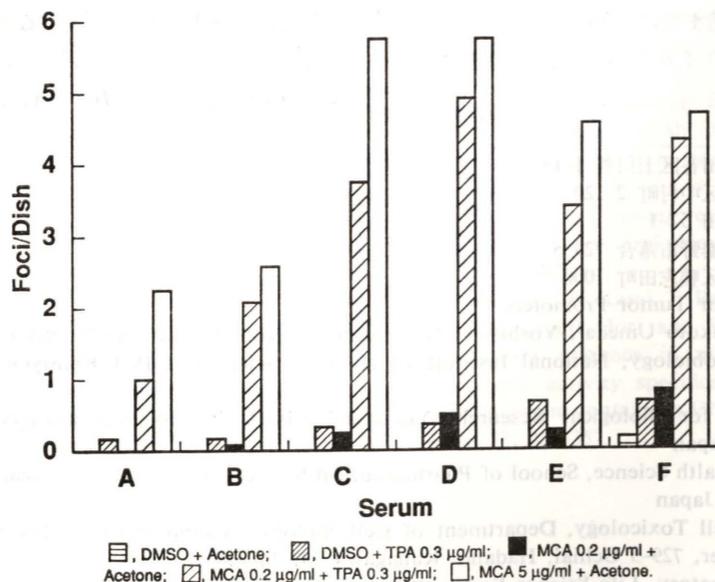


Fig. 1. フォーカス形成率に及ぼす血清ロットの影響

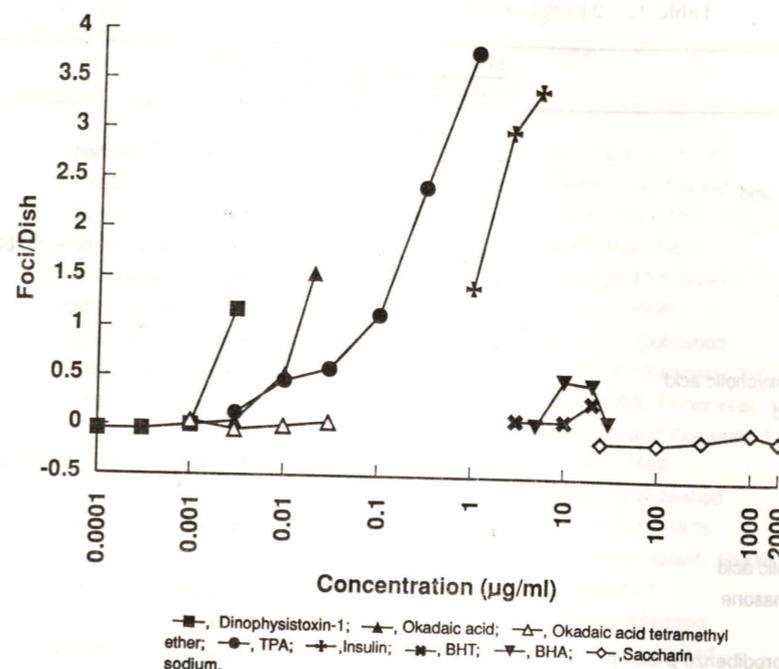


Fig. 2. BALB3T3 細胞 2段階トランスフォーメーション試験におけるプロモーション活性

フォーカスの形成率が異なり、癌原性物質の閾値濃度も異なるので、イニシエーション処理に用いる既知癌原性物質の濃度も研究室ごとに求めなければならない。細胞は、最初に大量に凍結保存しておき、試験のたびごとに新しいものを用いるようにし、継代の進んだものは用いない。特に、血清ロットは、フォーカス形成率に大きく影響するのでロット検査を慎重に行う必要がある。BALB-3T3 細胞 2段階トランスフォーメーションに対する血清ロットの影響の例を Fig. 1 に示した。

著者の研究室で得られた BALB3T3 細胞 2段階トランスフォーメーション試験の結果の一部を Fig. 2 にまとめた。イニシエーション処理には3-メチルコラントレン (MCA) を用いている。マウス皮膚の発癌プロモーター、ジノフィストキシン-1, オカダ酸, TPA は、低濃度でトランスフォーメーションを強く促進するが、マウス皮膚で活性のないオカダ酸テトラメチルエーテルには、促進作用は認められない。実験動物、臓器、イニシエーターの違いによって、発癌を抑制したり促進したりすることが知られている BHT と BHA も弱い促進作用を示すが、作用発現にかな

り高濃度を要する。膀胱癌のプロモーターであるサッカリンには、促進作用は認められなかった。インスリンは、強い促進作用を示すが、現在のところインスリンが体内で発癌プロモーションに関与しているかどうか不明である。

2段階トランスフォーメーション試験について、著者らの研究室での結果と文献調査の結果を合わせて Table 1 に示した。

BALB3T3 細胞を用いた場合、Fig. 2 に示したものの他に、マウス皮膚の発癌プロモーターでは、ジヒドロテレオシジン B, メゼレイン, アントラリンに促進作用がある。生体内ではジアシルグリセロールがプロテインキナーゼ C を活性化すると考えられているが、合成ジアシルグリセロールである 1-オレオイル-2-アセチルグリセロールやジオレインも促進作用を示す。さらに、肝癌のプロモーターである DDT, フェノバルビタール, 前胃のプロモーターであるカテコール, 結腸のプロモーターである胆汁酸類にも促進作用が認められる。活性型ビタミン D<sub>3</sub> である 1 $\alpha$ ,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> は、BALB3T3 細胞のトランスフォーメーションを促進するが、マウス

Table 1. 2段階トランスフォーメーション試験が行われた物質

| 物質  | 結果      |           | 文献  |
|---|---------|-----------|---|
|   | BALB3T3 | C3H10T1/2 |   |
| Anthralin                                       | +       |           | Sasaki, unpublished   |
| Anthranilic acid                                | -       |           | Umeda <i>et al.</i> , 1983                                  |
| BHA   | +       |           | Sakai, unpublished  |
| BHT   | +       | +         | Djurhuus and Lillehaug (1982)                               |
|   |         |           | Sakai, unpublished  |
| Caffeine  |         | +         | Chan and Little, 1982                                       |
| Catechol  | +       |           | Atchison <i>et al.</i> , 1982                               |
| Chenodeoxycholic acid                           |         | +         | Kaibara <i>et al.</i> , 1984                                |
| Cholic acid                                     |         | +         | Kaibara <i>et al.</i> , 1984                                |
|   | ±       |           | Umeda <i>et al.</i> , 1989                                  |
| Cortisone                                       |         | +         | Kennedy and Weichselbaum, 1981b                             |
| DDT   | +       |           | Sasaki, unpublished   |
| Deoxycholic acid                                |         | +         | Kaibara <i>et al.</i> , 1984                                |
| Dexamethasone                                   |         | +         | Kennedy and Weichselbaum, 1981b                             |
| 2,7-Dichlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin           |         | +         | Abernethy and Boreiko, 1987                                 |
| Diethylstilbestrol                              |         | +         | Lillehaug and Djurhuus, 1982                                |
| Dihydrotealeocidin B                            | +       |           | Hirakawa <i>et al.</i> , 1982                               |
| 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>  | +       |           | Kuroki <i>et al.</i> , 1983; Sasaki <i>et al.</i> , 1986    |
| Dinophysistoxin-1                               | +       |           | Sakai and Fujiki, 1991                                      |
| Diolein   | +       |           | Semba and Inui, 1990  |
| EGF   |         | +         | Fisher <i>et al.</i> , 1981                                 |
|   |         |           | Sasaki, unpublished   |
|   |         | ±         | Hamel <i>et al.</i> , 1988                                  |
| 17- $\beta$ -Estradiol                          |         | +         | Kennedy and Weichselbaum, 1981a                             |
|   | -       |           | Sakai, unpublished  |
| FGF   | +       |           | Sasaki, unpublished   |
| Formaldehyde                                    |         | +         | Frazelle <i>et al.</i> , 1983                               |
| 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin |         | +         | Abernethy and Boreiko, 1987                                 |
| 1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin |         | +         | Abernethy and Boreiko, 1987                                 |
| Hydrocortisone                                  | -       |           | Umeda <i>et al.</i> , 1983                                  |
| 3-Hydroxyanthranilic acid                       | +       |           | Umeda <i>et al.</i> , 1989                                  |
| Insulin   | +       |           | Umeda <i>et al.</i> , 1983                                  |
| Lithocholic acid                                |         | +         | Kaibara <i>et al.</i> , 1984; Kawasumi <i>et al.</i> , 1988 |
|   | +       |           | Umeda <i>et al.</i> , 1989                                  |
| 4-O-Methyl-TPA                                  |         | -         | Boreiko <i>et al.</i> , 1986                                |

Table 1. (continued)

| 物質   | 結果      |           | 文献  |
|--|---------|-----------|---|
|  | BALB3T3 | C3H10T1/2 |   |
| Mezerein                                     |         | +         | Boreiko <i>et al.</i> , 1986  |
|  | +       |           | Sasaki, unpublished   |
| Okadaic acid                                 | +       |           | Katoh <i>et al.</i> , 1990; Sakai <i>et al.</i> , 1991  |
| Okadaic acid tetramethyl ether               | -       |           | Sakai <i>et al.</i> , 1991  |
| 1-Oleoyl-2-acetyl glycerol                   | +       |           | Frixen and Yamasaki, 1987; Semba and Inui, 1990   |
| Phenobarbital                                | +       |           | Sasaki, unpublished   |
| Phorbol-12,13-didecanoate                    | +       |           | Frixen and Yamasaki, 1987; Katoh <i>et al.</i> , 1990; Fisher <i>et al.</i> , 1981; Enomoto and Yamasaki, 1985        |
| PDGF   |         | +         | Mordan, 1988  |
|  | +       |           | Sasaki, unpublished   |
| Saccharin                                    |         | +         | Mondal <i>et al.</i> , 1978   |
|  | -       |           | Sakai unpublished; Sasaki unpublished   |
| Sodium nitrite                               | -       |           | Sakai unpublished   |
| Taurocholic acid                             | +       |           | Sasaki unpublished  |
| 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin |         | +         | Abernethy <i>et al.</i> , 1985; Abernethy and Boreiko, 1987   |
| TGF $\beta$                                  | +       |           | Hamel <i>et al.</i> , 1988  |
| $\alpha$ -Thrombin                           | +       |           | Morris <i>et al.</i> , 1992   |
| TPA  |         | +         | Frazelle <i>et al.</i> , 1984; Mondal <i>et al.</i> , 1976; Mondal and Heidelberger, 1976; Male <i>et al.</i> , 1987他 |
|  | +       |           | Hirakawa <i>et al.</i> , 1982; Sasaki <i>et al.</i> , 1986; Sakai and Sato, 1989他                                     |
| Triiodothyronine                             | -       |           | Umeda <i>et al.</i> , 1983  |
|  |         | +         | Guernsey <i>et al.</i> , 1980   |
| Xanthine-xanthine oxidase                    |         | +         | Zimmerman and Cerutti, 1984   |

胆汁酸, saccharin, phenobarbitalは、ナトリウム塩を含む。±は、あいまいな結果であることを示す。

皮膚での実験では、TPAによる発癌プロモーションを抑制する。他に各種の増殖因子に促進作用が認められる。

サッカリンは、BALB3T3細胞のトランスフォーメーションを促進しないが、C3H10T1/2細胞では促進作用を示す。

C3H10T1/2細胞を用いた試験では、ステロイドホルモンのジエチルスチルベストール、17- $\beta$ -エストラジオール、デキサメタゾン、コルチゾンやキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で産生されたスーパーオキシド、さらに、ダイオキシン、カフェイン、ホルムアルデヒドに促進作用が認め

られている。

### 3) Bhas 42細胞を用いるトランスフォーメーション試験

Bhas 42細胞は、BALB3T3細胞に活性型 *ras* 遺伝子 (v-Ha-*ras*) を導入して作られた (Sasaki *et al.*, 1988)。

トランスフォーメーション試験は、BALB3T3細胞による2段階試験の場合と同様に、フォーカス法によって行う (Sasaki *et al.*, 1990)。しかし、活性型 *ras* 遺伝子の導入によって、すでにイニシエートされた状態になっており、プロモーターに

Table 2. BALB3T3 及び Bhas 42 細胞を用いるトランスフォーメーション試験が行われた物質

| 物質   | 結果      |         |
|--|---------|---------|
|  | BALB3T3 | Bhas 42 |
| Anthralin                                      | +       | +       |
| DDT  | +       | +       |
| 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> | +       | +       |
| EGF  | +       | -       |
| FGF  | +       | +       |
| Insulin  | +       | ±       |
| Mezerein                                       | +       | +       |
| PDGF   | +       | +       |
| Phenobarbital sodium                           | +       | +       |
| Saccharin sodium                               | -       | -       |
| Taurocholate sodium                            | +       | +       |
| TPA  | +       | +       |

±は、あいまいな結果であることを示す。

よる処理のみでトランスフォーメーションを起こす。Bhas 42 細胞と BALB3T3 細胞を混合播種し、1 週間目から 2 週間被験物質を加えた培地で培養して、通常培地でさらに 3 週間培養を続ける。血清ロットは、フォーカス形成率にあまり影響しない。比較的均一な形態のフォーカスを生ずるので、悪性フォーカスの判定は、BALB3T3 細胞に比べて容易である。

Bhas 42 細胞トランスフォーメーション試験と MCA をイニシエーターとして用いる BALB3T3 細胞 2 段階トランスフォーメーション試験とを並行して行い、結果の要約を Table 2 に示した (Sasaki, 1992)。TPA, メゼレイン, アントラリン, フェノバルビタール, DDT, タウロコレート, 活性型ビタミン D<sub>3</sub>, FGF, PDGF は、どちらの方法でも陽性、サッカリンは、どちらの方法でも陰性であった。インスリンは、BALB3T3 細胞では陽性であったが、Bhas 42 細胞ではあいまいな結果であった。EGF は、BALB3T3 細胞で陽性であったが、Bhas 42 細胞では陰性であった。

#### 4) JB6 細胞を用いるトランスフォーメーション試験

JB6 細胞は、BALB/c マウス新生児皮膚に由来する株細胞で、正常な細胞の形質である足場依存性を保持しており、器壁に付着した状態でしか増殖できない (Colburn *et al.*, 1978)。しかし、トランスフォーメーションを起こすと足場依存性を失

い、軟寒天内で増殖してコロニーを形成するようになる。TPA による処理のみで、このトランスフォーメーションを起こすので、すでにイニシエートされていると考えられている (Colburn *et al.*, 1979)。

プロモーターの検出を行うには、被験物質を含む 0.33% 軟寒天培地に細胞を加えて、0.5% 寒天平板上に重層して 2 週間培養し、形成されたコロニーの形態と数を観察、計数する (Nakamura *et al.*, 1985)。血清ロットのコロニー形成率に及ぼす影響は大きいですが、トランスフォーメーションによって生じたコロニーの判定は、比較的容易である。

JB6 細胞系でこれまでに試験された物質について Table 3 にまとめた。ホルボールエステル類で、マウス皮膚での発癌プロモーション活性との間により相関が認められる。マウス皮膚で活性を示す TPA やホルボール-12, 13-ジベンゾエート, ホルボール-12, 13-ジブチレート, 12-O-レチノールホルボール-13-アセテートは、JB6 細胞のトランスフォーメーションを起こすが、マウス皮膚で活性のないホルボールやホルボール-12, 13-ジアセテートは、起こさない。また、この方法は、活性酸素のプロモーション作用をよく検出し、過酸化ベンゾイル, 過酸化水素, スーパーオキシドが陽性である。さらに、フタル酸エステルであるジ (2-エチルヘキシル) フタレートや、たばこの煙, シスプラチン, プリオスタチン, 活性型ビタ

Table 3. JB 6 細胞を用いる軟寒天コロニー形成試験が行われた物質

| 物質   | 結果 | 文献   |
|--|----|--|
| A23187   | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Adriamycin                                     | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| AVP  | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Benzoyl peroxide                               | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985a,b                             |
| BHA  | -  | Nakamura, Unpublished  |
| Bryostat                                       | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Caffeine                                       | -  | Nakamura, Unpublished  |
| Capsaicin                                      | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Chenodeoxycholic acid                          | -  | Nakamura, Unpublished  |
| Cholera toxin                                  | +  | Hosoi <i>et al.</i> , 1987                                   |
| Cigarette smoke                                | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Cis-platinum                                   | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Colchicine                                     | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Cyclamate sodium                               | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Di(2-ethylhexyl) phthalate                     | +  | Diwan <i>et al.</i> , 1985; Colburn <i>et al.</i> , 1988     |
| 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> | +  | Hosoi <i>et al.</i> , 1986                                   |
| Dinophysistoxin-1                              | ±  | Nakamura, Unpublished  |
| EGF  | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| FGF  | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Hydrogen peroxide                              | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Insulin  | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Lanthanum chloride                             | +  | Colburn <i>et al.</i> , 1988; Smith <i>et al.</i> , 1986     |
| Mestranol                                      | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Mezerein                                       | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Mellitin                                       | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| MSA  | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| NaIO <sub>4</sub>                              | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Norethynodrel                                  | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Okadaic acid                                   | ±  | Nakamura, Unpublished  |
| Phorbol-12,13-diacetate                        | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b; Colburn <i>et al.</i> , 1979 |
| Phorbol-12,13-dibutyrate                       | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b; Colburn <i>et al.</i> , 1979 |
| Phorbol-12,13-dibenzoate                       | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b; Colburn <i>et al.</i> , 1979 |
| PDGF   | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Phorbol  | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| 12-O-Retinoylphorbol-13-acetate                | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Saccharin sodium                               | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| Teleocidin                                     | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| TGF $\beta$                                    | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b; Wilder and Rizzino, 1991     |
| Thrombin                                       | -  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b                               |
| TPA  | +  | Gindhart <i>et al.</i> , 1985b; Colburn <i>et al.</i> , 1979 |
| Xanthine-xanthine oxidase                      | +  | Nakamura <i>et al.</i> , 1988                                |

±は、あいまいな結果であることを示す。

ミン D<sub>3</sub>, EGF, TGF, コレラトキシン, 塩化ランタンが陽性である。サッカリン, サイクラミン酸塩, 胆汁酸のデオキシコレート, ステロイドホルモンのメストラノールは、陰性である。

### 3. 細胞間連絡の阻害

#### 1) 細胞間連絡について

細胞間連絡は、細胞の増殖や分化の調節, 恒常性の維持に必須であると考えられている。細胞間

連絡の 1 つは、隣接する細胞間で、膜のギャップ結合構造を通じて小分子やイオンが移動することで行われている。発癌プロモーターの多くが、このギャップ結合細胞間連絡を阻害する。ギャップ結合細胞間連絡を調べる方法は、いくつかあるが、代表的な方法は、代謝協同法と色素移行法である。代謝協同法では、一方の細胞に代謝的に生じた有毒物質が隣接する細胞へ移動するのを調べる。色素移行法では、細胞に注入した色素が隣接

Table 4. V 79 細胞を用いる代謝協同阻害試験が行われた物質

| 物質                                     | 結果 | 文献  |
|--|----|---|
| A23187                                 | -  | 野田, 1984  |
| Acetamide                              | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Acetaldehyde                           | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Acetazolamide                          | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| Acetone                                | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Acetonitrile                           | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Acetylsalicylic acid (Aspirin)         | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| Acrylonitrile                          | +  | Elmore <i>et al.</i> , 1985; Umeda <i>et al.</i> , 1985   |
| Adrenaline                             | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980  |
| Aflatoxin B1                           | -  | 野田, 1984; Jone <i>et al.</i> , 1987   |
| Aflatoxin B2                           | -  | Jone <i>et al.</i> , 1987   |
| Aldrin                                 | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982; Mills <i>et al.</i> , 1991   |
| Allyl isovalerate                      | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Altertoxins I                          | +  | Boutin <i>et al.</i> , 1989   |
| Altertoxins II                         | -  | Boutin <i>et al.</i> , 1989   |
| Altertoxins III                        | -  | Boutin <i>et al.</i> , 1989   |
| Amaranth                               | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| m-Aminobenzoic acid (sodium salt)      | -  | 青儀ら, 1985   |
| p-Aminobenzoic acid (sodium salt)      | -  | 青儀ら, 1985   |
| m-Aminobenzamide                       | -  | 青儀ら, 1985   |
| 2-Aminoethanol                         | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| 6-Aminonicotinamide                    | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| o-Aminophenol                          | -  | 野田, 1984  |
| 11-Aminoundecanoic acid                | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| n-Amyl alcohol                         | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| iso-Amyl alcohol                       | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Amobarbital                            | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988  |
| Ampicillin trihydrate                  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Anhydrodebroaplysiatoxin               | +  | Jone <i>et al.</i> , 1987   |
| Aniline                                | ±  | 青儀ら, 1985   |
| Aniline HCl                            | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Anthralin                              | ±  | Umeda <i>et al.</i> , 1980  |
|  | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982a  |
|  | -  | Kinsella <i>et al.</i> , 1982; Iwase <i>et al.</i> , 1991   |
| Anthranilic acid (o-Aminobenzoic acid) | -  | 野田, 1984; 青儀ら, 1985   |
| Aplysiatoxin                           | +  | Jone <i>et al.</i> , 1987   |
| Arachidic acid                         | -  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986  |
| Arachidonic acid                       | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986  |
| L-Ascorbic acid (free体)                | -  | Welsch <i>et al.</i> , 1984; Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Asphalt fume condensates               | +  | Toraason <i>et al.</i> , 1991   |
| Benzo[a]pyrene                         | -  | Malcolm <i>et al.</i> , 1983; Newbold and Amos, 1981; Iwase <i>et al.</i> , unpublished               |
| Benzo[e]pyrene                         | -  | Newbold and Amos, 1981  |
| Benz[a]anthracene                      | -  | Newbold and Amos, 1981  |
| Benzaldehyde                           | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Benzene                                | -  | Elmore <i>et al.</i> , 1985; Umeda <i>et al.</i> , 1985; 青儀ら, 1985; Iwase <i>et al.</i> , unpublished |

Table 4. (continued)

| 物質                           | 結果 | 文献   |
|------------------------------|----|--|
| Benzoin                      | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
|                              | ±  | Elmore <i>et al.</i> , 1985  |
|                              | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1985   |
| Benzoyl chloride             | -  | 青儀ら, 1985  |
| Benzoyl peroxide             | +  | Iwase <i>et al.</i> , 1991; Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                   |
|                              | -  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988   |
| 1,4-Benzoquinone             | +  | Malcolm <i>et al.</i> , 1985   |
| Benzyl acetate               | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Benzyl alcohol               | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| α-BHC                        | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982  |
| β-BHC                        | -  | Kurata <i>et al.</i> , 1982  |
| γ-BHC (Lindane)              | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982; Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                  |
| Bisphenol A                  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| BR-931                       | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
| 8-Br-cAMP                    | -  | 野田, 1984   |
| Bromopropylate               | +  | Wamgard <i>et al.</i> , 1985   |
| n-Butyl acetate              | ±  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| n-Butyl alcohol              | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| iso-Butyl alcohol            | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| BHA                          | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988; Iwase <i>et al.</i> , 1991                                   |
| BHT                          | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988; Malcolm <i>et al.</i> , 1983; Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
|                              | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1991   |
| Butyl benzyl phthalate       | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| n-Butyl chloride             | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| t-Butyl hydroperoxide        | -  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988   |
| Caffeine                     | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980; Toraason <i>et al.</i> , 1992; Iwase <i>et al.</i> , 1991      |
| Calcium chloride             | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Caprolactam                  | -  | Elmore <i>et al.</i> , 1985; Iwase <i>et al.</i> , unpublished; Umeda <i>et al.</i> , 1985 |
| Carbon tetrachloride         | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Catechol                     | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988; Malcolm <i>et al.</i> , 1983, 1985                           |
|                              | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1991   |
| Chaetoglobosin A             | +  | Umeda <i>et al.</i> , 1980   |
| Chenodeoxycholic acid        | +  | Noda <i>et al.</i> , 1981  |
| Chlorambucil                 | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992  |
| Chlordane                    | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
| Chlorendic acid              | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1992   |
| Chlorobenzene                | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Chlorobenzilate              | +  | Wamgard <i>et al.</i> , 1985   |
| Chlorodibromomethane         | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| 2-Chloroethanol              | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Chloropropylate              | +  | Wamgard <i>et al.</i> , 1985   |
| Chlorothalonil               | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| 4-Chloro-o-toluidine HCl     | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Chlorpheniramine melete      | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Cholestane-3 β,5 α,6 β-triol | +  | Chang <i>et al.</i> , 1988   |
| Cholesterol                  | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b; 野田, 1984   |
| Cholesterol-5 α,6 α-epoxide  | +  | Chang <i>et al.</i> , 1988   |

Table 4. (continued)

| 物質  | 結果 | 文献  |
|---|----|---|
| Cholesterol-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxide | +  | Chang <i>et al.</i> , 1988  |
| Cholic acid                               | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981   |
| Choline chloride                          | -  | Binder <i>et al.</i> , 1987   |
| C.I. Acid orange 10                       | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| C.I. Acid red 14                          | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| C.I. Acid yellow 73                       | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Cigarette smoke condensate                | +  | Hartman and Rosen, 1983   |
| Cinnamyl anthranilate                     | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1992  |
| Citrinin                                  | -  | 野田, 1984  |
| Clofibrate                                | +  | Iwase <i>et al.</i> , 1991  |
| 1% CMC solution                           | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Colcemid                                  | -  | 野田, 1984  |
| Concanavalin A                            | +  | Umeda <i>et al.</i> , 1980  |
| Coumarin                                  | ±  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| <i>o</i> -Cresol                          | -  | 野田, 1984  |
| <i>m</i> -Cresol                          | -  | 野田, 1984; Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| <i>p</i> -Cresol                          | -  | 野田, 1984  |
| Cyclophosphamide                          | +  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| Cytochalasin B                            | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b  |
| Cytochalasin D                            | ±  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
|   | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b  |
| Danthron                                  | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980  |
| DDE                                       | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982   |
| DDT                                       | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982; Trosko <i>et al.</i> , 1982b;<br>Wamgard <i>et al.</i> , 1985                                    |
| <i>o,p'</i> -DDT                          | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982   |
| Debromoaplysiatoxin                       | +  | Jone <i>et al.</i> , 1987   |
| Di(2-ethylhexyl)phthalate                 | +  | Elmore <i>et al.</i> , 1985; Iwase <i>et al.</i> , 1991;<br>Malcolm <i>et al.</i> , 1983, 1989;<br>Umeda <i>et al.</i> , 1985 |
|   | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981   |
| Dehydrocholic acid                        | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981   |
| Deoxycholic acid                          | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b  |
|   | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981; Iwase <i>et al.</i> , 1991; Umeda <i>et al.</i> ,<br>1980  |
| Dexamethasone                             | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| Diallyl phthalate                         | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Diaminopropane                            | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| 2,4-Diaminotoluene                        | +  | Mills <i>et al.</i> , 1991  |
| Diazepam (Valium)                         | +  | Trosko and Horrobin, 1980   |
|   | ±  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| Dibutyl cAMP                              | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b  |
| 1,2-Dichlorobenzene                       | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| 1,4-Dichlorobenzene                       | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| 2,4-Dichlorophenol                        | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid            | +  | Rubinstein <i>et al.</i> , 1984   |
| Dicofol                                   | +  | Wamgard <i>et al.</i> , 1985  |
| Dieldrin                                  | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1989; Kurata <i>et al.</i> , 1982   |
| Di(2-ethylhexyl)adipate                   | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |

Table 4. (continued)

| 物質                                  | 結果 | 文献   |
|-------------------------------------|----|--|
| Diethylstilboestrol                 | ±  | Barrett <i>et al.</i> , 1983   |
|                                     | -  | Elmore <i>et al.</i> , 1985; Kinsella, 1982; Toraason<br><i>et al.</i> , 1992; Umeda <i>et al.</i> , 1985; 岩瀬ら, 1991 |
| N,N'-Diethylthiourea                | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| 1,3-Dilinolein                      | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986   |
| 3,4-Dimethoxybenzoic acid           | -  | 青儀ら, 1985  |
| N,N'-Dimethylaniline                | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene      | -  | Newbold and Amos, 1981; Noda <i>et al.</i> , 1981  |
| Dimethylformamide                   | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| Dimethyl methylphosphate            | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Dimethyl morpholinophosphoramidate  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Dimethyl terephthalate              | ±  | 青儀ら, 1985  |
|                                     | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| 2,4-Dinitrofluorobenzene            | +  | Warren <i>et al.</i> , 1982  |
|                                     | -  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988   |
| <i>p</i> -Dinitrophenol             | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| 2,4-Dinitrophenol                   | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| 1,2-Diolein                         | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986   |
| 1,3-Diolein                         | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986   |
| P-Dioxane                           | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| Diphenylhydantoin (Dilantin)        | +  | Jone <i>et al.</i> , 1985; Welsch and Stedman, 1984  |
|                                     | ±  | Toraason <i>et al.</i> , 1992  |
| Diphenylhydramine                   | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992  |
| Disodium EDTA                       | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980   |
| Dispase                             | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980   |
| 1,3-Distearin                       | -  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986   |
| DMSO                                | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
|                                     | ±  | Malcolm <i>et al.</i> , 1985   |
|                                     | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b; Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| <i>n</i> -Dodecane                  | -  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988   |
| Doxylamine succinate                | ±  | Toraason <i>et al.</i> , 1992  |
| EGF                                 | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b; 野田, 1984   |
| Elastinal                           | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980   |
| EM-12                               | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992  |
| Endrin                              | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982  |
| Erythromycin stearate               | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Estradiol                           | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1992; Umeda <i>et al.</i> , 1980   |
| Ethinylestradiol                    | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b; Iwase <i>et al.</i> , 1991   |
| D,L-Ethionine                       | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| 2-Ethoxyethanol                     | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| Ethoxylated dodecyl alcohol         | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Ethyl acetate                       | ±  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| Ethyl acrylate                      | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Ethyl alcohol                       | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
|                                     | ±  | Malcolm <i>et al.</i> , 1985   |
|                                     | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished; Trosko <i>et al.</i> , 1982b  |
| Ethylene glycol                     | +  | Caruso <i>et al.</i> , 1984; Chen <i>et al.</i> , 1984;  |
| Ethylene glycol monobutyl ether     | +  | Caruso <i>et al.</i> , 1984; Welsch and Stedman, 1984  |
| Ethylene glycol monoethyl ether     | +  | Caruso <i>et al.</i> , 1984; Welsch and Stedman, 1984  |
| Ethylene glycol monoisopropyl ether | +  | Welsch and Stedman, 1984   |
| Ethylene glycol monomethyl ether    | +  | Caruso <i>et al.</i> , 1984; Welsch and Stedman, 1984  |

Table 4. (continued)

| 物質   | 結果 | 文献   |
|--|----|--|
| Ethylene glycol monopropyl ether                     | +  | Caruso <i>et al.</i> , 1984; Welsch and Stedman, 1984            |
| Ethylene thiourea                                    | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished; Toraason <i>et al.</i> , 1992 |
| Ethyl methanesulfonate                               | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                |
| Ethyl phenyl propiolate                              | +  | Bohman <i>et al.</i> , 1988                                      |
| Eugenol  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                |
| FD&C Yellow No.6                                     | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                |
| Fenarimol  | ±  | Wamgard <i>et al.</i> , 1985                                     |
| Ferric nitrilotriacetate                             | +  | Nakatsuka <i>et al.</i> , 1990                                   |
| Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O | -  | Nakatsuka <i>et al.</i> , 1990                                   |
| FGF  | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                     |
| 5-Fluorouracil                                       | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992                                    |
| Formaldehyde   | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992; Trosko <i>et al.</i> , 1982b      |
| Furosemide   | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1992                                       |
| Fusarenon X  | -  | 野田, 1984   |
| Geranyl acetate                                      | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                |
| Glycecrin  | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| Gossypol   | +  | Ye <i>et al.</i> , 1990  |
| Griseofulvin   | -  | Kinsella, 1982   |
| δ-Haemolysin   | -  | Kinsella, 1982   |
| Heptachlor   | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982                                      |
| Heptachlor epoxide                                   | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                     |
| Hexylmethylphosphoramidate                           | -  | Elmore <i>et al.</i> , 1985; Umeda <i>et al.</i> , 1985          |
| 4-Hexylresorcinol                                    | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                |
| Hydrochlorothiazide                                  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                |
| Hydrocortisone                                       | -  | 野田, 1984   |
| Hydrogen peroxide                                    | -  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988; Iwase <i>et al.</i> , 1991         |
| Hydrolyzed teleocidin                                | +  | Jone <i>et al.</i> , 1982  |
| Hydroquinone (Quinol)                                | +  | Malcolm <i>et al.</i> , 1983, 1985; Trosko <i>et al.</i> , 1982b |
| 3-Hydroxyanthranilic acid                            | +  | Umeda <i>et al.</i> , 1980                                       |
| p-Hydroxybenzoic acid                                | -  | 青儀ら, 1985  |
| Hydroxykynurenine                                    | +  | 野田, 1984   |
| Hydroxyquinol  | +  | Malcolm <i>et al.</i> , 1983, 1985                               |
| 8-Hydroxyquinoline                                   | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                |
| Hydroxyurea  | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992                                    |
| Insulin  | -  | 野田, 1984   |
| Iodoacetic acid                                      | -  | Kinsella, 1982   |
| Isoniazid  | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992                                    |
| Isophorone   | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                |
| Kaempferol   | -  | 野田, 1984   |
| Kepone (Chlordecone)                                 | +  | Tsushimoto <i>et al.</i> , 1982a                                 |
| D,L-Kynurenin  | ±  | 野田, 1984   |
| Kynurenic acid                                       | -  | 野田, 1984   |
| Lead acetate   | +  | Trosko and Chang, 1988   |
| D-Limonene   | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1992                                       |
| Linoleic acid  | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986                                   |
| cis-Linoleic acid                                    | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986                                   |
| trans-Linoleic acid                                  | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986                                   |
| Linolenic acid                                       | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986                                   |
| γ-Linolenic acid                                     | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986                                   |

Table 4. (continued)

| 物質  | 結果 | 文献   |
|---|----|--|
| Lithocholic acid                          | +  | Iwase <i>et al.</i> , 1991; Trosko <i>et al.</i> , 1982b; Umeda <i>et al.</i> , 1980             |
| Luteoskyrin                               | -  | 野田, 1984   |
| Mannitol                                  | +  | Binder and Volpenhein, 1987  |
| Melamine                                  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Melittin                                  | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
| D,L-Menthol                               | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Meprobamate                               | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992  |
| Mercaptobenzothiazole                     | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Mercaptoethanol                           | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| Mestranol                                 | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
| Methanol                                  | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| Methotrexate                              | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992  |
| Methoxychlor                              | +  | Iwase <i>et al.</i> , 1991; Kurata <i>et al.</i> , 1982  |
| Methoxyphenol                             | -  | Malcolm <i>et al.</i> , 1985   |
| α-Methylbenzyl alcohol                    | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Methyl carbamate                          | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1992   |
| Methyl clofenopate                        | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
| Methyl DOPA sesquihydrate                 | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Methyl ethyl ketone                       | ±  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| Methyl mercury chloride                   | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992  |
| Methyl methacrylate                       | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine      | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished; Noda <i>et al.</i> , 1981                                     |
| 2-Methyl-2,4-pentanediol                  | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984  |
| 9-Methylpteroylglutamic acid              | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
| 4-O-Methyl TPA                            | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988   |
| Mezerein                                  | ±  | Yotti <i>et al.</i> , 1979   |
| Mirex                                     | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988; Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                       |
| Monochlorinated biphenyl 4-chlorobiphenyl | +  | Toraason <i>et al.</i> , 1992; Tsushimoto <i>et al.</i> , 1982a                                  |
| Monuron                                   | +  | Malcolm <i>et al.</i> , 1983   |
| Mycophenolic acid                         | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Myristoleic acid                          | -  | 野田, 1984   |
| Myristic acid                             | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986   |
| Nafenopin                                 | -  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986   |
| Nalidixic acid                            | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
| Nitrolic acid                             | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Nitrilotriacetic acid (trisodium salt)    | +  | Malcolm <i>et al.</i> , 1983   |
| Nitrilotriacetic acid                     | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished; Nakatsuka <i>et al.</i> , 1990; Toraason <i>et al.</i> , 1992 |
| 4-Nitroquinoline 1-oxide                  | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981  |
| N-Nitrosodiphenylamine                    | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Norethynodrel                             | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b   |
| Ochratoxin                                | -  | 野田, 1984   |
| Okadaic acid                              | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished  |
| Oleic acid                                | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982a   |
| cis-Oleic acid                            | -  | Kinsella, 1982   |
| trans-Oleic acid                          | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986   |
| 1-Oleoyl-2-acetylglycerol                 | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986   |

Table 4. (continued)

| 物質                                     | 結果 | 文献  |
|--|----|---|
| Oxytetracycline HCl                    | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Palmitic acid                          | -  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986  |
| Palmitoleic acid                       | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986  |
| <i>cis</i> -Palmitoleic acid           | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986  |
| <i>trans</i> -Palmitoleic acid         | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986  |
| Palytoxin                              | -  | Jone <i>et al.</i> , 1987   |
| Patuline                               | -  | 野田, 1984  |
| Penicillic acid                        | -  | 野田, 1984  |
| Penicillin G                           | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| Pentachloroethane                      | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Pepstatin                              | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980  |
| Phenobarbital                          | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988; Iwase <i>et al.</i> , 1991;<br>Jone <i>et al.</i> , 1985; Trosko <i>et al.</i> , 1982b      |
|  | ±  | Elmore <i>et al.</i> , 1985   |
|  | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980, 1985  |
| Phenol                                 | ±  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988  |
|  | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984; Iwase <i>et al.</i> ,<br>unpublished; Malcolm <i>et al.</i> , 1983, 1985;<br>野田, 1984          |
| L-Phenylalanine                        | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| 1-Phenyldodecane                       | -  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988  |
| Phenylephrine HCl                      | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Phenyl glucuronide                     | -  | Malcolm <i>et al.</i> , 1985  |
| Phenyl hydroquinone                    | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981   |
| N-Phenyl-2-naphthylamine               | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| <i>o</i> -Phenylphenol                 | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981   |
| Phorbol                                | -  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988; Yotti <i>et al.</i> , 1979  |
| Phorbol-12,13-diacetate                | -  | Yotti <i>et al.</i> , 1979  |
| Phorbol-12,13-dibutyrate               | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988; Malcolm <i>et al.</i> , 1985;<br>Yotti <i>et al.</i> , 1979                                 |
| Phorbol-12,13-didecanoate              | +  | Yotti <i>et al.</i> , 1979  |
| 4- $\alpha$ -Phorbol-12,13-didecanoate | -  | Yotti <i>et al.</i> , 1979  |
| Phthalimide                            | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| Phytohemagglutinin-P                   | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981   |
| Polybrominated biphenyl (PBB)          | +  | Iwase <i>et al.</i> , 1991; Trosko <i>et al.</i> , 1981;<br>Tsushimoto <i>et al.</i> , 1982b; Welsch and Stedman,<br>1984 |
| Polyethylene glycol 400                | ±  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Polymixin B                            | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1980  |
| Potassium chloride                     | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Potassium phenyl sulfate               | ±  | Malcolm <i>et al.</i> , 1985  |
| Procarbazine (7 $\beta$ -体)            | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992   |
| <i>n</i> -Propyl alcohol               | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| iso-Propyl alcohol                     | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Propyl ether                           | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Propylene glycol                       | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Propylene oxide                        | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Pyridine                               | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Propyl gallate                         | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished   |
| Putrescine                             | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981   |
| Pyrogallol                             | ±  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988  |

Table 4. (continued)

| 物質   | 結果 | 文献   |
|--|----|--|
| Quercetin  | ±  | 野田, 1984   |
| Reserpine  | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1992                                   |
| Retinoic acid  | +  | Toraason <i>et al.</i> , 1992                                |
|  | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                 |
| 13- <i>cis</i> -Retinoic acid                            | +  | Shuin <i>et al.</i> , 1983; Toraason <i>et al.</i> , 1992    |
| Rotenone   | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Roxarsone  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Rugulosin  | -  | 野田, 1984   |
| Saccharin  | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1980; Binder and Volpenhein, 1987     |
|  | ±  | Umeda <i>et al.</i> , 1980; Bohrman <i>et al.</i> , 1988     |
|  | -  | Welsch and Stedman, 1984; Iwase <i>et al.</i> , 1991         |
| Saccharin (impure)                                       | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1980                                  |
| Safrole  | ±  | Elmore <i>et al.</i> , 1985; Umeda <i>et al.</i> , 1985      |
| Simfibrate   | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Sodium arsenate  | +  | Toraason <i>et al.</i> , 1992                                |
| Sodium chloride  | -  | Binder and Volpenhein, 1987; Iwase <i>et al.</i> , 1991      |
| Sodium cyclamate   | +  | Malcolm <i>et al.</i> , 1983                                 |
|  | ±  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988                                 |
| Sodium glucuronate                                       | -  | Binder and Volpenhein, 1987                                  |
| Stannous chloride  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Stearic acid   | -  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1986                               |
| Sterigmatocystin   | -  | 野田, 1984   |
| Stilboestrol dipropionate                                | -  | Kinsella, 1982   |
| Spermidine   | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981                                    |
| Spermine   | -  | Noda <i>et al.</i> , 1981                                    |
| Succinic acid 2,2-dimethylhydrazine                      | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Sucrose  | +  | Binder and Volpenhein, 1987; Bohrman <i>et al.</i> ,<br>1988 |
|  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Sulfisoxazole  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| 4,4'-Sulfonyldianiline (Dapsone)                         | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Sweet'N Low  | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1980                                  |
| T2-Toxin   | +  | Jone <i>et al.</i> , 1987                                    |
| Triiodothyronine   | -  | 野田, 1984   |
| Tannic acid  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Taurodeoxycholic acid                                    | -  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                 |
| TDE  | +  | Kurata <i>et al.</i> , 1982                                  |
| Teleocidin   | +  | Jone <i>et al.</i> , 1982                                    |
| Teleocidin B   | +  | Jone <i>et al.</i> , 1982                                    |
| Testosterone   | ±  | 野田, 1984   |
|  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Testosterone propionate                                  | ±  | Toraason <i>et al.</i> , 1992                                |
| 1,1,1,2-Tetrachloroethane                                | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Tetrachloroethylene                                      | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Tetracycline HCl   | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Tetrahydrofuran  | +  | Chen <i>et al.</i> , 1984                                    |
| Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium<br>Cl/SO <sub>4</sub> | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                            |
| Thalidomide  | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992; Trosko <i>et al.</i> , 1982b  |
| Thioacetamide  | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1992                                   |
| Thiobenzamide  | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1991                                   |

Table 4. (continued)

| 物質                                | 結果 | 文献  |
|-----------------------------------|----|---|
| Thiourea                          | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| Titanium dioxide                  | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| Toluene                           | -  | 青儀ら, 1985   |
| 2,6-Toluenediamine 2HCl           | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| 2,5-Toluenediamine sulfate        | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| o-Toluidine                       | +  | Elmore <i>et al.</i> , 1985                                       |
|                                   | ±  | 青儀ら, 1985   |
|                                   | -  | Umeda <i>et al.</i> , 1985  |
| Toxaphene                         | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1987                                       |
| TPA                               | +  | Yotti <i>et al.</i> , 1979; Trosko <i>et al.</i> , 1980他          |
| Trichloroethylene                 | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid | +  | Rubinstein <i>et al.</i> , 1984;<br>Toraason <i>et al.</i> , 1992 |
| Triethylamine                     | -  | Chen <i>et al.</i> , 1984   |
| Trimethylthiourea                 | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| Tris(2-chloroethyl)phosphate      | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| Tris(2-ethylhexyl)phosphate       | +  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| Triton-X                          | -  | 野田, 1984  |
| Trp-P-1                           | -  | 野田, 1984  |
| D(+)-Tryptophan                   | +  | Bohrman <i>et al.</i> , 1988                                      |
| Tween 60                          | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                      |
|                                   | -  | Iwase <i>et al.</i> , 1991  |
| Tween 80                          | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                      |
| Undecanoic acid                   | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1987                                    |
| Undecylenic acid                  | +  | Aylsworth <i>et al.</i> , 1987                                    |
| Urea                              | +  | Umeda <i>et al.</i> , 1980  |
|                                   | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| Urethane                          | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992; Iwase <i>et al.</i> , 1992         |
| Ursodeoxycholic acid              | +  | Noda <i>et al.</i> , 1981   |
| Vincristine sulphate              | -  | Toraason <i>et al.</i> , 1992                                     |
| Vomitoxin                         | +  | Jone <i>et al.</i> , 1987   |
| Warfarin                          | +  | Welsch and Stedman, 1984  |
| Wy-14,643                         | +  | Trosko <i>et al.</i> , 1982b                                      |
| Xanthurenic acid                  | -  | 野田, 1984  |
| o-Xylene                          | -  | 青儀ら, 1985   |
| Xylenes (mixture)                 | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |
| α-Zearalenol                      | -  | 野田, 1984  |
| Zearalenone                       | -  | Iwase <i>et al.</i> , unpublished                                 |

Phenobarbital, o-phenylphenol, saccharin, 胆汁酸類は、ナトリウム塩を含む。±は、あいまいな結果であることを示す。

する細胞へ拡散するのを調べる。色素移行法は、樹立細胞系だけでなく、種々の初代培養細胞にも適用でき、短時間で結果が得られるなど、有望な方法であるが、スクリーニング法としてはまだ十分に確立されていない。一方、代謝協同法は、実験設備・技術の点から簡便で容易な方法として用いられており、特に、チャイニーズハムスター V79 細胞を用いたデータが多い。

## 2) チャイニーズハムスター V79 細胞を用いる代謝協同阻害試験

ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) 活性をもった野生型 (HGPRT<sup>+</sup>) の V79 細胞と HGPRT 活性を欠いた変異株 (HGPRT<sup>-</sup>) を用いて行う (Yotti *et al.*, 1979)。6-チオグアニン (6TG) を含む培地で両方の細胞を混合培養した場合、両細胞間に細胞間連絡があると、HGPRT<sup>+</sup> 細胞で産生された有毒な 6-チオグアニンモノホスフェートが HGPRT<sup>-</sup>

細胞にも移行し、両方の細胞が死に至るが、培地中の発癌プロモーターで細胞間連絡が阻害されると、HGPRT<sup>-</sup> 細胞は生存することができ、コロニーを形成する。

実際の試験では、少数の HGPRT<sup>-</sup> 細胞を多数の HGPRT<sup>+</sup> 細胞とともに播種し (Jone *et al.*, 1985)、播種 4 時間後被験物質と 6TG を加えて 3 日間培養する。6TG のみを含む培地にかえてさらに 4 日間培養して、生じたコロニーを計数する。阻害作用の大きさをコロニー増加率で表す。血清ロットによる影響はほとんどなく、コロニーの計数は容易である。

ホルボールエステル類では、マウス皮膚での発癌プロモーション作用の強さとの間により相関があることが知られている (Yotti *et al.*, 1979)。岩瀬ら (未発表) は、最近フタル酸エステル類縁物質について試験し、癌原性との間により相関があることを明らかにしている。

この方法で陽性を示す物質は、3 つに大別することができるといわれている (Barrett *et al.*, 1986)。1 つは、TPA のように ng/ml レベルで作用し、受容体の介在が示唆されるもの、2 つ目は DDT のように μg/ml レベルで作用する脂溶性物質、3 つ目は mg/ml レベルで作用するその他の物質である。この濃度レベルは、*in vivo* での腫瘍プロモーション作用の強さと相関性があると考えられている。すなわち、TPA は、強力なマウス皮膚発癌プロモーターであり、DDT は、より高い濃度で作用のあるラット肝発癌プロモーターである。

約 400 の物質について代謝協同阻害試験の結果が報告されているので、Table 4 にまとめた。

## 4. 発癌プロモーター *in vivo* 試験との相関について

*In vivo* での発癌プロモーション作用がはっき

Table 5. *In vivo* 試験での発癌プロモーション作用との相関

| 物質                        | トランスフォーメーション |           |        | 代謝協同 |     | <i>In vivo</i> |     |
|---------------------------|--------------|-----------|--------|------|-----|----------------|-----|
|                           | フォーカス法       |           |        | 軟寒天法 |     | マウス            | ラット |
|                           | BALB3T3      | C3H10T1/2 | Bhas42 | JB6  | V79 |                |     |
| TPA                       | +            | +         | +      | +    | +   | 皮膚             |     |
| Phorbol-12,13-didecanoate | +            |           |        |      | +   | 皮膚             |     |
| Phorbol-12,13-dibenzoate  |              |           |        | +    |     | 皮膚             |     |
| Teleocidin                |              |           |        | +    | +   | 皮膚             |     |
| Mezerein                  | +            |           | +      | +    | +   | 皮膚             |     |
| Okadaic acid              | +            |           |        | ±    | -   | 皮膚             |     |
| Dinophysistoxin-1         | +            |           |        | ±    |     | 皮膚             |     |
| Anthralin                 | +            |           | +      |      | +/- | 皮膚             |     |
| Benzoyl peroxide          |              |           |        | +    | +/- | 皮膚             |     |
| Phenobarbital             | +            |           | +      |      | +/- |                | 肝   |
| DDT                       | +            |           | +      |      | +   |                | 肝   |
| Dexamethasone             |              | +         |        |      | -   |                | 肝   |
| Mestranol                 |              |           |        | -    | +   |                | 肝   |
| Diethylstilbestrol        |              | +         |        |      | -   | ちつ             |     |
| Saccharin                 | -            | +         | -      | -    | +/- |                | 膀胱  |
| Catechol                  | +            |           |        |      | +/- |                | 前胃  |
| Chenodeoxycholate         |              | +         |        | -    | +   |                | 結腸  |
| Lithocholate              | +            | +         |        |      | +   |                | 結腸  |
| Taurocholate              | +            |           | +      |      |     |                | 結腸  |
| BHA                       | +            |           |        | -    | +   | Modifier       |     |
| BHT                       | +            | +         |        |      | +   | Modifier       |     |

±は、あいまいな結果であることを示す。+/-は、+の報告と-の報告があることを示す。

Table 6. Ames 試験陰性の癌原性物質についての試験結果

| 物質                          | トランスフォーメーション |           |        |      | 代謝協同 |
|-----------------------------|--------------|-----------|--------|------|------|
|                             | フォーカス法       |           |        | 軟寒天法 |      |
|                             | BALB3T3      | C3H10T1/2 | Bhas42 | JB6  |      |
| Aldrin                      |              |           |        |      | +    |
| BHA                         | +            |           |        | -    | +    |
| Cyclamate                   |              |           |        | -    | +    |
| Di(2-ethylhexyl)phthalate   |              |           |        | +    | +    |
| Diethylstilbestrol          |              | +         |        |      | -    |
| 17-β-Estradiol              | -            | +         |        |      | -    |
| Polybrominated biphenyl     |              |           |        |      | +    |
| Phenobarbital               | +            |           | +      |      | +/-  |
| Saccharin                   | -            | +         | -      | -    | +/-  |
| Tetrachlorodibenzo-p-dioxin |              | +         |        |      |      |

+/-は、+の報告と-の報告があることを示す。

りしている物質について、*in vitro* 試験の結果をまとめて表にした (Table 5)。ただし、BHA と BHT は、発癌を修飾する物質である。フォーカス法では、サッカリンを除いて報告のあるものはすべて+である。JB6 細胞は、マウス皮膚の発癌プロモーターをよく検出するが、皮膚以外の臓器の発癌プロモーターについては、今後の実験結果が待たれる。代謝協同阻害試験では、+の報告があるものが多いが、全体的にいくらか-が混じっている。18 物質のうち+が 10, +/- が 5, - が 3 である。

*In vitro* 試験の評価を行うには、この表の物質だけではあまりにも数がすくないが、先に述べた文献調査全体の結果とも合わせて考えると、発癌プロモーターに対する感受性は、フォーカス法が最も高いようである。JB6 細胞は、活性酸素の産生が予想される物質の試験に適しているように見える。代謝協同阻害試験の感受性は、若干下がるかも知れないが、結果が報告されている物質が多いことや、試験法の簡便さに魅力がある。

### 5. Ames 試験陰性の癌原生物質についての発癌プロモーター *in vitro* 試験

Ames 試験陰性の癌原性物質について、発癌プロモーター *in vitro* 試験の結果をまとめた (Table 6)。この表では、他の物質と組み合わせないでも、単独で実験動物に癌を起こす物質を取り上げた。

物質の数が少ないので多くを語ることはできないが、発癌プロモーター *in vitro* 試験で陽性となる割合は約 60% である。Ames 試験陰性の癌原性物質には発癌プロモーション作用を主体とする物質がかなりあることが窺える。発癌プロモーター *in vitro* 試験を行えば、Ames 試験陰性の癌原性物質をかなりの程度検出することが可能であろう。

### 6. おわりに

本稿で紹介した発癌プロモーター *in vitro* 試験は、癌原性物質の作用機序や発癌機構の解明に広く利用されているが、環境化学物質の安全性評価や癌原性予測のための試験法としては、変異原性試験ほど普及していない。このことは、発癌プロモーター *in vitro* 試験がバクテリアを用いる変異原性試験ほど簡便ではないという手法上の問題のほか、安全性評価における発癌プロモーターの位置づけとも関係しているように思える。

シンポジウムでは、スライドを用いるという制約があって行えなかったが、本稿では、Table 1, 3, 4 は、各試験法のデータベースとして原報にも到達できるように作成した。もし、お役に立てば幸いです。各試験の詳細な実験法は、よい解説書があるのでそちらを参考にさせていただきたい (日本組織培養学会, 1991)。

### 謝辞

今回の発表にあたって御尽力いただいた三菱化成 (株) 吉川邦衛博士に深く感謝いたします。

### 参考文献

- Aaronson, S. A. and G. J. Todaro (1968) Development of 3T3-like lines from Balb/c mouse embryo cultures. Transformation susceptibility to SV-40, *J. Cell. Physiol.*, **72**, 141-148.
- Abernethy, D. J., W. F. Greenlee, J. C. Huband and C. J. Boreiko (1985) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) promotes the transformation of C3H/10T1/2 cells, *Carcinogenesis*, **6**, 651-653.
- Abernethy, D. J. and C. J. Boreiko (1987) Promotion of C3H/10T1/2 morphological transformation by polychlorinated dibenzo-p-dioxin isomers, *Carcinogenesis*, **8**, 1485-1490.
- 青儀 巧, 伊藤俊明, 津志本元 (1985) ベンゼン類の metabolic cooperation に対する効果日本環境変異原学会第 14 回大会抄録集, p. 138.
- Atchison, M., C.-S. Chu, T. Kakunaga and B. L. Van Duuren (1982) Chemical cocarcinogenesis with the use of a subclone derived from Balb/3T3 cells with catechol as cocarcinogen, *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**, 503-508.
- Aylsworth, C. F., J. E. Trosko and C. W. Welsch (1986) Influence of lipids on gap-junction-mediated intercellular communication between Chinese hamster cells *in vitro*, *Cancer Res.*, **46**, 4527-4533.
- Aylsworth, C. F., C. W. Welsch, J. J. Kabara and J. E. Trosko (1987) Effects of fatty acids on gap junctional communication: possible role in tumor promotion by dietary fat, *Lipids*, **22**, 445-454.
- Aylsworth, C. F., J. E. Trosko, C. C. Chang, K. Benjamin and E. Lockwood (1989) Synergistic inhibition of metabolic cooperation by oleic acid or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and dichlorodiphenyltrichlorethane (DDT) in Chinese hamster V79 cells: implication of a role for protein kinase C in the regulation of gap junctional intercellular communication, *Cell Biology and Toxicology*, **5**, 27-37.
- Barrett, J. C., J. A. McLachlan and E. Elmore (1983) Inability of diethylstilbestrol to induce 6-thioguanine-resistant mutants and to inhibit metabolic cooperation of V79 Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, **107**, 427-432.
- Barrett, J. C., T. Kakunaga, T. Kuroki, D. Neubert, J. E. Trosko, J. M. Vasiliev, G. M. Williams and H. Yamasaki (1986) In-vitro assays that may be predictive of tumour-promoting agents, In: R. Montesano, H. Bartsch, H. Vainio, J. Wilbourn and H. Yamasaki (Eds.), *Long-term and Short-term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal*, IARC, Lyon, pp. 287-302.
- Binder, R. L. and M. E. Volpenhein (1987) An evaluation of the effects of culture medium osmolality and pH on metabolic cooperation between Chinese hamster V79 cells, *Carcinogenesis*, **8**, 1257-1261.
- Bohrman, J. S., J. R. Burg, E. Elmore, D. K. Gulati, T. R. Barfknecht, R. W. Niemeier, B. L. Dames, M. Toraason and R. Langenbach (1988) Interlaboratory studies with the Chinese hamster V79 cell metabolic cooperation assay to detect tumor-promoting agents, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **12**, 33-51.
- Boreiko, C. J., D. J. Abernethy, J. H. Sanchez and B. H. Dorman (1986) Effect of mouse skin tumor promoters upon [<sup>3</sup>H]uridine exchange and focus formation in cultures of C3H/10T1/2 mouse fibroblasts, *Carcinogenesis*, **7**, 1095-1099.
- Boutin, B. K., J. T. Peeler and R. M. Twedt (1989) Effects of purified aflatoxins I, II, and III in the metabolic communication V79 system, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **26**, 75-81.
- Caruso, R. L., J. E. Trosko and I. A. Corcos (1984) Interruption of cell-cell communication in Chinese hamster V79 cells by various alkyl glycol ethers: implications for teratogenicity, *Environmental Health Perspectives*, **57**, 119-123.
- Chang, C. C., C. Jone, J. E. Trosko, A. R. Peterson and A. Sevanian (1988) Effect of cholesterol epoxides on the inhibition of intercellular communication and on mutation induction in Chinese hamster V79 cells, *Mutation Res.*, **206**, 471-478.
- Chan, G. L. and J. B. Little (1982) Dissociated occurrence of single-gene mutation and oncogenic transformation in C3H 10T1/2 cells exposed to ultraviolet light and caffeine, *J. Cell. Physiol.*, **111**, 309-314.
- Chen, T. H., T. J. Kavanagh, C. C. Chang and J. E. Trosko (1984) Inhibition of metabolic cooperation in Chinese hamster V79 cells by various organic solvents and simple compounds, *Cell Biology and Toxicology*, **1**, 155-171.
- Colburn, N. H., W. F. Vorder Bruegge, J. R. Bates, R. H. Gray, J. D. Rossen, W. H. Kelsey and T. Shimada (1978) Correlation of anchorage-independent growth with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cells, *Cancer Res.*, **38**, 624-634.
- Colburn, N. H., B. F. Former, K. A. Nelson and

- S. H. Yuspa (1979) Tumour promoter induces anchorage independence irreversibly, *Nature*, **281**, 589-591.
- Colburn, N. H., B. M. Smith, E. J. Wendel, Y. Nakamura and D. Winterstein (1988) Comparison of mouse pro-1 and pro-2 transfectants for response to tumor promoters and antipromoters, *Cancer Res.*, **48**, 6076-6080.
- Diwan, B. A., J. M. Ward, J. M. Rice, N. H. Colburn and E. F. Spangler (1985) Tumor-promoting effects of di(2-ethylhexyl)phthalate in JB6 mouse epidermal cells and mouse skin, *Carcinogenesis*, **6**, 343-347.
- Djurhuus, R. and J. R. Lillehaug (1982) Butylated hydroxytoluene: Tumor-promoting activity in an in vitro two-stage carcinogenesis assay, *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, **29**, 115-120.
- Elmore, E., E. A. Korytynski and M. P. Smith (1985) Tests with the Chinese hamster V79 inhibition of metabolic cooperation assay, In: J. Ashby, F. J. de Serres et al. (Eds.) *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 597-612.
- Enomoto, T. and H. Yamasaki (1985) Phorbol ester-mediated inhibition of intercellular communication in BALB/c 3T3 cells: relationship to enhancement of cell transformation, *Cancer Res.*, **45**, 2681-2688.
- Fisher, P. B., R. A. Mufson, I. B. Weinstein and J. B. Little (1981) Epidermal growth factor, like tumor promoters, enhances viral and radiation-induced cell transformation, *Carcinogenesis*, **2**, 183-187.
- Frazelle, J. H., D. J. Abernethy and C. J. Boreiko (1983) Weak Promotion of C3H/10T1/2 cell transformation by repeated treatments with formaldehyde, *Cancer Res.*, **43**, 3236-3239.
- Frazelle, J. H., D. J. Abernethy and C. J. Boreiko (1984) Enhanced Sensitivity of the C3H/10T1/2 cell transformation system to alkylating and chemotherapeutic agents by treatment with 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Environmental Mutagenesis*, **6**, 81-89.
- Frixen, U. and H. Yamasaki (1987) Enhancement of transformation and continuous inhibition of intercellular communication by 1-oleoyl-2-acetyl glycerol in BALB/c 3T3 cells, *Carcinogenesis*, **8**, 1101-1104.
- Gindhart, T. D., L. Srinivas and N. H. Colburn (1985a) Benzoyl peroxide promotion of transformation of JB6 mouse epidermal cells: inhibition by ganglioside G<sub>T</sub> but not retinoic acid, *Carcinogenesis*, **6**, 309-311.
- Gindhart, T. D., Y. Nakamura, L. A. Stevens, G. A. Hegameyer, M. W. West, B. M. Smith and N. H. Colburn (1985b) Genes and signal transduction in tumor promotion: conclusions from studies with promoter resistant variants of JB-6 mouse epidermal cells. In: M. Mass et al., (Eds.), *Carcinogenesis—A Comprehensive Survey*, vol. 8, Tumor Promotion and Enhancement in the Etiology of Human and Experimental Respiratory Tract Carcinogenesis, Raven Press, New York, pp. 341-368.
- Guernsey, D. L., A. Ong and C. Borek (1980) Thyroid hormone modulation of X ray-induced in vitro neoplastic transformation, *Nature*, **288**, 591-592.
- Hamel, E., F. Katoh, G. Mueller, W. Birchmeier and H. Yamasaki (1988) Transforming growth factor as a potent promoter in two-stage BALB/c 3T3 cell transformation, *Cancer Res.*, **48**, 2832-2836.
- Hartman, T. G. and J. D. Rosen (1983) Inhibition of metabolic cooperation by cigarette smoke condensate and its fractions in V-79 Chinese hamster lung fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 5305-5309.
- Hirakawa, T., T. Kakunaga, H. Fujiki and T. Sugimura (1982) A new tumor-promoting agent, dihydroteleocidin B, markedly enhances chemically induced malignant cell transformation, *Science*, **216**, 527-529.
- Hosoi, J., E. Abe, T. Suda, N. H. Colburn and T. Kuroki (1986) Induction of anchorage-independent growth of JB6 mouse epidermal cells by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, *Cancer Res.*, **46**, 5582-5586.
- Hosoi, J., K. Kato and T. Kuroki (1987) Induction of anchorage-independent growth of mouse JB6 cells by cholera toxin, *Carcinogenesis*, **8**, 377-380.
- Iwase, Y., K. Kato, Y. Takeda and K. Yoshikawa (1991) Results of some tumor promoters on the Chinese hamster V79 cell metabolic cooperation assay based on gap-junctional intercellular communication, *Mutation Res.*, **253**, 255-256.
- Iwase, Y., S. Tanaka, Y. Takeda and K. Yoshikawa (1992) Effects of tumor promoters on gap-junctional intercellular communication using Chinese hamster V79 cells in a metabolic cooperation assay (II): application of metabolic activation system for detecting tumor promoters, *Mutation Res.*, **272**, 265.
- Jone, C. M., J. E. Trosko, C. C. Chang, H. Fujiki and T. Sugimura (1982) Inhibition of intercellular communication in Chinese hamster V79 cells by Teleocidin, *Gann*, **73**, 874-878.
- Jone, C., J. E. Trosko, C. F. Aylsworth, L. Parker and C. C. Chang (1985) Further characterization of the in-vitro assay for inhibitors of metabolic cooperation in the Chinese hamster V79 cell line, *Carcinogenesis*, **6**, 361-366.
- Jone, C., L. Erickson, J. E. Trosko and C. C. Chang (1987) Effect of biological toxins on gap-junctional intercellular communication in Chinese hamster V79 cells, *Cell Biology and Toxicology*, **3**, 1-15.
- Jone, C. M., L. M. Erickson, J. E. Trosko, M. L. Netzloff and C. C. Chang (1985) Inhibition of metabolic cooperation by the anticonvulsants, diphenylhydantoin and phenobarbital, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **5**, 379-391.
- Kaibara, N., E. Yurugi and S. Koga (1984) Promoting effect of Bile acids on the chemical transformation of C3H/10T1/2 fibroblasts in vitro, *Cancer Res.*, **44**, 5482-5485.
- Kakunaga, T. (1973). A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from BALB/3T3, *Int. J. Cancer*, **12**, 463-473.
- Kakunaga, T. and Crow, J. D. (1980) Cell variants showing differential susceptibility to ultraviolet light-induced transformation, *Science*, **209**, 505-507.
- Katoh, F., D. J. Fitzgerald, L. Girolodi, H. Fujiki, T. Sugimura and H. Yamasaki (1990) Okadaic acid and phorbol esters: comparative effects of these tumor promoters on cell transformation, intercellular communication and differentiation in vitro, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 590-597.
- Kawasumi, H., N. Kaibara and S. Koga (1988) Cocarcinogenic activity of bile acids in the chemical transformation of C3H/10T1/2 fibroblasts in vitro, *Oncology*, **45**, 192-196.
- Kennedy, A. R. and R. R. Weichselbaum (1981a) Effects of 17 $\beta$ -estradiol on radiation transformation in vitro; inhibition of effects by protease inhibitors, *Carcinogenesis*, **2**, 67-69.
- Kennedy, A. R. and R. R. Weichselbaum (1981b) Effects of dexamethasone and cortisone with X-ray irradiation on transformation of C3H 10T1/2 cells, *Nature*, **294**, 97-98.
- Kinsella, A. R. (1982) Elimination of metabolic co-operation and the induction of sister chromatid exchanges are not properties common to all promoting or co-carcinogenic agents, *Carcinogenesis*, **3**, 499-503.
- Kurata, M., K. Hirose and M. Umeda (1982) Inhibition of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by organochlorine pesticides, *Gann*, **73**, 217-221.
- Kuroki, T., K. Sasaki, K. Chida, E. Abe and T. Suda (1983) 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> markedly enhances chemically-induced transformation in BALB 3T3 cells, *Gann*, **74**, 611-614.
- Lillehaug, J. R. and R. Djurhuus (1982) Effect of diethylstilbestrol on the transformable mouse embryo fibroblast C3H/10T1/2C18 cells. Tumor promotion, cell growth, DNA synthesis, and ornithine decarboxylase, *Carcinogenesis*, **3**, 797-799.
- Malcolm, A. R., L. J. Mills and E. J. McKenna (1983) Inhibition of metabolic cooperation between Chinese hamster V79 cells by tumor promoters and other chemicals, *Annals New York Academy of Sciences*, **407**, 448-450.
- Malcolm, A. R., L. J. Mills and E. J. McKenna (1985) Effects of phorbol myristate acetate, phorbol dibutyrate, ethanol, dimethylsulfoxide, phenol, and seven metabolites of phenol on metabolic cooperation between Chinese hamster V79 lung fibroblasts, *Cell Biology and Toxicology*, **1**, 269-283.
- Malcolm, A. R. and L. J. Mills (1989) Inhibition of gap-junctional intercellular communication between Chinese hamster lung fibroblasts by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and trisodium nitrilotriacetate monohydrate (NTA), *Cell Biology and Toxicology*, **5**, 145-153.
- Male, R., R. Bjerkvig and J. R. Lillehaug (1987) Biological and biochemical characterization of cell lines derived from initiation-promotion transformed C3H/10T 1/2 cells, *Carcinogenesis*, **8**, 1375-1383.
- Mills, L. J., D. L. Robson and A. R. Malcolm (1991) Interactivi effects of aldrin, cyclohexylamine, 2,4-diaminotoluene and two phorbol esters on metabolic cooperation between V79 cells, *Carcinogenesis*, **12**, 1293-1299.
- Mondal, S. and C. Heidelberger (1976) Transformation of C3H/10T 1/2 C18 mouse embryo fibroblasts by ultraviolet irradiation and a phorbol ester, *Nature*, **260**, 710-711.
- Mondal, S., D. W. Brankow and C. Heidelberger (1976) Two-stage chemical oncogenesis in cultures of C3H/10T 1/2 cells, *Cancer Res.*, **36**, 2254-2260.
- Mondal, S., D. W. Brankow and C. Heidelberger (1978) Enhancement of oncogenesis in C3T/10T 1/2 mouse embryo cell cultures by saccharin, *Science*, **201**, 1141-1142.
- Mordan, L. J. (1988) Induction by growth factors from platelets of the focus-forming transformed phenotype in carcinogen-treated C3H/10T 1/2 fibroblasts, *Carcinogenesis*, **9**, 1129-1134.
- Morris, D. L., J. B. Ward, Jr, P. Nechay, E. B. Whorton, Jr, J. W. Fenton, II and D. H. Carney (1992) Highly purified human-thrombin promotes morphological transformation of BALB/c

- 3T3 cells, *Carcinogenesis*, **13**, 1-7.
- Nakamura, Y., N. H. Colburn and T. D. Gindhart (1985) Role of reactive oxygen in tumor promotion: implication of superoxide anion in promotion of neoplastic transformation in JB-6 cells by TPA, *Carcinogenesis*, **6**, 229-235.
- Nakamura, Y., T. D. Gindhart, D. Winterstein, I. Tomita, J. I. Seed and N. H. Colburn (1988) Early superoxide dismutase-sensitive event promotes neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cells, *Carcinogenesis*, **9**, 203-207.
- Nakatsuka, S., H. Tanaka and M. Namba (1990) Mutagenic effects of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) on V79 Chinese hamster cells and its inhibitory effects on cell-cell communication, *Carcinogenesis*, **11**, 257-260.
- Newbold, R. F. and J. Amos (1981) Inhibition of metabolic cooperation between mammalian cells in culture by tumor promoters, *Carcinogenesis*, **2**, 243-249.
- 日本組織培養学会編 (1991) 細胞トキシコロジー試験法, 朝倉書店, pp. 252-268.
- Noda, K., M. Umeda and T. Ono (1981) Effects of various chemicals including bile acids and chemical carcinogens on the inhibition of metabolic cooperation, *Gann*, **72**, 772-776.
- 野田浩一 (1984) 発癌プロモーターおよび各種化学物質の細胞間代謝協同におよぼす影響 横浜医学, **35**, 407-420.
- Reznikoff, C. A., D. W. Brankow and C. Heidelberger (1973) Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division, *Cancer Res.*, **33**, 3231-3238.
- Rubinstein, C., C. Jone, J. E. Trosko and C. C. Chang (1984) Inhibition of intercellular communication in cultures of Chinese hamster V79 cells by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, *Fundamental and Applied Toxicology*, **4**, 731-739.
- Sakai, A. and M. Sato (1989) Improvement of carcinogen identification in BALB/3T3 cell transformation by application of a 2-stage method, *Mutation Res.*, **214**, 285-296.
- Sakai, A. and H. Fujiki (1991) Promotion of BALB/3T3 cell transformation by the okadaic acid class of tumor promoters, okadaic acid and dinophysistoxin-1, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 518-523.
- Sasaki, K., K. Chida, H. Hashiba, N. Kamata, E. Abe, T. Suda and T. Kuroki (1986) Enhancement by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  of chemically induced transformation of BALB 3T3 cells without induction of ornithine decarboxylase or activation of protein kinase, *Cancer Res.*, **46**, 604-610.
- Sasaki, K., H. Mizusawa and M. Ishidate (1988) Isolation and characterization of *ras*-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, *Jap. J. Cancer Res.*, **79**, 921-930.
- Sasaki, K., H. Mizusawa, M. Ishidate and N. Tanaka (1990) Transformation of *ras* transfected BALB 3T3 clone (Bhas 42) by promoters: Application for Screening and specificity of promoters, *Toxic. in Vitro*, **4**, 657-659.
- Sasaki, K. (1992) Screening system of promoters using *ras* transfected BALB 3T3 clone (Bhas 42), INVITTOX Protocol, No. 62, 1-11.
- Semba, M. and N. Inui (1990) Effects of activators and inhibitors of protein kinase C on two-stage transformation in BALB/3T3 cells, *Toxicol. Lett.* **51**, 7-12.
- Shuin, T., R. Nishimura, K. Noda, M. Umeda and T. Ono (1983) Concentration dependent differential effect of retinoic acid on intercellular metabolic cooperation, *Gann*, **74**, 100-105.
- Smith, B. M., T. G. Gindhart and N. H. Colburn (1986) Possible involvement of a lanthanide-sensitive protein kinase C substrate in lanthanide promotion of neoplastic transformation, *Carcinogenesis*, **7**, 1949-1956.
- Toraason, M., J. S. Bohrman, E. Elmore, G. Wyatt, D. McGregor, S. E. Willington and W. Zajac (1991) Inhibition of intercellular communication in Chinese hamster V79 cells by fractionated asphalt fume condensates, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **34**, 95-102.
- Toraason, M., J. S. Bohrman, E. Krieg, R. D. Combes, S. E. Willington and W. Zajac (1992) Evaluation of the V79 cell metabolic co-operation assay as a screen in vitro for developmental toxicants, *Toxic. in Vitro*, **6**, 165-174.
- Trosko, J. E. and D. F. Horrobin (1980) The activity of diazepam in a Chinese hamster V79 lung cell assay for tumor promoters, *IRCS Med. Sci.*, **8**, 887.
- Trosko, J. E., B. Dawson, L. P. Yotti and C. C. Chang (1980) Saccharin may act as a tumour promoter by inhibiting metabolic cooperation between cells, *Nature*, **285**, 109-110.
- Trosko, J. E., B. Dawson and C. C. Chang (1981) PBB inhibits metabolic cooperation in Chinese hamster cells in vitro: its potential as a tumor promoter, *Environmental Health Perspectives*, **37**, 179-182.
- Trosko, J. E., C. Jone, C. Aylsworth and G. Tsushimoto (1982a) Elimination of metabolic cooperation is associated with the tumor promoters, oleic acid and anthralin, *Carcinogenesis*, **3**, 1101-1103.
- Trosko, J. E., L. P. Yotti, S. T. Warren, G. Tsushimoto and C. C. Chang (1982b) Inhibition of cell-cell communication by tumor promoters, In: E. Hecker et al. (Eds), *Carcinogenesis*, Vol. 7, Raven Press, NY, pp. 565-585.
- Trosko, J. E., C. Jone and C. C. Chang (1987) Inhibition of gap junctional-mediated intercellular communication in vitro by aldrin, dieldrin, and toxaphene: a possible cellular mechanism for their tumor-promoting and neurotoxic effects, *Molecular Toxicology*, **1**, 83-93.
- Trosko, J. E. and C. C. Chang (1988) Nongenotoxic mechanism in carcinogenesis: role of inhibited intercellular communication, In: R. W. Hart and F. D. Hoerger (Eds.), *Banbury Report 31: Carcinogen Risk Assessment: New Directions in the Qualitative and Quantitative Aspects*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 139-170.
- Tsushimoto, G., J. E. Trosko, C. C. Chang and F. Matsumura (1982a) Inhibition of intercellular communication by chlordecone (kepone) and mirex in Chinese hamster V79 cells in vitro, *Toxicology and applied pharmacology*, **64**, 550-556.
- Tsushimoto, G., J. E. Trosko, C. C. Chang and S. D. Aust (1982b) Inhibition of metabolic cooperation in Chinese hamster V79 cells in culture by various polybrominated biphenyl (PBB) congeners, *Carcinogenesis*, **3**, 181-185.
- Umeda, M., K. Noda and T. Ono (1980) Inhibition of metabolic cooperation in Chinese hamster cells by various chemicals including tumor promoters, *Gann*, **71**, 614-620.
- Umeda, M., K. Tanaka and T. Ono (1983) Effect of insulin on the transformation of BALB/3T3 cells by X-ray irradiation, *Gann*, **74**, 864-869.
- Umeda, M., K. Noda and K. Tanaka (1985) Assays for inhibition of metabolic cooperation by a microassay method, In: J. Ashby F. J. de Serres et al. (Eds.), *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 619-622.
- Umeda, M., K. Tanaka and T. Ono (1989) Promotional effect of lithocholic acid and 3-hydroxyanthranilic acid on transformation of X-ray-initiated BALB/3T3 cells, *Carcinogenesis*, **10**, 1665-1668.
- Warngard, L., S. Flodstrom, S. Ljungquist and U. G. Ahlberg (1985) Inhibition of metabolic cooperation in Chinese hamster lung fibroblast cells (V79) in culture by various DDT-analogs, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, 541-546.
- Warren, S. T., D. J. Dolittle, C. C. Chang, J. I. Goodman and J. E. Trosko (1982) Evaluation of the carcinogenic potential of 2,4-dinitrofluorobenzene and its implications regarding mutagenicity testing, *Carcinogenesis*, **3**, 139-145 (1982).
- Welsch, F. and D. B. Stedman (1984) Inhibition of metabolic cooperation between Chinese hamster V79 cells by structurally diverse teratogens, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **4**, 285-301.
- Wilder, P. J. and A. Rizzino (1991) Effects of transforming growth factor  $\beta$  on the anchorage-independent growth of murine epithelial JB6 cells, *Cancer Res.*, **51**, 5898-5902.
- Ye, Y. X., D. Bombick, K. Hirst, G. Zhang, C. C. Chang, J. E. Trosko and T. Akera (1990) The modulation of gap junctional communication by gossypol in various mammalian cell lines in vitro, *Fundamental and Applied Toxicology*, **14**, 827-832.
- Yotti, L. P., C. C. Chang and J. E. Trosko (1979) Elimination of metabolic cooperation in Chinese hamster Cells by a tumor promoter, *Science*, **206**, 1089-1091.
- Zimmerman, R. and P. Cerutti (1984) Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T1/2/C18 fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 2085-2087.

シンポジウム「変異原性試験で何がわかるか：問題点の展望」

## In vivo-in vitro ラット・マウスの UDS と RDS 試験について

東大・医科研 降旗千恵<sup>1</sup>  
三菱化成・総合研究所 宇野芳文<sup>2</sup>

### 1. はじめに

UDS とは、変異原物質あるいは癌原物質との反応によって細胞の核の DNA に DNA 付加体が生成した時に、酵素反応によって除去修復される時の修復 DNA 合成のことで、*unscheduled DNA synthesis* (不定期 DNA 合成) と言う。RDS とは、核の DNA が複製される時の複製 DNA 合成 (*replicative DNA synthesis*) のことである。UDS や RDS の反応の時に [<sup>3</sup>H]thymidine を共存させておくと、合成された DNA が [<sup>3</sup>H] で標識されて、感度良く検出することができる。UDS では修復された部位に部分的に [<sup>3</sup>H] thymidine が取り込まれ、RDS では複製された側の DNA 全体に取り込まれる。

*In vivo-in vitro* とあるのは、動物個体に *in vivo* で化学物質を作用させて、[<sup>3</sup>H]thymidine の取り込みを *in vitro* で行うためである。

*In vivo-in vitro* UDS および RDS の試験結果の蓄積が肝臓で最も多いので、肝臓を中心としてまとめ、一部胃の結果を付け加える。

### 2. 肝臓の UDS と RDS

肝臓でオートラジオグラフィーを用いる方法は、Mirsalis と Butterworth によって 1980 年に発表され (Mirsalis and Butterworth, 1980)<sup>40)</sup>,

1) 〒108 東京都港区白金台 4-6-1

2) 〒227 横浜市緑区鴨志田町 1000

Overview on *In Vivo/in Vitro* UDS and RDS Tests in Rats and Mice

<sup>1</sup>Chie Furihata

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

<sup>2</sup>Yoshifumi Uno

Toxicology Laboratory, Life Science Sector Research Center, Mitsubishi Kasei Co., 1000, Kamoshidacho, Midori-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 227, Japan

1987 年には *Mutation Research* に protocol & guide も発表されている (Butterworth *et al.*, 1987)<sup>15)</sup>。Guideline も OECD や数カ国で出ている。日本では日常的試験として採用しているところがほとんど無く、したがって guideline もまだ

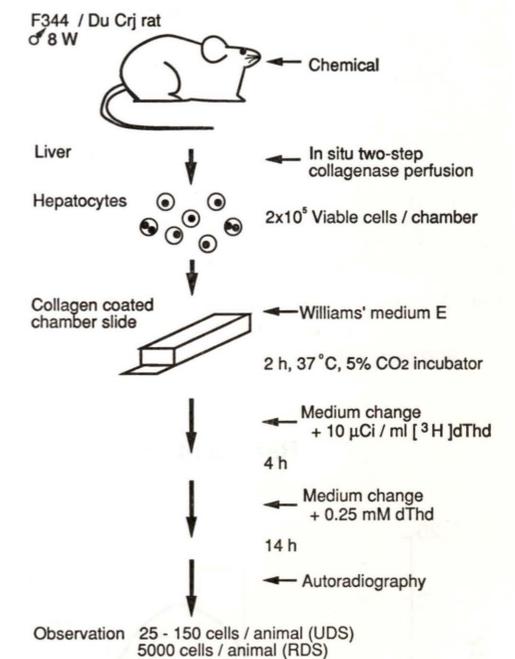


Fig. 1. 肝臓の *in vivo-in vitro* UDS・RDS 法 (オートラジオグラフィ法).

無い。また UDS はアメリカとイギリスでは委託試験が行われており、RDS は日本で委託試験が行われている。

行われている。

実験法は Fig. 1 に示すように、ラットやマウスに化学物質を投与して (主として経口), *in vivo* で作用させた後、コラゲナーゼ液で肝臓を灌流して肝細胞を調製し、 $[^3\text{H}]$ thymidine で標識して、オートラジオグラフィを行う (Fig. 2)。UDS では、2 または 12 時間、RDS では 24~48 時間 *in vivo* で作用させる。

初代培養肝細胞では、対照群の核でもかなりの数の grain が観察される。これは、細胞質のミトコンドリアでの DNA 合成が盛んなため、細胞をガラス板上で固定した時に核に重なった細胞質からくると説明されている。UDS の場合、対照群の値は核の grain 数から、同じ面積の細胞質の grain 数を差し引いた値 (-5 位の数値) が使われている。核の grain 数から、同じ面積の細胞質の grain 数を差し引いた値が +5 以上の時に、UDS 陽性とされている (Butterworth *et al.*, 1987)<sup>15)</sup>。RDS では、核全体が標識され識別しやすい。RDS の場合、ラットでは 105 回 (合計 422 頭) の対照実験の結果から、S 期細胞 1% 以上を RDS 陽性とした (Fig. 3) (Uno *et al.*, 1992 a; 1992 b)<sup>69,70)</sup>。マウスでは 35 回 (合計 141 頭) の対照実験の結果から、S 期細胞 0.4% 以上を RDS 陽性とした (Fig. 3) (高沢ら, 1992)<sup>67)</sup>。

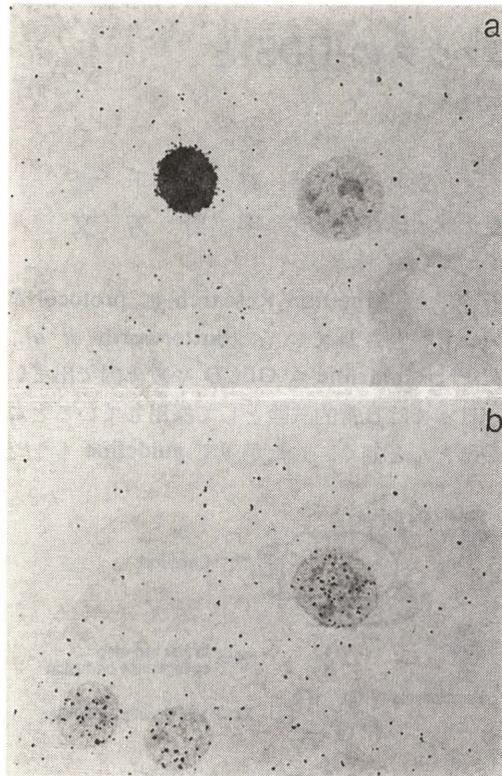


Fig. 2. ラット肝臓の UDS・RDS (オートラジオグラフィ)。a), 対照群, 黒く見える核は S 期細胞の核 (RDS); b), DMN (2.5 mg/kg)<sup>69)</sup>。

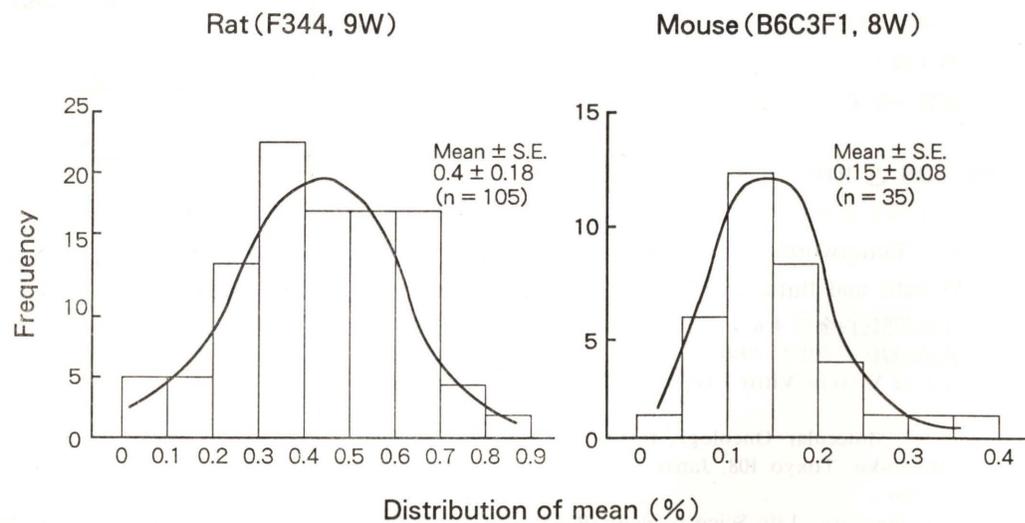


Fig. 3. ラット・マウスの肝 RDS 自然誘発率の分布<sup>67,69,70)</sup>。

Table 1. 肝臓で *in vivo-in vitro* UDS・RDS 陽性の化学物質

| No. | 化学物質              | UDS |   | RDS |   | 癌原性     | 文献                     |
|-----|-------------------|-----|---|-----|---|---------|------------------------|
|     |                   | R   | M | R   | M |         |                        |
| 1   | 2AAF              | +   |   | +   |   | 肝癌 (po) | 3, 18, 44, 49          |
| 2   | DMN               | +   | + | +   | + | 肝癌 (po) | 14, 16, 17, 44, 49, 50 |
| 3   | tg-Dinitrotoluene | +   |   | +   |   | 肝癌 (po) | 12, 61                 |
| 4   | 2-Nitrotoluene    | +   |   | +   |   | 肝癌 (po) | 16, 57                 |
| 5   | Riddelliine       | +   |   | +   |   | 未試験     | 53                     |
| 6   | Unleaded gasoline |     | + |     | + | 肝腫瘍     | 45                     |

R, ラット; M, マウス; +, 陽性; po, 経口投与; 2AAF, 2-Acetylaminofluorene; DMN, Dimethylnitrosamine; tg, technical grade.

Table 2. 肝臓で *in vivo-in vitro* UDS 陽性の化学物質

| No. | 化学物質  | UDS |   | 癌原性     | 文献            |
|-----|---|-----|---|---------|---------------|
|     |   | R   | M |         |               |
| 1   | Acid Blue 9   | +   |   | 癌原物質    | 43            |
| 2   | Aflatoxin B <sub>1</sub>                                  | +   |   | 肝癌 (po) | 44, 49        |
| 3   | <i>o</i> -Aminoazotoluene                                 | +   |   | 癌原物質    | 44            |
| 4   | 4-Aminobiphenyl   | +   | + | 肝癌 (po) | 50            |
| 5   | Azaserine   | +   |   | 膀胱癌     | 49            |
| 6   | Azoxymethane  | +   |   | 肝癌 (sc) | 大腸癌 (po) 49   |
| 7   | Benzidine   | +   |   | 肝癌 (po) | 49, 57        |
| 8   | 6-[p(N-β-CNEt-N-CH <sub>3</sub> NH)-phenylazo]benzthiazol | +   |   |         | 11            |
| 9   | DEN   | +   |   | 肝癌 (po) | 44, 49        |
| 10  | 2, 4-Diaminotoluene                                       | +   |   | 肝癌 (po) | 12, 49        |
| 11  | 3, 3-Dichlorobenzidine                                    | +we |   | 癌原物質    | 6             |
| 12  | 4-Dimethylaminobenzeneazo-1-naphthalene                   | +   |   |         | 43            |
| 13  | 4-Dimethylaminobenzeneazo-2-naphthalene                   | +   |   |         | 43            |
| 14  | 6-Dimethylaminophenylazobenzthiazole                      | +   |   | 肝癌 (po) | 11            |
| 15  | 5-p-Dimethylaminophenylazoindazole                        | +we |   | 非癌原物質   | 5             |
| 16  | 6-Dimethylaminophenylazoquinoline                         | +we |   |         | 4             |
| 17  | 4-Dimethylaminostilbene                                   | +   |   | 癌原物質    | 43            |
| 18  | 1, 2-Dimethylhydrazine                                    | +   |   | 肝癌 (sc) | 大腸癌 (po) 49   |
| 19  | 2, 4-Dinitrotoluene                                       | +   |   | 肝癌 (po) | 12, 47-49, 61 |
| 20  | 2, 6-Dinitrotoluene                                       | +   |   | 肝癌 (po) | 12, 47-49, 61 |
| 21  | Direct Black 38   | +we |   | 肝癌      | 6             |
| 22  | Direct Blue 53  | +   |   |         | 43            |
| 23  | Direct Brown 95   | +   |   | 肝癌      | 42            |
| 24  | 3-Methylcholanthrene                                      | +   |   | 肺癌      | 44            |
| 25  | 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene                       | +we |   | 肝癌      | 4             |
| 26  | Methylmethanesulfonate                                    | +   | + | 脳腫瘍     | 49            |
| 27  | Michler's ketone  | +   |   | 肝癌      | 51            |
| 28  | 6-Monomethylaminophenylazobenzthiazole                    | +   |   |         | 11            |
| 29  | Nitrosomorpholine   | +we |   | 肝癌      | 7             |
| 30  | Solvent Yellow 5  | +   |   |         | 43            |
| 31  | Solvent Yellow 14   | +   |   |         | 43            |

+we, 弱陽性; DEN, diethylnitrosamine.

Table 2 の化学物質については RDS の結果が発表されていない。

Table 3-1. 肝臓で in vivo-in vitro UDS 陰性の化学物質

| No. | 化学物質                                      | UDS |   | RDS |     | 癌原性             | 文献             |
|-----|---|-----|---|-----|-----|-----------------|----------------|
|     |   | R   | M | R   | M   |                 |                |
| 1   | Acetonitrile                              | -   |   |     |     |                 | 57             |
| 2   | 4AAF                                      | +-  | - | +   | +   | 非癌原物質           | 18, 55         |
| 3   | Acid Blue 74                              | -   |   |     |     |                 | 43             |
| 4   | Acid Red 14                               | -   |   | +   | -   | 非癌原物質           | 43             |
| 5   | Acid Red 27                               | -   |   |     |     |                 | 43             |
| 6   | Acid Red 51                               | -   |   |     |     |                 | 43             |
| 7   | Acid Yellow 23                            | -   |   |     |     | 非癌原物質           | 43             |
| 8   | 11-Aminoundecanoic acid                   | -   |   | -   |     | 肝癌(R) (Ames-)   | 56, 71         |
| 9   | <i>o</i> -Anisidine                       | -   |   |     |     | 癌原物質            | 10             |
| 10  | Benzo(a)pyrene                            | -   |   |     |     | 乳癌, 肺癌          | 49             |
| 11  | Benzyl acetate                            | -   |   | -   | +   | 非癌原物質(R), 肝癌(M) | 56, 71         |
| 12  | 2-Benzyl-4-chlorophenol                   | -   |   |     |     |                 | 57             |
| 13  | Bis(2-chloro-1-methylethyl)ether          | -   | - |     | +   | 肝癌(M)           | 56, 57         |
| 14  | Carbon tetrachloride                      | -   | - | +   | +   | 肝癌we(R, M)      | 49, 53, 56, 71 |
| 15  | Chlorinated paraffin                      | -   |   |     | +we | 肝癌              | 9              |
| 16  | Chloroform                                | -   | - | +   | +   | 肝癌(R, M)        | 49, 53, 57, 71 |
| 17  | C. I. Acid Red 114                        | +-  |   |     |     | 肝アデノーマ          | 57             |
| 18  | C. I. Direct Blue 218                     | -   |   |     |     |                 | 57             |
| 19  | C. I. Solvent Yellow 14                   | -   |   | +-  |     |                 | 51, 56         |
| 20  | Cinnamaldehyde                            | -   |   |     |     | 非癌原物質           | 56             |
| 21  | Cinnamylanthranilate                      | -   |   |     |     | 肝癌(M)           | 56             |
| 22  | 2, 6-Diamonotoluene                       | -   |   |     |     | 非癌原物質           | 49             |
| 23  | Dibenzyl nitrosamine                      | -   |   |     | +we |                 | 64             |
| 24  | Dichloromethane                           | -   | - |     |     | 肝癌(M)           | 68             |
| 25  | 2, 6-Dichloro- <i>p</i> -phenylenediamine | -   | - |     | +   | 肝癌(M)           | 4, 50, 51      |
| 26  | Dichlorvos                                | -   |   |     |     | 癌原物質            | 51             |
| 27  | Di(2-ethylhexyl)phthalate                 | -   | - | +   | +   | 肝癌(R, M)        | 14, 65, 71     |
| 28  | 3, 3'-Dimethoxybenzidine·2HCl             | -   |   |     |     | 肝癌              | 57             |
| 29  | 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene           | -   |   |     |     | 癌原物質            | 49             |
| 30  | 3, 3'-Dimethylbenzidine·2HCl              | -   |   |     |     | 肝癌              | 57             |
| 31  | 1, 6-Dinitropyrene                        | -   |   |     |     | 癌原物質            | 13             |
| 32  | Direct Blue 14                            | -   |   |     |     | 癌原物質(ip, iv)    | 43             |
| 33  | Direct Red 28                             | -   |   |     |     |                 | 43             |
| 34  | Food Black 1                              | -   |   |     |     |                 | 43             |
| 35  | Food Green 3                              | -   |   |     |     | 癌原物質            | 43             |
| 36  | Food Orange 4                             | -   |   |     |     | ND              | 43             |
| 37  | Food Red 1                                | -   |   |     |     | 非癌原物質           | 43             |
| 38  | Food Red 5                                | -   |   |     |     | ND              | 43             |
| 39  | Food Red 7                                | -   |   |     |     | 癌原物質            | 43             |
| 40  | Glutaraldehyde                            | -   |   |     |     |                 | 56             |
| 41  | H. C. Blue #1                             | -   | - | -   | +   | 肝癌(M)           | 53             |
| 42  | Manganesesulfate                          | -   |   |     |     |                 | 57             |
| 43  | Methapyrilene                             | -   | - | +   | +   | 肝腫瘍(R) 非癌原物質(M) | 54, 66         |
| 44  | Methdilazine·HCl                          | -   |   |     |     |                 | 57             |
| 45  | Methyl chloride                           | +-  |   |     |     | 癌原物質            | 72             |
| 46  | 4, 4'-Methylenedianiline·2HCl             | -   | - |     |     | 肝癌肝(M) アデノーマ(R) | 57             |
| 47  | MNNG                                      | -   |   |     |     | 胃癌, 十二指腸癌       | 49             |

4AAF, 4-Acetyaminofluorene; MNNG, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine; ND, not determined

Table 3-2. 肝臓で in vivo-in vitro UDS 陰性の化学物質

| No. | 化学物質  | UDS |   | RDS |     | 癌原性            | 文献             |
|-----|---|-----|---|-----|-----|----------------|----------------|
|     |   | R   | M | R   | M   |                |                |
| 48  | Methylphenidate                               | -   |   |     |     |                | 57             |
| 49  | Natural Red 4                                 | -   |   |     |     |                | 43             |
| 50  | 4-Nitroaniline                                | -   |   |     |     |                | 57             |
| 51  | 2-Nitroanisole                                | -   |   |     |     |                | 57             |
| 52  | Nitrobenzene                                  | -   |   |     |     | 非癌原物質          | 49, 58         |
| 53  | <i>N</i> -Nitrosodibenzylamine                | -   |   |     |     |                | 64             |
| 54  | <i>N</i> -Nitrosodiethanolamine               | -   |   |     |     | 肝癌             | 51             |
| 55  | 3-Nitrotoluene                                | -   |   | -   |     |                | 16             |
| 56  | 4-Nitrotoluene                                | -   |   | -   |     | 非癌原物質          | 16             |
| 57  | 4, 4'-Oxydianiline                            | -   |   |     |     | 肝アデノーマ         | 56             |
| 58  | Phenobarbital                                 | -   |   |     |     |                | 18             |
| 59  | Pigment Red 53                                | -   | - |     | +   |                | 43             |
| 60  | 6-[4- <i>N</i> -Piperidinyl-phenyl]azobenzene | -   |   |     |     |                | 11             |
| 61  | Polybrominated biphenyl                       | -   | - | +   | +   | 肝癌             | 50, 51, 57     |
| 62  | Promethazine·HCl                              | -   |   |     |     |                | 57             |
| 63  | Propanthelinebromide                          | -   |   |     |     |                | 57             |
| 64  | Pyrene  | -   |   |     |     | 非癌原物質          | 55             |
| 65  | 4- <i>N</i> -Pyrrolidinylazobenzene           | -   |   |     |     |                | 4              |
| 66  | Quinoline                                     | +-  |   |     | +we | 肝癌             | 8              |
| 67  | Reserpine                                     | -   |   |     |     |                | 51             |
| 68  | Safrole                                       | -   |   |     | +   | 肝癌we           | 49, 71         |
| 69  | Seleniumsulfide                               | -   |   |     | +   | 肝癌             | 51             |
| 70  | 1, 1, 2, 2-Tetrachloroethane                  | -   | - |     | +   | 肝癌(M)          | 51, 53         |
| 71  | Tetrahydrofuran                               | -   |   |     |     |                | 57             |
| 72  | Triamterene                                   | -   |   |     |     |                | 57             |
| 73  | 1, 1, 2-Trichloroethane                       | -   |   |     | +   | 肝癌(M)          | 51, 53         |
| 74  | Trichloroethylene                             | -   | - | +   | +   | 肝癌(M) 非癌原物質(R) | 50, 51, 53, 71 |
| 75  | 1, 2, 3-Trichloropropane                      | -   |   |     |     |                | 57             |
| 76  | Tricresylphosphate                            | -   |   |     |     |                | 57             |
| 77  | 2, 2, 4-Trimethylpentane                      | -   |   |     | +   | +              | 45             |
| 78  | 2, 6-Xylidine                                 | -   |   |     |     |                | 51             |

Table 4. 肝臓で in vivo-in vitro UDS·RDS 陰性の化学物質

| No. | 化学物質                    | UDS |   | RDS |   | 癌原性   | 文献     |
|-----|-------------------------|-----|---|-----|---|-------|--------|
|     |                         | R   | M | R   | M |       |        |
| 1   | C. I. Solvent Yellow 14 | -   |   | -   |   |       | 51     |
| 2   | H. C. Blue #2           | -   | - | -   | - | 非癌原物質 | 50, 52 |

UDS について見れば、ラットでは 118 種の化学物質の結果が発表されている (Table 1-4)。変異肝癌原物質 24 種類のうち 19 種類が陽性であった。非癌原物質あるいは非肝癌原物質 69 種類のうち 58 種類は陰性であった。このように UDS 法はラットでは特異性も感度も十分に良い。マウスでは 19 種の化学物質の結果が発表されている (Table 1-4)。変異肝癌原物質 6 種類のうち 3 種類が陽性であった。非癌原物質あるいは非肝癌原

物質 4 種類のうち 3 種類が陰性であった。マウスでは特異性や感度について議論するのは時期尚早であろう。

RDS について見れば、Ames 試験陰性の非変異・肝癌原物質の内 16 種類のハロゲン化合物の内 13 種類が RDS 陽性であった (Table 5)。その他の Ames 試験陰性の非変異・肝癌原物質 16 種類のうち 13 種類が RDS 陽性であった (Table 6)。また非・癌原物質 25 種類の内 20 種

Table 5. 非変異・肝癌原物質 (含ハロゲン化合物) を用いたラット・マウス肝 RDS 試験結果<sup>71)</sup>

| No. | 化学物質                      | 変異原性    |         | 肝癌原性 |   | RDS 試験 |   | 総合判定 |
|-----|---------------------------|---------|---------|------|---|--------|---|------|
|     |                           | Ames 試験 | 染色体異常試験 | R    | M | R      | M |      |
| 1   | Bromodichloromethane      | -       | -       | -    | + | +      |   | +    |
| 2   | Carbon tetrachloride      | -       | -       | +    | + | +      |   | +    |
| 3   | Chloroform                | -       | -       | +    | + | +      |   | +    |
| 4   | Clofibrate                | -       | +       | +    |   | +      | - | +    |
| 5   | 1,4-Dichlorobenzene       | -       | -       | -    | + | -      | + | +    |
| 6   | Hexachloroethane          | -       | -       | -    | + |        | + | +    |
| 7   | Pentachloroethane         | -       | -       | -    | + | -      | + | +    |
| 8   | Polybromobiphenyl         | -       | -       | +    | + | +      |   | +    |
| 9   | Simfibrate                | -       | -       | +    | + | +      |   | +    |
| 10  | 1,1,1,2-Tetrachloroethane | -       | -       | -    | + |        | + | +    |
| 11  | 1,1,2-Trichloroethane     | -       | -       | -    | + |        | + | +    |
| 12  | Trichloroethylene         | -       | -       | -    | + | +      | + | +    |
| 13  | Wy-14,643                 | -       | -       | +    | + | +      |   | +    |
| 14  | Chlorendic acid           | -       | -       | +    | + | -      | - | -    |
| 15  | Tetrachloroethylene       | -       | -       | -    | + | -      | - | -    |
| 16  | 2,4,6-Trichlorophenol     | -       | -       | -    | + |        | - | -    |

R, ラット; M, マウス; +, 陽性; -, 陰性.

Table 6. 非変異・肝癌原物質 (その他の化合物) を用いたラット・マウス肝 RDS 試験結果<sup>71)</sup>

| No. | 化学物質                          | 変異原性    |         | 肝癌原性 |   | RDS 試験 |   | 総合判定 |
|-----|-------------------------------|---------|---------|------|---|--------|---|------|
|     |                               | Ames 試験 | 染色体異常試験 | R    | M | R      | M |      |
| 1   | Acetaminophen                 | -       | +       | +    | + | +      |   | +    |
| 2   | Benzene                       | -       | +       | -    | + | +      |   | +    |
| 3   | Benzyl acetate                | -       | -       | -    | + | -      | + | +    |
| 4   | Di(2-ethylhexyl)adipate       | -       | +       | -    | + | +      |   | +    |
| 5   | Di(2-ethylhexyl)phthalate     | -       | -       | +    | + | +      | + | +    |
| 6   | Diethylstilbestrol            | -       | +       | +    | - | +      |   | +    |
| 7   | 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol | -       | -       | +    | - | +      |   | +    |
| 8   | Methyl carbamate              | -       | -       | +    | - | +      |   | +    |
| 9   | Phenobarbital sodium          | -       | +       | +    | + | +      | + | +    |
| 10  | Safrole                       | -       | +       | +    | + | +      |   | +    |
| 11  | Tannic acid                   | -       | +       | +    | + | +      | * | +    |
| 12  | Thioacetamide                 | -       | -       | +    | + | +      |   | +    |
| 13  | Urethane                      | -       | +       | +    | + | +      |   | +    |
| 14  | 11-Aminoundecanoic acid       | -       | -       | +    | - | -      |   | -    |
| 15  | Tris(2-ethylhexyl)phosphate   | -       | -       | -    | + | -      | - | -    |
| 16  | D, L-Ethionine                | -       | -       | +    | + | -      |   | -    |

R, ラット; M, マウス; +, 陽性; -, 陰性; \*, 皮下投与.

Table 7. 非癌原物質を用いたラット肝 RDS 試験結果<sup>71)</sup>

| No. | 化学物質                                       | 変異原性    |         | RDS 試験 |
|-----|--|---------|---------|--------|
|     |  | Ames 試験 | 染色体異常試験 |        |
| 1   | Anthranilic acid                           | -       |         | -      |
| 2   | L-Ascorbic acid                            | -       | -       | -      |
| 3   | Benzyl alcohol                             | -       | +       | -      |
| 4   | Caprolactam                                | -       | -       | -      |
| 5   | 2-Chloroethanol                            | +       | +       | -      |
| 6   | Flutolanil                                 | -       |         | -      |
| 7   | Halothane                                  | -       |         | -      |
| 8   | 8-Hydroxyquinoline                         | +       | +       | -      |
| 9   | Lindane                                    | -       |         | -      |
| 10  | Lithocholic acid                           | -       | +       | -      |
| 11  | D-Mannitol                                 | -       | -       | -      |
| 12  | Methoxychlor                               | -       |         | -      |
| 13  | 4-Nitroanthranilic acid                    | +       |         | -      |
| 14  | 4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine        | +       | +       | -      |
| 15  | Phenol                                     | -       | +       | -      |
| 16  | <i>p</i> -Phenylenediamine dihydrochloride | +       | +       | -      |
| 17  | Sulfisoxazole                              | -       | -       | -      |
| 18  | 2,5-Toluenediamine sulfate                 | +       |         | -      |
| 19  | 2,6-Toluenediamine                         | +       | +       | -      |
| 20  | L-Tryptophane                              | -       | -       | -      |
| 21  | Benzoin                                    | -       | -       | +      |
| 22  | Butylated hydroxytoluene                   | -       | -       | +      |
| 23  | 3-Chloro- <i>p</i> -toluidine              | -       |         | +      |
| 24  | Geranyl acetate                            | -       | -       | +      |
| 25  | D, L-Menthol                               | -       | -       | +      |

+, 陽性; -, 陰性.

類は RDS 陰性であった (Table 7)。すなわち、調べられた Ames 試験陰性の肝癌原物質 32 種類の 81% が RDS 陽性で、非・癌原物質 25 種類の 80% が RDS 陰性であった。このように RDS 法は特異性も感度も十分に良い。

オートラジオグラフィ法による肝臓の *in vivo-in vitro* UDS・RDS の結果を要約すると、167 種類の化学物質について発表されていて、UDS と RDS 共に調べられていて陽性の化学物質が 6 種類 (Table 1)、UDS のみが調べられていて陽性の化学物質が 31 種類 (Table 2)、UDS 陰性の化学物質が 78 種類 (Table 3) であった。RDS が陽性の化学物質が 39 種類 (Table 8)、RDS 陰性の化学物質が 28 種類 (Table 9)、UDS と RDS 共に

陰性の化学物質が 2 種類 (Table 4) であった。この他に委託試験で調べられていて発表されていない化学物質が数 10 から 100 位は有りそうだ。

肝臓の UDS と RDS を調べるのに液体シンチレーションカウンターを使用している所は少ないが、私達の検討結果を示す。私達は肝細胞初代培養の時に、複製 DNA 合成阻害剤 hydroxyurea 添加および無添加の培地中で培養した後、核分画を取り、DNA を抽出して、取り込まれた [<sup>3</sup>H] thymidine を液体シンチレーションカウンターで測定した (Fig. 4) (Sawada *et al.*, 1989)<sup>62)</sup>。RDS が上昇している場合にはその補正をする。Fig. 5 は F 344 雄ラットに dimethylnitrosamine を投与し 2 時間後に肝細胞を採取して UDS を調べ

Table 8. 肝臓で in vivo-in vitro RDS 陽性の化学物質

| No. | 化学物質                                     | RDS |   | UDS |   | 肝癌原性 |   |
|-----|--|-----|---|-----|---|------|---|
|     |  | R   | M | R   | M | R    | M |
| 1   | Acetaminophen                            | +   |   |     |   | +    | + |
| 2   | 4AAF                                     | +   | + | +-  | - | -    | - |
| 3   | Benzene                                  | +   |   |     |   | -    | + |
| 4   | Benzoin                                  | +   |   |     |   | -    | - |
| 5   | Benzyl acetate                           | -   | + | -   |   | -    | + |
| 6   | Bis(2-chloro-1-methyl-ethyl)ether        |     | + |     | - |      |   |
| 7   | Bromodichloromethane                     | +   |   |     |   | -    | + |
| 8   | Butylated hydroxytoluene                 | +   | + |     |   | -    | - |
| 9   | Carbone tetrachloride                    | +   | + | -   | - | +    | + |
| 10  | Clofibrate                               | +   | - |     |   | +    |   |
| 11  | Chloroform                               | +   |   | -   | - | +    | + |
| 12  | 3-Chloro- <i>p</i> -toluidine            | +   | + |     |   | -    | - |
| 13  | Dibenzyl nitrosamine                     | +we |   | -   |   |      |   |
| 14  | 1,4-Dichlorobenzene                      | -   | + |     |   | -    | + |
| 15  | 2,6-Dichloro- <i>p</i> -phenylenediamine |     | - |     | + |      | + |
| 16  | Di(2-ethylhexyl)adipate                  | +   |   |     |   | -    | + |
| 17  | Di(2-ethylhexyl)phthalate                | +   | + | -   | - | +    | + |
| 18  | Diethylstilbestrol                       | +   |   |     |   | +    | - |
| 19  | 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol            | +   |   |     |   | +    | - |
| 20  | Geranyl acetate                          | +   | + |     |   | -    | - |
| 21  | H. C. Blue #1                            | -   | + | -   | - |      | + |
| 22  | Hexachloroethane                         |     | + |     |   | -    | + |
| 23  | D, L-Menthol                             | +   | + |     |   | -    | - |
| 24  | Methapyrilene                            | +   | + | -   | - | +    | - |
| 25  | Methyl carbamate                         | +   |   |     |   | +    | - |
| 26  | Pentachloroethane                        | -   | + |     |   | -    | + |
| 27  | Phenobarbital sodium                     | +   | + |     | - | +    | + |
| 28  | Polybromobiphenyl                        | +   | + | -   | - | +    | + |
| 29  | Quinoline                                | +we |   | +-  |   |      |   |
| 30  | Safrole                                  | +   |   | -   |   | +    | + |
| 31  | Simfibrate                               | +   |   |     |   | +    | + |
| 32  | Tannic acid                              | +   |   |     |   | +    | + |
| 33  | 1, 1, 1, 2-Tetrachloroethane             |     | + |     | - | -    | + |
| 34  | Thioacetamide                            | +   |   |     |   | +    | + |
| 35  | 1, 1, 2-Trichloroethane                  |     | + |     | - | -    | + |
| 36  | Trichloroethylene                        | +   | + | -   | - | -    | + |
| 37  | Trimethylpentane                         | +   | + | -   |   |      |   |
| 38  | Urethane                                 | +   |   |     |   | +    | + |
| 39  | Wy-14,643                                | +   |   |     |   | +    | + |

た結果である(沢田ら, 未発表データ<sup>63)</sup>。この実験の場合 RDS は上昇していなかった。1群5頭の同一のラットについて、オートラジオグラフィ法と液体シンチレーションカウンター法の結果を比較した。図にあるように感度を含めて非常に良く一致した。

また最近、RDS は bromodeoxyuridine(BrdU) で測定する方法が使われている。<sup>[3H]</sup>thymidine

の代わりに BrdU を *in vivo* または *in vitro* で取り込ませて、免疫酵素抗体法で染色する (Fig. 6)。Fig. 7 は F 344 雄ラットに CCl<sub>4</sub> を体重 1 kg 当り 400 mg 投与し 48 時間後に RDS を BrdU 法で測定した結果である<sup>2)</sup>。この場合は、BrdU は *in vitro* で取り込ませた。結果は <sup>[3H]</sup>thymidine でオートラジオグラフィ法または液体シンチレーションカウンター法で測定した結果と良く一致し

Table 9. 肝臓で in vivo-in vitro RDS 陰性の化学物質

| No. | 化学物質                                       | RDS |   | UDS |   | 肝癌原性 |   |
|-----|--|-----|---|-----|---|------|---|
|     |  | R   | M | R   | M | R    | M |
| 1   | 11-Aminoundecanoic acid                    | -   |   |     | - | +    | - |
| 2   | Anthranilic acid                           | -   |   |     |   | -    | - |
| 3   | L-Ascorbic acid                            | -   | - |     |   | -    | - |
| 4   | Benzyl alcohol                             | -   |   |     |   | -    | - |
| 5   | Caprolactam                                | -   | - |     |   | -    | - |
| 6   | Chrorendic acid                            | -   | - |     |   | +    | + |
| 7   | C. I. Sovent Yellow 218                    | +-  |   | -   |   |      |   |
| 8   | D, L-Ethionine                             | -   |   |     |   | +    | + |
| 9   | 2-Chloroethanol                            | -   |   |     |   | -    | - |
| 10  | Flutolanil                                 | -   |   |     |   | -    | - |
| 11  | Halothane                                  | -   |   |     |   | -    | - |
| 12  | 8-Hydroquinoline                           | -   | - |     |   | -    | - |
| 13  | Lindane                                    | -   | - |     |   | -    | - |
| 14  | Lithocholic acid                           | -   |   |     |   | -    | - |
| 15  | Mannitol                                   | -   | - |     |   | -    | - |
| 16  | Methoxychlor                               | -   | - |     |   | -    | - |
| 17  | 4-Nitroanthranilic acid                    | -   |   |     |   | -    | - |
| 18  | 4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine        | -   |   |     |   | -    | - |
| 19  | 3-Nitrotoluene                             | -   |   | -   |   | -    | - |
| 20  | 4-Nitrotoluene                             | -   |   | -   |   | -    | - |
| 21  | Phenol                                     | -   | - |     |   | -    | - |
| 22  | <i>p</i> -Phenylenediamine dihydrochloride | -   |   |     |   | -    | - |
| 23  | Sulfisoxazole                              | -   | - |     |   | -    | - |
| 24  | Tetrachloroethylene                        | -   | - |     |   | -    | + |
| 25  | 2, 5-Toluenediamine sulfate                | -   |   |     |   | -    | - |
| 26  | 2, 6-Toluenediamine                        | -   |   |     |   | -    | - |
| 27  | 2, 4, 6-Trichlorophenol                    | -   | - |     |   | -    | + |
| 28  | L-Tryptophane                              | -   |   |     |   | -    | - |

た。RDS のみを測定するには、オートラジオグラフィ法より短時間で、放射性物質を使わずに済むので有用と考えられる。しかし、作用の弱い化学物質の場合にはオートラジオグラフィ法の方が判定しやすいという意見もある。

### 3. 胃粘膜の UDS と RDS

胃粘膜で液体シンチレーションカウンター法で UDS と RDS を測定するには、ラットに化学物質を経口投与して *in vivo* で作用させた後、胃粘膜を取って細かく刻み、<sup>[3H]</sup>thymidine 存在下で、複製の DNA 合成阻害剤 hydroxyurea 添加と無添加の培養液中で培養する。組織から DNA を抽出して、DNA への <sup>[3H]</sup>thymidine の取り込みを、液体シンチレーションカウンターで測定する。RDS が上昇している場合にはその補正をす

る (Fig. 8) (Furihata and Matsushima, 1982; Furihata *et al.*, 1984; Ohsawa *et al.*, 1993)<sup>20, 21, 59)</sup>。

Table 10 に UDS 誘導の臓器特異性を胃粘膜を中心に示した。例えば、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine は標的臓器の胃粘膜、前胃、大腸共に陽性であり (Furihata and Matsushima, 1987)<sup>20)</sup>、肝癌原物質 2-acetylaminofluorene と dimethylnitrosamine は肝臓では陽性であるが (Sawada *et al.*, 1989)<sup>62)</sup> 胃粘膜では陰性で (Furihata *et al.*, 1982; Ohsawa *et al.*, 1993)<sup>21, 59)</sup>、特異性はかなり良い。

Table 11-13 にラット胃幽門腺部粘膜での UDS と RDS の結果を要約した。34 種類の化学物質について結果が出ていて、UDS と RDS 共に陽性の物質が 10 種類、UDS が疑陽性で RDS が陽性が 1 種類、UDS が疑陽性が 1 種類 (Table 11), RDS

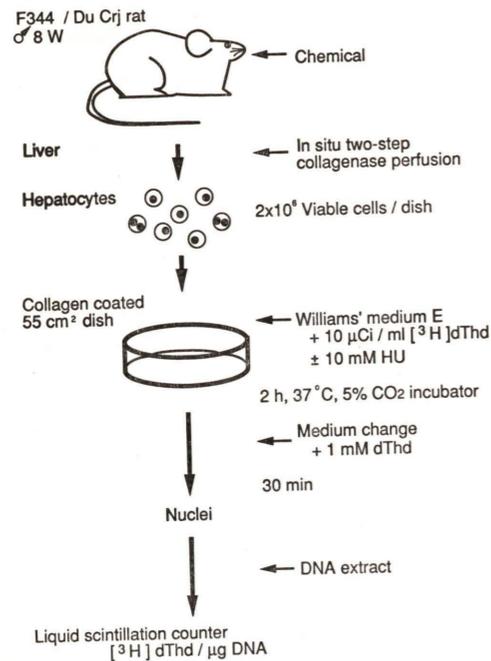


Fig. 4. 肝臓の *in vivo-in vitro* UDS・RDS 法 (液体シンチレーションカウンター法).

のみ陽性の物質が 14 種類 (Table 12), UDS のみが調べられていて陰性の物質が 3 種類, RDS のみが調べられていて陰性の物質が 1 種類, UDS と RDS 共に陰性が 4 種類 (Table 13) である。胃粘

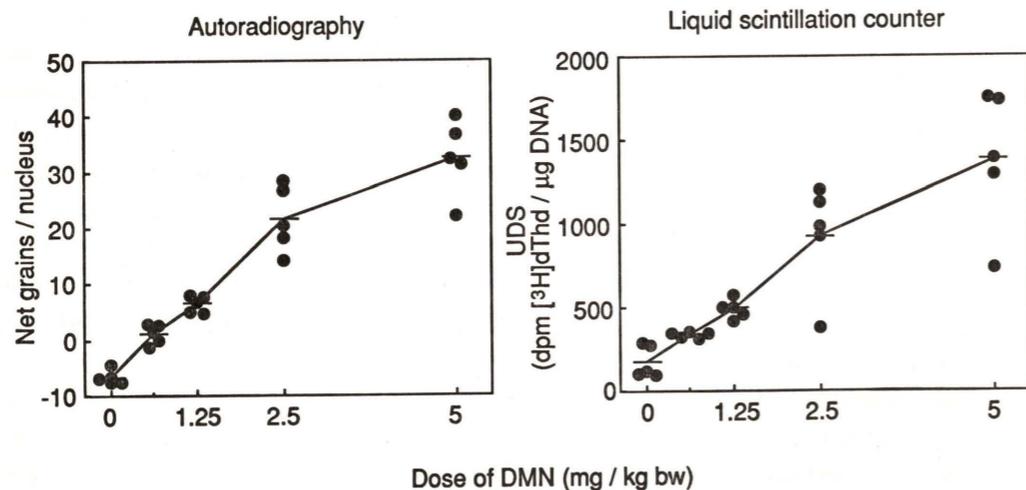


Fig. 5. Dimethylnitrosamine によるラット肝臓の *in vivo-in vitro* UDS 誘導: オートラジオグラフィ法と液体シンチレーションカウンター法の比較 (Sawada *et al.*, 1989)<sup>82)</sup>.

膜でも非変異・癌原物質と考えられている catechol (Furihata *et al.*, 1989)<sup>83)</sup> と p-methylcatechol<sup>41)</sup> は RDS のみ陽性である。

#### 4. おわりに

*in vivo-in vitro* ラット・マウスの UDS と RDS 試験の長所としては、

1. 一つの方法で tumor-initiating activity と tumor-promoting activity を測定できる。
2. RDS 試験は、非変異・癌原物質を *in vivo* で短期間に検索する良い方法である。
3. 化学発癌には臓器特異性があるが、この方法は臓器特異的に調べる方法である。
4. 動物実験発癌の場合も個体差が有るが、この方法は一度に 10-20 頭の動物について調べられるので、個体差を調べられる。
5. UDS は細胞毒性によるのではなく、変異に関係した DNA 傷害である。

短所としては、

1. UDS は変異そのものでなく、変異の傍証的な変化にすぎない。
2. RDS は全ての型の非変異・癌原物質の検索に有効とは考えられない。promoter 型に有効と考えられる。

最近、非変異・癌原物質の検出される数が増加

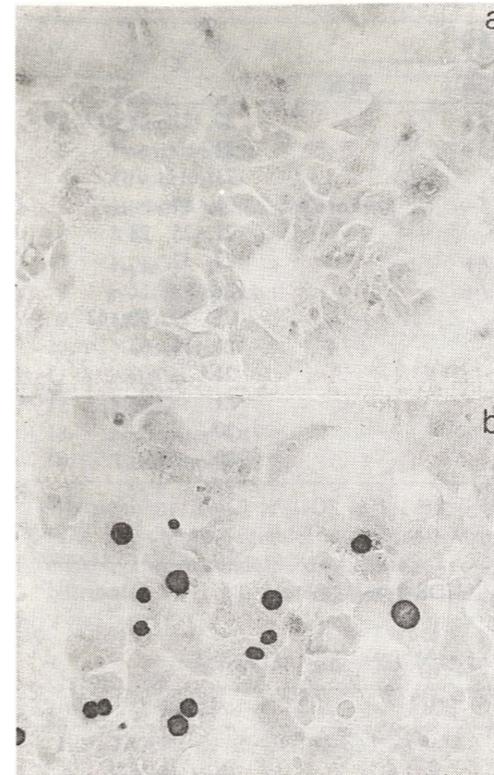


Fig. 6. BrdU 法による S 期細胞の染色: CCl<sub>4</sub> によるラット肝臓の RDS 促進. a), 対照群; b), CCl<sub>4</sub>(400 mg/kg)<sup>82)</sup>.

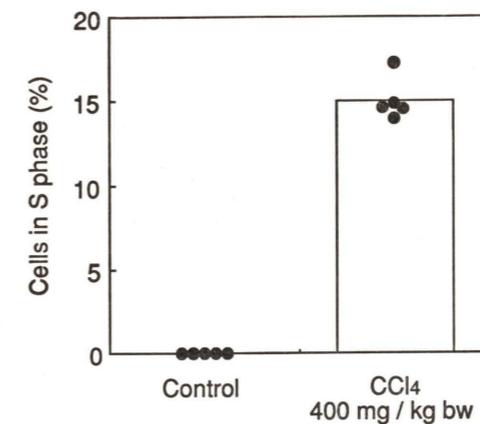


Fig. 7. CCl<sub>4</sub> によるラット肝臓の RDS 促進: BrdU 法<sup>82)</sup>.

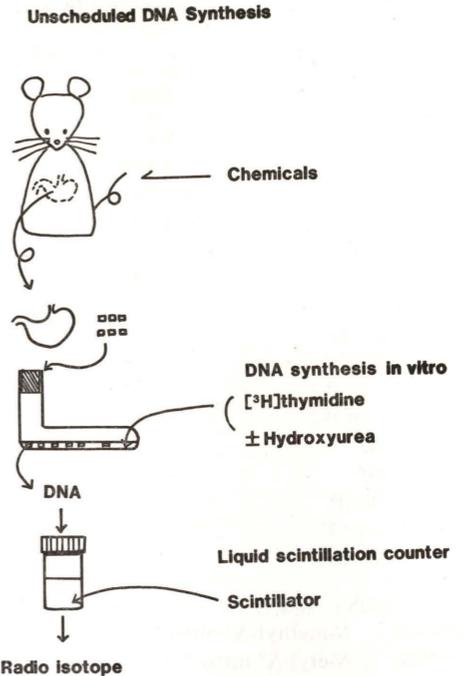


Fig. 8. 胃の *in vivo-in vitro* UDS・RDS 法 (液体シンチレーションカウンター法).

し、以前提出された“癌原物質=変異原物質”の仮説が心ずしも当てはまらなくなってきた。生活環境中の癌原物質を検出して、可能な物質を取り除くためには、非変異・癌原物質の作用機構の解明と、それに基づく試験法の開発は重要課題である。

また、癌遺伝子と呼ばれている“発癌と直接関係する遺伝子群”の構造の変化が次ぎ次ぎと明らかにされている。この研究成果を変異・癌原物質の研究に取り入れる必要がある。

しかしこれらの課題は十分にこなされていない。現状では *In vivo-in vitro* ラット・マウスの UDS と RDS 試験は癌原物質の *in vivo* 短期検索法として有用である。

Table 10. In vivo-in vitro UDS 誘導の臓器特異性

| No. | 化学物質    | UDS 誘導/腫瘍誘発 |       |     |     | 文献                 |
|-----|---------|-------------|-------|-----|-----|--------------------|
|     |         | 腺胃          | 前胃    | 大腸  | 肝臓  |                    |
| 1   | MNNG    | +/+         | +/+   | +/+ |     | 20, 21, 28, 29, 59 |
| 2   | ENNG    | +/+         |       |     |     | 21                 |
| 3   | PNNG    | + -/+       |       |     |     | 21                 |
| 4   | 4NQO    | +/+         |       | -/- |     | 21, 59             |
| 5   | NMUT    | +/+         | +/+   |     |     | 21, 25, 28         |
| 6   | MNU     | +/+         | +/+   | +/+ |     | 29, 37             |
| 7   | MAMAc   |             |       | +/+ |     | 29                 |
| 8   | 2AAF    | -/-         | -/-   | -/- | +/+ | 21, 29, 32, 62     |
| 9   | DMN     | -/-         |       |     | +/+ | 21, 55, 62         |
| 10  | Trp-P-1 | -/-         |       |     |     | 21                 |
| 11  | Trp-P-2 | -/-         |       |     |     | 21                 |
| 12  | IQ      | -/-         |       |     |     | 20                 |
| 13  | NC      | -/-         |       |     |     | 20                 |
| 14  | B[a]P   |             | + -/+ |     |     | 32                 |
| 15  | 4AAF    |             | -/-   |     |     | 32                 |
| 16  | Pyrene  |             | -/-   |     |     | 32                 |

+/+, UDS+/癌原性+; -/-, UDS-/癌原性-; + -/+, UDS±/癌原性+

MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;  
 ENNG, N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;  
 PNNG, N-propyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;  
 4NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide;  
 NMUT, N-nitroso-N-methylurethane;  
 MNU, 1-methyl-1-nitrosourea;  
 MAMAc, methylazoxymethanolacetate;  
 2AAF, 2-acetylaminofluorene;  
 DMN, dimethylnitrosamine;  
 Trp-P-1, 3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido[4, 3-b]indole;  
 Trp-P-2, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4, 3-b]indole;  
 IQ, 2-amino-3-methyl-imidazo[4, 5-f]quinoline;  
 NC, nitrosocimetidine;  
 B[a]P, benzo[a]pyrene;  
 4AAF, 4-acetylaminofluorene

Table 11. ラット胃粘膜で in vivo-in vitro UDS・RDS 陽性の化学物質

| No. | 化学物質                                       | UDS               | RDS | 腺胃癌原性              | 文献         |
|-----|--|-------------------|-----|--------------------|------------|
| 1   | Diacetyl                                   | +                 | +   |                    | 24, 29     |
| 2   | 3-Diazo-N-nitrosobamethan                  | +                 | +   |                    | 30         |
| 3   | ENNG                                       | +                 | +   | +                  | 21, 29     |
| 4   | Glyoxal                                    | +                 | +   |                    | 24         |
| 5   | Hickory smoke condensate+NaNO <sub>2</sub> | +                 | +   |                    | 60         |
| 6   | Methylglyoxal                              | +                 | +   |                    | 23         |
| 7   | MNNG                                       | +                 | +   | +                  | 21, 29     |
| 8   | MNU  | +                 | +   | +                  | 37         |
| 9   | NMUT                                       | +                 | +   | +                  | 21, 29     |
| 10  | 4NQO                                       | +                 | +   | +                  | 21, 29, 59 |
| 11  | Omeprazole                                 | + - <sup>a)</sup> |     | ラット胃底腺部に<br>カルシノイド | 19, 38, 39 |
| 12  | PNNG                                       | + -               | +   | +                  | 21, 29     |

<sup>a)</sup> 1990年に陽性の結果が出たが、1991-1992年に調べた他の数 lot は陰性であった。

Table 12. ラット胃粘膜で in vivo-in vitro RDS 陽性の化学物質

| No. | 化学物質   | RDS | 腺胃癌原性 | 腺胃発癌<br>プロモーター活性 | 文献     |
|-----|--|-----|-------|------------------|--------|
| 1   | CaCl <sub>2</sub>                            | +   |       |                  | 34, 36 |
| 2   | Catechol                                     | +   | +     | +                | 35     |
| 3   | Formaldehyde                                 | +   |       | +                | 31     |
| 4   | Glycocholate                                 | +   |       |                  | 26     |
| 5   | Hickory smoke condensate                     | +   |       |                  | 59     |
| 6   | KCl  | +   |       |                  | 33     |
| 7   | K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | +   |       | +                | 33     |
| 8   | p-Methylcatechol                             | +   | +     | +                | 41     |
| 9   | MX   | +   |       |                  | 40     |
| 10  | Na acetate                                   | +   |       |                  | 33     |
| 11  | NaCl   | +   |       | +                | 22     |
| 12  | NIAN   | +   |       |                  | 27     |
| 13  | Nitrosated OIV                               | +   |       |                  | 1      |
| 14  | Taurocholate                                 | +   |       | +                | 26     |

Glycocholate, NaCl は UDS 陰性。他の化学物質については UDS が調べられていない。

MX, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2-(5H)-furanone;

NIAN, 1-nitrosoindole-3-acetonitrile;

Nitrosated Oiv, Nitrosated *Oroxylum indicum* Vent.

Table 13. ラット胃粘膜で in vivo-in vitro UDS・RDS 陰性の化学物質

| No. | 化学物質               | UDS | RDS | 備考               | 文献     |
|-----|--------------------|-----|-----|------------------|--------|
| 1   | 2AAF               | -   | -   | 非腺胃・癌原物質         | 21     |
| 2   | DMN                | -   | -   | 非腺胃・癌原物質         | 21, 59 |
| 3   | Ethylalcohol       | -   | -   | 非癌原物質            | 33     |
| 4   | Methylhydroquinone | -   | + - | 腺胃発癌プロモーション+     | 41     |
| 5   | Nitrosocimetidine  | -   | -   | Ames 試験陽性, 非癌原物質 | 20     |
| 6   | IQ                 | -   | -   | 非腺胃・癌原物質         | 20     |
| 7   | Trp-P-1            | -   | -   | 非腺胃・癌原物質         | 21     |
| 8   | Trp-P-2            | -   | -   | 非腺胃・癌原物質         | 21     |

## 参考文献

- Anong, T., C. Furihata, W. Rojanapo and T. Matsushima (1992) Genotoxicity and cell proliferative activity of a nitrosated *Oroxylum indicum* Vent fraction in the pyloric mucosa of rat stomach, *Mutation Res.*, 281, 55-61.
- 朝倉省二, 沢田繁樹, 大門弘彦, 降旗千恵 ラット肝臓の不定期 DNA 合成 (UDS) および複製 NDA 合成 (RDS) 誘発における給餌の影響, 第21回日本環境変異原学会大会 要旨, p. 93, 1992.
- Ashby J. and B. Beije (1985) Concomitant observation of UDS in the liver and micronuclei in the bone marrow of rats exposed to cyclophosphamide or 2-acetylaminofluorene, *Mutation Res.*, 150, 383-392.
- Ashby, J., B. M. Elliot, W. Keen and E. Riley (1985) Studies in vivo to investigate the status of 4-N-pyrrolidinylazobenzene as a pure cancer initiating agent to the rat liver, *Cancer Lett.* 27, 115-122.
- Ashby, J., P. A. Lefevre, B. Burlinson and M. G. Penman (1985) An assessment of the in vivo rat hepatocyte DNA-repair assay, *Mutation Res.*, 156, 1-18.
- Ashby, J. and R. Mohammed (1988) UDS activity in the rat liver of the human carcinogens benzidine and 4-aminobiphenyl, and the rodent carcinogens 3, 3'-dichlorobenzidine and Direct Black 38, *Mutagenesis*, 3, 69-71.
- Ashby, J. and P. A. Lefevre (1989) The rat-liver carcinogen N-nitrosomorpholine initiates unscheduled DNA synthesis and induces micronuclei in the rat liver in vivo, *Mutation Res.*, 225, 143-147.
- Ashby, J., R. Mohammed, P. A. Lefevre and L. Bandara (1989) Quinoline: Unsch-

- duled DNA synthesis and mitogenesis data from the rat liver in vivo, *Environ. Mol. Mutagenesis*, 14, 221-228.
- 9) Ashby J., P. A. Lefevre and C. R. Elcombe (1990) Cell replication and unscheduled DNA synthesis (UDS) activity of low molecular weight chlorinated paraffins in the rat liver in vivo, *Mutagenesis*, 5, 515-518.
  - 10) Ashby, J., P. A. Lefevre, H. Tinwell, G. Brunborg, P. Schmezer, B. Pool-Zobel, R. Shanu-Wilson, J. A. Holme, E. J. Soderlund, D. Gulati and J. P. Wojciechowski (1991) The non-genotoxicity of the potent rodent bladder carcinogens *o*-anisidine and *p*-cresidine, *Mutation Res.*, 250, 115-133.
  - 11) Beije, B. and J. Ashby (1985) Use of in vivo-in vitro rat liver DNA repair assay to predict the relative rodent hepatocarcinogenic potency of 3 new azo mutagens, *Carcinogenesis*, 6, 611-615.
  - 12) Bermudez, E., D. Thillery and B. E. Butterworth (1979) The effect of 2,4-diaminotoluene and isomers of dinitrotoluene on unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocytes, *Environ. Mutagenesis*, 1, 391-398.
  - 13) Butterworth, B. E., L. L. Earle, S. Strom, R. Jirtle and G. Michalopoulos (1983) Induction of DNA repair in human and rat hepatocytes by 1,6-dinitropyrene, *Mutation Res.*, 122, 73-80.
  - 14) Butterworth, B. E., E. Bermudez, T. Smith-Oliver, L. Earle, R. Cattley, J. Martin, J. A. Popp, S. Stom, R. Jirtle and G. Michalopoulos (1984) Lack of genotoxic activity of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes, *Carcinogenesis*, 5, 1329-1335.
  - 15) Butterworth, B. E., J. Ashby, E. Bermudez, D. Casciano, J. Mirsalis, G. Probst and G. Williams (1987) A protocol and guide for the in vivo rat hepatocyte DNA-repair assay, *Mutation Res.*, 189, 123-133.
  - 16) Doolittle, D. J., J. C. Sherrill and B. E. Butterworth (1983) Influence of intestinal bacteria, sex of the animal, and position of the nitro group on the hepatic genotoxicity of nitrofluorene isomers in vivo, *Cancer Res.*, 43, 2836-2842.
  - 17) Doolittle, D. J., E. Bermudez, P. K. Working and B. E. Butterworth (1984) Measurement of genotoxic activity in multiple tissues following inhalation exposure of dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 141, 123-127.
  - 18) Doolittle, D. J., G. Muller and H. E. Scribner (1987) The in vivo-in vitro hepatocyte assay for assessing DNA repair and DNA replication: Studies in the CD-1 mouse, *Fd. Chem. Toxic.* 25, 399-405.
  - 19) Evans, H. J. (1991) Letter to the Editor, *Mutation Res.*, 264, 87-88.
  - 20) Furihata, C. and Matsushima, T. (1982) Unscheduled DNA synthesis in rat stomach—Short-term assay of potential stomach carcinogens. Banbury Report, 13, 123-135.
  - 21) Furihata, C., Yamawaki, Y., Jin, S. S., Moriya, H., Kodama, K., Matsushima, T., Ishikawa, T., Takayama, S. and Nakadate, M. (1984) Induction of unscheduled DNA synthesis in rat stomach mucosa by glandular stomach carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.*, 72, 1327-1334.
  - 22) Furihata, C., Y. Sato, M. Hosaka, T. Matsushima, F. Furukawa and M. Takahashi (1984) NaCl induced ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 1027-1032.
  - 23) Furihata C., Y. Sato, T. Matsushima and M. Tatematsu (1985) Induction of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by methylglyoxal, *Carcinogenesis*, 6, 91-94.
  - 24) Furihata, C., S. Yoshida and T. Matsushima (1985) Potential initiating and promoting activities of diacetyl and glyoxal in rat stomach mucosa, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 76, 809-814.
  - 25) Furihata, C. and T. Matsushima (1986) Unscheduled DNA synthesis in rat forestomach stratified squamous epithelium by forestomach carcinogens, *Mutation Res.*, 164, 265.
  - 26) Furihata, C., R. Takezawa, T. Matsushima, M. Tatematsu (1987) Potential tumor-promoting activity of bile acids in rat glandular stomach, *Jpn. J. Cancer Res.*, 78, 32-39.
  - 27) Furihata, C., Y. Sato, A. Yamakoshi, M. Takimoto and T. Matsushima (1987) Inductions of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by 1-nitroindole-3-actonitrile, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 432-435.
  - 28) Furihata, C., S. Yoshida, Y. Sato and T. Matsushima (1987) Inductions of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by glandular stomach carcinogens, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 1363-1369.
  - 29) Furihata, C. and T. Matsushima (1987) Use of in vivo/in vitro unscheduled DNA synthesis for identification of organ specific carcinogens, *CRC Critical Rev. Toxicol.*, 17, 245-277.
  - 30) Furihata, C., A. Yamakoshi, T. Matsushima, T. Kato and K. Kikugawa (1988) Possible tumour-initiating and -promoting activities of 3-diazo-N-nitrosobamethan in rat stomach mucosa, *Mutagenesis*, 3, 299-301.
  - 31) Furihata, C., A. Yamakoshi and T. Matsushima (1988) Induction of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by formaldehyde, *Jpn. J. Cancer Res.*, 79, 917-920.
  - 32) Furihata, C., R. Takezawa and T. Matsushima (1988) Unscheduled DNA synthesis in rat forestomach stratified squamous epithelium, In: *Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens* (J. Ashby et al., eds.) WHO/Cambridge Univ. Press, Vol. 2, pp. 45-47.
  - 33) Furihata, C., A. Yamakoshi, R. Takezawa and T. Matsushima (1989) Various sodium salts, potassium salts, a calcium salt and an ammonium salt induced ornithine decarboxylase and stimulated DNA synthesis in rat stomach mucosa, *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 424-429.
  - 34) Furihata, C., K. Sudo and T. Matsushima (1989) Calcium chloride inhibits stimulation of replicative DNA synthesis by sodium chloride in the pyloric mucosa of rat stomach, *Carcinogenesis*, 10, 2135-2137.
  - 35) Furihata, C., A. Hatta and T. Matsushima (1989) Inductions of ornithine decarboxylase and replicative DNA synthesis but not DNA single strand scission or unscheduled DNA synthesis in the pyloric mucosa of rat stomach by catechol, *Jpn. J. Cancer Res.*, 8, 1052-1057.
  - 36) Furihata, C. and T. Matsushima (1990) Possible antitumor promoter in the glandular stomach: Calcium chloride, In: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis II* (Y. Kuroda and D. N. Shankel eds.), pp. 395-400, Plenum Publishing Co., New York.
  - 37) 降旗千恵, 松島泰次郎 (1990) メチルニトロソウレア (MNU) のラット胃幽門腺部粘膜における潜在性イニシエーター活性とプロモーター活性, 第 49 回日本癌学会総会.
  - 38) Furihata, C., K. Hirose and T. Matsushima (1991) Genotoxicity and cell proliferative activity of omeprazole in rat stomach mucosa, *Mutation Res.*, 262, 73-76.
  - 39) Furihata, C. and T. Matsushima (1991) Reply to Professor Evans, *Mutation Res.*, 264, 89-91.
  - 40) Furihata, C., M. Yamashita, N. Knae and T. Matsushima (1992) Genotoxicity and cell proliferative activity of 3-chloro-4-(di-chloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in rat glandular stomach, *Water Science & Technol.*, 11, 341-345.
  - 41) Furihata, C., S. Oguchi and T. Matsushima (1993) Possible tumor-initiating and -promoting activity of *p*-methylcatechol and methylhydroquinone in the pyloric mucosa of rat stomach, *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 223-229.
  - 42) Joachim, F., and G. M. Decad (1984) Induction of unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocytes by benzidine-congener-derived azo dyes in the in vitro and in vivo/in vitro assays, *Mutation Res.*, 136, 147-152.
  - 43) Kornbrust D. and T. Barfknecht (1985) fabric dyes in the in vitro and in vivo/in vitro rat hepatocyte primary culture/DNA repair assays, *Environ., Mutagenesis*, 7, 101-120,
  - 44) Kornbrust, D. and D. Dietz (1985) Alrclor 1254 pretreatment effects on DNA repair in rat hepatocytes elicited by in vivo or in vitro exposure to various chemicals, *Environ. Mutagenesis*, 7, 857-870.
  - 45) Loury D. J., T. Smith-Oliver, S. Strom, S. Jirtle, R. Michalopoulos and B. E. Butterworth (1987) Assessment of unscheduled and replicative DNA synthesis in hepatocytes treated in vivo and in vitro with unleaded gasoline or 2, 2, 4-trimethylpentane, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 85, 11-23.
  - 46) Mirsalis, J. C. and B. E. Butterworth (1980) Detection of unscheduled DNA synthesis in hepatocytes isolated from rats treated with genotoxic agents: an in vivo-in vitro assay for potential carcinogens and mutagens, *Carcinogenesis*, 1, 621-625.
  - 47) Mirsalis, J. C. and B. E. Butterworth (1982) Induction of unscheduled DNA synthesis in rat hepatocytes following in vivo treatment with dinitrotoluene, *Carcinogenesis*, 3, 241-245.
  - 48) Mirsalis, J. C., T. E., Hamm Jr., J. M. Sherrill and B. E. Butterworth (1982) Roll of gut flora in the genotoxicity of dinitrotoluene, *Nature*, 295, 322-323.
  - 49) Mirsalis, J. C., C. K. Tyson and B. E. Butterworth (1982) Detection of genotoxic carcinogens in the in vivo-in vitro hepatocyte DNA repair assay, *Environ. Muta-*

- genesis, 4, 553-562.
- 50) Mirsalis, J., K. Tyson, E. Loh, J. Bakke, C. Hamilton, D. Spak, K. Steinmez and J. Spalding (1985) Induction of unscheduled DNA synthesis (UDS) and cell proliferation in mouse and rat hepatocytes following in vivo treatment, *Carcinogenesis*, 6, 1521-1524.
  - 51) Mirsalis, J., K. Tyson, E. Loh, J. Bakke, C. Hamilton, D. Spak, K. Steinmez and J. Spalding (1985) Induction of unscheduled DNA synthesis (UDS) and cell proliferation in mouse and rat hepatocytes following in vivo treatment *Environ. Mutagenesis*, 7 (supp 3), 73.
  - 52) Mirsalis, J. C., K. L. Steinmez, J. P. Bakke, C. K. Tyson, E. K. N. Loh, C. M. Hamilton, M. J. Ramsey and J. W. Spalding (1986) Genotoxicity and tumor promoting capabilities of blue hair dyes in rodent and primate liver, *Environ. Mutagenesis*, 8 (supp 6), 55-66.
  - 53) Mirsalis, J. C. (1987) In vivo measurement of unscheduled DNA synthesis and S-phase synthesis as an indicator of hepatocarcinogenesis in rodents, *Cell Biol. Toxicol.* 3, 165-173.
  - 54) Mirsalis, J. C. (1987) Genotoxicity, toxicity, and carcinogenicity of the antihistamine methapyrilene, *Mutation Res.*, 185, 309-317.
  - 55) Mirsalis, J. C. (1988) In: Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens (J. Ashby et al., eds.) WHO/Cambridge Univ. Press, Vol. 2, pp. 45-47.
  - 56) Mirsalis, J. C., C. K. Tyson, K. L. Steinmez, E. K. Loh, C. M. Hamilton, J. P. Bakke and J. W. Spalding (1989) Measurement of unscheduled DNA synthesis and S-phase synthesis in rodent hepatocytes following in vivo treatment: testing of 24 compounds. *Environ. Mol. Mutagenesis* 14, 155-164.
  - 57) Mirsalis, J. C., Personal communication.
  - 58) Mitchel A. D. and J. C. Mirsalis (1984) Unscheduled DNA synthesis as an indicator of genotoxic exposure, In: A. A. Ansari and F. J. de Serres (Eds.), *Single Cell Mutation Monitoring Systems* pp. 165-216, Plenum, New York.
  - 59) Ohsawa, K., C. Furihata, M. Mori, and E. Ikui (1993) Abilities of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, 4-nitroquinoline 1-oxide, dimethyl-nitrosamine, and NaCl to induce unscheduled DNA synthesis, stimulate replicative DNA synthesis, and produce DNA single strand breaks in pyloric mucosa of rat stomach. *Mutation Res.*, 307-319.
  - 60) Ohshima, H., C. Furihata, T. Matsushima and H. Bartsch (1989) Evidence of potential tumour-initiating and tumour-promoting activities of hickory smoke condensate when given alone or with nitrite to rats, *Fd. Chem. Toxic.*, 27, 511-516.
  - 61) Rickert, D. E., B. E. Butterworth and J. A. Popp (1984) Dinitrotoluene: Acute toxicity, oncogenicity, genotoxicity, and metabolism, *CRC Critical Rev. Toxicol.* 13, 217-234.
  - 62) Sawada, S., C. Furihata and T. Matsushima (1989) In vivo short-term assays of repair and replication of rat liver DNA. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 115, 345-350.
  - 63) 沢田繁樹, 朝倉省二, 大門弘彦, 山津清実, 降旗千恵, 未発表.
  - 64) Schmezer, P., B. L. Pool, P. A. Lefevre, R. D. Callander, F. Ratpan, H. Tinwell and J. Ashby (1990) Assay-specific genotoxicity of *N*-nitrosodibenzylamine to the rat liver in vivo, *Environ. Mol. Mutagenesis*, 15, 190-197.
  - 65) Smith-Oliver, T., D. Loury and B. E. Butterworth (1985) Measurement of DNA repair and cell proliferation in hepatocytes from mice treated with di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP), *Environ. Mutagenesis*, 7 (supp 3), 71.
  - 66) Steinmetz, K. L., C. K. Tyson, E. F. Meierhenry, J. W. Spalding and J. C. Mirsalis (1988) Examination of genotoxicity, toxicity and morphologic alterations in hepatocytes following in vivo or in vitro exposure to methapyrilene, *Carcinogenesis*, 9, 959-963.
  - 67) 高沢博修, 宇野芳文, 宮川 誠, 井上由起, 村田妙子, 吉川邦衛 (1992) In vivo-in vitro マウス肝 RDS (複製 DNA 合成) 試験の検討, 第 21 回日本環境変異原学会大会要旨, p. 92.
  - 68) Trueman, R. W. and J. Ashby (1987) Lack of UDS activity in the livers of mice and rats exposed to dichloromethane, *Environ. Mol. Mutagenesis*, 10, 189-195.
  - 69) Uno, Y., H. Takasawa, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata, M. Ogawa and K. Yoshikawa (1992 a) In vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: I. Establishment of a standard protocol, *Toxicol. Lett.*, 63, 191-199, 1992.
  - 70) Uno, Y., H. Takasawa, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata, M. Ogawa and K. Yoshikawa (1992 b) In vivo-in vitro replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: II.

Assessment of judgement criteria, *Toxicol. Lett.*, 63, 201-209, 1992.

- 71) 宇野芳文, 高沢博修, 宮川 誠, 井上由起, 村田妙子, 吉川邦衛 (1992) 第 21 回日本環境変異原学会大会シンポジウムで発表.
- 72) Working, P. K., D. J. Doolittle, T. Smith-

Oliver, R. D. White and B. E. Butterworth (1986) Unscheduled DNA Synthesis in rat tracheal epithelial cells, hepatocytes and spermatocytes following exposure to methyl chloride in vitro and in vivo, *Mutation Res.*, 162, 219-224.

「アジア学術会議(仮称)」の開催決まる

平成5年3月 日本学術会議広報委員会

「アジア学術会議(仮称)」の開催経費を含む日本学術会議の平成5年度予算が決まりましたので、その概要についてお知らせします。

平成5年度日本学術会議予算

日本学術会議の第15期活動計画の大きな柱である「学術研究の国際貢献の重視」の具体的方策の一環として、「アジア学術会議(仮称)」の開催が、平成5年度予算によって実現することとなりました。その内容は、学術研究が環境問題等の諸課題を克服し、人類の繁栄と世界の平和に寄与するとの認識に立って、本年秋に東京で、我が国と地理的・文化的に関係の深いアジア各国を代表する学術研究者が一堂に会して、各国における学術研究の現状、アジア地域

における連携・協力のあり方などに関し意見を交換する場として開催するものです。我が国を含め10か国程度のアジア諸国から、代表者を招へいする予定です。

その他、平成5年度予算では、国際分担金の25団体に対する単価アップが認められ、国際会議の国内開催費については、アジア社会科学、植物科学、太平洋学術、電波科学、純粋・応用物理学、気象・水分、の6国際会議の開催を予定しています。また、世界各地で開催される学術関係国際会議への代表派遣や二国間交流に必要な経費が計上されております。

平成5年度予算概算決定額表は、下記のとおりであります。

(単位：千円)

| 事 項             | 前年度<br>予算額<br>A | 平成5年度<br>予算額<br>B | 比較増<br>△減額<br>C=B-A | 備 考                                     |
|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|---|
| 日本学術会議の運営に必要な経費 | 1,042,482       | 1,095,827         | 53,345              | 対前年度比較<br>105.1%                        |
| 審議関係費           | 248,789         | 265,525           | 16,736              | ○地球圏-生物圏国際協同研究計画<br>(IGBP)シンポジウム、公開講演会等 |
| 国際学術交流関係費       | 198,514         | 221,254           | 22,740              |   |
| 国際分担金           | 67,089          | 74,722            | 7,633               |   |
| 国内開催            | 80,596          | 73,543            | △ 7,053             |   |
| 代表派遣            | 44,006          | 44,006            | 0                   |   |
| 二国間交流           | 6,823           | 6,823             | 0                   |   |
| アジア学術会議         | -               | 22,160            | 22,160              |   |
| 会員推薦関係費         | 21,216          | 19,574            | △ 1,642             |   |
| 一般事務処理費         | 573,963         | 589,474           | 15,511              |   |

日本学術会議第16期会員の推薦について

日本学術会議の会員は、従来、科学者を有権者とする直接選挙によって選出されていましたが、日本学術会議法の一部を改正する法律（昭和58年法律65号）により、第13期（昭和60年7月22日）から、学術研究団体を基盤とする推薦・任命制に改められました。来年7月で、この推薦制度も三期9年を経過することとなります。

この会員選出制度のあらまは、次のとおりです。

- ① 日本学術会議は、一定の要件を備える学術研究団体を、その申請により登録する。
- ② 登録学術研究団体は、その構成員である科学者のうちから、会員の候補者を選定し、及び会員の推薦に当たる推薦人を指名し、それぞれ、日本学術

会議に届け出る。

- ③ 推薦人は、会員推薦管理会がその資格があると認定した会員の候補者のうちから、会員として推薦すべき者及び補欠の会員として推薦すべき者を決定し、日本学術会議を経由して内閣総理大臣に推薦する。
- ④ 内閣総理大臣は、上記③の推薦に基づいて、会員を任命する。
- ⑤ 学術研究団体の登録、会員の候補者の資格の認定その他会員の推薦に関する所要の事務は、日本学術会議に置かれる会員推薦管理会が行う。

以上の概要を第16期（平成6年7月～平成9年7月）の会員選出日程によると、次表のようになり、これに従って今後の事務処理が行われる予定になっています。

日本学術会議第16期会員選出手続日程

|          |                      |   |
|----------|----------------------|---|
| 平成5年     | 5月31日(月)まで           | 学術研究団体の登録申請の締切り                             |
|          | 9月上旬                 | 登録審査結果の通知                                   |
|          | 不登録通知を受けた日の翌日から20日以内 | 不登録通知を受けた団体からの異議の申出受付                       |
|          | 9月上旬                 | 関連研究連絡委員会についての意見聴取*                         |
|          | 10月下旬                | 〈団体関係〉異議の申出に対する決定                           |
|          | 11月30日(火)まで          | 関連研究連絡委員会の指定*                               |
| 平成6年     | 12月上旬                | 会員の候補者の選定及び推薦人の指名の依頼                        |
|          | 1月31日(月)まで           | 会員の候補者の届出の締切り                               |
|          | 2月21日(月)まで           | 推薦人（予備者を含む）の届出の締切り                          |
|          | 3月20日(日)まで           | 会員の候補者の資格の認定等の通知                            |
|          | 3月下旬                 | 推薦人に会議開催等の通知発送                              |
|          | 不認定通知を受けた日の翌日から20日以内 | 会員の候補者の資格の不認定通知を受けた学術研究団体又は会員の候補者からの異議の申出受付 |
|          | 4月20日(水)まで           | 〈会員の候補者関係〉異議の申出に対する決定                       |
|          | 5月中旬から6月上旬まで         | 推薦人会議（会員及び補欠の会員として推薦すべき者を決定）                |
| 6月中旬     | 日本学術会議を経由して内閣総理大臣へ推薦 |   |
| 7月22日(金) | 第16期日本学術会議会員の任命      |   |

注：\*は、日本学術会議会長が意見聴取し、指定する。

日学双書の刊行について

日本学術会議主催公開講演会及び公開シンポジウムの記録をもとに編集した、次の日学双書が刊行されました。

日学双書第15刊 「文明の選択—都市と農業・農村の共存を目指して—」

定価1,000円（消費税込み、送料240円）

日学双書第16刊 「子どもの人権を考える」

定価1,000円（消費税込み、送料240円）

日学双書第17刊 「首都機能の一極集中問題」

定価2,000円（消費税込み、送料310円）

（問い合わせ先）

〒106 東京都港区西麻布3-24-20

交通安全教育センター内

（財）日本学術協力財団

☎03-3403-9788

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

「学術分野における国際貢献についての基本的提言」を採択

平成5年5月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る4月21日から23日まで第116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同総会で採択された「学術分野における国際貢献についての基本的提言」等についてお知らせいたします。

日本学術会議第116回総会報告

日本学術会議第116回総会（第15期・第5回）が、4月21日～23日の3日間にわたって開催された。

総会の初日の午前は、会長からの前回総会以降の経過報告に続いて、各部、各委員会等の報告が行われた。次いで、今回総会に提案されている2案件について、それぞれ提案説明がなされた後、質疑応答が行われた。

午後からも提案案件に対する質疑応答が行われた後、引き続き各部会が開催され、午前中に提案説明された総会提案案件の審議が行われた。

総会2日目の午前は、前日提案された2案件及び緊急に提案された1案件の審議・採決が順次行われた。

まず、「国際対応委員会の改組について(申合せ)」が採択された。これは、学術の国際化の急速な進展に伴い、国際学術団体及び国際学術協力事業への対応の重要性がますます増大してきており、日本学術会議としてもその職務を遂行する上で、学術の国際化に関する状況の迅速かつ的確な把握が不可欠であるという観点から、より広範囲にわたる国際学術情報の収集と、それに基づく適切な対応ができるよう、国際対応組織の充実強化を図るために、必要な措置を講じたものである。

次いで、「学術分野における国際貢献についての基本的提言」が採択された。本件については、日本学術会第15期活動計画の中の重点目標として掲げられており、また、一昨年初の第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、日本学術会議における重要案件として鋭意審議してきたものである。

提言は、1.学術分野における国際貢献の意義、2.学術分野における国際貢献の在り方、3.学術分野における国際貢献を進めるための提案という構成内容になっており、日本学術会議は、今後とも、本提言に基づき、具体的な諸課題について検討していくこととしている。

最後に、上記の提言に基づき、日本学術会議は、国際貢献のための新しいシステムを構築するための具体的方策を直ちに検討し、その速やかな推進を図るという内容の「学術分野における国際貢献についての基本的提言に関する附帯決議」が採択された。

また、「学術分野における国際貢献についての基本的提言」に関する会長談話を22日付けで発表した。

午後からは、現在、常置委員会、特別委員会で審議されている懸案事項について、自由討議が行われた。

総会3日目は、午前は各特別委員会、午後は各常置委員会・国際対応委員会がそれぞれ開催された。

なお、近藤会長が、4月22日に河野内閣官房長官と、また、同27日に宮澤内閣総理大臣とそれぞれ会見し、「学術分野における国際貢献についての基本的提言」を手渡すとともに、同提言について報告した。

学術分野における国際貢献についての基本的提言（抜粋）

（前文略）

1.学術分野における国際貢献の意義

（本文略）

2.学術分野における国際貢献の在り方

（本文略。項目のみ）

- (1) 対等・互惠の原則に基づいた国際学術協力の強化
- (2) 国際学術協力の積極的発議等
- (3) 人材育成への協力による国際貢献の推進
- (4) 我が国の学術情報の提供・紹介の促進
- (5) 学術に関する国際団体への対応強化

3.学術分野における国際貢献を進めるための提案

前節で述べた我が国の学術分野における国際貢献の在り方を踏まえ、これを推進していくために、以下の事項を提案する。

(1) 我が国からの情報提供機能等の充実・強化

① 学会の支援・育成

我が国の学会は、高等教育研究機関や産業界の研究発表の場として重要な役割を果たしてきた。また、研究者相互の活発な国際交流等を通じて、情報の提供に努めているところである。しかしながら、ほとんどの学会は、資金の不足から、必要な活動も十分にできない状況にある。

学術分野における国際貢献という観点において、非政府機関（NGO）としての学会の果たす役割は極めて大きく、それらが有する情報提供機能を最大限に発揮できるよう、学会の支援・育成を図る必要がある。

② アジア地域における学術研究に関する連携の強化

我が国と地理的・歴史的・文化的な関係の深いアジア地域の学術の発展に資するため、アジア地域の科学者や学術研究機関の間の学術研究ネットワークを拡充・強化することが必要である。また、将来的には、アジアの学術振興のための国際的な組織の在り方について、関係各国の科学者と協議していく必

要がある。

(2) 国際学術交流のための支援の充実

① 学術研究機関の整備等

新しい知識の創造と発展は、優れた研究者が集い、切磋琢磨するところから生まれるものであり、研究者の未知への挑戦に対して最も適切な施設・資金・支援システムなどの研究環境を提供することが必要である。したがって、全世界の研究者が日本で研究することに魅力を感じ、充実した研究生活を送れるように、学術研究機関の整備及び適切な運営を図るべきである。

② 来日研究者・留学生への支援の充実

学術分野における国際貢献の第一歩として、各国の人材育成への協力、とりわけ来日研究者・留学生の支援に十分な配慮がなされなければならない。したがって、内外における日本語教育の充実や、来日研究者・留学生の住居、日本人研究者・学生や地域の人々との交流を可能とする交流施設など生活・文化施設の整備・充実は早急に図るべきである。

③ 海外派遣研究者への支援の拡充

国際学術交流は、相手国の国情に応じた総合的配慮の下に行われる必要がある。したがって、その国の研究者との恒常的な連携・協力を維持するとともに我が国からの海外派遣研究者が必要とする各種情報の提供や連絡・調整などでもできる人材の当該国への配置など、海外派遣研究者の支援体制の拡充を検討する必要がある。

(3) 学術分野における国際貢献のための新しいシステムの構築

国際的な学術協力については、我が国においても、既に多くの機関がその努力を重ねているところである。しかしながら、投入されている資金等そのための支援は、質・量ともに、未だ国際的な要求に応える水準にまで達しているとは言えない。しかも、現在個別に推進されている学術協力の相互の連絡・調整は、必ずしも十分ではなく、我が国の総力を挙げてこれを推進しているとは言えない状態にある。

また、今後ますます増えていくと思われる各種の国際的な学術協力プロジェクトの立案や協力、参加、推進については、これまで以上に、科学者の総意を反映しつつ、総合的かつ適切な判断を機動的になし得る場を確保しなければならない。

さらに、我が国が国際的な学術協力のための諸施策を強力に推進するためには、科学者の力のみならず、政府・産業界の協力、更には国民の理解等総合的な支援が必要である。

これらの問題点を改善し、学術分野において国際社会の期待に応える貢献をなし得るように、国民の理解の下に、諸課題の整理、必要な資金の確保・配分等を行う新しいシステム（例えば「学術協力機構」）を構築するなど、今後真剣に検討を進める必要がある。

終わりに

日本学術会議は、人類共通の資産としての学術の発展こそが人類の繁栄と世界の平和の礎となるとの見地から、本提言を取りまとめたものである。

なお、日本学術会議は、今後とも、本提言に基づき、内外の科学者を始め、広く関係各方面の意見を聴きながら、具体的な諸課題について引き続き検討していくことを付言したい。

平成5年(1993年)度共同主催国際会議

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

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

◆第7回太平洋学術中間会議(6月27日～7月3日)

太平洋地域の住民の繁栄と福祉に直接関わる学術上の問題に関する研究を進展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として宜野湾市(沖縄コンベンションセンター、沖縄都ホテル、メルパルク沖縄)において開催される。

参加予定人数500人(国外300人、国内200人)参加予定国数29か国。

◆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(7月11日～23日) 気象学、大気物理学及び陸水・水文科学に関する研究を進展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として横浜市(横浜国際平和会議場)において開催される。

参加予定人数1,500人(国外700人、国内800人)、参加予定国数68か国。

◆第15回国際植物科学会議(8月23日～9月3日)

植物科学に関する研究を進展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として横浜市(横浜国際平和会議場)において開催される。

参加予定人数4,000人(国外1,500人、国内2,500人)、参加予定国数81か国。

◆第24回国際電波科学連合総会(8月23日～9月3日)

電波科学に関する研究を進展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として京都市(国立京都国際会館)において開催される。

参加予定人数1,200人(国外800人、国内400人)、参加予定国数49か国。

◆アジア社会科学研究協議会連盟第10回総会

(9月5日～11日)

アジア・太平洋地域における社会科学の教育、研究、訓練及び普及を促進するため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として川崎市(かながわサイエンスパーク)において開催される。

参加予定人数120人(国外60人、国内60人)、参加予定国数17か国。

◆第21回国際純粋・応用物理学連合総会(9月20日～25日) 物理学を進展させるため、討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として奈良市(奈良県新公会堂)において開催される。

参加予定人数300人(国外150人、国内150人)、参加予定国数41か国。

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291(代)

日本環境変異原学会会則

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

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

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

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

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

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

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

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

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

評議員は正会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。

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

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

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

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

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。

会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

附 記

1. 本会則は平成2年1月1日より施行する。
2. 本会は事務所を静岡県三島市谷田1,111番地に置く。
3. 正会員、学生会員および賛助会員の会費は、それぞれ年額5,000円、3,000円および1口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    | 洪 谷 徹   |
| 国際交流幹事  | 長 尾 美奈子 |
| 編集幹事    | 佐 藤 茂 秋 |
| 会計監査    | 松 下 秀 鶴 |
| 〃       | 乾 直 道   |
| 賞等選考委員  | 祖父尼 俊 雄 |
|         | 菊 池 康 基 |
|         | 渡 部 烈   |
|         | 佐々木 正 夫 |
|         | 若 林 敬 二 |
| 編 集 委 員 | 島 田 弘 康 |
|         | 後 藤 純 雄 |
|         | 菊 川 清 見 |
|         | 林 真     |
|         | 田 中 憲 穂 |
| 企 画 委 員 | 大 西 克 成 |
|         | 菊 池 康 基 |
|         | 若 林 敬 二 |
|         | 山 添 康   |

日本環境変異原学会平成4～5年評議員名簿

(五十音順)

| 氏 名     | 所 属                |
|---------|--------------------|
| 大 西 克 成 | 徳島大学医学部            |
| 加 藤 隆 一 | 慶応義塾大学医学部          |
| 鎌 滝 哲 也 | 北海道大学薬学部           |
| 菊 川 清 見 | 東京薬科大学薬学部          |
| 菊 池 康 基 | 武田薬品工業(株)研究開発本部    |
| 黒 田 行 昭 | 麻布大学生物科学総合研究所      |
| 後 藤 純 雄 | 国立公衆衛生院            |
| 佐々木 正 夫 | 京都大学放射線生物研究センター    |
| 佐 藤 茂 秋 | 神戸大学医学部            |
| 洪 谷 徹   | (財)食品薬品安全センター秦野研究所 |
| 島 田 弘 康 | 第一製薬(株)中央研究所       |
| 清 水 英 佑 | 東京慈恵会医科大学          |
| 須 藤 鎮 世 | 伊藤ハム(株)中央研究所       |
| 祖父尼 俊 雄 | 国立衛生試験所            |
| 武 部 啓   | 京都大学医学部            |
| 田 中 憲 穂 | (財)食品薬品安全センター秦野研究所 |
| 常 盤 寛   | 福岡県衛生公害センター        |
| 長 尾 美奈子 | 国立がんセンター研究所        |
| 西 岡 一   | 同志社大学工学部           |
| 林 真     | 国立衛生試験所            |
| 早 津 彦 哉 | 岡山大学薬学部            |
| 松 島 泰次郎 | 日本バイオアッセイ研究センター    |
| 山 添 康   | 慶応義塾大学医学部          |
| 吉 川 邦 衛 | 三菱化成工業(株)総合研究所     |
| 若 林 敬 二 | 国立がんセンター研究所        |
| 渡 部 烈   | 東京薬科大学             |

## 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。

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実を含むものとする。

「短報」は、新しい事実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. 論文の送り先

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。

日本語の場合: 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。表には縦罫を使用せず、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ってする。

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

貴学会に入会いたしたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

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

|                   |                 |
|-------------------|-----------------|
| 所属機関<br>部局<br>職名  | (和)             |
|                   |                 |
|                   | (英)             |
|                   |                 |
| 所属機関<br>所在地       | 〒 電話 内線 ( ) FAX |
|                   | (和)             |
|                   | (英)             |
|                   |                 |
| 自宅<br>住所          | 〒 電話 内線 ( ) FAX |
|                   | (和)             |
|                   | (英)             |
|                   |                 |
| 会誌送付先 ① 所属機関 ② 自宅 |                 |

|         |       |      |   |
|---------|-------|------|---|
| 学 部     | 学部学校名 | 卒業年次 | 年 |
| 歴 大 学 院 | 課程学校名 | 修了年次 | 年 |
| 学 位     |       | 取得年  | 年 |

研究領域 (下記にあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)

- |          |          |             |         |          |
|----------|----------|-------------|---------|----------|
| 1. 変異原   | 2. 検出系   | 3. 毒性       | 4. 発生異常 | 5. 汚染    |
| 6. 疫学    | 7. 遺伝    | 8. がん       | 9. 微生物  | 10. 高等動物 |
| 11. 高等植物 | 12. 食品   | 13. 気体・粉じん  | 14. 医薬品 | 15. 農薬   |
| 16. 代謝   | 17. 分子機構 | 18. その他 ( ) |         |          |

研究歴 (現在行っている研究の動向や興味のポイントについて数行記入のこと)

加入学会名 (本学会以外の)

推薦者 (日本環境変異原学会評議員)

氏名 (署名) ㊟

入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

# 住所・所属等変更届

平成 年 月 日

日本環境変異原学会  
事務局 御中

下記変更がありましたのでお届け致します。

|      |   |
|------|---|
| フリガナ |   |
| 氏名   | 印 |
| 旧所属  |   |

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

環境変異原研究 第15巻 第1号 1993年

平成5年9月10日 印刷

平成5年9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