

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications



Vol.15 No.2 1993

環境変異原研究

第15巻 第2号 1993年

目 次

「F. H. Sobels 先生を偲ぶ」

Sobels 先生を悼む	早津彦哉.....	185
Sobels さんの思い出	田島弥太郎.....	187
F. H. Sobels さんの思い出	近藤宗平.....	189
ソーベルス先生と私	藤川和男.....	191

日本環境変異原学会主催第4回公開シンポジウム

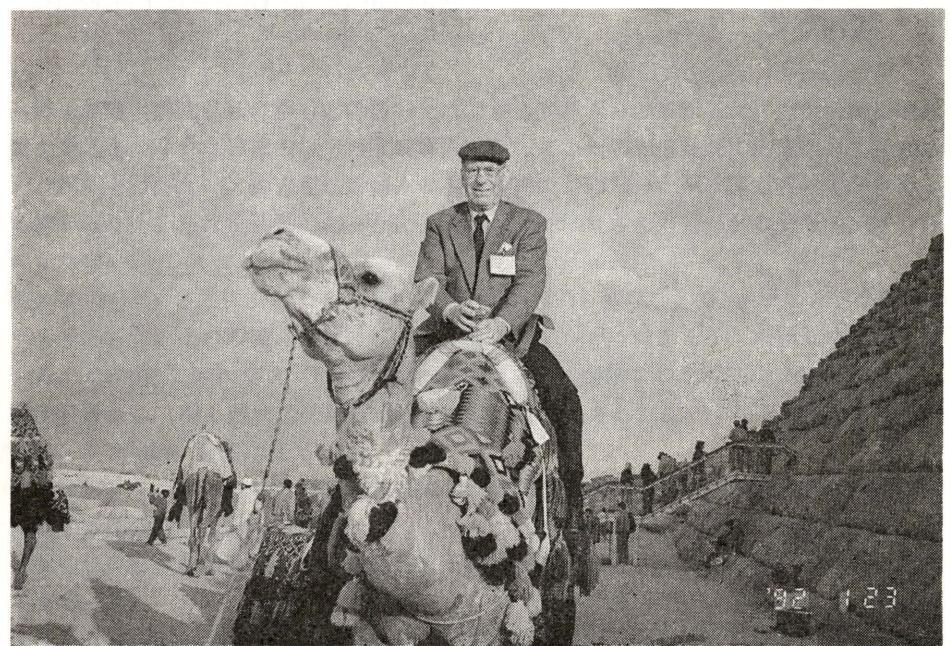
「発がん物質の検索法」

第4回公開シンポジウム特集号の発刊によせて	山添 康.....	193
ヒトが曝露される環境変異源とその抑制因子—ポルフィリンによる		
多環性発がん物質の捕捉	早津彦哉, 有元佐賀恵, 根岸友恵.....	195
環境変異原検出系・評価系の開発	能美健彦.....	203
癌原物質による癌遺伝子の活性化	長尾美奈子.....	213
変異原・癌原物質の活性化と個体差		
鎌滝哲也, 横井 肇, 中島美紀, 澤田 稔.....	219	
代謝酵素遺伝子の異常と発癌リスク	川尻 要.....	225
細胞周期と癌遺伝子	田矢洋一.....	233
日本学術会議だより (No. 30, 31, 32).....		241

付記

日本環境変異原学会 会 則.....	247
" 役員名簿.....	248
" 評議員名簿.....	249
" 投稿規定・執筆規定.....	250
" 入会申し込み書.....	252
" 住所・所属等変更届.....	254
広告.....	255

「F. H. Sobels 先生を偲ぶ」



(1992年1月カイロにて、田島弥太郎先生提供)

In Cairo; January, 1992 (photo donated by Prof. Y. Tajima)

1993年7月6日、オランダ、ライデン大学 F. H. Sobels 教授が亡くなられた。享年71才であった。ここに深く哀悼の意を表する。Sobels 博士は、日本環境変異原学会の名誉会員であり、本会の発展のために蔭になり日向になり大きな貢献をされた方である。皆よく知っているように、Sobels 博士は Mutation Research 誌を創設され、長年その編集長として努力された。変異原研究の今日の世界的な隆盛を招いた功績の大きな部分が Sobels さんにあると言ってよい。私達日本環境変異原学会のメンバーとしても、人類、地球の健全な存在に深く関連しているこの研究分野の発展に尽くすことをもって、Sobels さんのご努力に応えたいと考えるものである。

早津彦哉（岡山大学薬学部；1992年—1993年 日本環境変異原学会会長）

Obituary: 'In Memory of Professor F. H. Sobels'

Professor F. H. Sobels of the State University of Leiden, the Netherlands, passed away on July 6, 1993, at his age of 71. He has been an honorary member of the Environmental Mutagen Society of Japan and has done a great deal for the benefit and development of our Society. As we all know, Prof. Sobels founded the journal, Mutation Research, and has acted as the Editor-in-Chief of this eminent journal for a long period of time, thereby contributing very

much for the present-day flourishing of the scientific activity of this field. We mourn the loss of this great master of science and would like to further endeavour at the advancement of environmental mutagen studies.

Hikoya Hayatsu (1992–1993 President of the Environmental Mutagen Society of Japan, Professor of the Okayama University)

環境変異原研究 15: 187–188 (1993)

Sobels さんの思い出

田島 弥太郎

Sobels 博士急逝の通知が私の手もとに届いたのは去る 8 月 6 日の事だった。遺伝研から回送されて来た手紙を見ると、7 月 6 日死去、7 月 9 日葬儀となっていた。死去後既に約 1 ヶ月も経過し、今更弔電という訳にも行かない。夫人宛にお悔みの手紙を書いたのだったが、何と言ってお慰めしてよいか言葉も浮かばない。あれ程活動的だった、人の良い Sobels さんの姿が私の脳裏につぎつぎと浮んで文章にならない。

私が初めて Sobels さんに会ったのは今から 40 年前、1953 年のことだ。エディンバラの Auerbach 先生のラボであった。その時撮った彼の写真が今も私のアルバムにあるが、前額部は既に 4 割方禿げ上っている。この時 Sobels さん 31 才、私は 40 才だった。当時このラボには Muller 先生の愛弟子 Oster 博士が居たし、少し遅れて仲尾善雄博士もここで勉強された。いずれも頭髪がうすく、Auerbach 門下の 3 brights と呼ばれていた。

この年私はイタリヤのベラジオで開かれた第 9 回国際遺伝学会議に日本学術会議から派遣され、その機会に欧米各国歴訪の途中であった。ベラジオで Auerbach 先生に始めてお目にかかった時、エディンバラの研究所にお邪魔したいとお願いした所、蚕のモザイクに興味を持っていた先生は即座に快諾して下さった。

約束通り 9 月 25 日 King's Buildings に先生をお訪ねすると、先生は大喜びで、午前中は各研究室を案内して、若い研究者や学生達に紹介して下さった。午後は 2 時から先生の部屋で議論を始めて、大方 5 時近くまでかかったろうか。帰り際に Sobels さんに挨拶に立寄ると、「一体彼女は蚕を飼う気かな」と丸い眼玉を一層丸くして大きな驚きを示した。

それから話はとぶが、1962 年第 2 回国際放射線会議が英国ハロゲートで開催された。それを機会に Sobels さんは各国の遺伝学者約 40 名程を招いて、ライデン大学で、国際シンポジウム “Genetic Radiation Damage and Different Radiosensitivity in Germ Cells” を開催した。会期は 8 月 15 日～19 日の 5 日間、話題提供者は 17 名で私もその 1 人であった。座長は半日交替で、6 部会。他に Muller 博士の特別講演があった。毎晩レセプション、最後の日はバスでオランダの田舎の観光を楽しんだ。至れりつくせりの歓待で、参加者一同すっかり親しくなった。

この会議で Sobels さんは新しい学術雑誌 Mutation Research 発刊の計画について参加者一同に意見を求めた。Auerbach 先生は「また雑誌が一つ増えるのは賛成できない」という意見だったが、どうして刊行して見ると投稿はおすなおすなの盛況だった。いま年度別の発行ページ数を調べて見ると、1964 年の第 1 卷は 333 ページ、1967 年の第 4 卷は 892 ページ、1969 年には第 7 卷、第 8 卷と 2 卷発行、併せて 1182 ページとなり、1973 年には本誌だけで 4 卷 1636 ページの他に新たに Environmental Mutagenesis Section(青版) 1 卷 372 ページを発行するに至った。さらにその後紫版(Reviews in Genetic Toxicology)、赤版(Genetic Toxicology Testing)なども別巻として発行されるに至り、1 年間に 2000 ページを越す大雑誌に成長した。これを見ても Sobels さんの時代を読む目の確かさと精力的な活動振りには驚くほかない。

いつの事だったか記録がさがし出せないが、私は Sobels さんのお宅に招かれたことがある。奥行きの深い建物で長い廊下の窓際寄りに、長卓が続いて置かれその上に数々の皿や花瓶などの焼き物が



(1981年、第3回国際環境変異原学会にて、田島弥太郎先生提供)

いっぱい飾ってあった。全部中国産のもので敵父のコレクションだという。この晩は Faula 夫人のおもてなしで、夜ふけまで楽しく語り合った。

Sobels さんが日本へ来られたのは私の記憶が誤りなければ 3 回だったと思う。初回は 1968 年、東京で第 12 回国際遺伝学会議が開かれた時で、その後京都で菅原教授が主催した“放射線および放射線作用類似物質の遺伝的影響”シンポジウムでも講演されている。その時遺伝研でも講演をお願いしたが、まず最初長崎出島の錦絵のスライドが出て、日本とオランダの友好の歴史から話に入ったのを思い出す。2 度目は 1981 年で第 3 国際環境変異原会議で副会長をつとめられた。講演は ICPEMC の活動状況について語られた。その時、Oftedal, Sobels, 田島, Bridges の 4 人でとった写真を私は今大切に保存している。3 回目は 1984 年、私が主催した日産シンポジウム“化学変異原の作用に閾値はあるか”の時で、「遺伝毒性物質のリスク評価と閾値の問題」という題で話された。

今秋の日本環境変異原学会には Sobels さんの招待講演が予定されていることを知り、私は再会できる日を楽しみにしていたのであるが、その日を待たず逝去されたことは何とも残念である。昨年 12 月配達された X マスカードにはピラミッドを背景に駱駝の背にまたがった Sobels さんが嬉しそうな、恥かしそうな顔をしている写真が貼ってあった。これが私の記憶に残る Sobels さんの最後の面影となってしまった。

(1993. 10. 12)

F. H. Sobels さんの思い出

近畿大学原子力研究所 近藤宗平

これからの活躍が期待されていたソーベルさんの訃報は、先日の遺伝学会で、田島弥太郎先生から伺って、びっくりした。

ソーベルさんからの手紙を探したが、整理のわるい私は、ほとんど失っている。Mutation Research のレフェリーになる要請をうけたものをおみせする。手紙の日付は、1973 年 9 月 27 日、国際 EMS 旗揚げのアシロマーシンポジウムを礼賛した文面が懐かしい。

レター紙の上左の印刷から分かるように、ソーベルさんは、放射線遺伝学の方が本職であった。国連原子放射線科学委員会 (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) の委員を長年務めた。しかし、実務はインド出身の K. Sankaranarayanan を雇ってまかせていた。1977 年の国連報告では、ベルギー代表委員になっている。大物科学者の片鱗が伺える。1973 年に国際 EMS が設立されたときは、会長は A. Hollaender, 副会長 F. H. Sobels で私は経理担当を仰せつかった。

1978 年 11 月 16 日付けのものは、ソーベルさんからのお叱りと楽しみの便りであった。「親愛なる近藤教授：数年前貴殿が提唱したように、ショウジョウバエを用いて、違った遺伝的 endpoints を用いるテスト系の技術に関するワークショップを、ライデンで開催する。日本から誰も応募していない。ぜひ参加して欲しい。(中略) この間ダブリン(欧洲 EMS の折に)では、絶好の快晴の午後一緒に古代石器遺跡を見学したときの楽しみを思いだしている。」ダブリンでは、珍しく奥さん・娘さん同伴で、私をその中に加えて、家族の一員並に田園のドライブにさそってもらった。訪問した巨石文明遺跡と共に、このときの思い出が昨日のように蘇ってきた。ソーベルさんの冥福を祈りつつ筆をおく。

追伸：ソーベルさんとは、覚えてるだけでも、日本や米国で 10 回以上会っている。しかし、ソーベルさんに奥さんが同伴されていた記憶がない。従って、ダブリンで開催された欧洲 EMS の折に、奥さんにお会いできた上にソーベル一家の旅行に招待されたのは、いま考えると特別に暖かいものでない。であった。

1994 年 3 月 15 日、カリフォルニア大学デービス分校の遺伝学名誉教授 M. M. グリーンさんと、8 年ぶりに、近畿大学の私の研究室で、懐旧談に及んだおり、ソーベルさんの話になった。そこで、グリーンさんに、「奥さんはなぜソーベル教授が海外に旅行するとき同伴しないのか、知っているなら、教えてほしい」と頼んだ。次のような返事をもらった。「ほんとかどうか知らないが、奥さんが、ある時、占い師に運勢を見て貰ったら、ソーベル教授の海外旅行に同伴すると大きな不幸にあうだらうと言われたからと聞いている。奥さんは名門の出身でお金持ちである。」

MUTATION RESEARCH

International Journal on Mutagenesis, Chromosome Breakage and Related Subjects

環境変異原研究 15: 191-192 (1993)

Prof. Dr. F. H. Sobels
Department of Radiation Genetics and
Chemical Mutagenesis
Wassenarweg 62
Leiden, The Netherlands

Professor S. Kondo
Dept. of Fundamental Radiology
Faculty of Medicine
Osaka University
Kita-ku
OSAKA
Japan 530

mr 73/873

September 27, 1973

Dear Professor Kondo,

We would be greatly honoured if you were willing to serve on the Editorial Board of the journal "Mutation Research". Members of the Editorial Board are requested to review papers in their own field, from time to time, and since Prof. Rörsch is taking the responsibility for the papers in the field of microbiology, he will then contact you for this. Further, we always appreciate it if members of the Editorial Board stimulate their co-workers and other workers in the field of mutation studies to publish in the journal.

I hope you are willing to accept this invitation, and if so, I will notify Elsevier Publishing Company, with the request to mention your name on the cover of Mutation Research, and send you a complementary copy of the journal.

It was a great pleasure to see you again at the time of the Asilomar Meeting, which I thought was really excellent.

With warmest personal regards,

sincerely yours,



F.H. Sobels

ソーベルス先生と私

近畿大学原子力研究所 藤川和男

今から20年ほど前、広島大学動物学教室の片隅で、大学院生の私は、ライデン帰りの稻垣栄一博士の指導のもと、ショウジョウバエの放射線遺伝学の研究を始めた。当初与えられたテーマは Muller 学派の仕事の延長線上にあったが、稻垣博士の影響もあって、F. H. Sobels 教授の率いるライディングループの研究にも早くから親しんだ。とりわけ、ハエの生殖細胞のX線感受性と前突然変異損傷からの回復に関する60年代の一連の研究から、突然変異頻度の変異要因を解析する仕事の楽しさを学んだ。自分でも実際に楽しむため、学位論文のテーマに卵母細胞の放射線感受性の問題をとりあげた。ライデン色の濃い論文ができた。Sobels 先生のお名前は、教科書代わりに愛読した "Recovery from Genetic Radiation Damage" (1963, Pergamon Press) の編者としても、努力目標として投稿をめざした Mutation Research 誌の主幹編者としても、私の脳細胞に刷り込まれた。当然、処女論文は Mutation Res. 誌に出した。レフェリーの一人は C. Auerbach であった。受理の通知が先生から届いたとき、天にものぼる気持ちだった (1975)。かくほどさように、先生は大学院生の私にとって大きな存在だったので、後に知遇を受けても、とてもフリッツとは呼べなかった。

自然突然変異の大部分はトランスポゾンによる。トランスポゾンによる突然変異生成に放射線や化学変異原はほとんど影響しない。したがって、自然突然変異率を倍加する量で変異原の遺伝的リスクを推定する方法はよくない。これは、1980年以降、先生が繰り返し主張してきたことである。時をほぼ同じくして、私もトランスポゾン挿入変異の研究を始めた。その初期の成果は 1981 年の国際環境変異原会議（東京）のワークショップで発表した。そこで初めて先生とお会いした。大きくて暖かい手だった。高級和紙に印刷された名刺では「ソーベルス」となっていたが、私は「ソーベルス」先生で通した。「先生」もセンセであった。これは標準語が苦手な私が親しみを込める時のくせである。先生の日常会話は時として全く理解できなかった。英語を母語とする友人もそうだったので、自分の英語ヒアリング能力の低さを呪わずにすんだ。ある時、先生は小さな手帳に細かい字でメモを取りながら、私の話に耳を傾けてくださった。とても恐縮した。1988年、国際抗変異原・抗発がん会議（大仁）の折、ホテルの自室に私を招き入れて、先生の主張の根拠となる実験結果を講義してくださった。膝を接していたにもかかわらず、隣室まで響くかと思われるほど大きな声であった。私の左手にはいただいた論文別刷 (Sobels, F. H. and J. C. J. Eeken, 1988, Banbury Report 30, pp. 195-207, Cold Spring Harbor Laboratory) があった。右手にはグラスがあった。喉が焼けるほど強いウイスキーであった。先生に勧められたとはいえ、グラスを持っていたのはまずい。右手には鉛筆を持っておくべきだった。私は他人の研究の話を聴く際の真摯な態度を先生から学んだはずだ。その夜、小さな料亭の狭い座敷で海の幸を楽しんだ。先生と親しくお話をした最後になった。

先生は日蘭交流史に詳しかった。長崎にご一緒する約束をした。しかし、今となっては、こんな約束はどうでもいい。先生は放射線の不分離誘発効果にいき値がないことを証明された (1970) が、私は、別の作用原を用いて、いき値があるかもしれない不分離誘発の仕事を最近始めた。その話を聴いてもらえないことが悲しい。ソーベルス先生のご冥福を祈る。合掌。

活性酸素の生物作用

環境因子により生成する活性酸素は、生体に何を起こすか？

日 時／平成6年5月26日(木)・27日(金)

場 所／産業医科大学ラマツィーニホール(小ホール)

北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号 TEL 093-603-1611

1. 基調講演

がん化過程と活性酸素

杉 村 隆 (国立がんセンター癌・名医研究)

2. 特別講演

Professor Arthur P. Grollman
(State University of New York at Stony Brook)

Dr. Michael G. Simic
(Center for Radiation Research in USA)

3. シンポジウム

(1) LバンドESRを用いた生体ラジカルの挙動解析 内 海 英 雄 (昭和大・薬)

(2) 環境因子による活性酸素生成とその反応性

DNA中のヒドロキシアミンの生成
ディーゼル微粒子による呼吸器疾患
DNA損傷機構と生物作用

葛 西 宏 (昭和大)
鶴巣井 勝 (国立環境研)
桑 原 幹 典 (北大・醫科)

(3) 癌と活性酸素

癌におけるNORの役割
放射線癌と活性酸素

江 角 浩 安 (国立がんセンター癌・支所)
伊 藤 明 弘 (北大・原医研)

(4) 活性酸素関連遺伝子とその調節

遺伝子損傷とその制御
SoxRS遺伝子の発現
ADF/thioredoxinの発現

米 井 篤 治 (東大・理)
布 柴 達 男 (ハーバード大・公衆衛生)
淀 井 淳 司 (東大・ウイルス研)

(5) 生理機能における活性酸素の作用

セカンドメッセンジャーとしての活性酸素
低線量放射線とSOD

野 瀬 清 (昭和大・薬)
山 岡 聖 典 (東中研・原子力)

(6) 活性酸素に対する生体防御

突然変異の抑制
放射線に対する生体内防御機構

関 口 瞳 夫 (九大・生醫研)
松 原 純 子 (東大・薬)

4. 一般発表(ポスター)

発表申込方法…演題、演者、所属及び要旨(8頁)を、産業医大・葛西 宏宛お送り下さい。

発表申込締切…平成6年3月31日

●参加希望者は産業医大・葛西 宏宛、葉書またはファックスでお申し込み下さい。
参加申込締切…平成6年2月28日

●参加費…1,000円(要旨集代を含む)
●懇親会…5月26日 産業医科大学・龍ヶ池会館

主催／日本環境変異原学会・日本放射線影響学会
後援／放射線影響協会

世話人

葛 西 宏 (産業医科大学・産業生態科学研究所・職業性腫瘍学)
湯 川 脩 身 (放射線医学総合研究所・生物研究部)

連絡先

〒807 北九州市八幡西区医生ヶ丘1番1号
産業医科大学・産業生態科学研究所・職業性腫瘍学 葛 西 宏
TEL 093-691-7468 FAX 093-601-2199

第4回公開シンポジウム特集号の発刊によせて

シンポジウム世話人 慶應義塾大学医学部薬理 山 添 康

平成5年5月17日(月)に、日本環境変異原学会主催による第4回公開シンポジウム「ヒト環境発癌リスクの検出と評価」がヤクルトホール(東京・新橋)にて開催された。本学会の早津彦哉会長を始め、関連分野においてご活躍の6名の先生方に講演いただきました。この誌面をお借りして厚く御礼申し上げます。本学会員を初めとする多くの研究者によってヒトの環境に含まれる発癌物質のリスクが我々の健康に対する重要な問題として取り上げられて来ましたが、このリスクを精度良く検出し、評価するには多くの解決すべき問題が山積しています。この機会にシンポジウムの内容が本誌に特集号として掲載されることは、本シンポジウムに参加できなかった会員だけでなく、参加した学会員にとっても今後の研究を進めるうえに有益となるものと確信いたしております。

ヒトが曝露される環境変異原とその抑制因子— ポルフィリンによる多環性発がん物質の捕捉

岡山大学薬学部 早津彦哉, 有元佐賀恵, 根岸友恵

1. はじめに

ヒトの発癌には環境因子がその原因の大部分を占めていると考えられている。発癌は遺伝子の病気であり、突然変異の集積で起るとされている。ヒトの発癌の原因と見なされる変異抑制遺伝子の失活の発見が最近相次いでなされ、話題となっている (Marx, 1993; Radman and Wagner, 1993; Culotta and Koshland Jr., 1993)。とくに、200人に1人という高率で存在するミスマッチ修復欠陥変異は、大腸がん、子宮、卵巣がんに至るリスクファクターであることがごく最近見出され、DNA上の誤った塩基を直せなくなることが発癌へのスタートであることが示されたことは興味深い (Radman and Wagner, 1993)。これらのこととはヒトが変異原に曝されていることが発癌への道程であり、それを防ぐことががん予防になることを示している。

ヒトが環境の変異原に曝露される主要な一般的経路は食事であり、従って食事中の変異原が重要な研究対象となる。また一方、食事中には、抗変異原性因子が含まれていると信じられており、そのような抑制因子について調べることも重要である。食物の中の変異原や修飾因子については最近の著書 (Hayatsu, 1991) に詳しくまとめられているが、本稿ではこれらのうち著者ら自身の研究成果であるポルフィリンによる多環性発がん物質の捕捉作用について、最近の成果も含めて紹介したい。

2. ヘテロサイクリックアミンなどの多環性変異原物質に対するヘミンの抑制作用

ヘムはヘモグロビンやミオグロビンの分子中に1分子含まれている。その分子中のポルフィリン部分の共軛系が光吸収をするため赤色を呈する。ヘム部分を安定に取り出すことは困難であり、安定化合物として分離されるのは塩素をつけた「ヘミン」である (Fig. 1)。ヘミンが Trp-P-2, Glu-P-1, benzo(a)pyrene の *Salmonella typhimurium* への変異原性を阻害することをわれわれは見出した (Arimoto *et al.*, 1980a, b)。これらの他にも、3環あるいはそれ以上の多数の環が縮合した形の多環化合物、例えばアフラトキシン Bl, に対してヘミンは変異原性抑制作用を持つが、それ以外の少環あるいは非環状変異原、例えば MNNG や 4NQO に対しては抑制作用を持たない (Arimoto *et al.*, 1980b)。抑制の作用点は 2つ考えられる。1つは Trp-P-2 などの promutagens の代謝活性化のステップであり、もう1つは活性化された変異原が細胞 DNA に変異を誘導するステップである。

Trp-P-2 についてみると、それが S9 で N-水酸化を受けるステップをヘミンは阻害する (Fig. 2) (Arimoto and Hayatsu, 1989)。また、もし Trp-P-2 の水酸化が起こったとしても、その生成物である Trp-P-2(NHOH) の持つ直接変異原性はヘミンによって強く阻害される (Table 1)。Trp-P-2 以外の3つのヘテロサイクリックアミンについても、それらの活性化型はヘミンの変異原性阻害を

〒700 岡山市津島中 1-1-1

Suppressing factors against human exposure to environmental mutagens—Entrapping of carcinogenic polycyclic compounds by porphyrins.

Hikoya Hayatsu, Sakae Arimoto and Tomoe Negishi

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima, Okayama 700, Japan

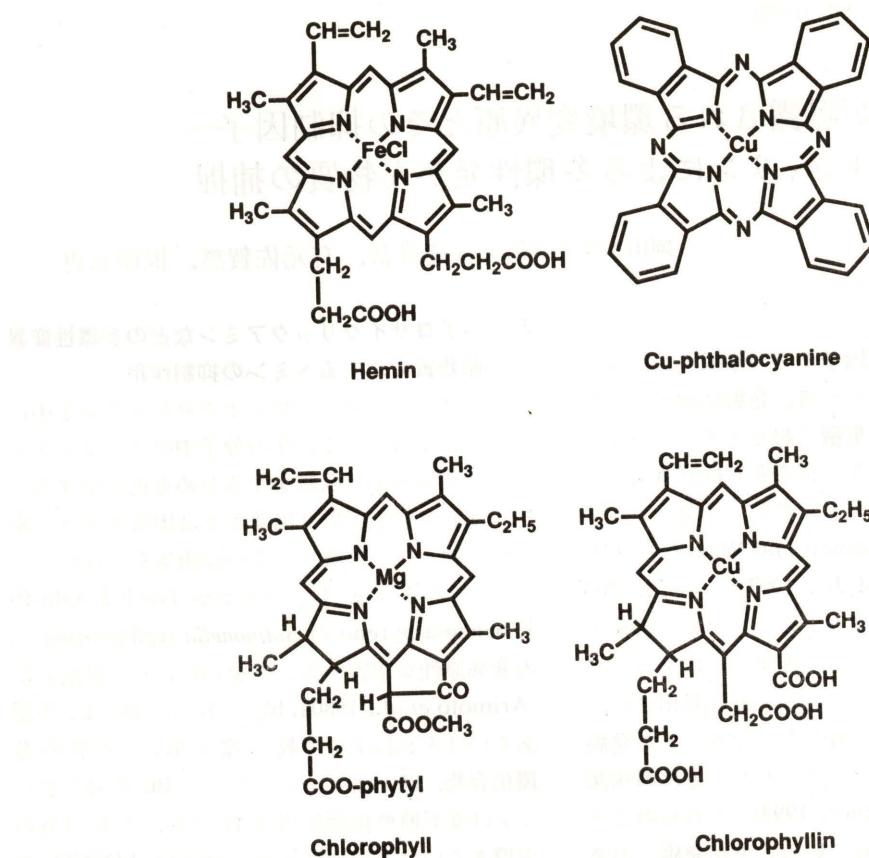


Fig. 1. ポルフィンおよび銅フタロシアニンの構造式。

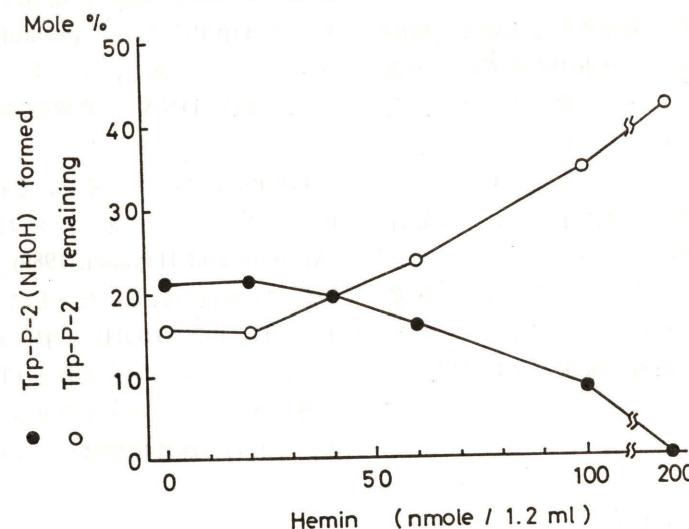


Fig. 2. Trp-P-2 の S9 による活性化に対するヘミンの阻害。S9 による Trp-P-2 の活性化については HPLC により分析した。詳細は文献 (Arimoto and Hayatsu, 1989) にゆずる。グラフは、測定した活性化型の Trp-P-2(NHOH) 量および残存 Trp-P-2 量を、反応混合液中のヘミン量に対してプロットしたものである。

Table 1. 代謝活性化されたヘテロサイクリックアミンの変異原性に対するヘミン、ヘモタンパクの抑制効果

変異原 (サルモネラ菌TA98を用いて)	50% 阻害量 (nmole)			
	nmole (* nmole 当量)	ヘミン	ミオグロビン	ヘモグロビン
Trp-P-2(NHOH)	0.05	0.5	1.8	0.7
Glu-P-1(NHOH)	1.0	8	16	15
Activated IQ ^a	1.25*	15	—	—
	0.25*	—	9.5	6.2
Activated MeIQx ^a	1.25*	25	—	—
	0.4*	—	—	60

^a S9 处理により作成 (Arimoto and Hayatsu, 1989)

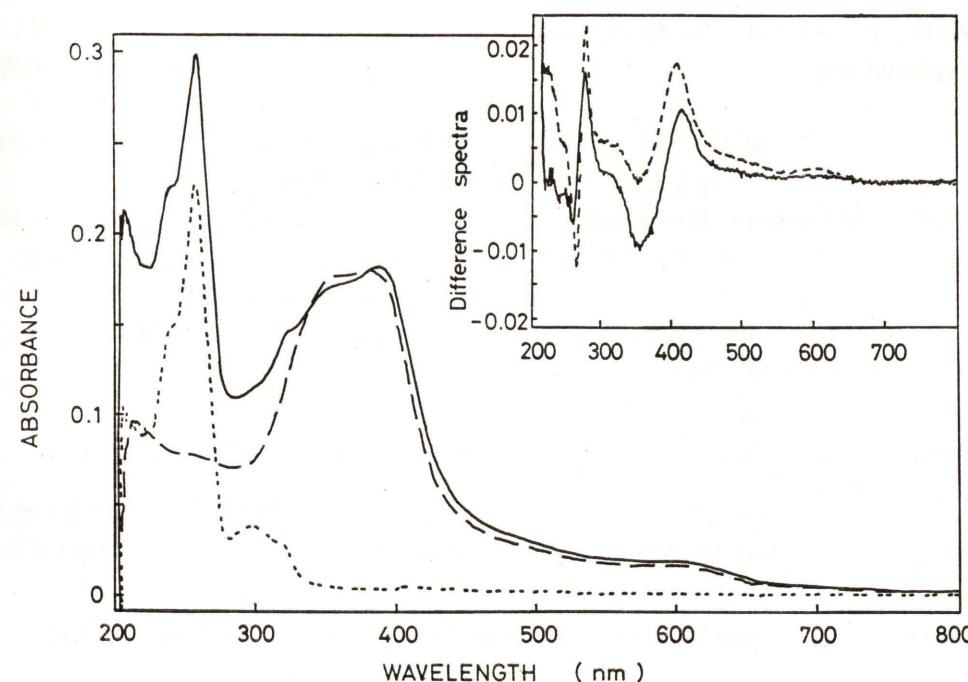


Fig. 3. Trp-P-2(NHOH) (点線), ヘミン (破線) および混合液 (実線) の吸収スペクトル。右上の挿入図には Trp-P-2(NHOH) とヘミンとの混合液の差スペクトル (実線) および Trp-P-2 とヘミンとの混合液の差スペクトル (破線) を示した。溶液中の変異原と色素の濃度はそれぞれ、5 μM である。緩衝液として、0.1 M リン酸ナトリウム–0.05 M KCl, pH 7.4, を用いた。

受けたことがわかった。一方、吸光度測定によつてヘミンと Trp-P-2, ヘミンと Trp-P-2(NHOH) の間に相互作用があることがわかった (Fig. 3)。差スペクトルの形は、このいずれの組合せでも

同じようであり、従つて似たような相互作用が起つていると考えられる。また一方、ヘミンは Trp-P-2(NHOH) の分解を促進する作用もある (Arimoto and Hayatsu, 1989)。

Trp-P-2 の代謝活性化をヘミンが阻害するメカニズムとしては、ヘミンが Trp-P-2 と複合体を形成することによって、Trp-P-2 が P450 酵素の基質となり得なくなったという可能性がある。また、Trp-P-2(NHOH) がヘミンに捕捉された場合は、その分解が促進されるであろうと考えられる。さらに、Trp-P-2(NHOH) がヘミンと複合体を作ると、もはやサルモネラ菌に変異原作用を及ぼさなくなるのではないかと想像される。

ヘム含有蛋白質であるミオグロビンとヘモグロビンにもヘテロサイクリックアミンの変異原性を阻害する作用がある (Table 1) (Arimoto *et al.*, 1987)。グロビン自身には阻害作用はないので、この阻害はヘム部分によって起こっていると考えられる。

3. 銅フタロシアニントリスルホン酸に対する多環化合物の親和性

青色染料として広く用いられる銅フタロシアニンはポルフィリン様の化合構造を持ち、その分子の平面の大きさはポルフィリンより大きいため、多環性化合物との強い親和性を持つと期待される。実際銅フタロシアニントリスルホン酸をセルロースに共有結合で固着したブルーコットン、ブルーレイヨン (Fig. 4) は多環性化合物を選択的に強く吸収する (Hayatsu *et al.*, 1983)。この吸着は

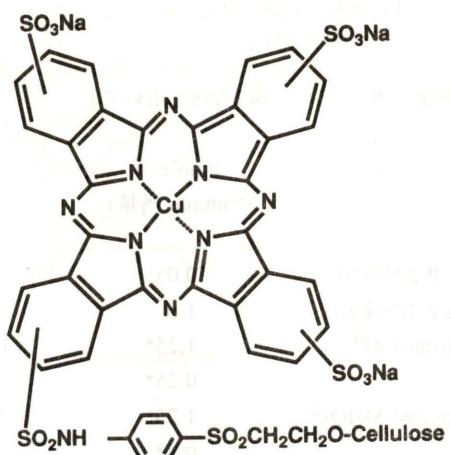


Fig. 4. ブルーコットンとブルーレイヨンの構造。

水溶液中で起こるが、有機溶媒中では起こらない。従ってブルーコットン/レイヨンに対して水溶液中の多環性化合物を吸着し、それを有機溶媒（とくに有効なのはメタノール-濃アンモニア水 (50:1) 混液）で溶出することによって、目的の多環性化合物を分離回収できる。この方法はヘテロサイクリックアミンの食物からの分離、ヒト排泄物からの分離などにしばしば使われる（総説： Hayatsu, 1992; Bartsch, 1992）。最近ではヒト血中の Trp-P-1=ヘモグロビン adduct の分離にも用いられる (Umemoto *et al.*, 1992)。

Table 2. ブルーコットンと多環性化合物との複合体形成（ブルーコットンによる滴定実験の結果）

化合物	解離定数 ($K_d \times 10^6$, M)	飽和時のモル比 (compd/Cu-pc-SO ₃ ⁻ :1/n)	相関係数 (r)	化合物初濃度 (M × 10 ⁵)
9-Aminoacridine	5.90 (6.24, 5.56)	1.10 (1.04, 1.16)	0.997 (0.998, 0.996)	1.10
Trp-P-2	2.90 (2.98, 2.82)	1.25 (1.22, 1.28)	0.994 (0.997, 0.991)	1.11
Quinacrine	4.83 (5.00, 4.66)	1.03 (0.98, 1.08)	0.998 (0.999, 0.997)	1.03
2-Aminofluorene	73.1 (75.2, 71.0)	1.00 (0.93, 1.07)	0.994 (0.990, 0.997)	2.39
2-Acetylaminofluorene	18.5 (18.9, 17.3)	0.96 (0.80, 1.30)	0.973 (0.986, 0.958)	2.12

実験の詳細は Hayatsu *et al.* (1986a) 参照。Cu-pc-SO₃⁻ はブルーコットン中の銅フタロシアニントリスルホン酸を表している。

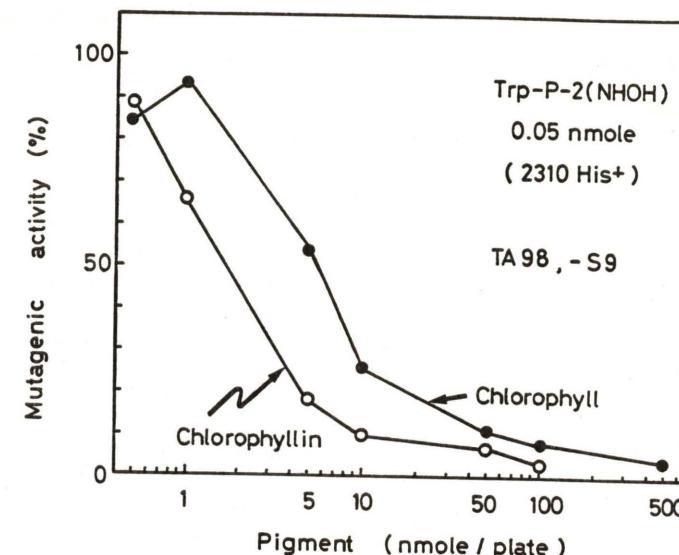


Fig. 5. サルモネラ菌 TA 98 に対する Trp-P-2(NHOH) の変異原性のクロロフィルおよびクロロフィリンによる阻害。0.05 nmole の Trp-P-2(NHOH) を、代謝活性化なしに色素の存在下または非存在下でサルモネラ菌 TA 98 の系でアッセイした。変異原性 100% はプレートあたり 2310 復帰コロニーであった。データは、溶媒コントロールの値 (30±5 復帰コロニー/プレート) を差し引いて示した。

ブルーコットンを用いることによって、多環化合物と銅フタロシアニン環との複合体形成の詳細を調べることができる (Hayatsu *et al.*, 1986)。表 2 に示すように、Trp-P-2 など 5 種の多環化合物について、それぞれブルーコットン中の青色リガンドと 1:1 の複合体を形成することが証明された。また、その複合体の解離定数は 10^{-5} – 10^{-6} M であった。

4. クロロフィル、クロロフィリンによるヘテロサイクリックアミンの変異原性の阻害

緑色野菜中の色素クロロフィルは Fig. 1 に示すようにポルフィリン誘導体であり、ヘミンと同様な作用をヘテロサイクリックアミンに対して持つことが予想される。クロロフィリンはクロロフィルの安定型化合物であり、実験研究にはクロロフィルよりもクロロフィリンが用いられることが多い。Fig. 5 に示すように、Trp-P-2(NHOH) の直接変異原活性がクロロフィリン及びクロロフィルによって阻害される。その阻害の強さはヘムタンパクのそれと近い強さであることが Table 1 と Fig. 5 を比べてみるとわかる。また、ショウジョウバエ wing spot test (Graf *et al.*, 1984) によっても Trp-P-2 の遺伝子損傷をクロロフィル及びクロロ

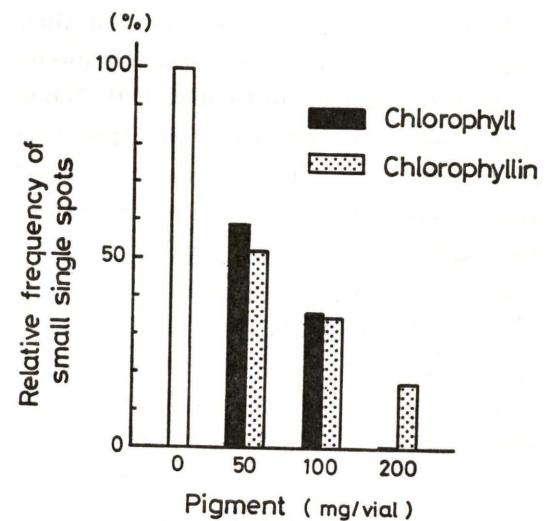


Fig. 6. Trp-P-2 の変異原性へのクロロフィルおよびクロロフィリンによる阻害を、ショウジョウバエ体細胞変異試験系 (Graf *et al.*, 1984) で測定したもの。Small single spot の相対変異率 (RF %) は次式で計算した。

$$RF (\%) = \frac{((Trp-P-2 + 色素) の場合のスポット数/翅) - (溶媒コントロールのスポット数/翅)}{((Trp-P-2 のみの場合のスポット数/翅) - (溶媒コントロールのスポット数/翅)} \times 100$$

Small single spot は体細胞の染色体組換え、遺伝子変異、染色体末端欠失、および染色体不分離により起こる。バイアル瓶あたり 2 mg の Trp-P-2 により、翅 1 枚あたり small single spot が 1.20 個生成したのに対して、溶媒コントロールでは 0.29 個であった。

フィリンが抑制することを示すことができる (Fig. 6) (Negishi *et al.*, 1989)。

われわれは Sepharose にクロロフィリンを共有結合させたものを作成し、これに対するヘテロサイクリックアミンの吸着を調べた結果、可逆的吸着が起こること、複合体中のクロロフィリンと変異原の割合は変異原によって異なるという結果を得ているが、詳細は原報にゆずる (Arimoto *et al.*, 1993)。

Trp-P-2 とクロロフィル、あるいはクロロフィリンの組合せについて、Fig. 3 と同様な手法で吸光度測定を行なうと、Trp-P-2 と色素の単純加算の吸収スペクトルとは異なるスペクトルが得られる。このことも Trp-P-2 とクロロフィルが複合体を作ることの証拠である (Negishi *et al.*, 1989)。

われわれの研究室以外の研究グループからもクロロフィル、クロロフィリンについての変異原性阻害の報告が多数なされている (Bronzetti *et al.*, 1990; Dashwood, 1992; Dashwood and Guo, 1992; Dashwood and Liew, 1992; Dashwood *et al.*, 1991; Gentile and Gentile, 1991; Katoh *et al.*, 1983; Lai, 1979; Lai *et al.*, 1980; Ong *et al.*, 1986, 1989; Romert *et al.*, 1992; Terwel and van der Hoeven, 1985; Warner *et al.*, 1991; Whong *et al.*, 1988)。最近われわれはヒトに対するクロロフィリンの効果を調べている。これはまだ研究を継続中であるが、焼き肉食由来の尿中の変異原性をクロロフィリンの同時投与が抑制するという結果を得ている。以前に、パセリの摂取が加熱タンパク食由来の尿中変異原性を減少させるという現象が（観察した例数は極く少ないが）報告されており (Ohyama *et al.*, 1987)，実際に緑色野菜がヘテロサイクリックアミンを消化管内で捕捉して、腸管からの吸収を妨げているという可能性がある。

5. 謝辞

この研究は文部省科学研究費及び厚生省がん研究助成金によって実施された。また、高松宮妃がん研究助成金にもよっていることを記して感謝する。

参考文献

- Arimoto, S., and H. Hayatsu (1989) Role of hemin in the inhibition of mutagenic activity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2) and other aminoazaarenes, *Mutation Res.*, 213, 217-226.
- Arimoto, S., Y. Ohara, T. Namba, T. Negishi and H. Hayatsu (1980a) Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 662-669.
- Arimoto, S., T. Negishi and H. Hayatsu (1980b) Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens, *Cancer Lett.*, 11, 29-33.
- Arimoto, S., Y. Ohara, K. Hiramoto and H. Hayatsu (1987) Inhibitory effect of myoglobin and hemoglobin on the direct-acting mutagenicity of protein pyrolylate heterocyclic amine derivatives, *Mutation Res.*, 192, 253-258.
- Arimoto, S. and H. Hayatsu (1989) Role of hemin in the inhibition of mutagenic activity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2) and other aminoazaarenes, *Mutation Res.*, 213, 217-226.
- Arimoto, S., S. Fukuoka, C. Itome, H. Nakano, H. Rai and H. Hayatsu (1993) Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in the inhibition of the mutagenic activity, *Mutation Res.*, 287, 293-305.
- Bartsch, H. (1992) Blue Rayon, *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 1408-1409.
- Bronzetti, G., A. Galli and C. Della Croce (1990) Antimutagenic effect of chlorophyllin, in: Y. Kuroda, D. M. Shankel and M. D. Waters (Eds.) *Antimutagens and Anticarcinogenesis Mechanisms II*, Plenum, New York, pp. 463-468.
- Culotta, E. and D. E. Koshland Jr. (1993) Molecule of the year: p53 sweeps through cancer research, *Science*, 262, 1958-1961.
- Dashwood, R. H. (1992) Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) to rat liver DNA, *Carcinogenesis*, 13, 113-118.
- Dashwood, R. and D. Guo (1992) Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation, *Carcinogenesis*, 13, 1121-1126.
- Dashwood, R. and C. Liew (1992) Chlorophyllin-enhanced excretion of urinary and fecal mutagens in rats given 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline, *Environ. Molec. Mutag.*, 20, 199-205.
- Dashwood, R. H., V. Breinholt and G. S. Bailey (1991) Chemopreventive properties of chlorophyllin: Inhibition of aflatoxin B1 (AFB₁)-DNA binding in vivo and anti-mutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay, *Carcinogenesis*, 12, 939-942.
- Gentile, J. M. and G. J. Gentile (1991) The metabolic activation of 4-nitro-o-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extracts: The relationship between mutagenicity and antimutagenicity, *Mutation Res.*, 250, 79-86.
- Graf, U., F. E. Wurgler, A. J. Katz, H. Frei, H. Juon, C. B. Hall and P. G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagenesis*, 6, 153-188.
- Hayatsu, H. (1992) Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulfonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens, *J. Chromatography*, 487, 37-56.
- Hayatsu, H. Ed. (1991) *Mutagens in food: Detection and prevention*, CRC Press, Boca Raton, pp. 286.
- Hayatsu, H., T. Oka, A. Wakata, Y. Ohara, T. Hayatsu, H. Kobayashi and S. Arimoto (1983) Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine, *Mutation Res.*, 119, 233-238.
- Hayatsu, H., H. Kobayashi, A. Michiue and S. Arimoto, (1986) Affinity of aromatic compounds having three fused rings to copper phthalocyanine trisulfonate, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 944-947.
- Katoh, Y., N. Nemoto, M. Tanaka and S. Takayama (1983) Inhibition of benzo[a]pyrene induced mutagenesis in Chinese hamster V 79 cells by hemin and related compounds, *Mutation Res.*, 121, 153-157.
- Lai, C. N. (1979) Chlorophyll: The active factor in wheat sprout extract inhibiting the metabolic activation of carcinogens in vitro, *Nutrition and Cancer*, 1, 19-21.
- Lai, C. N., M. A. Butler and T. S. Matney (1980) Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content, *Mutation Res.*, 77, 245-250.
- Marx, J. (1993) New colon cancer gene discovered, *Science*, 260, 75-752.
- Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki and H. Hayatsu (1989) Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), *Carcinogenesis*, 10, 145-149.
- Ohyama, S., S. Kitamori, H. Kawano, T. Yamada, T. Inamasu, M. Ishizawa and N. Ishinishi (1987) Ingestion of parsley inhibits the mutagenicity of male human urine following consumption of fried salmon, *Mutation Res.*, 192, 7-10.
- Ong, T. M., W. Z. Whong, J. Stewart and H. E. Brockman (1986) Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures, *Mutation Res.*, 173, 111-115.
- Ong, T., W. Z. Whong, J. D. Stewart and H. E. Brockman (1989) Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA 98, *Mutation Res.*, 222, 19-25.
- Radman, M. and R. Wagner (1993) Missing mismatch repair, *Nature*, 366, 722.
- Romert, L., M. Curvall and D. Jenssen (1992) Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity, *Mutagenesis*, 7, 349-355.
- Terwel, L. and J. C. M. van der Hoeven (1985) Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the *Salmonella*/microsome assay, *Mutation Res.*, 152, 1-4.
- Umemoto, A., Y. Monden, S. Grivas, K. Yamashita and T. Sugimura, (1992) Determination of human exposure to the dietary carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1) from hemoglobin adduct: the relationship to DNA adducts, *Carcinogenesis*, 13, 1025-1030.
- Warner, J. R., J. Nath and T. M. Ong (1991) Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose-resistant assay system, *Mutation Res.*, 262, 25-30.
- Whong, W. Z., J. Stewart, H. E. Brockman and T. M. Ong (1988) Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B₁-induced reversion in *Salmonella typhimurium* strain TA 98, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 8, 215-224.

環境変異原検出系・評価系の開発

国立衛生試験所変異遺伝部 能 美 健 彦

1. はじめに

我々は沢山の化学物質に囲まれて生活しており、現代社会は化学物質に支えられて成り立っていると言っても過言ではない。しかし化学物質の中には、生物の遺伝子 DNA に反応し突然変異を起こすものが存在する。こうした突然変異を起こす物質は変異原物質 (chemical mutagens) と呼ばれ、放射線とならんで遺伝子に対する危険要因 (risk factor) と考えられている。

DNA はしばしば「生物の設計図」と呼ばれる。これは DNA が生物の形態や機能、すなわち生命を規定しているからである。化学物質がヒトの DNA に変異を起こすと、遺伝情報の変化は我々の体に不可逆的な変化を与える。癌や遺伝的疾患の発生には、こうした遺伝情報の変化が重要な役割をはたしている (Levine, 1993)。また、変異した DNA は次の DNA を作る錠型として働く。このことは体細胞や生殖細胞で変異が起こると、遺伝的に異なる性質を持つ新しい細胞集団や個体が生ずることを意味する。したがって、変異原性試験は「生物の設計図」に対する化学物質の影響を調べる試験であると言うことができる。

本稿では、微生物からマウスを用いる試験まで、新しい変異原検出系・評価系の開発について、研究の現状を紹介する。

2. 環境変異原の検出と評価

変異原性試験の役目を大別すると①変異原物質の検出と②そのヒト遺伝子 DNA に対する影響の評価、の 2 つになるであろう。

変異原物質は、文字どおり我々の環境中すなわち大気、水、食品中に存在し、我々は不斷に変異原に曝露されながら生活している。したがって環境中に存在する変異原を迅速・高感度に検出し、その動態を明らかにすることは、変異原性試験の重要な役目の一である。実際、エームテストなどを「検出器」に用いて、これまでに沢山の変異原物質が検出され、その構造が明らかにされている。迅速・高感度な変異原性試験を用いることにより①化学構造と変異原活性の相関②変異原・発癌物質の代謝活性化機構の研究が進歩し③大気、河川、食品、ヒトの尿などに含まれる変異原の高感度モニタリングが可能になった。また、検出された新しい変異原物質を合成して実験動物に長期投与し、その発癌性との関連が追求された例も少なくない。

一方、新たに市場に出される医薬品、化学工業原料、農薬、食品添加物などは新しい環境変異原の供給源でもある。現在では、新しく市場に出される化合物は、事前に変異原性試験を行うことが義務付けられている。こうした新規化学物質のヒト DNA に対する作用を正確に評価する、すなわち予知、予測するということは、変異原性試験のもう一つの重要な役目である。これまでに起きた悲惨な薬害の例を挙げるまでもなく、新たに市場に出される化学物質のヒトに対する影響を事前に把握することは、健康な市民生活を保証する上で極めて重要である。評価を行う場合には、いろいろな生物（微生物、哺乳類培養細胞、ラット・マウス）を用いる試験を幾つか組み合わせて行い、

〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Development of New Test Systems using Bacteria, Cultured Mammalian Cells and Transgenic Mice for the Detection and Evaluation of Environmental Mutagens and Carcinogens

Takehiko Nohmi

Division of Genetic and Mutagenesis National Institute of Health Sciences 1-18-1 Kamiyouga Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan

その結果から実験動物に対する発癌性、ヒトに対する影響を推測している。

3. 変異原検出系の開発

カリフォルニア大学のエームス博士らによって開発された微生物を用いる変異原性試験、いわゆるエームス・テストは、現在でも最も汎用されている変異原性試験の一つである (Maron and Ames, 1983)。

このテストは、テスターとなる *Salmonella typhimurium* (サルモネラ) を試験化合物と混ぜて最少培地上にまき、2日間インキュベーションして培地上に生ずる復帰株数を計測し、試験化合物の変異原性を調べるというものである。また代謝活性化が必要な場合には薬物で誘導処理したラットの肝臓のホモジネート (S9) を一緒にインキュベートする。エームステストでは遺伝学的にいろいろ手を加えられた菌株が使われている。除去修復系の欠失 (*Δ uvrB*)、膜の変異 (*rfa*)、誤りがち DNA 修復蛋白質をコードしたプラスミドの導入 (pK M101) などがそれである。「エームステストで実験動物に発癌性を示す物質 (rodent carcinogens) を同定できるか?」という問は、エームステストが開発された 20 年前からあり、今日でも議論の続いているところである。しかしエームステストを変異原の検出系として用い、環境変異原の単離、同定、モニタリングに使用することに異論は少ない。事実、エームステストを用いて数多くの新しい変異原物質、発癌物質が見い出されている。エームステストや umu テストなどの微生物を用いる変異原テストは、環境変異原の検出の面で重要な役割を果たしてきたと言つてよい。

我々は「検出系としての微生物変異原性試験の価値」をより高めることを目的に、遺伝子工学的な手法を用いて新しいサルモネラ・テスター株の開発を進めてきた。このうちいくつかのものを以下に紹介する。

4. 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・テスター株の開発

ニトロアレーンはニトロ基を 1 つ以上持つ芳香族炭化水素の総称で、1,8-dinitropyrene(1,8-

DNP) に代表される変異原性・発癌性を示すニトロアレーンは、排気ガス、タバコの煙、都市の大気、河川の低質などに存在する (Rosenkranz and Mermelstein, 1983)。一方、benzidine, 4-amino-biphenyl に代表される芳香族アミンは化学工業原料として用いられてきたが、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)。

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 O-アセチル転移酵素により活性化され、最終的に生じたニトレニーム・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に入ってからは、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因子と考えられる。我々は、環境中のニトロアレーン・芳香族アミンをより高感度に検出することを目的に、サルモネラのニトロ還元酵素、アセチル転移酵素遺伝子のクローニングを行い (Watanabe et al., 1987), それぞれの遺伝子を持つマルチコピープラスマドを従来からエームステストを用いられてきた TA100, TA98 株へ導入した。

このようにして作製した菌株が YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 株である。YG1021, YG1026 は TA98, TA100 にサルモネラのニトロ還元酵素遺伝子を持つプラスミド pYG216 を導入した菌株であり、このプラスミドのためニトロ還元酵素活性が親株に比べ約 50 倍増大している (Watanabe et al., 1989)。一方、YG1024, YG1029 は TA98, TA100 にサルモネラのアセチル転移酵素遺伝子を持つプラスミド pYG219 を導入した菌株であり、このプラスミドのため、アセチル転移酵素活性が親株に比べ約 100 倍上昇している (Watanabe et al., 1990)。これまでに 30 種類以上の様々な構造の化合物につき、これら YG 株を用い試験を行い、YG1021, YG1026 はニトロアレーンを含む芳香族ニトロ化合物に、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、特異的に高い感受性を示す指標菌株であるものと結論した (Einisto et al., 1991)。

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ヶ国、約 160 研究機関で、大気、河川、食品、代謝物、尿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使われている (能美, 1993)。

5. アルキル化剤に高感受性を示すサルモネラ・テスター株の開発

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も少なくない。こうしたアルキル化剤による 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 *O⁶-methylguanine (O⁶-MeG)* である。*O⁶-MeG* は、バクテリアからヒトまで広く生物界に存在している *O⁶-MeG DNA methyltransferase (MT)* によって修復される (Lindahl et al., 1988)。

大腸菌は 2 種類の MT、すなわち Ada と Ogt を持っている。Ada は分子量 39 kDa の蛋白質で、*O⁶-MeG* の他、*O⁴-methylthymine (O⁴-MeT)*, *methylphosphotriester* 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。これに対し Ogt は分子量 19 kDa の蛋白質で *O⁶-MeG*, *O⁴-MeT* の修復は行うが *methylphosphotriester* 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。

我々は、サルモネラの ada 遺伝子、ogt 遺伝子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、塩基配列の決定ならびに遺伝子破壊を行った。

サルモネラの ada 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 39 kDa の蛋白質をコードしていた (Hakura et al., 1991)。ogt 遺伝子は大腸菌の ogt 遺伝子とスクレオチドレベルで 77% の相同性を示し、分子量 19 kDa の蛋白質をコードしていた (Yama-

da et al., in preparation)。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 (Yamada et al., 1993), ogt 遺伝子の破壊を行った (Yamada et al., in preparation)。N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) の突然変異誘発作用に対し、ada 欠損株は親株である TA1535 とほぼ同様な感受性を示したが、ogt 欠損株は極めて高い感受性を示した。ogt 欠損株 (YG7104), ada, ogt 二重変異株 (YG7108) 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た ENNG, PNNG, BNNG に対しても高い感受性を示した。また dimethylnitrosamine, diethyl-nitrosamine に対しても高い感受性を示した。ogt 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。TA1535 の ogt 欠損株である YG7104 株そして ada, ogt 二重欠損株である YG7108 は、各種アルキル化剤の高感度検出、ならびにアルキル化剤による DNA 修復機構の究明に有効であるものと考える。

6. 変異原評価系の開発

化学物質、特に新たに市場に出される化学物質のヒト遺伝子に対する危険性・安全性を事前に評価することは、変異原性試験の重要な役割である。評価のためには、微生物を用いるテスト以外に、哺乳類培養細胞やマウス・ラットを用いるテストが用いられている。哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験やマウスを用いる小核試験は、化学物質の染色体異常誘発性を調べる試験法として、広く用いられている。我々は「評価系としての変異原性試験の価値」を高めることを目的に①ヒトおよびバクテリアのアセチル転移酵素を発現する Chinese hamster 肺細胞 (CHL) を樹立する (Watanabe et al., 1994) とともに②遺伝子突然変異検出用トランスジェニックマウスを開発するのに必要な、受精卵導入用シャトルベクター λEG および突然変異検出用大腸菌株 YG6020 を作製した。

7. ヒトおよびサルモネラのアセチル転移酵素を発現する CHL 細胞の樹立

高感受性サルモネラ株の中で発現しているアセチル転移酵素は、バクテリアにのみ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。ヒトには2種類のアセチル転移酵素が存在し、一方は遺伝的多型を示す、すなわち個体差を示すアセチル転移酵素でポリモルフィック・アセチル転移酵素と呼ばれ、他方は遺伝的多型を示さない、個体差を示さないアセチル転移酵素でモノモルフィック・アセチル転移酵素と呼ばれている。ポリモルフィック・アセチル転移酵素遺伝子、モノモルフィック・アセチル転移酵素遺伝子はクローニングされ、ヒト第8染色体に存在することが明らかにされている(Deguchi, 1992; Blum *et al.*, 1990)。

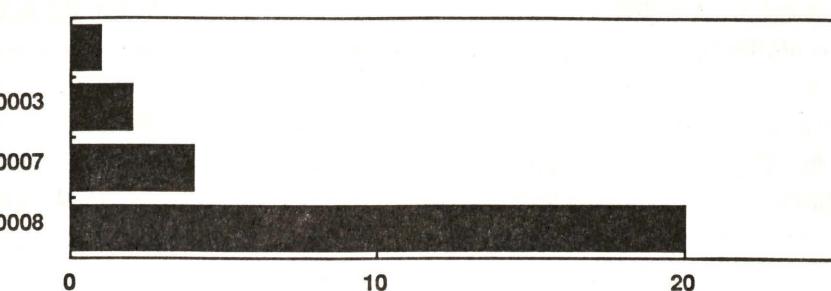
我々は、出口武雄博士との共同研究としてヒトのポリモルフィックおよびモノモルフィック・アセチル転移酵素遺伝子をCHL細胞にトランسفェクトし、ヒトのアセチル転移酵素を安定に発現する形質転換株を作製した。また我々の研究室でクローニングしたサルモネラのアセチル転移酵素遺伝子を、哺乳類細胞用の発現ベクターに連結しCHLへトランسفェクトした。サルモネラのアセチル転移酵素はヒトのアセチル転移酵素とアミノ酸配列上の相同性を示し、特に acetyl CoA の結合部位と考えられる 69番目の cystein 残基を含む Arg-Gly-Gly-X-Cys 配列はこれまでにクローニングされた全ての生物種のアセチル転移酵素で保存されている(Watanabe *et al.*, 1992)。トランسفェクトした遺伝子が発現していることは RNA ドット・プロットおよび酵素活性測定を行うことで確認した。樹立した CHL 細胞につき、芳香族ニトロ化合物である 1,8-DNP と 2-nitrofluorene(2-NF) そして芳香族アミンである IQ に対する感受性を *in vitro* 小核出現を指標に比較した。染色体異常の結果生ずる小核は、培養細胞では細胞質に主核にともなって小さな核として出現するが、アクリジンオレンジで染色すると容易にかつ客観的に同定する事が可能となる(Matsuoka *et al.*, 1993)。

8. ニトロアレーンに対する発癌リスクと個体差

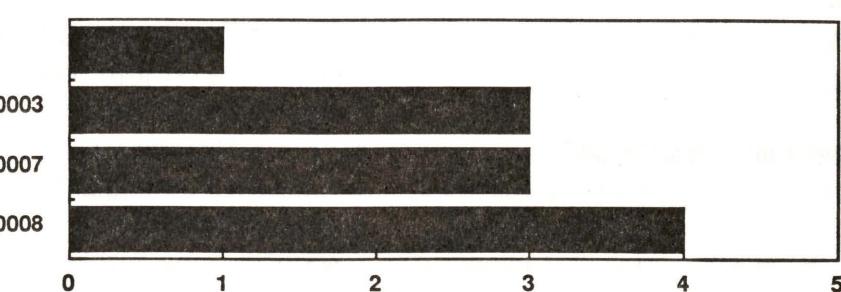
樹立した各細胞は 1,8-DNP に対し異なる感受性を示した。ヒトのポリモルフィック・アセチル転移酵素を発現する細胞(YG10008)は 1,8-DNP に対して最も高い感受性を示し、ついでヒトのモノモルフィック・アセチル転移酵素(YG10007), サルモネラのアセチル転移酵素(YG10003), 親株の CHL の順であった(Fig. 1)。2-NF を用いた場合にも、ヒトのポリモルフィック・アセチル転移酵素を発現する株(YG10008)は、サルモネラのアセチル転移酵素を発現する株(YG10003)や CHL 細胞よりも高い感受性を示した(Fig. 1)。この結果は、ヒトのポリモルフィック・アセチル転移酵素が、1,8-DNP や 2-NF の代謝活性化に関与していることを示唆している。ヒトのポリモルフィック・アセチル転移酵素は活性に個体差を示すことから、図に示す結果は 1,8-DNP や 2-NF に対する発癌リスクには個体差が存在する可能性を示唆している。芳香族アミンについては、アセチル転移酵素の多型と膀胱癌、直腸・結腸癌との間に関連があることが疫学的に示唆されている(Hein, 1988)。ニトロアレーンに対する発癌リスクの個体差とアセチル転移酵素の遺伝的多型の相関については、今後更に研究する必要があろう。

芳香族アミンである IQ に対する感受性を、phenobarbital と benzoflavone 処理したラットの肝臓から調製したミクロソームの存在下で調べると、サルモネラのアセチル転移酵素を発現する細胞(YG10003)が最も高い感受性を示した(Fig. 1)。ついで、ヒトのポリモルフィック(YG10008)およびモノモルフィック・アセチル転移酵素を発現する細胞(YG10007)そして親株の CHL の順になった。この結果はサルモネラのアセチル転移酵素が、ヒトのアセチル転移酵素よりも IQ に対し高い代謝活性化能を持つことを示唆している。サルモネラのアセチル転移酵素を発現する細胞(YG10003)は 1,8-DNP, 2-NF に対しては感受性が低かったことから、YG10003 が IQ に対し高い感受性を示したのは、単にアセチル転移酵素の発現量が YG10003 で高かったためではなく、3種類のアセチル転移酵素の基質特異性を反映してい

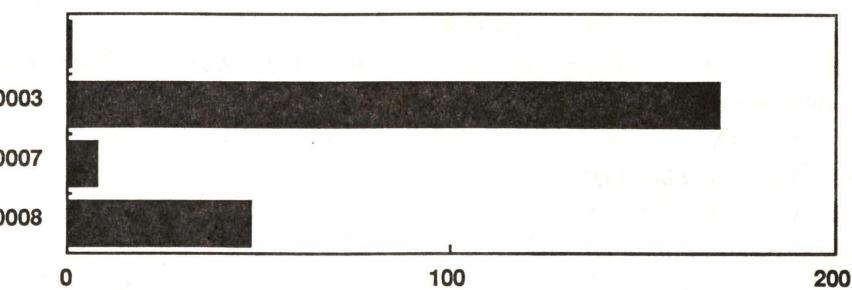
1,8-dinitropyrene



2-nitrofluorene



IQ(+microsome)



YG10003 : the subline expressing O-acetyltransferase of *S. typhimurium*

YG10007 : the subline expressing human monomorphic N-acetyltransferase

YG10008 : the subline expressing human polymorphic N-acetyltransferase

Fig. 1. The sensitivities of the sublines of CHL cells expressing bacterial or human acetyltransferases (Watanabe *et al.*, 1994).

The clastogenicities of 1,8-dinitropyrene, 2-nitrofluorene and IQ were determined using the *in vitro* micronucleus assay (Matsuoka *et al.*, 1993). The sensitivities of the sublines were calculated as the numbers of cells having micronuclei per 1000 intact cells per μg . The bars represent the relative sensitivities of the sublines when the sensitivities of the parent CHL cells were assigned as 1.0. When IQ was tested, the microsomes prepared from liver of rats pretreated with phenobarbital and 5,6-benzoflavone plus NADPH-generating system were added to the culture.

るものと考える。IQは長期投与するとラットの大腸に癌を誘発することが報告されている (Wakabayashi *et al.*, 1992)。サルモネラは大腸菌の近縁のバクテリアであり、そのDNAは大腸菌と約80%相同であることが知られている。したがって大腸菌や他の腸内細菌もアセチル転移酵素遺伝子を持つ可能性があり、図に示す結果は、腸内微生物の持つアセチル転移酵素がIQの代謝活性化に関与している可能性を示唆している。

ヒトやサルモネラのアセチル転移酵素を発現するCHL細胞YG10003, YG10007, YG10008,は①ニトロアレーン、芳香族アミンの代謝活性化機構の研究②ヒトに対する発癌リスクの評価に有用であるものと考える。

9. 動物個体を用いる変異原性試験

化学物質のヒトに対する発癌性の評価は、ラット、マウスを用いる長期毒性試験の結果を中心に行われている。変異原性に関しても、動物個体をテスターとして用いることにより、サルモネラや培養細胞を用いたのでは見ることのできない、化学物質の遺伝子に対するより複雑な影響を観察することができると考えられる。例えば、架橋型のアルキル化剤でヒトに対する発癌性が明らかにされているchlorambucilは、サルモネラTA102株に対してはAT→TAトランスバージョンを選択的に誘発し (Yamada *et al.*, 1992), チャイニーズハムスターV79細胞に対しても主に点突然変異を誘発するが (Speit *et al.*, 1992), 雄マウスの生殖細胞に対しては主に欠失などの大きな染色体変化を誘発する (Russel *et al.*, 1989)。変異原の特異性(mutagenic specificity)は、標的細胞の代謝能やDNA修復能によって大きく影響されるため (Ashby and Tinwell, 1993), 動物個体を用いる変異原性試験がヒトに対する影響を調べる際には重要なとなる。

化学物質によって生ずるラットやマウスの染色体異常やDNA損傷は、小核試験(林, 1991)やUDS試験(降旗, 1993)またSingle Cell Gel(SCG) Assay(平井, 1993)を用いることにより検出することができる。しかし遺伝子に起る点突然変異、すなわち塩基置換やフレームシフトを

動物個体で検出する方法はこれまで有力なものではなく、新しい方法の開発が望まれていた。最近、海外の会社から大腸菌のlacIあるいはlacZ遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスが開発され、遺伝子突然変異検出用のテスターとして市販されるようになった。現在、市販されているトランスジェニックマウスは2種類あり、一方はβ-ガラクトシダーゼをコードしたlacZ遺伝子を組み込んだマウスで「ミュータマウス」と呼ばれ、他方はリプレッサーをコードしたlacI遺伝子を組み込んだマウスで「ビッグブルーマウス」と呼ばれている。こうしたトランスジェニックマウスは生殖細胞を含む多数の臓器で遺伝子突然変異を検出できるという優れた特徴を持つが、一方で①突然変異を検出するのに要する労力、時間が少なくなく②試験の費用がかさみ③マーカー遺伝子のサイズが大きいため塩基配列の決定に手間取るなどの欠点が指摘されていた。

我々は、より高性能なトランスジェニックマウス試験系を、食品薬品安全センター・秦野研究所の加藤基恵博士と共同で開発しており、その一部を以下に紹介する。

10. トランスジェニックマウス試験系の開発

開発に当たって我々が留意した点は、ポジティブ・セレクションが可能な系を作るということである。ポジティブ・セレクションとはミュータントだけが培地上でコロニーを作ることのできるシステムである。このポジティブ・セレクションを可能にするマーカー遺伝子として、我々は大腸菌のgpt遺伝子を選んだ。大腸菌のgpt遺伝子はプリン代謝に関与するguanine phosphoribosyl transferaseをコードしており、培地中に6-thioguanine(6-TG)を加えておくと野生型のgpt遺伝子を持つ大腸菌は6-TGを取り込んで死滅し、gpt遺伝子に変異を持つ株だけが生き残る。またgptのコード領域は456 bpと小さいことから、変異部位の同定を迅速に行うことが可能である。大腸菌のgpt遺伝子は、すでに遺伝子突然変異検出用培養細胞株AS-52に組み込まれてin vitroでの突然変異検出に用いられており、gpt遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスはin vitro

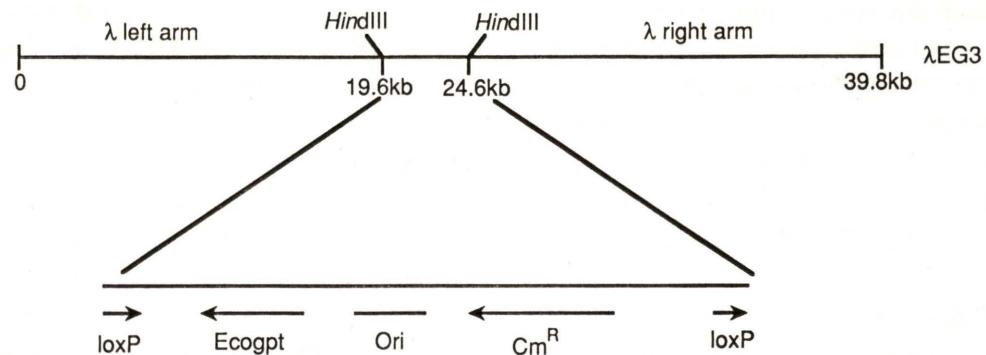


Fig. 2. The structure of λEG 3 vector.

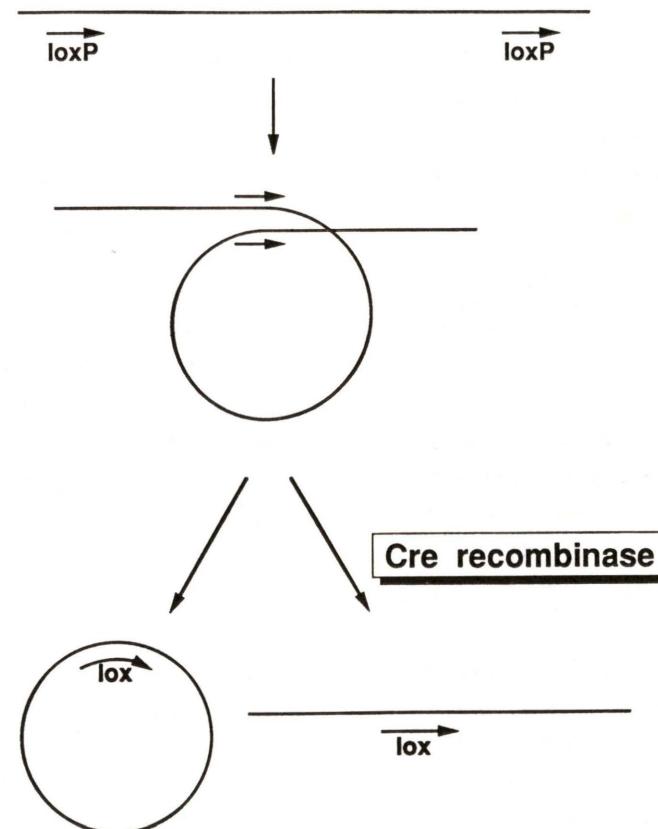


Fig. 3. Site-specific recombination of λ phage having loxP sequences by Cre protein.

での試験結果をin vivoで確認する際にも有用であるものと期待される。そこで、大腸菌のgpt遺伝子を持つラムダーファージEG3の構造を示す(Fig. 2)。このベクターはラムダーファージを基本としたシャトル型ベクターで、ファージの右腕と左腕の間に、両端にloxPと呼ばれる34 bp

11. 遺伝子突然変異検出用シャトルベクターλEG

トランスジェニックマウスに導入するため我々が作製したラムダーファージEG3の構造を示す(Fig. 2)。このベクターはラムダーファージを基本としたシャトル型ベクターで、ファージの右腕と左腕の間に、両端にloxPと呼ばれる34 bp

の同方向反復配列をもつ pACYC184 系のプラスミドが直線上に挿入されている。このプラスミド領域には chloramphenicol 耐性遺伝子、プラスミドの複製開始点、および遺伝子突然変異検出のレポーターとなる大腸菌 *gpt* 遺伝子が含まれている。またプラスミドの右腕および左腕の連結部位には、それぞれ *HindIII* の認識部位を組み込んだ。

loxP 配列は Cre と呼ばれる部位特異的組換え酵素により認識され、2 つの同方向 *loxP* 配列に挟まれた DNA 領域は、Cre 蛋白質が存在する場合には直鎖 DNA から環状プラスミドとして切り出される (Fig. 3)。したがってマウスからのトランジーンの回収は、3 通りが可能となる。第 1 の方法は、DNA を回収した後 *in vitro* でパッケージングし、ファージとしてから *cre* 遺伝子を発現する大腸菌 YG6020 へ感染させ、大腸菌の細胞内でプラスミドに変換させる方法である。 λ E_G3 を YG6020 に感染させると、ほぼ定量的にプラスミドに変換することは実験的に確認した。第 2 の回収方法は、試験管内で λ E_G3 を Cre 蛋白質と反応させプラスミドにしてから電気的に大腸菌 YG6019 に導入するというものである。なお、YG6020, YG6019 の染色体上の *gpt* 遺伝子は欠失させてある。第 3 の方法は *loxP* 配列に頗らす制限酵素 *HindIII* で切断してから ligase でつないでプラスミドとし、電気的大腸菌に導入する方法である。いずれの方法をとった場合でも、*gpt* 遺伝子とクロラムフェニコール耐性遺伝子を持ったプラスミドが入った大腸菌は、6-TG を含む培地と含まない培地上にまき、突然変異コロニーおよび生存コロニーを検出し、突然変異について塩基配列の決定を行い *gpt* 遺伝子上に起きた変異部位の同定を行う予定である。

現在 EG3 ファージは、秦野研究所の加藤基恵博士のもとでマウスの授精卵にマイクロインジェクションされ、トランジニックマウスが作製されている。

こうした遺伝子突然変異検出用のトランジニックマウスは、化学物質の安全性評価だけでなく、特定の DNA 修復能を欠損したトランジニックマウスや、ヒトの代謝酵素遺伝子を組み込

んだトランジニックマウスと交配させることにより、DNA 修復や薬物代謝の研究にも有用なマウスになるものと考える。

12. おわりに

化学物質のヒト遺伝子に対する影響を予知・予測する事は、火山の噴火や地震の発生を予知するのに似て、社会的には重要であるが科学的には極めて難しいテーマである。この難しさの原因の一つとしては、動物個体を用いて迅速、高感度に突然変異を検出する試験法が確立されていないことがあげられよう。こうした意味からマウスの体にレポーター遺伝子を導入し、大腸菌に戻して突然変異を検出するトランジニックマウス試験系に対する期待は大きい。しかし、たとえトランジニックマウスを用いた試験系が確立されたとしても「マウスを用いてヒト遺伝子に対する影響を正確に予測できるか?」という問は残される。

ヒトは実験動物のように遺伝的に均一ではなく、アセチル転移酵素の例にみるように代謝に関して(もしかすると DNA 修復についても)個体差があるため、個体によって発癌リスクが異なる可能性がある。この発癌リスクの個体差は、食事や喫煙などに影響され更に大きな差異になりうる。しかし、ヒトの遺伝的不均一性を考慮にいれた評価法は未だ確立されているとは言がたい。また、通常の動物実験では単一物質を高濃度に投与するが、はたしてこのような試験で得られた結果を、低濃度の変異原に複数暴露されることが多いヒトに当てはめることができるのか、という点は依然として議論の続いているところである。そして、マウス、ヒトはもとより、微生物でも突然変異のメカニズムは多くが不明であり(能美、1991), 作用機序の判らない「検出器」を用いて突然変異を測定していることも、化学物質のヒトに対する影響の評価を難しくしている。

したがって、既存の変異原性試験の結果を「陽性か陰性か」また「強いか弱いか」という点でだけ解釈したのでは、安全性の評価を十分に行うことはできない。1 つ 1 つの物質について①どのように代謝され②どの代謝物が DNA のどこにどのように突然変異を起こすのか、すなわち変異原

の作用機序を分子レベルで明らかにする「入り口」として試験の結果を考えることが大切である。作用メカニズムにまで踏み込んだ化学物質と突然変異のデータ・ベースを作り上げることが、評価能力の向上につながるのではないだろうか。分子生物学の進歩によりヒトという生物の分子的実体が明らかになるにつれ、バクテリアや培養細胞そしてラット、マウスで得られた変異原性試験の結果を「ヒトに外挿する」ということも現実の問題になってくると思われる。本稿がこうした流れの一助となれば幸いである。

13. 謝辞

本稿で紹介したバクテリア、哺乳類培養細胞、トランジニックマウスの開発は、主に国立衛生試験所、変異遺伝部の諸氏との共同研究として実施されたものであり、祖父尼俊雄部長はじめ変異遺伝部の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- Ashby, J. and H. Tinwell (1993) Clastogenicity of chlorambucil to the mouse bone marrow: consideration in relation to the genetic specificity of action in some assays, *Mutagenesis*, 8, 373-375.
- Blum, M., D. M. Grant, W. McBride, M. Heim and U. A. Meyer (1990) Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosome location, and functional expression, *DNA and Cell Biol.*, 9, 193-203.
- Deguchi, T. (1992) Physiology and molecular biology of arylamine N-acetyltransferases, *Biomedical Res.*, 13, 231-242.
- Einsto, 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, *Mutat. Res.*, 259, 95-102.
- 降旗千恵, 宇野芳文 (1993) *in vivo-in vitro* ラット・マウスの UDS と RDS 試験について, 環境変異原研究, 15, 155-171.
- Hakura, M., S. Morimoto, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium ada* gene, which encodes O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, *J. Bacteriol.*, 173, 3663-3672.
- 林 真 (1991) 小核試験, サイエンティスト社, 東京.
- Hein, D. W. (1988) Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis, *Biochem. Biophys. Acta*, 948, 37-66.
- 平井 収, Tice, R. R. (1994) Single Cell Gel Assay: 細胞レベルでの高感度な DNA 損傷検出法, 変異原性試験, 3, 1-11.
- Levine, A. J. (1993) The tumor suppressor genes, In: C. C. Richardson, J. N. Abelson, A. Meister, C. T. Walsh (Eds.), *Annual Review of Biochem.*, Annual Reviews Inc., Palo Alto, Vol. 62, pp. 623-651.
- Lindahl, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi and Y. Nakabepu (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents, In: C. C. Richardson, P. D. Boyer, I. B. Dawid, A. Meister (Eds.), *Ann. Rev. Biochem.*, Annual Reviews Inc., Palo Alto, Vol. 57, pp. 133-157.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- Matsuoka, A., N. Yamazaki, T. Suzuki, M. Hayashi and T. Sofuni (1993) Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosomal aberration test, *Mutat. Res.*, 272, 223-236.
- 能美健彦 (1991) 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, 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.
- Rosenkranz, H. S. and R. Mermelstein (1983) Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal, *Mutat. Res.*, 114, 217-267.
- Russell, L. B., W. L. Russell, E. M. Rinchik and M. D. Shelby (1989) Chlorambucil effectively induced deletion mutations in mouse germ cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3704-3708.
- Speit, G., W. Menz, C. Roscheisen and B. Koberle (1992) Cytogenetic and molecular characterization of the mutagenicity of chlorambucil in V 79 cells, *Mutat. Res.*, 283, 75-81.
- Sugimura, T. (1986) Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan, *Sciences*, 233, 312-318.
- Wakabayashi, K., M. Nagao, H. Esumi and T. Sugimura (1992) Food-derived mutagens and carcinogens, *Cancer Res. (Supply.)*, 52, 2092s-2098s.
- Watanabe, M., T. Nohmi and M. Ishidate Jr. (1987) New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes, *Biochim. 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 nitro-reductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA 98 and TA 100, *Mutat. 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-acetyltransferase levels, *Mutat. Res.*, 234, 337-348.

Watanabe, M., T. Sofuni and T. Nohmi (1992) Involvement 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.

Watanabe, M., A. Matsuoka, N. Yamazaki, M. Hayashi, T. Deguchi, T. Nohmi and T. Sofuni (1994) New sublines of Chinese hamster CHL stably expressing human NAT 1 or NAT 2 N-acetyltransferases or *Salmonella typhimurium* O-acetyltransferase: comparison of the sensitivities to nitroarenes and aromatic amines using the *in vitro* micronucleus test, *Cancer Res.*, in press.

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*, *J. Bacteriol.*, 175, 5539-5547.

Yamada, M., T. Sofuni and T. Nohmi (1992) Preferential induction of AT-TA transversion, but not deletions, by chlorambucil at hisG428 site of *Salmonella typhimurium* TA 102, *Mutat. Res.*, 283, 29-33.

環境変異原研究 15: 213-217 (1993)

癌原物質による癌遺伝子の活性化

国立がんセンター研究所発がん研究部 長尾 美奈子

1. はじめに

細胞の癌化には、多くの場合複数のがん遺伝子及びがん抑制遺伝子変異が必要である。特定のがんでは、ある特定のいくつかのがん遺伝子及びがん抑制遺伝子変異を伴う。例えば大腸では、*APC*, *K-ras*, *p53* などが腫瘍化に関与する遺伝子である。さらに進行がんへの進展には *DCC* などが関与する(宮木らによる。*Vogelstein* らは少し異なるモデルを提唱している)。しかし大腸がんでもこれらの遺伝子に変異を伴わないものもあり、腫瘍化に必要な遺伝子変異にもいくつかの組み合わせがある。また、つい最近、*HNPPCC*(FCC)という DNA のミスマッチ修復酵素遺伝子異常が遺伝性非ポリポージス大腸がんに関与していることが報告された。この遺伝子異常は、ヒト大腸がんの 15% 位で起こっている(Ionov *et al.*, 1993; Aaltonen *et al.*, 1993)。またヒト染色体 8 番の短腕にのっている抑制遺伝子の関与も報告されている(Ichii *et al.*, 1993)。このように 1 つの臓器の腫瘍でもいろいろのがん関連遺伝子変異が関与している。

一方、化学発がん物質は、物質特有の mutational fingerprint を DNA 上に残す可能性がこれまでの研究から示唆されている(Harris, 1993)。例えばアフラトキシン B1 汚染のある地方のヒトの肝がんでは、*p53* 遺伝子のコドン 249 における AGG→AGT 変異が特異的に観察される。UV が原因と考えられ皮膚がんではピリミジンが連続して配列している部位に変異がある(Brash *et al.*, 1991)。*p53* 変異は、ヒトの場合種々の腫瘍で、しかも約 50% という高頻度で見つかる。また、変

異のターゲットとなっている配列も比較的広範囲に及ぶことから、この遺伝子の変異様式をもとに、がん誘発原因物質を追求するというアプローチが考えられる。がん原因物質が外来性のものか、内因性のものか推定することも試みられている。例えば、欧米の大腸がんでは *p53* 変異の 60% 以上は CpG site の C→T 変異である。変異のホットスポットであるコドン 175, 273 および 282 の CpG site は血球細胞で methyl 化され 5-methylcytosine になっていることが確認されている。C→T 変異は germ line 自然突然変異としてもっとも頻度が高く観察されることから、内因性因子によって脱アミノ反応が誘発された可能性が考えられている。それに対しヒト肺がん及び乳がんでは G→T 変異の頻度が比較的高く外来性因子が *p53* 変異の原因になっていると考えられている(Biggs *et al.*, 1993)。

原因物質が明らかである動物実験系を用いて、発がん物質の fingerprint を明らかにすることは、ヒトがんの原因物質を追求するうえで、重要な情報を提供してくれると言える。我々は、ヒトが日常摂取している発がん性ヘテロサイクリックアミン(HCA)の残す fingerprint の特徴を明らかにし、HCA がヒト発がんにどのような役割をはたしているかを分子レベルで明らかに出来るかという問題に挑戦している。その研究の一端を紹介する。

2. MeIQ および IQ 誘発扁平上皮腫瘍における ras の活性化

MeIQ(2-アミノ-3,4-ジメチルイミダゾ[4,5-f]キ

〒104 東京都中央区築地 5 丁目 1-1
Carcinogenicity tests using mutant rats (LEC, NAR)
Minako Nagao, Masako Ochiai and Hideko Sone
Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute, 1-1, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku,
Tokyo 104, Japan

Table 1. H-ras Mutations in Squamous Cell Tumors Induced by MeIQ.

Animal species	Tumor	Tumors with H-ras mutation/ examined	Mutation profile (codon)	Case
Mouse	Forestomach	4/7	GCC → GTC (13)	4
Rat	Zymal gland	10/15	GCC → GTC (13)	10
			GGA → GAA (12)	1
			GGA → GTA (12)	1

(Makino et al., 1992, Kubo et al., 1991)

Table 2. ras and p53 Gene Mutation in Zymal Gland Tumors Induced by IQ in F344 Rats.

Sample	ras		p53	
	Mutation	Amino acid alteration	Mutation	Amino acid alteration
Papilloma				
2	Ki-ras GGA → TGT	G ¹² → C ¹²	—	—
8	Ha-ras GGA → GAA	G ¹² → E ¹²	—	—
SCC				
1	—	—	—	—
3	Ha-ras GGC → CGC	G ¹³ → A ¹³	GTG → TTG	V ²¹⁴ → L ²¹⁴
4	Ha-ras GGC → CGC	G ¹³ → A ¹³	—	—
5	Ha-ras GGA → GAA	G ¹² → E ¹²	TGC → TTC	C ¹⁷⁴ → F ¹⁷⁴
6	—	—	—	—
7	Ha-ras CAA → AAA	Q ⁶¹ → K ⁶¹	—	—
9	Ha-ras CAA → AAA	Q ⁶¹ → K ⁶¹	—	—
10	—	—	—	—
11	Ha-ras GGA → GAA	G ¹² → E ¹²	—	—
12	Ki-ras GGT → TGT	G ¹² → C ¹²	—	—
13	Ha-ras CAA → AAA	Q ⁶¹ → K ⁶¹	—	—
19	Ha-ras GGA → GAA	G ¹² → E ¹²	CGT → GGT	R ¹⁵⁶ → G ¹⁵⁶
21	Ha-ras CAA → AAA	Q ⁶¹ → K ⁶¹	GAA (deletion)	frameshift

ノリン)により誘発されたマウス前胃扁平上皮腫瘍について ras の活性化を検討した。7例の腫瘍のうち 4 例に H-ras の活性化が見られ、その変異様式はいずれもコドン 13 の GGC→GTC であった。K-ras および N-ras には変異は認められなかった (Makino et al., 1992)。Kudo ら (1991) は、MeIQ 誘発ラット、シンバル腺扁平上皮腫瘍に高率に (10/15) H-ras 変異を認めた。10例すべてに同じ GGC→GTC 変異が検出され、2 例のがんでは、コドン 12 に重複して変異を持つものがあった (Table 1)。以上、MeIQ は種を越えて共通な、しかも非常に特異的な変異を誘発することが明らかになった。

一方メチル基の 1 個少ない IQ(2-アミノ-3-メチルイミダゾ[4,5-f]キノリン)で誘発したラット、

シンバル腺腫瘍では、ras の活性化率は同様に極めて高率であったが、その変異様式は非常に多様性に富んでいた (Table 2)。H-ras のコドン 12, 13 および 61 に、各々、G→A, G→C、および C→A が誘発されていた。K-ras のコドン 12 に G→T 変異が誘発されていた。IQ はグアニン塩基と共有結合する。ras の活性化は全て G·C 塩基対に生じているので、多様な ras の変異は全て IQ が共有結合した直接の結果であると考える。これらの結果は、K-ras の活性化も H-ras の活性化と同様、細胞の腫瘍化を導く変化であること、さらに、化学物質によって変異を誘発する遺伝子に特異性があることを示唆するもので大変興味深い。

Takahashi (1993) らも同様の結果を得ている。

IQ 誘発ラット、シンバル腺扁平上皮がんでは

Table 3. Mutations in Rat Colon Tumors Induced by Heterocyclic Amines.

Heterocyclic amine	Ki-ras	Ha-ras	N-ras	p53	APC MCR
Glu-P-1	1/7 (Codon 12 GGT → GTT)	0/7	0/6	0/7	
IQ	0/11	0/11	0/11	0/12	
PhIP	0/9	0/9	0/9	0/9	2/8 (Codon 1416 GGG → GG)

p53 の変異も 13 例中 4 例に検出された (Table 2)。変異は全て G·C 塩基対に生じたものであったが、変異コドンはそれぞれ異なった。現在のところ、IQ の fingerprint としての特徴は明らかにされていない。

3. HCA 誘発ラット大腸がんにおける遺伝子変異

発がん性の証明された HCA10 種類のうち、ラットに大腸がんを誘発するものが 5 種類ある。前に記したように、ヒト大腸がんではその遺伝子変異の解明がかなり進んでいる。Sporadic なヒト大腸がんでは、K-ras 変異が約 50%, p53 変異が 65~70%, APC 変異が 80% に検出されている。そこで HCA 誘発ラット大腸がんについてこれらの遺伝子における変異を解析した。用いた sample は 27 例で、IQ 誘発腫瘍の 2 例は adenoma であったが、その他 25 例はすべて adenocarcinoma と診断されたものである。結果を Table 3 に示す。K-ras の活性化は Glu-P-1 誘発大腸がん 1 例に認められたのみで他の 26 例には変異は認められなかつた。また 27 例すべてに H-ras および N-ras の活性化は検出されなかつた (Kakiuchi et al., 1993)。さらに p53 に関しても調べたが、変異は全く検出されなかつた (Ushijima et al., 1993)。

次に APC 遺伝子変異を検討した。APC 遺伝子は mRNA コーディング領域が 8 kb 以上にもまたがる大きな遺伝子で、ラットのスクレオチド配列が全く報告されていなかつた。そこで、まず塩基配列の決定から行った。ヒト大腸がんに生じた、sporadic な APC 遺伝子変異はエキソン 16 にあるコドン 1286-1513 に、即ち MCR (Mutation cluster region) と呼ばれる領域に高頻度に観察された (Miyoshi et al., 1992)。そこでラッ

トの MCR のスクレオチド配列を決定し、この領域における変異を検討した。Table 3 に示すように PhIP 誘発大腸がん 8 例のうち 2 例に全く同じ変異、即ちヒト APC のコドン 1416 番に相当する配列 GGG が GG に変異していた。現在他の領域についても検討中であるが、もう 1 コ GGG→GG の欠損がみつかっており、この変異が PhIP の fingerprint として使える可能性が出てきた。APC 遺伝子の MCR における変異は PhIP 大腸がんの 25% に検出され、この遺伝子は HCA 誘発ラット大腸がんで変異しているがん関連遺伝子としてはじめてとらえることができたものである。

ラット大腸がんに関しては、DMH (ジメチルヒドラジン) またはその metabolite のアゾキシメタンで誘発されたものの約 30% に K-ras の活性化が報告されている。DMH で誘発される腫瘍と HCA のものとでは腫瘍の形態が異なる。また実験に用いたラットの系統も異なる。K-ras 変異における頻度の差が何によるのかは現在不明である。

ヒト大腸がんでは p53 変異は adenoma→carcinoma の conversion の際に関与していると考えられている (宮木ら)。解析した HCA 誘発大腸がんはすべて高分化型の腺癌であり、さらに悪性度が進んだ進行癌で変異しているか否か検討する必要がある。p53 の機能としては、細胞周期を制御している cdk の活性を阻害する p21 (WAF-1, CiPl, sdil とも呼ばれる) の発現の制御に関わっていることが明らかにされた (Marx, 1993)。

APC 遺伝子産物は homo-oligomer を形成し、E-カドヘリン蛋白である β-カテニンと associate して (Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993) 細胞間接着を通して細胞増殖や分化を制御している

と考えられている。ヒト大腸腫瘍における *APC* 変異は、frameshift や non-sense コドンへの点突然変異が非常に多い。*APC* の不活性化には N 末が intact で C 末側の truncation が必要なことが推定される。PhIP 誘発ラット大腸がんでも frameshift が誘発されており、変異により *APC* の機能喪失が生じたと考えられる。PhIP は *in vivo* でグアニン塩基の 8 位に共有結合することが証明されている。従って、*APC* における変異は PhIP の共有結合により direct に誘発されたものと考えられる。GGG と並んだ配列では slippage が起こりやすいのであろう。

4. おわりに

ヒト発がんの原因が環境因子によることが疫学的に示唆され、我々は日常食品中に HCA という発がん物質の存在を証明して来た。HCA は、勿論単独でヒトがんを誘発しているとは考え難い。多数の遺伝子変異を必要とする発がん過程で、いずれかの step で HCA が関与していることは容易に推定できる。このことを証明する手段として、我々は mutational fingerprint からのアプローチを取った。

研究が進むに従って、mutational fingerprint は複雑な factor を含んでいることが次第にわかつて来た。サルの *p53* のコドン 249 はヒトと同じ AGG であるが、AFB₁ で誘発された肝がんでの *p53* の変異は 4 例中 1 例にコドン 175 が検出され、コドン 249 に変異のないことが確認されている (Fujimoto *et al.*, 1992)。またラットの *p53* のスクレオチド配列はヒトとは微妙に異なり、ヒトでは AGG (Arg) であるのに対しラットでは CGG (Arg) で第 3 レターの G→T 変異は silent である。最近 IQ 投与により A/J マウスに誘発された肺がんと肝がんでは、K-ras および H-ras がそれぞれ活性化されているが、誘発された変異様式はそれぞれ異なっていると報告されている (Herzog *et al.*, 1993)。A/J マウスでは肺がんが自然発生するため、IQ が発がんのどの step に関与しているのか現在不明である。実験手技としては、これらの問題は解決可能であり、はたして臓器により変異様式が異なるか否か、今後次第

に明らかにされていくであろう。また mutational fingerprint が、動物の種や系統の差によってどの位影響を受けるものなのかを明らかにすることは、ヒト発がんの原因を追求する上で重要な課題である。

参考文献

- Aaltonen, L. A., P. Peltomäki, F. S. Leach, P. Sistonen, L. Pylkkänen, J.-P. Mecklin, H. Järvinen, S. M. Powell, J. Jen, S. R. Hamilton, G. M. Petersen, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and de la Chapelle, A. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer, *Science*, 260, 812-816.
- Biggs, P. J., W. Warren, S. Venitt and M. R. Stratton (1993) Does a genotoxic carcinogen contribute to human breast cancer? The value of mutational spectra in unravelling the aetiology of cancer, *Mutagenesis*, 8, 275-283.
- Basrur, D. E., J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J., McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin and J. Pontén (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10124-10128.
- Fujimoto, Y., L. L. Hampton, L.-di Luo, P. J. Wirth and S. S. Thorgeirsson (1992) Low frequency of *p53* gene mutation in tumors induced by aflatoxin B₁ in nonhuman primates, *Cancer Res.*, 52, 1044-1046.
- Harris, C. C. (1993) *p53*: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment, *Science*, 262, 1980-1981.
- Herzog, C. R., H. A. J. Schut, R. R. Maronpot and M. You (1993) *ras* mutations in 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced tumors in the CDF₁ mouse, *Mol. Carcinog.*, 8, 202-207.
- Ichii, S., S. Takeda, A. Horii, S. Nakatsuru, Y. Miyoshi, M. Emi, Y. Fujiwara, K. Koyama, J. Furuyama, J. Utsunomiya and Y. Nakamura (1993) Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP), *Oncogene*, 8, 2399-2405.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata and M. Perucho (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis, *Nature*, 363, 558-561.
- Kakiuchi, H., T. Ushijima, M. Ochiai, K. Imai, N. Ito, A. Yachi, T. Sugimura and M. Nagao (1993) Rare frequency of activation of the Ki-ras gene in rat colon tumors induced by heterocyclic amines: Possible alternative mechanisms of human colon carcinogenesis, *Mol. Carcinog.*, 8, 44-48.
- Kudo, M., T. Ogura, H. Esumi and T. Sugimura (1991) Mutational activation of c-Ha-ras gene in squamous cell carcinomas of rat Zymbal gland induced by carcinogenic heterocyclic amines, *Mol. Carcinog.*, 4, 36-42.
- Makino, H., M. Ochiai, A. Caignard, Y. Ishizaka, M. Onda, T. Sugimura and M. Nagao (1992) Detection of a Ha-ras point mutation by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis in 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline-induced mouse forestomach tumors, *Cancer Lett.*, 62, 115-121.
- Marx, J. (1993) Gene defect identified in common heredity colon cancer, *Science*, 262, 1645-1646.
- Miyoshi, Y., H. Nagase, H. Ando, A. Horii, S. Ichii, S. Nakatsuru, T. Aoki, Y. Miki, T. Mori and Y. Nakamura (1992) Somatic mutations of the *APC* gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the *APC* gene, *Human Mol. Genetics*, 1, 229-233.
- Rubinfeld, B., B. Souza, I. Albert, O. Müller,
- S. H. Chamberlain, F. R. Masiarz, S. Munesmitsu and P. Polakis (1993) Association of the *APC* gene product with β -catenin, *Science*, 262, 1731-1734.
- Su, L.-K., B. Vogelstein, and K. W. Kinzler (1993) Association of the *APC* tumor suppressor protein with catenins, *Science*, 262, 1734-1737.
- Takahashi, M., T. Minamoto, T. Sugimura and H. Esumi (1993) High frequency and low specificity of *ras* gene mutations in rat Zymbal's gland tumors induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, *Carcinogenesis*, 14, 1355-1357.
- Ushijima, T., H. Makino, H. Kakiuchi, R. Inoue, A. Tsujimoto, T. Sugimura and M. Nagao (1993) Genetic alterations in HCA-induced tumors, In: Adamson, R., J-A. Gustafsson, N. Ito, M. Nagao, T. Sugimura, K. Wakabayashi and Y. Yamazoe, "Heterocyclic Amines in Cooked Foods: Possible Human Carcinogens. Proceedings of 23rd Princess Takamatsu Symposium" Princeton Scientific Publication Co., Inc., Princeton, NJ. in press.

変異原・癌原物質の活性化と個体差

北海道大学薬学部代謝分析学講座 鎌滝哲也, 横井毅,
中島美紀, 澤田稔

1. はじめに

全く同じものを食べ、生活していても癌になるヒトとならないヒトがいる。煙草を吸っていても癌になるヒトとならないヒトがいる。このような違いは初めは単に偶発的なものと考えられていたが、さまざまな研究の証拠が積み重ねられてくる従い、遺伝的な因子によって癌になりやすいヒトと癌になりにくいヒトがいるらしい事がわかつてきた。その最初の証拠は発癌物質を摂取させても動物の系統による発癌の違いである（鎌滝哲也, 1983）。また、ヒトにおいても高発癌の家系の存在と、その原因の解析が進むに従い遺伝的な因子の重要性が確定的になってきた（Knudson, 1986; Eng and Ponder, 1993）。

実験動物に癌原物質を投与したときの発癌のし易さ、換言すると動物における発癌リスクの研究の成果は、ヒトにおける発癌リスクの疫学的な研究の成果と必ずしも一致していない。しかし、従来このような矛盾はその後の詳しい研究で少しづつ解決されており、むしろ研究の矛盾が新しい研究の糸口にさえなっている。

ここでは癌原物質の代謝的な活性化に関する酵素の遺伝的な多型と発癌リスクについて我々の研究成果を交えながら解説する。

2. 発癌の個体差の原因となる因子

Fig. 1 に示したように化学発癌物質を摂取してから発癌に至るまでには色々なステップがある。このステップを一つずつ検討すればどの因子が発癌の個体差の発現に最も深く関わっているかが分

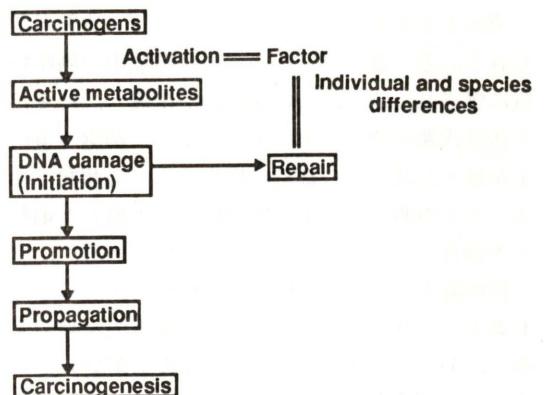


Fig. 1. Multistage carcinogenesis.

かるはずである。癌原物質はそのもの自身化学的に安定であり、遺伝子 DNA に共有結合することは出来ない。遺伝子損傷を惹起するには癌原物質が生体内で代謝され、化学的に不安定な、あるいは反応性の高い代謝物になる必要がある。このような活性代謝物の生成には様々な酵素が関与しており、その酵素の活性に大きな個体差があることが最近の研究で確定的となっている。したがってこれらの酵素が発癌の個体差の発現に重要な役割を担っている可能性がある。癌原物質による遺伝子損傷が発癌のイニシエーションと言われるが、損傷された遺伝子の修復は発癌の防御の意味でとても重要である。しかも、このステップの個体差は大きいようである。発癌のプロモーションやプロパゲーションに関する研究は近年急速に進歩してきている。このステップでは大きな個体差は見いだされていない（藤木博太、私信）。

〒060 北海道札幌市北区北 12 条西 6 丁目

Metabolic activation of promutagens and procarcinogens and its individual differences

Tetsuya Kamataki, Tsuyoshi Yokoi, Miki Nakajima and Minoru Sawada

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

3. 遺伝子修復酵素の個体差

損傷された遺伝子の修復の重要性は感覚的にも分かりやすい。環境中にいかに多数の癌原物質が存在するかは変異原試験の研究成果が明確に示している。したがって、我々は常に多数の環境中の癌原物質に曝され、これらは我々の体内の遺伝子を損傷していると想像される。それでも全てのヒトが癌にならないのは各種の修復酵素が損傷された遺伝子を正常に修復しているからであると考えられる。逆に我々が癌になるのは環境中の癌原物質に曝され、その活性代謝産物が生成し、たまたま活性代謝産物が修復酵素を欠損した細胞の遺伝子を襲った時にその細胞が癌化するとも想像できる。ヒトの個体によって修復酵素を欠損した細胞を多数持っている個体がある可能性もあるし、また修復酵素の発現レベルが低い個体がある可能性もある。これ迄に知られている実験事実を列記すると、1) ヒトのリンパ球に紫外線を照射したときの不定期DNA合成(unscheduled DNA synthesis)は個体によって5倍も異なっていると報告されている(Setlow et al., 1983)。2) アルキル化によるDNA損傷の傷復を行うO⁶-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼに大きな個体差があったという(D'Ambrosio et al., 1984, 1987; Gerson et al., 1985; Lawley et al., 1986)。また、3) O⁶-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼはアルデヒドや抗がんアルキル化剤によって阻害されたと報告されている(Grafstrom et al., 1984; Sagher et al., 1988)。従って、これらの化学物質によって遺伝子修復能が

減少する可能性が示唆される。

4. 薬物代謝酵素系による癌原物質の活性化と不活性化

チトクロームP450をはじめ多数の酵素が癌原物質の活性化に関与するが、これらの酵素は活性化のみを行うのではなく不活性化も触媒する。そこで、活性化を触媒することが知られている誘導剤を投与しても必ずしも発癌が促進されるとは限らない(Lutz, 1979)。むしろ一般的にはチトクロームP450などを誘導する誘導剤を投与すると発癌は抑制されることが多い。それは誘導される酵素自身が不活性化も触媒し、また同時に誘導される他の酵素も不活性化を触媒するからである。他方、癌原物質を投与すると癌が起こることは実験的にも証明されており確かなことである。これらを総合すると、恐らく限局された組織の、それもある特定の細胞で生じた活性代謝物が解毒的な代謝を免れ、その細胞の遺伝子を損傷し癌へと導くのではないかと想像される。もし発癌の個体差をこのような考え方で無理に説明しようとすれば、活性化能は高く解毒能の低い細胞の割合がヒトの個体によって異なっているのだろうということになるが、この辺は全く研究されていない。

代謝的活性化を必要とする癌原物質の代表としてベンツピレンやアフラトキシンB₁それに2-アセチルアミノフルオレンがある。培養したヒトの組織を用いてこれらの癌原物質のヒト組織のDNAへの共有結合量を調べた例では、組織によって異なるが特に結腸では100倍以上の個体

差があったことが報告(Autrup et al., 1986)されている(Table 1)。この研究の場合おそらく代謝的活性化と不活性化の複雑なバランスによって結果として大きな個体差が見られたものと考えられる。

5. N-アセチルトランスフェラーゼの個体差と人種差

薬物代謝の個体差は以前から認識されていた。最近になって遺伝子レベルでの研究も開始され、徐々に個体差の原因が突き止められつつある。発癌に人種差があることも広く知られている。

古くから知られている薬物代謝の個体差の例としてN-アセチルトランスフェラーゼによるアミノ基やヒドロジン基を持つ薬物のN-アセチル化がある。近年、本酵素がヘテロサイクリックアミンのN-水酸化体のO-アセチル化も触媒することが立証され、発癌の分野で大きな注目を集めている。N-アセチルトランスフェラーゼの遺伝的な変異は遺伝子レベルでも明らかにされ、今や、薬物などを投与しなくても遺伝子解析によって容易に判定できるようになった。また、本酵素の多型を同時にしかも簡便に知る方法としてカフェインテストが開発されている。この方法ではボランティ

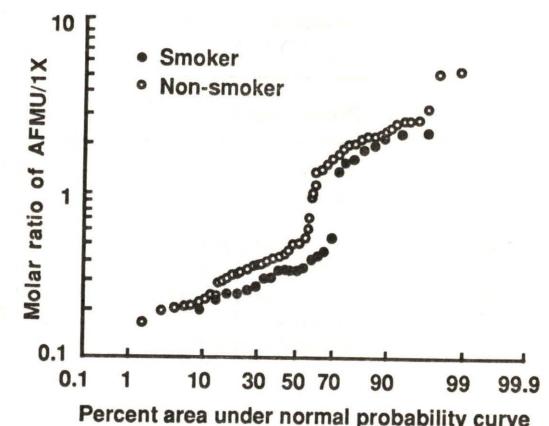


Fig. 3. Probit analyses of the urinary molar ratio of AFMU/IX in Caucasian. The ordinate and abscissa are the same as described in Fig. 2.

アに一定量の珈琲を飲んでもらい、そのボランティアの尿中の代謝産物を分析することによりN-アセチルトランスフェラーゼと後で述べるチトクロームP450(CYP1A2)の活性も同時に推定することが出来る。我々の日本人に関する研究によれば約10%のボランティアがpoor metabolizerであったが全く同じ方法で分析したアメリカの白人では40%がpoor metabolizerであった(Fig. 2, 3)。このデータのみから判断すれば統計的に日本人の方が白人よりヘテロサイクリックアミンに対する発癌リスクが高いことになる。

6. チトクロームP450の個体差と人種差

チトクロームP450の分子種であるCYP2C, CYP2D6の遺伝的な多型が多数の研究によって明らかにされている。癌原性ヘテロサイクリックアミンのN-水酸化(活性化)に関与するCYP1A2にも遺伝的多型があることが提唱されている(Shahidi, 1968)。Table 2に示すようにCYP1A2は多くのヘテロサイクリックアミンを極めて効率良く活性化することが出来る(Kato et al., 1983)。したがって、CYP1A2の活性の高いヒトと低いヒトがあるとすればそれらのヒトでは発癌リスクが異なる可能性があるが、CYP1A2活性に関する遺伝的な多型性の存在はまだ確定していない。まして日本人に遺伝的な多型性があるか否かは全

Table 1. Interindividual Variation in Carcinogen-DNA Binding in Cultured Human Tissues

Tissue	Fold variation		
	BP	AFB1	2-AAF
Bladder	68	127	114
Bronchus	75	120	18
Colon	130	150	-
Endometrium	70	-	-
Liver	20	12	-
Oesophagus	99	70	-
Skin	25	-	-
Stomach	5	-	-

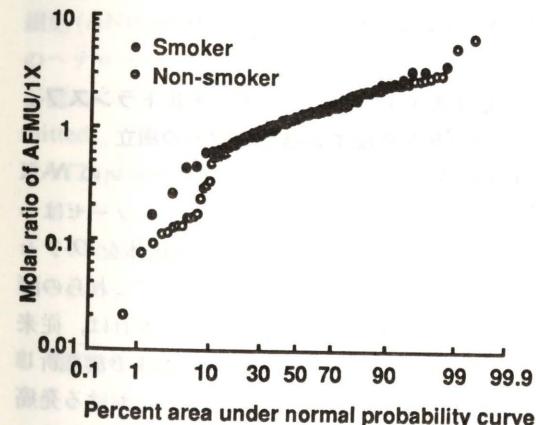


Fig. 2. Probit analyses of the urinary molar ratio of AFMU/IX in Japanese. The ordinate denotes values obtained from analysis of caffeine urinary metabolites in different individuals. The abscissa represents the percentage area under the normal probability curve calculated for each data point.

Table 2. Mutagenic Activation of Promutagens by CYP1A2 and CYP1A1

Promutagens	Tester Strain	CYP1A2 (rev. $\times 10^{-3}$ /nmol CYP1A)	CYP1A1 (rev. $\times 10^{-3}$ /nmol CYP1A)
Trp-P-2	TA98	7810	3650
Glu-P-1	TA98	5090	180
IQ	TA98	2410	202
2-Aminofluorene	TA98	211.4	63.1
2-Acetylaminofluorene	TA98	5.05	1.43
4-Aminobiphenyl	TA98	11.50	1.58
Aflatoxin B ₁	TA100	8.17	1.73
Benzo[a]pyrene	TA100	0.84	2.22

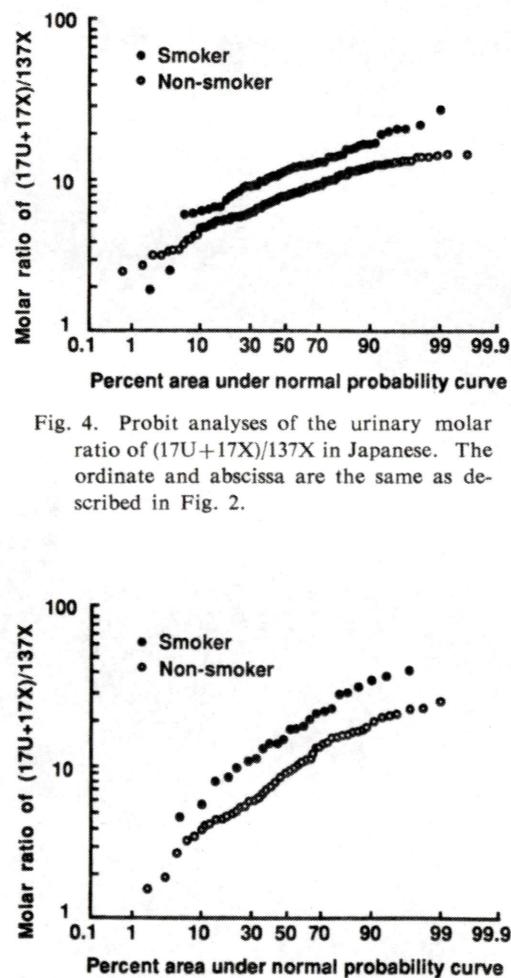


Fig. 4. Probit analyses of the urinary molar ratio of (17U+17X)/137X in Japanese. The ordinate and abscissa are the same as described in Fig. 2.

Fig. 5. Probit analyses of the urinary molar ratio of (17U+17X)/137X in Caucasian. The ordinate and abscissa are the same as described in Fig. 2.

く分かっていない。そこで、我々は米国の Dr. Kadlubar と共同研究を行い、カフェインテストにより CYP1A2 活性の多型性の存在の可能性について検討した。Fig. 4 と Fig. 5 には日本人と白人についての結果を示してある。プロビットプロットにおいて白人では比較的明確な 3 相性の分布を示すが (Butler et al., 1992), 日本人では余り明確ではなく 2 相の分布が認められた。日本人において CYP1A2 に遺伝的な多型性があるか否かを確かめるために家系解析を試みた。すなわち, poor metabolizer の両親や兄弟についてもカフェインテストを実施した。今までに得られた結果は、日本人において CYP1A2 に遺伝的な多型が存在することを消極的にではあるが支持している (Nakajima et al., submitted)。

7. ヒトの CYP1A2 と N-アセチルトランスフェラーゼを発現する培養細胞系の樹立

CYP1A2 はヘテロサイクリックアミンの N-水酸化を行い、N-アセチルトランスフェラーゼはヘテロサイクリックアミンの N-水酸化体を O-アセチル化すると考えられている。そこでこれらの酵素を同時に発現する細胞系を樹立できれば、従来の仮説を細胞レベルで実証出来るだけでなく新しいヘテロサイクリックアミンのヒトにおける発癌リスクを推定する一助になることが期待される。N-アセチルトランスフェラーゼには遺伝的に多型を示さない (monomorphic) 分子種である NAT1 と多型を示す (polymorphic) 分子種 NAT2 の 2 種類があることが明らかになっている (Oh-sako and Deguchi, 1990)。そこで NADPH-チ

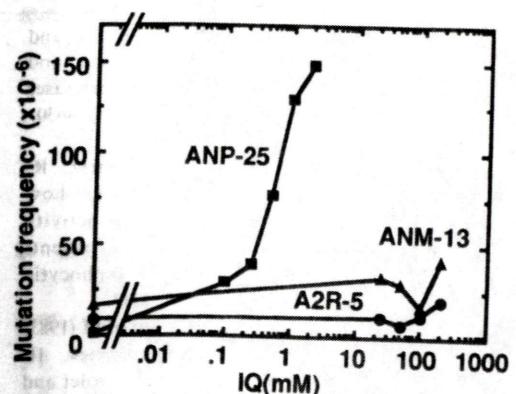


Fig. 6. Mutagenicity of IQ in A2R-5, ANM-13 and ANP-25 cells. Colony-forming ability was determined by seeding 100 cells per dish after 24 h exposure to IQ. ●, A2R-5; ▲, ANM-13; ■, ANP-25.

トクローム P450 還元酵素や CYP1A2 に加え NAT1 と NAT2 の cDNA をそれぞれ導入した CHL 細胞系を樹立した。これらの細胞の培養液に IQ などのヘテロサイクリックアミンを添加して細胞の突然変異を 6-チオグアニンに対する耐性の発現で調べた。CYP1A2 と NAT1 (monomorphic) を発現している細胞 (ANM-13) では突然変異はほとんど見られなかったが CYP1A2 と NAT2 (polymorphic) を組み合わせ発現している細胞 (ANP-25) では相当低い濃度 (約 400 分の 1) のヘテロサイクリックアミンでも明確な突然変異が認められた (Fig. 6) (Yanagawa et al., submitted)。このことは遺伝的に高い CYP1A2 と NAT2 (polymorphic) の活性を示す個体はヘテロサイクリックアミンに対して高い発癌リスクを持っている仮説を積極的に支持するものであると考えられる。

8. 薬物代謝酵素の遺伝的多型と発癌リスク

トクローム P450 や N-アセチルトランスフェラーゼなど直接癌原物質を活性化する酵素の遺伝的多型は発癌のリスクと相関すると考えられるが、現象的にはそう簡単ではなさそうである。たとえば、N-アセチルトランスフェラーゼの活性の高いヒトはヘテロサイクリックアミンに対する発癌リスクが高いと期待される。事実、結腸癌に対

する発癌リスクは有意に高い疫学的なデータが報告されている (Ilett et al., 1987) が、逆に N-アセチルトランスフェラーゼの活性の高いヒトは膀胱癌のリスクは低いという報告 (Lower et al., 1979) もある。

このような矛盾はいずれ解決されなければならない問題である。我々の知識が生体内での発癌を解明するにはまだまだ不十分であることを実感させる一例である。

参考文献

- Autrup, H., R. Grafstrom, K. Vahakangas and C. C. Harris (1986) Inter-individual variations in carcinogen metabolism, Arch. Toxicol., Suppl. 9, 147-153.
- Butler, M. A., N. P. Lang, J. F. Young, N. E. Caporaso, P. Vineis, R. B. Hayes, C. H. Teitel, J. P. Massengill, M. F. Lawsen and F. F. Kadlubar (1992) Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites, Pharmacogenetics, 2, 116-127.
- D'Ambrosio, S. M., G. Wani, M. Samuel and R. E. Gibson-D'Ambrosio (1984) Repair of O⁶-methylguanine in human fetal brain and skin cells in culture, Carcinogenesis, 5, 121-124.
- D'Ambrosio, S. M., M. J. Samuel, T. A. Dutta-Choudhury and A. A. Wani (1987) O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase in human fetal tissues: fetal and maternal factors, Cancer Res., 47, 51-55.
- Eng, C. and B. A. J. Ponder (1993) The role of gene mutations in the genesis of familial cancers, FASEB J., 7, 910-919.
- Gerson, S. L., K. Miller and N. A. Berger (1985) O⁶-Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human myeloid cells, J. Clin. Invest., 76, 2106-2114.
- Grafstrom, R. C., A. Fornace Jr. and C. C. Harris (1984) Repair of DNA damage caused by formaldehyde in human cells, Cancer Res., 44, 4323-4327.
- Ilett, K. F., B. M. David, P. Detchon, W. M. Castleden and R. Kwa (1987) Acetylation phenotype in colorectal carcinoma, Cancer Res., 47, 1466-1469.
- 鎌瀬哲也 (1983) 癌原物質などの化学物質の毒性発現と薬物代謝酵素; 薬物代謝の比較生化学 (加藤隆一, 鎌瀬哲也編), 清至書院/丸善, pp. 21-35.
- Kato, R., T. Kamataki and Y. Yamazoe (1983) N-Hydroxylation of carcinogenic and mutagenic aromatic amines, Environ. Health Perspect.,

- 49, 21-25.
- Knudson, A. G. Jr. (1986) Genetics of human cancer, Ann. Rev. Genet., 20, 231-251.
- Lawley, P. D., G. Harris, E. Phillips, W. Irving, C. B. Colaco, P. M. Lydyard and I. M. Roitt (1986) Repair of chemical carcinogen-induced damage in DNA of human lymphocytes and lymphoid cell line—studies of the kinetics removal of O⁶-methylguanine and 3-methyladenine, Chem. Biol. Interact., 57, 107-121.
- Lower, G. M., T. Nilsson Jr., C. E. Nelson, H. Wolf, T. E. Gamsky and G. T. Bryan (1979) N-Acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark, Environ. Health Perspect., 29, 71-79.
- Lutz, W. K. (1979) *In vivo* covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogens, Mutat. Res., 65, 289-356.
- Nakajima, M., T. Yokoi, M. Mizutani, S. Shin, F. F. Kadlubar and T. Kamataki, Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites; absence of mutation prescribing the phenotype in CYP1A2 gene, submitted.
- Ohsako, S. and T. Deguchi (1990) Cloning and expression of cDNAs for polymorphic and monomorphic arylamine N-acetyltransferases from human liver, J. Biol. Chem., 265, 4630-4634.
- Sagher, D., T. Garrison, J. L. Schwartz, R. Larson, P. Meier and B. Strauss (1988) Low O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase activity in the peripheral blood lymphocytes of patients with therapy-related acute nonlymphocytic leukemia, Cancer Res., 48, 3084-3089.
- Setlow, R. B., J. M. Lipman and L. Sokoloff (1983) DNA repair by articular chondrocytes. II. Direct measurement of repair of ultraviolet and X-ray damage in monolayer cultures, Mech. Ageing Dev., 21, 97-103.
- Shahidi, N. T. (1968) Acetophenetidin-induced methemoglobinemia, Ann. NY Acad. Sci., 151, 822-832.
- Yanagawa, Y., M. Sawada, T. Deguchi, F. J. Gonzalez and T. Kamataki, Stable expression of human CYP1A2 and N-acetyltransferases in Chinese hamster CHL cells and metabolic activation of food-derived heterocyclic amines, submitted.

環境変異原研究 15: 225-232 (1993)

代謝酵素遺伝子の異常と発癌リスク

埼玉県立がんセンター研究所生化学部 川尻 要

1. はじめに

ヒトの癌の多くは、環境中に存在している化学物質に起因しており、発癌は宿主側因子と環境因子との相互作用の結果として理解されている。従って、発癌に関与する宿主側因子の詳細な解析は、環境中に含まれている発癌物質を同定し除去することと同様に、ヒトの癌の一次予防に対して重要な寄与をなすものと考えられている。現在までのところ、ヒトの発癌においては、その宿主因子として遺伝的要素が本質的である癌は少数に限られ、多くの一般的な癌においては遺伝的要素は発癌を決定する要因ではなく、むしろ環境中の発癌物質に対する宿主の代謝能の違いとして発癌感受性の個人差を生み出していると考えられている (Kawajiri *et al.*, 1991)。

一般的には、多くの化学発癌物質の代謝 (initiation) は Phase I の薬物代謝酵素である P450 による活性化代謝とさまざまな Phase II の転移酵素による解毒化反応により構成されており、この代謝的バランスが発癌感受性に重要な役割をはたしていると指摘されている (Ernster *et al.*, 1991)。P450 は一群のヘムタンパク質の総称であり、多くの分子種が存在し、外来性の薬物の代謝だけでなく、ステロイドホルモンや胆汁酸などの多くの重要な生理活性物質の生合成、代謝に関与している (Omura *et al.*, 1993)。ヒトの P450 については現在までのところ 12 種のファミリーが同定されているが (Nelson *et al.*, 1993), これらのうちで CYP1A, CYP2, CYP3 などに属する特定の分子種の P450 がさまざまな発癌物質の活性

化代謝に関与していることが明らかになってきた (Guengerich *et al.*, 1991)。一方、Phase II の酵素としては、glutathione S-transferase, epoxide hydrolase, acetyltransferase, sulfotransferase, glucuronosyltransferase などが知られているが、活性化に作用する酵素もあるので、複雑である。

以前よりヒトの薬物代謝活性には大きな個人差があることが知られていたので、従来の研究においては健常者と癌患者との活性を比較することによって遺伝的な発癌感受性の個人差の問題が検討されてきた (Caporaso *et al.*, 1991)。しかしながら活性を指標とするアプローチにおいてはある種の薬物代謝酵素はさまざまなヒトをとりまく環境中に存在している化学物質 (医薬品、タバコ、アルコールなど) で誘導されること、癌患者の示す活性が疾患の原因ではなく結果を反映している可能性があることなどの本質的な問題点が内在している。近年の分子生物学的な解析法の進歩により、薬物代謝酵素遺伝子の多型と活性との相関性の例も明らかにされてきた。ヒトの癌の多くは環境発癌と考えられるので、発癌物質の代謝に関与する酵素遺伝子の多型と発癌感受性の個人差を検討することは興味深い研究対象とおもわれる。当然のことながら発癌物質の種類と癌の標的臓器により対象とする薬物代謝酵素遺伝子の組み合わせは異なる。ここでは主に筆者らがおこなっている芳香族炭化水素の活性化、解毒化に関与する CYP1A1 と Mu-型の glutathione S-transferase (GST1) の遺伝子多型と肺癌感受性との関連性について論じたい。

〒362 埼玉県北足立郡伊奈町小室 818
Genetic Polymorphism of Drug-Metabolizing Enzymes and Cancer Susceptibility
Kaname Kawajiri

Department of Biochemistry, Saitama Cancer Center Research Institute, 818 Komuro, Ina-machi, Kita-adachi-gun, Saitama 362, Japan

2. CYP1A1 の多型と肺癌感受性

遺伝子多型に基づくケース・コントロール研究により発癌感受性を検討する場合においては基本的なコンセンサスが必要であると思われる。コントロールとなる健常者 DNA ライブライバーの作成に当たっては多型に起因する遺伝子型の出現頻度が集団遺伝学の Hardy-Weinberg の法則を満たす十分なサイズであること、病院内コントロールや volunteers などの biased populations は用いずに疫学的な data のある一般健常者集団より作成することなどが必須であろうし、ケース側の患者 DNA ライブライバーにおいても十分大きなサイズは当然であり（サイズの妥当性については多型の遺伝子頻度により変わる）、対象となる患者の選択に予後因子などの bias が入らないようすること、癌の種類によっては組織型分類などを考慮する必要があろう。又、遺伝的バックグラウンドが明らかに異なる人種が複数存在する集団においては単なる統計処理で調整して一つの研究対象集団として扱うのではなく、それぞれの異なる人種においてケース・コントロール研究を行い相互に比較することは当然のことである。

芳香族炭化水素は古くから研究が行われている代表的な化学発癌物質であり喫煙中に含まれている benzo(a)pyrene は重要な肺癌誘発物質の一つである。CYP1A1 はヒトを含む多くの動物種に存在し、肝、肺などの臓器に誘導的に発現して

いることが知られている。ヒトの肺で発現している CYP1A1 については最近、島田らにより単離された benzo(a)pyrene 代謝における役割が報告された (Shimada *et al.*, 1992)。その結果、主に中間代謝体である 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene から genotoxic な products の形成に関与する事が明らかにされた。

クローニングにより明らかにされた CYP1A1 遺伝子の構造は 7 個のエキソンからなっており 512 のアミノ酸から構成されている (Jaiswal *et al.*, 1985; Kawajiri *et al.*, 1986)。この遺伝子の poly A 付加シグナルから約 250 塩基下流に T から C への点突然変異があり、その結果、制限酵素 Msp I での多型が出現する。すなわち、A 型 (m1/m1) はこの制限酵素による切断部位を全く持たないヒト、C 型 (m2/m2) は切断部位を持つヒト、B 型 (m1/m2) はヘテロである (Kawajiri *et al.*, 1990)。この遺伝子型の同定は多型部分を含む領域の PCR 産物を制限酵素処理する事によって容易に可能である (Hayashi *et al.*, 1991)。

そこでまず健常集団における遺伝子型の分布と肺癌患者中の遺伝子型の分布を比較した。一般住民コホートの約 2500 人の健常者の白血球より単離した DNA からさらに無作為に選んだ 375 人の DNA について遺伝子型の判別を行い、A 型 166 人、B 型 169 人、C 型 40 人という結果を得た (Nakachi *et al.*, 1991)。これから計算された m1,

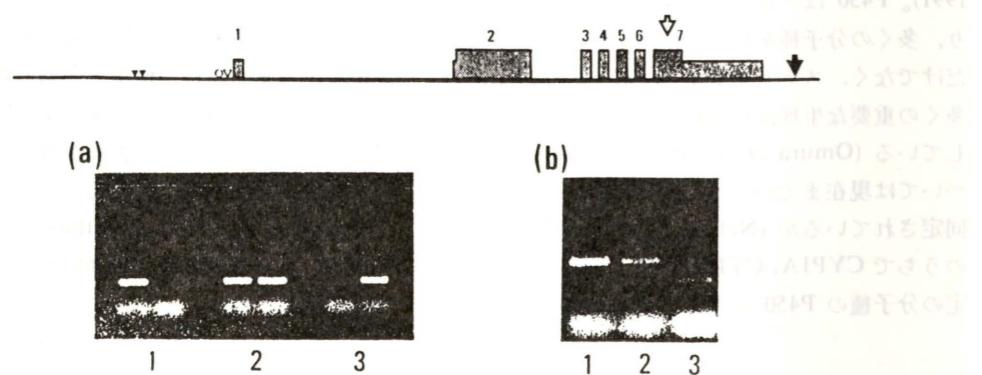


Fig. 1. Structural organization of the human CYP1A1 gene and detection of polymorphisms. (a) Isoleucine-valine polymorphism. Paired lanes 1, 2, and 3 show isoleucine-homozygous, heterozygous, and valine-homozygous, respectively. (b) Msp I polymorphism. Lanes 1, 2, and 3 show genotypes A, B and C, respectively. ▼, XRE; ○, BTE; ▽, TATA box; ↓, polymorphic isoleucine/valine site; ▲, polymorphic Msp I site.

Table 1. Distribution of three genotypes of CYP1A1 gene in cancer patients and healthy controls

Populations	CYP1A1 genotypes			Total
	A(m1/m1)	B(m1/m2)	C(m2/m2)	
Healthy controls	166 (44.3)	169 (45.1)	40 (10.6)	375 (100%)
Lung cancer	130 (39.9)	144 (44.1)	52 (16.0)	326 (100%)
Kreyberg I type	61 (34.7)	78 (44.3)	37 (21.0)	176 (100%)
Squamous cell ca.	38 (36.1)	43 (41.0)	24 (22.9)	105 (100%)
Undif. cell ca.	23 (32.4)	35 (49.3)	13 (18.3)	71 (100%)
Kreyberg II type (Adeno ca.)	69 (46.0)	66 (44.0)	15 (10.0)	150 (100%)
Stomach cancer	45 (43.3)	50 (48.0)	9 (8.7)	104 (100%)
Cororectal cancer	37 (47.5)	32 (41.0)	9 (11.5)	78 (100%)
Breast cancer	15 (48.4)	13 (41.9)	3 (9.7)	31 (100%)

m2 の遺伝子頻度はそれぞれ 0.67, 0.33 であり Hardy-Weinberg の法則を満たしている。一方、肺癌患者 326 人中の遺伝子型の分布は A 型 130 人、B 型 144 人、C 型 52 人であった。肺癌患者を組織型別に見てみると、喫煙との因果関係が深いと言われている Kreyberg I 型に C 型が多くみられ特に扁平上皮癌 (squamous cell ca.) で顕著であり、健常者 (11%) の 2 倍以上 (23%) をしめた。又、喫煙との関係が弱いと考えられる Kreyberg II 型の腺癌 (adenocarcinoma) や、発症に benzo(a)pyrene の関与が少ないと考えられている胃癌、大腸癌、乳癌においては健常者での出現頻度と変わらなかった。これらの結果は、C 型のヒトは喫煙が深く関係するといわれるタイプの肺癌に対する感受性が高いことを示している。

なぜ C 型が肺癌に対して感受性が高いのか、その分子レベルでのメカニズムはどうなのか。ま

ず考えられることは、この遺伝子の多型によって直接 CYP1A1 のタンパク質が質的、あるいは量的な差を生じることによって benzo(a)pyrene の活性化能に差を生み、発癌の感受性の差として現ってきたということである。あるいはこの多型が他の発癌感受性を規定している重要な遺伝子とリンクしている可能性も考えられる。そこで、A 型、C 型の DNA を CYP1A1 遺伝子のアミノ酸翻訳領域及び発現調節領域を中心に、PCR 直接塩基配列決定法により解析した (Hayashi *et al.*, 1991)。その結果、転写調節領域には差は認められなかつたが、第 7 エクソンの中に 1 か所の点突然変異が見いだされた。すなわち、462 残基目のアミノ酸をコードしているトリプレットの一文字目が A から G に変化しておりイソロイシン (Ile) からバリン (Val) への置換をもたらしていた。しかもこの置換の生じる部位は HR2 領域と

呼ばれる (Gotoh *et al.*, 1983) ヘム結合領域に含まれていた。

次に Ile-Val 多型がヒトの集団中にどの程度存在し、又、Msp I 多型との関係はどうなのかを調べた (Hayashi *et al.*, 1991)。尚、この遺伝子型の判別は二組のプライマーを使用して allele-specific PCR 増幅法で行った。Msp I 多型の A 型、B 型、C 型の DNA からそれぞれ約 40 人を無作為に抽出し Ile-Val 多型を判定したところ A 型の 98% は Ile 型のホモ (Ile/Ile) であったのに対し、C 型では約 5% が Ile 型のホモ、50% が Val 型のホモ (Val/Val) で残りはヘテロ (Ile/Val) であった。これらの結果から計算された Hill-Robertson の連関係数は 0.778 で、この 2 つの多型は強く associate していることが明らかになった。

ヒトの集団内において 2 種類の一次構造の異なる CYP1A1 が存在することが明らかになったので、肺癌発生との関係を調べた (Hayashi *et al.*, 1992)。健常者 358 人中 Val/Val を有する人は 17 人で 4.7% であったが、喫煙由来の肺癌 (Kreyberg I 型) では 176 人中 22 人で 12.5% を占め健常者に比べ 2.7 倍高い頻度を示した。この分布状態を基にして Val/Val の Ile/Ile に対する発癌

リスクをオッズ比で求めると、肺癌全体で約 2.6 倍、Kreyberg I 型で 3.1 倍、II 型で 2.2 倍の値が求められた。

3. CYP1A1 と GST1 の遺伝子多型の組み合わせと肺癌感受性

CYP1A1 により生じた benzo(a)pyrene の活性型メタボライトは GST1 によりその一部は解毒されるが、この遺伝子にも欠損 (変異) による多型が存在し、両方の allele が欠損している GST1 (-) の人の酵素活性は非常に弱いことも知られている (Seidegård *et al.*, 1988)。GST1 の遺伝子型も PCR を用いて容易に判定できる (Comstock *et al.*, 1990)。その結果、健常者においては、少なくとも一方は正常な GST1 遺伝子を持つ遺伝子型である GST1 (+) の人は 53.4% であり、GST1 (-) は 46.6% であった。Kreyberg I 型、II 型の肺癌患者においては、GST1 (-) は 59.3%，52.3% で GST1 (+) に比べた発癌リスクは 1.7 倍、1.3 倍であった (Hayashi *et al.*, 1992)。

薬物代謝反応は連続した酵素反応であるので、CYP1A1 と GST1 の多型とを組み合わせて発癌へのリスクを検討した (Hayashi *et al.*, 1992)。健

常者における GST1 多型の分布状態は CYP1A1 の多型の視点より見ても GST1 単独での分布と一致しているので、CYP1A1 と GST1 の多型とは遺伝的には独立した現象であると考えられる。ところが喫煙由来の Kreyberg I 型、特に扁平上皮癌においては CYP1A1 の高感受型の Val/Val において GST1 多型の遺伝子型の分布状態が大きく変動していることが明らかになった。すなわち、GST1 (-) の方が (+) に比べ 5 倍以上も多い分布を示した。又、健常者では Val/Val で GST1 (-) は全体で 2.2% を占めるのに対し、扁平上皮癌では 10.6% を示した。Ile/Ile で GST1 (+) に比べ Val/Val で GST1 (-) の組み合わせの遺伝子型を持つ人は扁平上皮癌に 7 倍以上も高い発癌リスクを持つことが明らかになった。組み合わせによるリスクの増加はそれぞれの遺伝子多型単独における場合よりも synergistic に作用していることは明らかであり、これら 2 つの遺伝的危険因子が etiological に関連しあっていることを示唆している。Val 型の CYP1A1 の方が Ile よりも高い benzo(a)pyrene 活性化能を有することを考えると (Kawajiri *et al.*, 1993), synergistic なリスクの増加は、発癌物質代謝の活性化と解毒化のバランスが遺伝的に崩れていることに起因することを示唆していると考えることができる。

4. 遺伝子型と喫煙量との関係からみた肺癌感受性

喫煙中の発癌物質の代謝活性化に関与する CYP1A1 のある特定の遺伝子型が肺癌発生に高い感受性を示すということから、遺伝子型により肺癌発症までの喫煙量に差があることが考えられる。この点を明らかにするために、喫煙との因果関係が強いと言われている扁平上皮癌の患者について遺伝子型と生涯喫煙本数との関係を調べた (Nakachi *et al.*, 1993)。その結果、面接調査を行った 85 人の患者の CYP1A1 の Msp I 多型の遺伝子型は A 型 33 人、B 型 33 人、C 型 19 人で、遺伝子型ごとの発症年令はほぼ等しかったにも拘らず平均生涯喫煙本数はそれぞれ 44 万本、41 万本、32 万本であった。すなわち、感受性の高い C 型は統計的に有意に少ない量で発癌しており、患者の分布も喫煙量が少ない方にシフトしていることが明らかになった。同様なことが Ile-Val 多型でも観察された。高い感受性を持つ Val/Val の患者 (9 人) は 31 万本で発癌に至っているのに対し、Ile/Ile (50 人) は 44 万本と多く、ヘテロの Ile/Val (26 人) は 38 万本とその中間であった。これらのこととは CYP1A1 で代謝される benzo(a)pyrene の活性型 metabolite の質的、量的の相違が遺伝子型によってあることを示唆している。

次に CYP1A1 と GST1 の 2 つの遺伝子型を

Table 2. Distribution of combined genotypes of CYP1A1 and GST1 genes in lung cancer patients and healthy controls

CYP1A1	Genotypes							
	Ile/Ile		Ile/Val		Val/Val		Total	
	GST1	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
Healthy controls	127 (35.5)	106 (29.6)	55 (15.4)	53 (14.8)	9 (2.5)	8 (2.2)	358 (100%)	
Lung cancer	83 (25.4)	105 (32.1)	50 (15.3)	53 (16.2)	11 (3.4)	25 (7.6)	327 (100)	
Kreyberg I type	44 (25.0)	55 (31.3)	23 (13.1)	32 (18.1)	4 (2.3)	18 (10.2)	176 (100)	
Squamous cell ca.	24 (23.1)	37 (35.6)	13 (12.5)	17 (16.3)	2 (1.9)	11 (10.6)	104 (100)	
Undif. cell ca.	20 (27.8)	18 (25.0)	10 (13.9)	15 (20.8)	2 (2.8)	7 (9.7)	72 (100)	
Kreyberg II type (Adeno ca.)	39 (25.8)	50 (33.2)	27 (17.9)	21 (13.9)	7 (4.6)	7 (4.6)	151 (100)	

Table 3. Cigarette consumption of patients in combined genotypes of the CYP1A1 and GST1 genes

Genotypes	No. of subjects (frequency)	Mean age ± SD (yr)	Cigarette consumption ± SD (x 10 ⁴)
CYP1A1 GST1	(+)	12(0.141)	65.1±8.0
	(-)	21(0.247)	42.0±21.9
A	(+)	14(0.165)	65.9±8.1
	(-)	19(0.224)	36.6±18.2
B	(+)	7(0.082)	62.4±11.6
	(-)	12(0.141)	66.8±6.8
C	(+)	12(0.141)	40.3±20.5
	(-)	85(1.000)	31.8±7.7
Total		65.2±8.4	48.3±30.2

組み合わせて喫煙量との関係を検討した。その結果、A型でGST1(+)の遺伝子型の患者(12人、平均年令65才)は48万本で発癌しているのに對し、C型でGST1(-)の患者(12人、平均年令67才)の場合は32万本であった。また、Ile/IleでGST1(+)の患者(19人、平均年令65才)は48万本、Val/ValでGST1(-)の患者(8人、平均年令65才)は29万本で発癌にいたった。これらの遺伝子型の組み合わせを基にした喫煙量との関係は扁平上皮癌患者が85人という限界はあるが、明らかなgrading、すなわち高発癌感受性の遺伝子型の組み合わせほど少ない喫煙本数で発症しており、薬物代謝酵素の遺伝的に規定される代謝バランスと喫煙との相互作用が発癌感受性の個人差を決めている重要な因子の一つであることをしめしている。

遺伝子型による肺癌の相対危険を定量的に評価するために、ケース・コントロール研究を行い喫煙量を考慮して解析した。すなわち肺扁平上皮癌患者各1人につき、性・年令を一致させた健常者2人を前述した2500人のコホート集団から選ん

で計170人の対照群を設定し、遺伝子型および生涯喫煙本数を比較した。対照群では、当然のことながら、遺伝子型による喫煙量の差はなく平均生涯喫煙本数は22万本であった。又、遺伝子型分布はHardy-Weinbergの法則を満たしており、集団遺伝学的にも対照群が適切に選択されていることを示している。C型の平均生涯喫煙本数である32万本を喫煙量の区切り値とし、それ以下および以上の喫煙レベルでのCYP1A1の遺伝子型による肺癌のリスクをオッズ比で求めた。32万以下の喫煙量におけるA型の人の発癌リスクを基準にするとC型は6.5倍と高い遺伝的リスクを示し、32万本以上ではA型は5.5倍、C型は8.3倍と喫煙量の増加によってリスクが高くなるが、少ない喫煙レベルで遺伝子型の影響がより強いという以前の結果(Nakachi *et al.*, 1991)が確認された。さらにGST1の多型を組み合わせて解析してみても、C型でGST1(-)という遺伝子型の組み合わせをもつ人は、A型でGST1(+)に比べ少ない喫煙レベルで16倍もの高いリスクを示したにもかかわらず、高い喫煙レベルでは遺

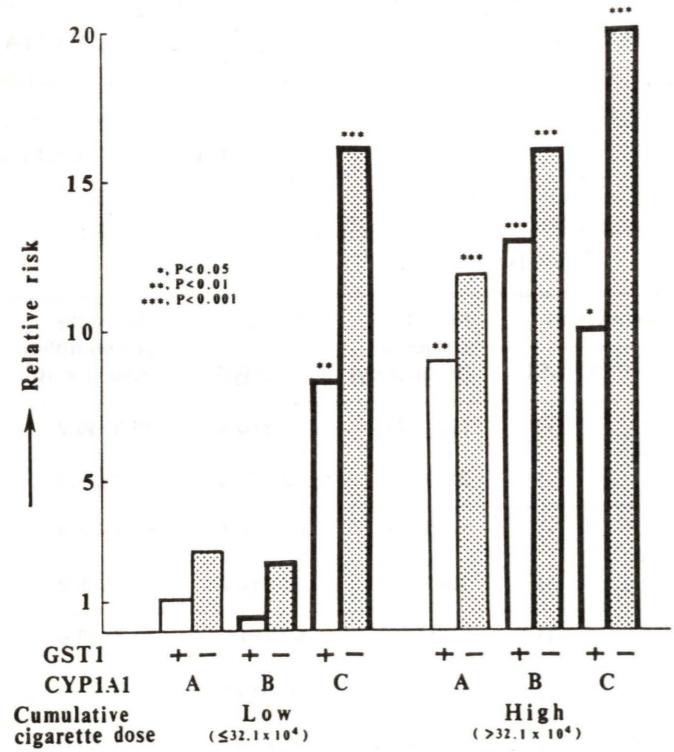


Fig. 2. Relative risk in combined genotypes and cigarette dose.

伝子型の組み合わせによるリスクの違いは2.2倍であった。同様な結果がIle-Val多型とGST1多型との組み合わせにおいても明らかになった。すなわち、低い喫煙レベルにおいてはVal型でGST1(-)の人はIle型でGST1(+)に比べ41倍のリスクを持つにも拘らず高い喫煙レベルにおいては2倍にすぎなかった。これらの結果より、CYP1A1やGST1の遺伝子型による肺癌の感受性は低い喫煙レベルで顕著であり、喫煙量が多いヘビースモーカーのレベルにおいては遺伝的差異はすくなくなり、むしろ環境要因としての喫煙の影響が支配的になることが示された。

5. おわりに

喫煙由来の肺癌の遺伝的感感受性を薬物代謝酵素の遺伝子多型によって検討した。薬物代謝酵素の多くは誘導酵素であり、CYP1A1はAhレセプターやArnt(Ah receptor nuclear translocator)などの転写因子がその発現に重要な役割をはたしている(Hankinson, 1993)。今後、このような因子も発癌感受性との観点で考慮する必要がある。又、発癌感受性の問題は代謝酵素の側面からだけでは一面的であるので、異なるレベルでの遺伝的危険因子をDNAレベルで検討し、それらの結果を体系的に整理することによって議論することが必要である。最近、われわれは、がん抑制遺伝子のp53のコドン72のArg-Pro多型も肺癌感受性に関与しており、それは薬物代謝酵素の遺伝的感感受性とはindependentであることを見出している(Kawajiri *et al.*, 1993)。肺癌の発症、進展においては染色体3p, 13q(Rb), 17p(p53)のがん抑制遺伝子の突然変異や欠損、ras遺伝子などのがん遺伝子の変異が重要であると指摘されている。p53遺伝子の突然変異は累積喫煙本数に関連していると報告されており(Suzuki *et al.*, 1992), このことは喫煙中に含まれる発癌物質の代謝の結果と考えられる。従って、われわれが明らかにした代謝酵素の遺伝子多型と癌部位でのこれらの遺伝子の変異との関係を調べることは、発癌の遺伝的要因と発症との関連性を解明する上で非常に重要なアプローチになるであろう。同時に、実験動物でのモデル系の研究も必要となろう。

謝辞

本稿で述べた研究の多くは当センター研究所生化学部の林慎一、渡辺潤子、疫学部の中地敬、今井一枝博士らとの共同研究である。又、ここに述べた筆者らの研究の一部は、文部省科学研究費補助金、厚生省科学研究費補助金、高松宮妃癌研究基金研究助成金の援助を受けた。

参考文献

- Caporaso, N., M. T. Landi, and P. Vineis (1991) Relevance of metabolic polymorphisms to human carcinogenesis: evaluation of epidemiologic evidence, Pharmacogenetics, 1, 4-19.
- Comstock, K. E., J. S. Sanderson, G. Clafelin, and W. D. Henner (1990) GST1 gene deletion determined by polymerase chain reaction, Nucleic Acids Res., 18, 3670.
- Ernster, L., H. Esumi, Y. Fujii, H. V. Gelboin, R., Kato, and T. Sugimura, (eds) (1991) Xenobiotics and cancer, pp. 1-368, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
- Gotoh, O., Y. Tagashira, T. Iizuka, and Y. Fujii-Kuriyama, (1983) Structural characteristics of cytochrome P-450; Possible location of the heme-binding cysteine in determined amino-acid sequences, J. Biochem., 93, 807-817.
- Guengerich, F. P. and T. Shimada (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes, Chem. Res. Toxicol., 4, 391-407.
- Hankinson, O. (1993) Research on the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor is primed to take off, Arch. Biochem. Biophys., 300, 1-5.
- Hayashi, S.-I., J. Watanabe, and K. Kawajiri (1992) High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes, Jpn. J. Cancer Res., 83, 866-870.
- Hayashi, S.-I., J. Watanabe, K. Nakachi, and K. Kawajiri (1991) Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 IAI gene, J. Biochem., 110, 407-411.
- Jaiswal, A. K., F. J. Gonzalez, and D. W. Nebert (1985) Human P₄₅₀ gene structure and correlation of mRNA with genetic differences in benzo(a)pyrene metabolism, Nucleic Acids Res., 13, 45-3-4520.
- Kawajiri, K., and Y. Fujii-Kuriyama (1991) P450 and human cancer, Jpn. J. Cancer Res., 82, 1325-1335.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, K. Imai, J. Wata-

- nabe, and S.-I. Hayashi (1993) Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer, *Carcinogenesis*, 14, 1085-1089.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, K. Imai, J. Watanabe and S.-I. Hayashi (1993) The CYP1A1 gene and cancer susceptibility, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 14, 77-87.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, K. Imai, A. Yoshii, N. Shinoda, and J. Watanabe (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene, *FEBS Letter.*, 263, 131-133.
- Kawajiri, K., J. Watanabe, O. Gotoh, Y. Tagashira, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama (1986) Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene, *Eur. J. Biochem.*, 159, 219-225.
- Nakachi, K., K. Imai, S.-I. Hayashi and K. Kawajiri (1993) Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population, *Cancer Res.*, 53, 2994-2999.
- Nakachi, K., K. Imai, S.-I. Hayashi, J. Watanabe, and K. Kawajiri (1991) Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose, *Cancer Res.*, 51, 5177-5180.

- Nelson, D. R., T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyerisen, 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 Biology*, 12, 1-51.
- Omura, T., Y. Ishimura, and Y. Fujii-Kuriyama, (eds.) (1993) Cytochrome P-450, pp. 1-292, Kodansha, Tokyo, Japan.
- Seidegård, J., W. R. Vorachek, R. W. Pero, and W. R. Pearson (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 7293-7297.
- Shimada, T., C.-H. Yun, H. Yamazaki, J.-C. Gautier, P. H. Beaune, and F. P. Guengerich (1992) Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens, *Mol. Pharmacol.*, 41, 856-864.
- Suzuki, H., T. Takahashi, T. Kuroishi, M. Suyama, Y. Ariyoshi, T. Takahashi, and R. Ueda (1992) p53 Mutations in non-small cell lung cancer in Japan: Association between mutations and smoking, *Cancer Res.*, 52, 734-736.

細胞周期と癌遺伝子

国立がんセンター研究所 田矢洋一

1. はじめに

がんの制圧はいまでもなく人類の悲願である。1980年以降のがん研究はこれに応えるかのごとく、目覚ましい発展を遂げ、数多くのがん遺伝子とがん抑制遺伝子の存在を明らかにしてきた。しかし、それら多種多様の遺伝子から作られるタンパク質が、どういうメカニズムで細胞をがん細胞という共通の性質を有するものへと変化させるのかということはいまだに大きな謎である。本稿は、筆者の推理を交えながら、この謎解きにあえて挑もうとするものである。

近年における分子生物学の威力は素晴らしい、がん研究だけでなく、生命科学のさまざまな分野における爆発的な進歩の推進力となってきた。この過程で、かつては別個の分野として研究が進められてきたDNA複製、細胞周期や分化とがんとの深い関係を示す事実が、分子レベルでつぎつぎと見出されつつある。本稿は、異なったこれらの流れの合流点が何であるかも論じる。なぜなら、その合流点こそは、がん遺伝子とがん抑制遺伝子のシグナルが集約される最終ターゲットでもあると考えるからである。

本稿は、6年前の筆者の総説(田矢, 1987)“がんと発生と分化とをつなぐ遺伝子群”の続編である。この間には、執筆当時クローニングされたニュースが入ったばかりで、筆者がその性質を予言した、がん抑制RBタンパク質に関して、特に顕著な研究の進展があった。

願わくは、本稿がたたき台となって論議を引き起こし、科学の発展に寄与することを。

2. がん遺伝子とがん抑制遺伝子

本論に入る前に、まず、がん遺伝子とがん抑制遺伝子とはどういうものなのかを簡単に解説しておきたい。ヒトの細胞にはがん遺伝子の元となる原型がん遺伝子が数十種類は存在している。これがタバコの煙や放射線などの発がん物質で傷ついて活性化されると、がんを引き起こす遺伝子、すなわちがん遺伝子となる。ここで活性化とは、その遺伝子から作られるタンパク質のアミノ酸配列が変化したり量が増えたりすることによって、そのタンパク質の酵素活性などが異常に高まることをいう。

がん抑制遺伝子の場合も、やはり発がん物質で傷ついたときに細胞をがん化に向かわせるのであるが、遺伝子が欠失したり、タンパク質のアミノ酸配列が変化したりして、そのタンパク質の活性が異常に低下したときにがん化に関与するという点でがん遺伝子と異なる。がん抑制遺伝子も数十種類はあると予想されているが、これまでにクローニングされたものは6~7種類にすぎない。

もう少し詳しいことは文献を参照されたい。

このようにがん遺伝子やがん抑制遺伝子の種類は多いが、これらの遺伝子は作られるタンパク質の機能によって、Fig. 1のように数個のグループに分けることができる。一つはRas(ラス)のグループである。これはGTPと結合して、それをGDPへと加水分解する活性をもつ。しかし、がん細胞によくみられるRasタンパク質は、特定のアミノ酸残基が他のアミノ酸へと変化したために、GTPが加水分解されずにRasタンパク質と結合したままになっている。この状態のRasタンパク質は、何らかの形でシグナルを核の中へと伝え、

〒104 東京都中央区築地5丁目1-1
Yoichi Taya

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

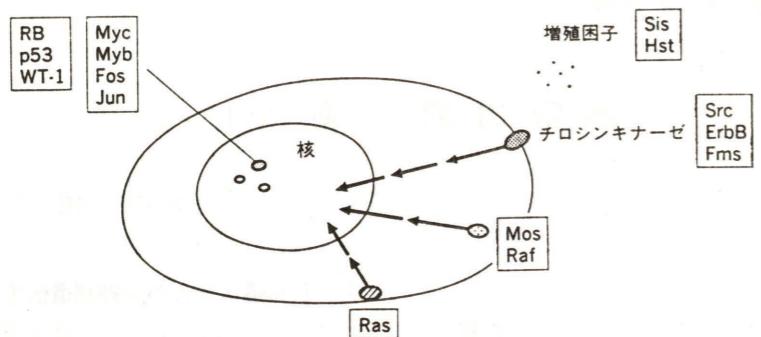


Fig. 1. がん遺伝子・がん抑制遺伝子タンパク質の分類

細胞をがん化へと向かわせる。本稿が取り上げるのは、そのシグナルが核の中のどこに伝えられるかという問題である。

二つめは Src (サーク) や ErbB (アープB) のグループである。これらは、細胞の外からきた増殖因子が結合すると、細胞内に存在する特定のタンパク質のチロシン残基をリン酸化する酵素活性(チロシンキナーゼ活性)を発揮する。すると、この分子によってリン酸化されたタンパク質が、やはり何らかの形でシグナルを核の中へ伝え、細胞をがん化へと向かわせるらしい。

このグループと似たものに、Mos(モス)や Raf(ラフ)のグループがある。このグループも他のタンパク質をリン酸化することによって、がん化のシグナルを伝えると考えられるのだが、この場合には、タンパク質のチロシン残基ではなく、セリンかスレオニン残基をリン酸化する。

チロシンキナーゼのグループともっと深い関係のあるものとして、Sis や Hst などの増殖因子のグループがある。これらは細胞表面のリセプター・タンパク質と結合して細胞を増殖へと向かわせる。リセプター自身がチロシンキナーゼであるか、そうでない場合には、リセプターが細胞の内側でチロシンキナーゼと結合している。

がん遺伝子タンパク質のもう一つの大きなグループは、Myc (ミック) や Jun (ジュン) など核の中で働くグループである。このグループは、たいてい、遺伝子の上流にある発現調節領域 (プロモーター) の、エンハンサーと呼ばれる特定配列の小さな領域に結合して遺伝子の発現を調節するタンパク質らしい。その際、二つの異なったタンパ

ク質がロイシンジッパーという構造でヘテロ2量体を作りエンハンサーに結合する場合が多い。例えば、Jun は Fos と、Myc は Max というタンパク質とヘテロ2量体を作り働く。これらは、何か増殖のためにたいへん重要な遺伝子の発現を制御することによって細胞をがん化に向かわせるらしいが、その重要な遺伝子が何ものであるのかはいまだにわからない。

核の中にはもう一つ別のグループもある。それは RB タンパク質、p53 や WT-1 などのがん抑制遺伝子産物である。これらは、その遺伝子が消失したり、あるいはそのタンパク質が失活したりすると、細胞ががんのはうに進むので、本来は、がん遺伝子のタンパク質と逆に、細胞の増殖を抑えるような機能をもっているらしい。最近、その機能がかなり具体的にわかりつつある。わかつてきたところでは、これらもやはり、エンハンサーに直接に、あるいは他のタンパク質を通して間接的に結合するタンパク質らしい。しかし、結果としては細胞増殖を抑える方向に働くところが Myc などのがん遺伝子グループと違う。

3. シグナル伝達の中間経路

Fig. 1 に示した、細胞の表層近くで働く Ras やチロシンキナーゼ、あるいは Mos や Sis などによるがん化のシグナルは、何らかの経路を通り、核の中のどこかのターゲットに伝わり、細胞をがん化するように働くと考えられる。しかし、このシグナル伝達経路は、長年にわたって多数の研究者が取り組んできたにもかかわらず、今でもよくわからない。多くの研究者が漠然と信じさせられ

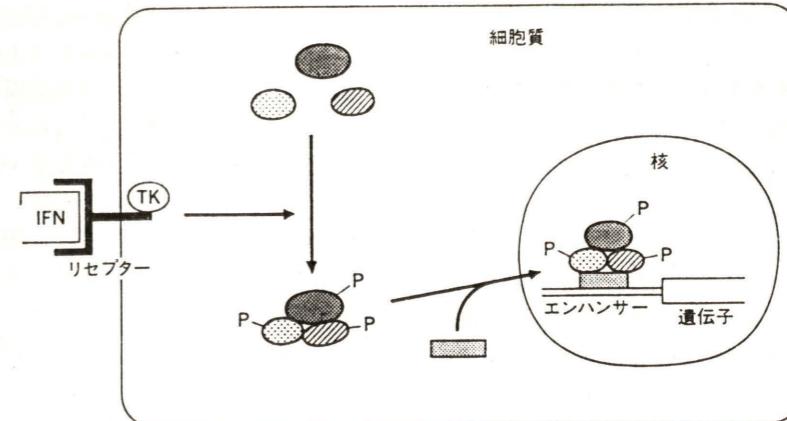


Fig. 2. インターフェロンαのシグナル伝達経路. IFN: インターフェロン, TK: チロシンキナーゼ

ているのは、チロシンキナーゼにホスホリバーゼ C や C キナーゼ、さらには PI3 キナーゼなどからまた複雑なネットワークを経由するという説や、あるいは、最近頻繁に登場する MAP キナーゼを経由するという説である。MAP キナーゼというのは、マイトージェン (細胞分裂誘起剤) で刺激したときに細胞内で活性化され、他のタンパク質のセリン、スレオニンをリン酸化する酵素である。この MAP キナーゼにしても、それを活性化するキナーゼがあって、それをまた活性化するキナーゼのキナーゼがあるなどといわれている⁶⁾。

だが、筆者には、自然がこのようにわかり難い経路を作り出すとはとても思えない。なぜなら、真理はあくまで単純明快であり、かつ巧妙で美しいものであるはずだと思うからである。実際、複雑難解と思われていた自然現象の根本的な原理が解明されたとき、あまりの単純さと巧妙さと美しさと人々が驚嘆の声を上げた例は枚挙にいとまがないであろう。DNA の 2 重らせん構造しかり、ジャコブー・モノーのオペロン説しかり、利根川氏が解明した抗体遺伝子の多様性の原理もしかりである。

筆者のこの気持を代弁するかのように、つい最近、あるシグナル伝達の経路が解明された。それは、インターフェロン α が細胞の外から核にまでシグナルを伝える経路である。これは、すべてのシグナル伝達経路の中で、リセプターから遺伝子発現までのメカニズムが解明された初めてのも

のである。わかったメカニズムは誰も予想していなかったほど、単純で直接的なものであった (Fig. 2)。

インターフェロンは細胞の外から働きかけるタンパク質で、細胞にさまざまなウイルスに対する抵抗性を与える。その際、ウイルス抵抗性に関係する何種類かのタンパク質の遺伝子が発現されるのであるが、その発現は、それらの遺伝子のプロモーター上に存在するエンハンサーに、あるタンパク質が結合することによって引き起こされる (Fig. 2)。ところが、そのタンパク質は四つのサブユニットから成っていて、そのうちの三つは、インターフェロンが作用しないときには遺伝子のある核ではなく細胞質に存在している。そして、インターフェロンが細胞表面のリセプターに結合すると、リセプターの細胞内側部分に結合していたチロシンキナーゼが活性化され、それが先ほどの三つのサブユニットをリン酸化する。そうすると、三つのサブユニットが集合して核内に移行し、さらにもう一つのサブユニットも会合してエンハンサーに結合する。

すでに、インターフェロン γ でも類似の経路が発見されたという。がん化のシグナル伝達にも同様に単純なメカニズムが存在するほうが自然であると筆者は思う。

中間経路がどうであるにせよ、本稿で論じようとするのは、がん化のシグナルが最終的に伝えられるターゲットが何ものであるかという問題である。真理は単純明快であるはずという筆者の信念

からすれば、これまた複雑であるはずはない。

4. 鍵を握る G1 サイクリンと RB タンパク質

まず、その最終ターゲットが何であるのか予言してみよう。それは **G1 サイクリン** というものである。これは筆者の単なる直感ではない。多くの研究者がいろいろな方向から出している実験データを整理し、少しばかり想像力を働かせれば、**G1 サイクリン** が最終ターゲットではないかと推測するだけの状況証拠がそろいつつあるというのである。では、**G1 サイクリン** とは何ものなのか説明してみよう。

酵母からヒトまで、真核生物は増殖する際に Fig. 3 のようなサイクル(細胞周期)を回る。G0期という休止状態の細胞は、増殖因子などの増殖刺激を与えられると、G1期を経てS期(DNA複製期)に入っていく。DNA複製が完了すると、G2期という準備期を経て細胞は二つに分裂し(M期)、再びG1期に戻る。このいわば細胞周期時計とでも呼ぶべきものを回すために必須な推進力の正体がこの数年間でわかつってきた。それは、cdk2 キナーゼ、あるいは cdk2 キナーゼなどという一群のキナーゼ(リン酸化酵素)である。

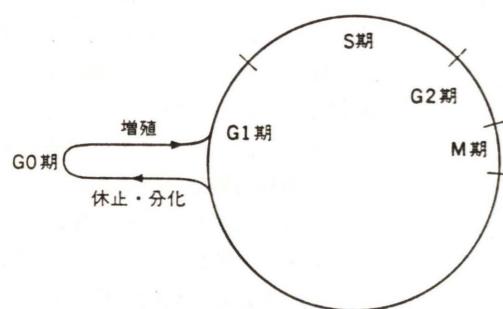


Fig. 3. 細胞周期。

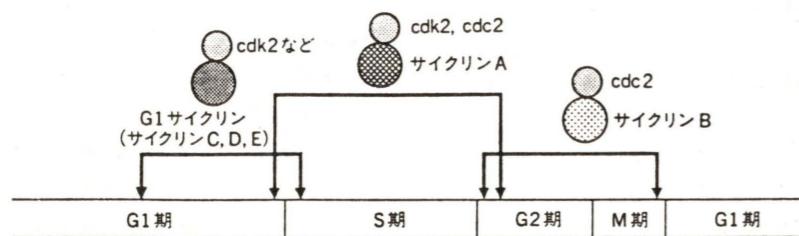


Fig. 4. 種々のサイクリンと cdk2, cdc2 の活動時期。

このキナーゼは、cdk2 あるいは cdk2 とサイクリンという二つのサブユニットで主に構成されている(Fig. 4)。サイクリンは細胞周期のある特定の時期に一時に発現してすぐに分解されるタンパク質であるが、これが cdc2 や cdk2 などと結合するとキナーゼ活性をあらわす。そして、サイクリンには数種類以上が存在し、細胞周期時計の進行のために異なる役割を演じているらしい。最もよくわかつているのはサイクリンBであり、これは cdc2 と結合して、有糸分裂に関与する何種類かのタンパク質をリン酸化し、細胞をM期へと進める。サイクリンAはG1/S境界から出現してS期の間ずっと存在し、DNA複製の進行に働くのであろうと推定されているが、不明確な点が多い。このサイクリンはまた、S期の始めには cdk2 と結合していく、途中から cdc2 と置き換わるらしい。

本稿で特に重視する **G1 サイクリン** というのは、G1期からS期の初期にかけて働くサイクリンの総称である。動物においては、C, D, Eという少なくとも三つのタイプがあり、D型はさらにD1, D2, D3という少しずつ異なったものを含む。これらのG1サイクリンは cdk2 と結合するものが多いが、D型サイクリンは cdk4 や cdk5 とも結合することがつい最近発見された。

細胞が増殖するためには、まずDNAが複製されなければならない。G1サイクリンはおそらく、DNA複製を開始させるために働いているのだと思われる。一方、正常細胞は、増殖の条件が悪くなるとG0期という休止状態に入り、逆に増殖因子などが与えられると、G1期を経てS期にと入っていく(Fig. 3)。その際には、G1サイクリンの発現が必須と考えられる。このことは動物におい

ては明確な証明実験がなされていないが、酵母においては証明がなされている。

一方、がん細胞は、少々条件が悪くても増殖サイクルをグルグル回る細胞である。Fig. 3のG0からG1へ至る過程がほとんど省略された細胞といふこともできる。なぜそうなっているのであろうか? 筆者の推測では、がん細胞においては、Fig. 1のRasやチロシンキナーゼなどのがん遺伝子タンパク質からの増殖シグナルによって、G1サイクリンがいつも発現されやすい状態になっているからである。すなわち、G1サイクリンこそががん化シグナルの最終ターゲットなのである。

そして、G1サイクリンが結合したキナーゼは、何種類かの重要なタンパク質をリン酸化することによってDNA複製開始に至らしめると考えられるが、最も重要なリン酸化ターゲットの一つは、たぶん、これから述べるがん抑制RBタンパク質である。

G1サイクリンががん化シグナルの最終ターゲットであるなら、G1サイクリンの遺伝子そのものががん遺伝子になっても不思議はないと思える。まさにその通りで、副甲状腺がん、乳がんや多くのリンパ腫で、サイクリンD1の遺伝子が染色体転座や遺伝子增幅によって過剰発現され、がん遺伝子として働いていることが発見された。サイクリンAの遺伝子も、ある肝がんにおいて、B型肝炎ウイルスのDNAとつながって活性化さ

れ、がん遺伝子として働いているらしい例がみつかっている。

5. DNA腫瘍ウイルスが教えるもの

アデノウイルスはDNAを遺伝子としても、実験動物の細胞をがん化させることができる。このウイルスのもう一つ遺伝子のうち、特に、E1AとE1Bという二つの遺伝子ががん化を起こすことが知られていた。E1Aタンパク質の機能を解析していたHAWLOWらのグループは、1988年にE1Aタンパク質ががん抑制RBタンパク質と複合体を形成しているという大発見をする(Fig. 5)。ヒトの多くのがんにおいては、遺伝子に変異が生じてRBタンパク質が失活しているのであるが、このE1Aタンパク質は正常RBタンパク質と結合することによってそれを失活させ、増殖抑制能を除去し、それががん化の原因となるのであろうと解釈された。

一方、E1Bのほうは、p53と結合することがそれ以前にみつかっていたのであるが、これは意味が説明できないまま放置されていた。なぜなら、当時は、p53遺伝子はがん遺伝子と考えられていたからである。しかし、p53が多くのがんで失活しているらしいことがみつかり、むしろがん抑制遺伝子ではないかという可能性が浮かび上がってきた。HARLOWの発見などを契機にして考え方直された結果、E1Bはp53と結合することに

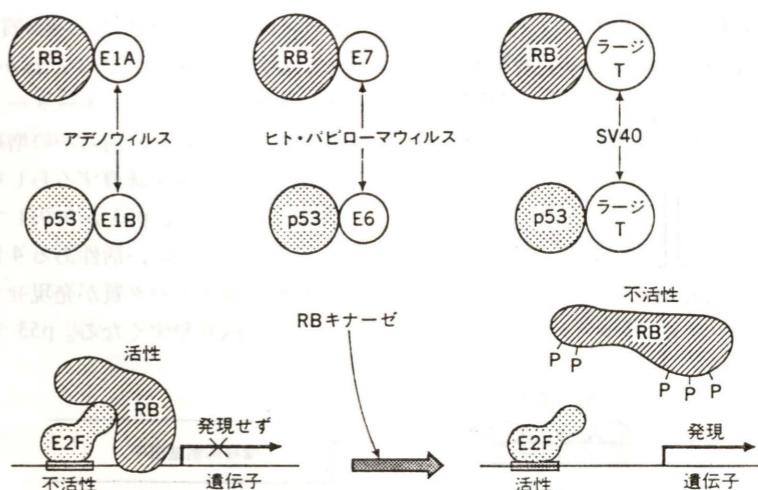


Fig. 5. DNA腫瘍ウイルスのがん遺伝子産物とRBタンパク質、p53との結合。

よってその増殖抑制能を失活させ、がん化に寄与するのであろうと解釈された。

ヒトの多くのがんでは RB と p53 という 2 種類のがん抑制遺伝子が両方とも失活している。アデノウイルスは自分自身が作り出すタンパク質 (E1A, E1B) によって同じことをやっていたのである。

その後、ヒト・パピローマウイルスの E7, E6 タンパク質でも同様のことがみつかった (Fig. 5)。このウイルスはヒトの子宮頸がんの原因となるウイルスで、この現象はヒトのがん発生と直接に結びついている。また、SV40においては、ラージTというがん遺伝子タンパク質が RB にも p53 にも結合することがわかった (Fig. 5)。

しかし、これらウイルスのがん遺伝子タンパク質は、細胞をがん化させる目的でこうすることをやっているわけではない。本当の目的はウイルスの DNA 複製を引き起こすことなのである。換言すると、RB タンパク質や p53 がウイルス DNA の複製開始に至る道筋を妨害していたからそれを取り除こうとしたのである。では、RB タンパク質や p53 が何を妨害していたのか、次に考えてみたい。

6. がん抑制遺伝子の働き

1991年になって、RB タンパク質の本来の機能らしいものが具体的にわかりはじめた。その一つは、転写因子 E2F と結合して、その活性を抑えることにあるらしい (Fig. 6)。E2F はプロモーター上の特定配列に結合するのであるが、DNA ポリメラーゼ α やチミジンキナーゼなどの DNA 複製に必要な酵素の遺伝子、それに c-myc, N-myc

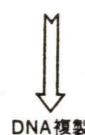


Fig. 6. E2F と RB タンパク質。

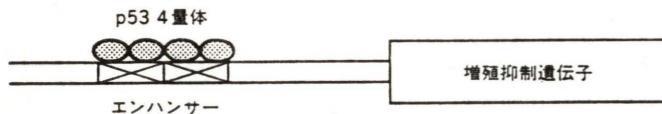


Fig. 7. p53 の機能。

などのがん遺伝子さらには cdc2 遺伝子のプロモーターにも E2F 結合配列が存在する。実際に、遺伝子発現のためには E2F がそこに結合する必要があるらしい。

しかし、G1 後期に、特異的リン酸化酵素 (RB キナーゼ) によって RB タンパク質がリン酸化されると、RB タンパク質は E2F からはずれて不活性となり、逆に、E2F は活性な状態となり、遺伝子の発現を誘導して細胞を DNA 複製へと進めるらしい。

したがって、RB キナーゼは細胞を S 期へと進めるためにたいへんに重要な役割を演じていることになる。筆者はこれが cdc2 ファミリーのキナーゼであろうことを以前に示した。その後、サイクリン A と cdk2 も含まれるであろうと示唆していたが、他のグループは、つい最近、サイクリン A と E が関与するらしいこと、あるいはサイクリン D も関与することを報告している。何か少しずつ使い分けされているのかもしれないが、そのメカニズムは今後の問題である。

いずれにしても、多くのデータは、G1 サイクリンからなるキナーゼによるリン酸化の重要なターゲットの一つが RB タンパク質であることを示している。

先に述べた E1A タンパク質は、RB タンパク質と結合することによって、E2F を遊離の状態にする。これは、RB キナーゼの代りの働きをしていたともいえる。

p53 のほうも、RB タンパク質ほど具体的ではないが、その機能がやっとわかりはじめた。p53 は転写因子で、プロモーター上の特定配列に 4 量体として結合し、何らかの増殖抑制タンパク質の遺伝子の発現を誘導するらしい (Fig. 7)。多くのがん細胞では、p53 が欠失しているか変異を起こしているために、活性ある 4 量体が形成されず、増殖抑制タンパク質が発現せず、細胞は増殖サイクルを回りやすくなる。p53 もやはり G1 期

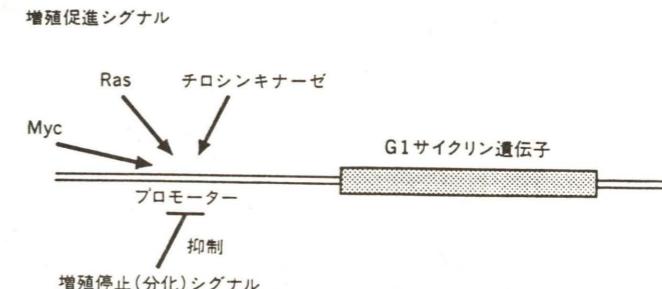


Fig. 8. 増殖促進・停止シグナルの最終ターゲットは G1 サイクリン遺伝子の発現制御 (?)。

で細胞を止めるらしい。p53 で発現制御される抑制タンパク質が何であるかはわからないのだが、そのタンパク質が実は G1 サイクリンの発現を抑えるという可能性はおおいにあると筆者は思う。

7. 今後の展望

これまで、がん化シグナルの最終ターゲットが G1 サイクリンであろうと考えるための状況証拠を説明してきた。今後は、以下のような研究が進めば、この考えが正しいか否か明確になるであろう。

第 1 には、動物細胞の G1 サイクリンとサイクリン A の発現調節機構が解明されねばならない。現時点では何もわかっていないが、Ras やチロシンキナーゼからのシグナルだけでなく、核内で働く Myc タンパク質も、これらのプロモーターに働きかけるのではないかと予想する。酵母の G1 サイクリンの発現調節はすでにかなりの程度研究がなされていて、増殖を停止させ分化のほうへと向かわせる接合フェロモンからのシグナルは、G1 サイクリンの発現を抑制するように働くことが知られている (Fig. 8)。また、E2F 結合配列に似た配列のところに SW14 と 6 という転写因子が結合することによって G1 サイクリンの発現が起きることもわかっている。サイクリン A に関しては不明な点が多いが、G1/S 境界から出現して (図 4), DNA の複製の開始に必要らしいことなど、G1 サイクリンと類似した点が多い。したがって多くのがん化シグナルがサイクリン A の発現制御にも集約されていることが考えられる。

第 2 には Myc タンパク質によって発現調節さ

れる遺伝子の解明も重要である。myc は、ヒトの非常に多くのがんの原因となっている遺伝子でありながら、いまだに本来の機能が不明である。だが、たぶん、増殖進行にとってたいへん重要なタンパク質の発見を引き起こすと推定され、それが G1 サイクリンかサイクリン A、あるいは cdk2 などである可能性は大いにある。いずれにしても、Myc タンパク質の機能の解明は、シグナル伝達の最終ターゲットに関しても強力な情報を提供するであろう。

文 献

- 田矢洋一, 野田 亮, 山本 雅著 (1992) がん遺伝子ハンティング, 羊土社.
- 田矢洋一 (1987) がんと発生と分化とをつなぐ遺伝子群, 科学, 57, 141-148.
- 田矢洋一 (1989) 核オンコジーン: ロイシンジッパーの構造, 細胞工学, 8, 791-798.
- 田矢洋一 (1991) myc と情報伝達, 実験医学, 9, 1659-1662.
- 竹繩忠臣 (1991) イノシトールリン脂質情報伝達研究の現況, 実験医学, 9, 1557-1560.
- Pelech, S. L. and J. S. Sanghera (1992) MAP kinases: Charting the regulatory pathways, Science, 257, 1355-1356.
- Marx, J. (1992) Taking a direct path to the genes, Science, 257, 744-745.
- 柳田充弘編 (1992) 細胞周期の制御とメカニズム, 羊土社.
- Matsushime, H., M. E. Ewen, D. K. Strom, J. Kato, S. K. Hanks, M. F. Roussel and C. J. Sherr (1992) Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins, Cell, 71, 323-334.
- Xiong, Y., H. Zhang and D. Beach (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair

- factor PCNA, *Cell*, 71, 505-514.
 荒木弘之 (1992) "START" から DNA 複製開始を制御する核内因子類, *細胞工学*, 11, 809-816.
 本倉徹 (1992) 癌化の標的としてのサイクリン, *実験医学*, 10, 1116-1120.
 Wang, J., X. Chenivesse, B. Henglein and C. Brechot (1990) Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma, *Science*, 243, 555-557.
 Whyte, P., K. J. Buchovich, J. M. Horowitz, S. H. Friend, M. Raybuck, R. A. Weinberg and E. Harlow (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product, *Science*, 234, 124-129.
 田矢洋一 (1990) RB タンパク質と細胞周期の制御, *実験医学*, 8, 837-842.
 田矢洋一 (1992) 核内癌遺伝子, 癌抑制遺伝子産物と細胞周期, *実験医学*, 10, 1136-1142.

- 田矢洋一 (1992) RB 蛋白の活性調節機構, *実験医学*, 10, 2154-2158.
 田矢洋一 (1992) 細胞周期と癌とをつなぐ核内因子群, *細胞工学*, 11, 824-829.
 Hinds, P. W., S. Mittnacht, V. Dulic, A. Arnold, S. I. Reed and R. A. Weinberg (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins, *Science*, 258, 993-1006.
 Nasmyth, K. A. (1990) FAR-reaching discoveries about the regulation of START, *Cell*, 63, 1117-1120.
 田矢洋一 (1991) 癌抑制遺伝子と DNA 複製, *実験医学*, 9, 1455-1459.
 松影昭夫 (1992) 真核生物の DNA 複製, *科学*, 62, 711-719.
 小田鉢一郎 (1992) E1A タンパク質による細胞周期と増殖の搅乱, *細胞工学*, 11, 791-800.

日本学術会議だより №30

アジア学術会議 11月に開催

平成5年10月 日本学術会議広報委員会

今回の日本学術会議だよりでは、アジア学術会議、本年6月に閣議了解を得ました平成6年度日本学術会議共同主催国際会議の概要及び日本学術会議が本年度において実施する地域活性化施策推進事業等についてお知らせします。

アジア学術会議について

- 1 日本学術会議は、アジア地域の各国を代表する科学者を東京に招き、本年11月15日（月）から18日（木）までの4日間、アジア学術会議を開催します。
 - 2 アジア地域との学術分野における交流の重要性については、「学術分野における国際貢献についての基本的提言」（平成5年4月、日本学術会議第116回総会採択）においても指摘されたところですが（「日本学術会議だより」（No.29）参照）、地理的、歴史的、文化的に多くの共通点を持つ近隣諸国間の交流は、それぞれの国の学術の発展、ひいてはその地域全体の学術の発展にとって極めて重要なことあります。
 - 3 このことから、日本学術会議は、アジア地域の各国における学術研究の現状について情報交換を行うとともに、アジア地域における学術研究分野での連携・協力の在り方などについて討議し、併せてアジア地域の学術研究者間の相互理解と信頼を深めることを目的として、本年度からアジア学術会議を開催することとしました。
- このことから、日本学術会議は、特定分野に限らない全学問領域にわたるアジア地域の科学者による連携・協力のための初の国際会議であり、その意義は極めて大きく、日本学術会議では、会議の成果をあげるために、既に本年4月、アジア学術会議実行委員会（委員長：渡邊格・日本学術会議副会長、副委員長：川田侃・同副会長）を設置し、関係学協会の御協力の下、開催に向け、鋭意、準備を進めているところです。

会議の概要是以下のとおりです。

- (1) 主 催
日本学術会議
- (2) 日 程
11月15日（月）開会式（基調講演、特別講演等）
16日（火）会議（自由討議）
17日（水）視察（筑波研究学園都市）
18日（木）会議（自由討議）、閉会式
- (3) 会 場
三田共用会議所
〔東京都港区三田2-1-8〕
〔電話 03-3455-7591〕
- (4) 参加者
インド、インドネシア、シンガポール、タイ、大韓民国、中華人民共和国、日本、フィリピン、マレーシアの各國の学術推進機関（アカデミー等）から推薦された人文・社会科学系及び自然科学系の科学者21名

（日本からは、近藤次郎日本学術会議会長及び川田侃同副会長が出席の予定）

- (5) 議 題
「アジア地域における学術の発展とそのための連携・協力について」

平成5年度地域活性化施策推進事業の実施について —地域の過去、現在、未来を探る—

東京一極集中を是正し、国土の均衡ある発展を図るために、地域を活性化することの必要性が叫ばれています。この中で、地域において、情報発信能力を高め、産業技術の進歩、暮らしの質的向上を促す総合的な学術研究の力の向上は、「豊かな国民生活」を実現するために不可欠のことであり、また、国際的に開かれた地域を形成するためにも有効なことと考えられます。このため、日本学術会議では、本年度において、国土府の地域活性化施策推進費を活用して、全国3か所での地域における産学官の協力による公開フォーラムの実施とその報告書作成を柱とする“ふるさと学会”開催事業を実施することとしました。

本事業は、地域を対象とする学術研究の成果を人文、社会、自然科学を網羅して総合的に取りまとめ、その地域の過去の歴史、現在の状態、将来の予想を明らかにし、地域のアイデンティティーと将来像を考える一助とともに、この過程において、地域の産学官の連携や学術研究者と地域住民の交流をも促進することを狙いとするモデル事業と位置づけています。

平成6年度に開催する日本学術会議 共同主催国際会議

日本学術会議は、昭和28年9月の国際理論物理学会議の開催以来、平成5年度までに135件の国際会議を関係の学術研究団体と共に開催し、我が国のみならず世界の学術水準の向上に努めてきたところです。

平成6年度においても、次表の6会議を共同主催することとし、本年6月25日、これらの国際会議の開催とこれについて所要の措置を講ずる旨の閣議了解を得ました。

また、本年は、平成8年（1996年）度開催分の国際会議について共同主催の申請を受け付けており、締切りは12月10日です。

詳しく述べては、下記までお問い合わせください。

【問い合わせ先】
日本学術会議事務局学術部情報国際課国際会議係
電話03-3403-6291(内) 254, 255

平成6年（1994年）度日本学術会議・国内学術研究団体共同主催国際会議概要

会議名	第8回国際神経・筋学会	第24回国際園芸学会議	第30回錯体化学国際会議
母体機関	世界神経連合	国際園芸学会	国際純正・応用化学連合
共催団体	日本神経学会	園芸学会	(社)日本化学会 錯体化学研究会
参加予定人数 参加予定国数	国外 1,100人 国内 800人 計 1,900人 [41か国・2地域]	国外 1,000人 国内 750人 計 1,750人 [88か国・2地域]	国外 300人 国内 700人 計 1,000人 [46か国・2地域]
開催時期	7月10日～15日 (6日間)	8月21日～27日 (7日間)	7月24日～29日 (6日間)
開催場所	京都市（国立京都国際会館）	京都市（国立京都国際会館）	京都市（国立京都国際会館）
開催間隔	4年ごと	4年ごと	1ないし2年ごと
組織委員会委員長	国立精神・神経センター 名譽総長 里吉栄二郎	東京農業大学農学部 教授 岩田正利	(準備委員会代表者)立命館大学理工学部 教授 大瀧仁志

会議名	第21回世界心電学会	第47回国際情報ドキュメンテーション連盟総会	第2回国際病態生理学会総会
母体機関	世界心電学会	国際情報ドキュメンテーション連盟	国際病態生理学会
共催団体	日本心電学会 (財)日本心臓財團	(社)情報処理学会 (社)情報科学技術協会 情報知識学会	日本病態生理学会
参加予定人数 参加予定国数	国外 500人 国内 1,000人 計 1,500人 [30か国]	国外 400人 国内 800人 計 1,200人 [55か国・1地域]	国外 500人 国内 800人 計 1,300人 [62か国・2地域]
開催時期	7月3日～7日 (5日間)	10月2日～9日 (8日間)	11月19日～24日 (6日間)
開催場所	横浜市（横浜国際平和会議場）	大宮市（大宮ソニックシティ）	京都市（国立京都国際会館）
開催間隔	毎年	2年ごと	4年ごと
組織委員会委員長	国立療養所中野病院 病院長 春見建一	国文学研究資料館 客員教授 藤原鎮男	日本儀器製薬株式会社生物活性科学研究所 所長 大村裕

日本学術会議主催公開講演会
女性科学研究者に期待する

日本学術会議は、学術の成果を国民に直接還元するための活動として、日本学術会議員が講師となって、市民を対象に年3回公開講演会を開催しています。

この度、次の公開講演会を開催しますので、お知らせします。多数の方々の御来場をお待ちしています。

(1) 日時 平成5年11月26日（金）13:00～16:30
(2) 会場 日本学術会議講堂
(地下鉄千代田線「乃木坂駅」下車徒歩1分)

(3) テーマ 「女性科学研究者に期待する」

(4) 演題及び演者

- 女性科学研究者問題に関する日本学術会議の取組
須藤 一（第5部会員、東北学院大学工学部教授）

- 女性学センター論の発展と役割
加藤春恵子（第1部会員、東京女子大学現代文化学部教授）

- 自然科学分野に見られる女性進出とこれに伴う諸問題
本間 慎（第6部会員、東京農工大学農学部教授）

・女性科学研究者の地位向上と基盤整備（スウェーデンを例として）

一番ヶ瀬康子（第1部会員、日本女子大学人間社会学部長）

〔申込方法〕

聴講（入場無料）を希望される方は、はがきに、郵便番号、住所、氏名を明記し、11月12日までに下記あてお申し込みください（複数人の連記可、FAX送付可）。締切り後も、席に余裕があれば、受け付けますので、下記あてお問い合わせください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議事務局「公開講演会係」

T E L 03-3403-6291代 内線228

F A X 03-3403-6224

「日本学術会議だより」について御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

日本学術会議だより

No.31

アジア学術会議～科学者フォーラム～開催

平成5年12月 日本学術会議広報委員会

今回の日本学術会議だよりでは、10月20日から22日まで開催された第117回総会の概要、同総会で採択された「生物遺伝資源レポジトリー及び細胞・DNAレポジトリーの整備について（要望）」等、11月15日から18日まで開催されたアジア学術会議～科学者フォーラム～についてお知らせします。

日本学術会議第117回総会報告

日本学術会議第117回総会（第15期・第6回）が、10月20日～22日の3日間にわたり開催されました。

総会の初日（20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（学術分野における国際貢献、アジア学術会議の開催など214件）が行われました。次いで、今回総会に提案される案件の「生物遺伝資源レポジトリー及び細胞・DNAレポジトリーの整備について（要望）」について、提案説明が行われた後、質疑応答が行われました。

午後からは、各部会が開催され、上記提案案件の審議及び各部会個別案件について審議が行われました。

総会2日目（21日）の午前は、同提案案件についての討論・採決が行われ、採択されました。これは、生物遺伝資源レポジトリー整備拡大の必要性の増大に対処するため、現在ある個別系統保存施設の拡充、総合調整機構の設置などを要望するとともに、細胞・DNAレポジトリーの整備のため、各省庁傘下の施設のネットワーク体制を構築し全体の活動を総合調整する、チェック機構を付加した細胞・DNAレポジトリーセンターの設置など、政府関係機関において取るべき具体的措置を要望するものです。

なお、本件を要望するに当たり会長談話が併せて発表されました。

同案件の採択に引き続き、昼休みを挟んで午後にかけて、現在、常置委員会及び特別委員会で審議されている懸案事項について、自由討議が行われました。この中で、「人の死と医療の在り方」を検討している死と医療特別委員会がまとめた「尊厳死」についての考え方を総会に報告し、それについて活発な議論が展開され、マスコミにも報道されました。

同委員会では、今回の議論を踏まえ、更に検討を深め、来年5月の総会に報告として提案するため準備を進めています。

総会3日目（22日）は、午前は、各常置委員会及び国際対応委員会、午後は各特別委員会がそれぞれ開催されました。

生物遺伝資源レポジトリー及び細胞・DNAレポジトリーの整備について（要望）

我が国の生物遺伝資源の保存は、数多くの施設・機関によって個別的に行われているが、その充実・強化と、国のレベルでの生物遺伝資源レポジトリーの整備が急務となっ

てきている。他方、癌、遺伝病などの疾患の原因究明、ひいては人類の健康・福祉への貢献を目的とする細胞・DNAレポジトリーの充実・整備もまた、今日の我が国にとって急務である。

このため、互いに関連はするが、異なる性格、目的をもつこれら二つのレポジトリーの整備等について要望する。

1 生物遺伝資源レポジトリーの整備について

生物遺伝資源レポジトリーの整備拡大の必要性の増大に対処するため、政府関係機関において次の措置をとるよう要望する。

- 生物遺伝資源の保存は、基本的には、従来どおり、その分野の担当研究者の能力、地域性などをいかして、個別の系統保存施設で行うことが望ましいので、そのより一層の拡充を図り、そこに専任の研究者、専門技術をもつ職員を置き、予算を充実し施設の近代化を図る。
- 個別の系統保存施設では、遺伝子工学に基づくトランジェニック生物、細胞融合によって作出される新種、DNAクローンや細胞及び凍結組織などを加えた新材料の保存を、社会的、法律的及び倫理的側面に配慮しつつ、積極的に推進する。
- 系統保存事業の永続性を保障するため、国のレベルにおいて、研究施設を附置する生物遺伝資源保存センターを設立し、DNAクローンや細胞及び凍結組織のレポジトリーもこのセンターに集中する。

- 生物遺伝資源保存センターは、関係機関との対応、保存系統に関する情報の収集・提供、系統の導入・配布・品質管理、海外との情報交換などについて、個別の系統保存施設の活動を総合調整する。

- 国際的視野に立って、海外諸国との連携を深めるため、保存系統に関するデータベースを整備する。

2 細胞・DNAレポジトリーの整備について

細胞・DNAレポジトリーの重要性と必要性についての認識を新たにし、早急に次の対策を講ずることを、政府関係機関に要望する。

- 現在、各省庁傘下の各研究機関及び大学・研究所の研究室に個別に置かれているレポジトリー又はそれに類する施設に対して予算、人員、スペース等について格段の措置を講ずるべきである。

- それとともに、研究施設を附置した細胞・DNAレポジトリー・センターを新たに設置する。このセンターは、上記の諸施設の活動を総合調整する。

- このセンターは、すべての施設と有機的に結合するネ

ットワーク体制を構築し、必要に応じて各研究室に分散保存されている細胞・DNAを受け入れる。また、現在設置されている施設のうち運営困難なものを解消し、このセンターに移管する。

- (3) 新しく設置されるセンターには十分な予算を措置し、自主的な運営ができるようにするとともに、このセンターの運営を支えるための専門職を育成・確保する十分な方策を講ずる。また、海外との協力関係のより一層の促進を図る。

さらに、センターの運営の適正を期すため、ヒトゲノムプロジェクトの推進についての勧告に言及されているようなチェック機構を付加する。

(詳細は、日本学術会議月報11月号を参照して下さい。)

生物遺伝資源レポジトリ―及び細胞・DNAレポジトリ―の整備について(会長談話)

(平成5年10月21日)
日本学術会議
会長 近藤次郎

昨年6月、リオデジャネイロで開催された国連環境開発会議(UNCED)で合意された生物多様性保護条約を受けて、現在、世界中で生態系、生物種や遺伝子などの保存について関心が高まっている。これは本来、人間も含めて生命界全体の命運にかかわる重要な問題である。日本学術会議としても、今後さらに引き続き審議を深めるべきであると考える。

しかしながら、先進国を中心にしてこの種のプロジェクトは、国家の強力な援助の下に推進されている。将来におけるこの分野の科学の発展を考慮するとき、我が国の状況をこのままに放置すれば学問の進歩に遅れるなど由々しき事態になると憂慮するものである。

今回は「生命科学と社会的諸問題」特別委員会のまとめた提案について、総会で人文社会科学部門も含めて真剣な討議を行った上、とりあえずここに要望するものである。

アジア学術会議～科学者フォーラム～の開催について

1 日本学術会議は、アジア地域の各国科学者の代表を東京に招き、本年11月15日(月)から18日(木)までの4日間、三田共用会議所(東京都港区)においてアジア学術会議～科学者フォーラム～を開催しました。

2 このアジア学術会議～科学者フォーラム～は、地理的、歴史的、文化的に多くの共通点を持つ近隣諸国間の交流がそれぞれの国の学術の発展、ひいてはその地域全体の学術の発展にとって極めて重要であるとの認識から、アジア地域の各国における学術研究の現状について情報交換を行うとともに、アジア地域における学術研究分野での連携・協力の在り方などについて討議し、併せてアジア地域の学術研究者間の相互理解と信頼を深めることを目的として、本年度初めて開催したものです。

3 今回の会議には、中国、インド、インドネシア、日本、マレーシア、フィリピン、大韓民国、シンガポール、タイの9か国の学術推進機関(アカデミー等)から推薦された人文・社会科学系及び自然科学系の科学者19名が出席(日本からは近藤次郎日本学術会議会長及び川田侃同副会長が出席)、「アジア地域における学術の発展とそのための連携・協力について」をメイン・テーマとして活発な討議を行いました。

4 初日の15日には、鳩山内閣官房副長官(内閣総理大臣あいさつ代読)を始め、国會議員、各大使館、関係学会、関係省庁、関係団体などから200名を超える方々をお迎えし、開会式及び歓迎セレブーションを開催しま

た。

翌16日からの自由討議においては(17日は筑波研究学園都市視察(研究交流センター、電子技術総合研究所、農業生物資源研究所を訪問))、それぞれの国籍や専門分野を超えて、アジア地域における学術の振興という共通の目的の下、熱心な討議を行い、議長サマリーをまとめ、18日に無事閉会しました。

開催に当たり御支援・御協力いただきました方々に厚くお礼申し上げます。

(参考) アジア学術会議～科学者フォーラム～議長サマリー(仮訳)

1 アジア学術会議～科学者フォーラム～は、日本学術会議の主催により、アジア地域の9か国から、19人の各国の科学界を代表する科学者の参加を得て開催され、それぞの国籍や専門分野を超えて、アジア地域における学術の振興という共通の目的の下、熱心な議論がなされた。本会合に参加した科学者は、学術の振興を通じた社会への貢献が重要であり、科学者の責務であるということを確認し、学術研究の成果は、人類の共通資産として、文化的、社会的、経済的発展を通じて、世界の平和と人類の福祉に貢献するものであると信じる。また、そのためには、自然科学者と人文・社会科学者の密接な協力も不可欠である。

2 本会合に出席した科学者は、アジアの科学者による学術協力についての初の会合を提案し、開催した日本学術会議に感謝し、今後も、このような日本学術会議の努力が続けられることを期待する。

3 今日、世界は、環境悪化、人口爆発、資源の枯渇など人類の英知を結集して取り組まねばならない深刻な問題に直面しており、本会合での討議は、そのような問題の解決に向けての将来の国際協力に発展していくものである。

4 持続的開発は、アジア地域の各国にとって、21世紀に向けての共通の重要課題である。地理的、歴史的、文化的に密接な関係を持つアジア地域の科学者は、この問題に協力して取り組むことが重要である。

5 國際的な研究、技術・資源の共有等に当たっては、地域的な協力が効果的である。今後、そのような領域において、地域の発展のために協力を推進することが必要である。

6 学術の発展、社会の発展の基盤となる人材の育成は、科学者が地域的に協力して取り組むべき課題である。次世紀に向けて、人材の育成のため、アジアの科学者も協力することが必要である。

7 各科学者及び各国は、研究者の交流、共同研究、シンポジウム、ワークショップ等による情報の交換を促進するよう努力することが必要である。

8 学術協力は、対等互恵の原則に基づいて行われねばならない。

9 本会合の趣旨、提案を受け継ぎ、より密接な学術交流・協力の基盤となる将来の会合が開かれることを期待する。

10 アジア地域の科学者によるこのような会合を毎年開催すること、当面、日本学術会議がその事務局となること、アジア地域の学術動向についてのニュースレターを定期的に発行することを提案する。

「日本学術会議だより」について御意見、お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

日本学術会議だより No.32

平成6年度予算(案)決定

平成6年3月 日本学術会議広報委員会

今回の日本学術会議だよりでは、第16期の会員推薦関係費、アジア学術会議開催経費などを計上した平成6年度予算及び最近公表された「調査報告 我が国における学術団体の現状」等についてお知らせします。

平成6年度日本学術会議予算

平成6年度日本学術会議の予算額は、総額で12億128万7千円で閣議決定されました。前年度と比較して1億546万円の増。率にして9.6%の伸びです。これは、平成6年度が第16期の会員推薦期に当たり、会員の推薦に必要な経費、臨時総会及び臨時部会等の会員推薦関係費が8,048万1千円増額し1億5万5千円になったことが主な事由です。

また、アジア学術会議の開催に必要な経費が、前年度に引き続き2,219万5千円が認められました。

その他、平成6年度予算では、国際分担金の16団体に対する単位額の変更が認められ、国際会議の国内開催については、神經・筋、園芸学、錯体化学、心電学、情報ドキュメンテーション、病態生理学の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います。

平成6年度予算概算決定額表は、下表のとおりです。

(単位:千円)

事 项	前 年 度 予 算 額 A	平成6 年度 予 算 額 B	比 較 増 △ 減 額 C = B - A	備 考
日本学術会議の運営に必要な経費	1,095,827	1,201,287	105,460	対前年度比較 109.6%
審 議 関 係 費	265,525	272,534	7,009	○地球圏-生物圏国際協同研究計画(IGBP)シンポジウム、公開講演会等
国際学術交流関係費	221,254	226,646	5,392	
国際 分 担 金	74,722	67,450	△ 7,272	
国 内 開 催	73,543	86,172	12,629	
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	22,195	35	
会 員 推 薦 関 係 費	19,574	100,055	80,481	○第16期推薦経費
会 員 推 薦 管 理 会	19,102	21,632	2,643	○臨時総会、臨時部会
推 薦 経 費	472	57,629	57,393	
臨 時 審 議 経 費	0	21,007	21,007	
一 般 事 務 处 理 費	589,474	602,052	12,578	

第4常置委員会報告—調査報告 我が国における学術団体の現状(要旨)

平成6年1月26日

学会協会等の学術団体は各専門分野の学術の進展において重要な役割を果たしており、加えて、日本学術会議の会員候補者を推薦し、また、研究連絡委員会に委員を送るなど、日本学術会議の基盤となっています。第4常置委員会は、学術団体の活性化・活動強化等のための支援方策を検討するに当たって、学術全分野における学術団体の現状を知る必要を認め、調査を行いました。調査票は選択肢方式の9項目44設問にわたる詳細なものであります。調査対象とした日本学術会議広報協力学術団体1069団体の70%にあたる750団体から回答を得ました。分析結果を対外報告「調査報告 我が国における学術団体の現状」として今回公表しました。

報告書は、(1)専門分野、(2)会員、(3)設置形態と組織形態、(4)活動状況、(5)国際性、(6)財政状態、(7)学術団体の属性による専門分野の類似性、(8)学術団体への支援について、及び「附属資料」よりなっています。報告では、学術団体の諸属性を、全団体平均に加えて、専門分野別と団体規模別に比較しています。63頁にわたる報告書の内容を簡潔に要約することは困難ですが、以下にその一端を紹介します。

学術団体の数は文学系及び医学系の分野で多く、法学系及び経済学系で少ない。2つ以上の専門分野にまたがる団体の割合は文学系及び医学系で少なく、理学及び工学が多い。平均正会員数は全団体平均で約2.5千人、人文科学部門で0.7~1千人、理学及び農学で1.7~2.5千人、工学及び医学系では約4千人である。

全団体の約20%が法人である。法人の割合は団体の規模の増大とともに急速に増加する。工学において特に高く、人文科学部門で低い。フルタイムに換算した事務職員数は正会員数に比例し、全団体平均でみれば正会員千人あたり0.71人である。事務所面積は正会員数に比例し、全団体についてみれば、基本面積が27m²で、正会員千人あたり1.7m²である。

会誌の発行は最も普遍的な活動で95%の団体に見られる。人文科学部門ではやや低く、理学及び工学においてやや高い。論文誌の発行は約27%の団体で行われており、経済学系、理学及び工学において割合が高い。書籍の出版は15%の団体で行われており、理学、工学及び農学が高い。その他の活動のうち、社会人教育は19%の団体で行われており、理学及び工学に多く、経済学系及び医学系で少ない。

国際集会を主催した経験をもつ団体は51%である。団体の規模が大きいほどその割合は高い。専門分野別で見れば、文学系及び法学系において低く、理学、工学及び農学で高い。国際集会を開催する上での困難の第1位は「経費の調達」で84%に達している。会誌あるいは論文誌を何らかの意味で国際的に開放しているのは85%の団体にみられる。

団体の財政規模を正会員数で割った額は全団体平均で29千円で、文学系及び経済学系において10~15千円、理学及び工学で高く48~57千円に達する。平成3年度における実質収支(繰り越しを除く)での赤字団体は全体の約3分の1であり、予算規模の10%以上の赤字をもつ団体が7%ある。外部からの支援を必要とする事業は、成果刊行が最大で60%，次が国際活動で30%である。団体の規模が大きくなると、国際活動への支援要求の割合が高まる。具体的な支援方策としては、学術団体の活動が円滑に進むよう制度等を整備する方法、特に、学術団体に対する課税及び学術団体への寄付者への課税を緩和する方策が効果的と考えられる。

終わりに、この調査に御協力を頂いた学術団体の担当者の方々に深く感謝申し上げる次第です。

第16期日本学術会議会員のための 登録学術研究団体の概況

日本学術会議では、現在、第16期(平成6年7月22日~平成9年7月21日)会員(定員210人)選出のための手続が進められていますが、その第1段階として、昨年(平成5年)5月末日を締切期限として、学術研究団体からの登録申請の受付が行われました。これらの登録申請については、日本学術会議会員推薦管理会において審査が行われましたが、その結果は次のとおりでした。

- ・申請団体数……………1110団体
- ・登録団体数……………1069団体

「日本学術会議だより」について御意見、お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

日本環境変異原学会会則

第1条 本会は日本環境変異原学会(The Environmental Mutagen Society of Japan)と称する。

第2条 本会は人間環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。

第3条 本会の会員は、正会員、学生会員、賛助会員および購読会員とする。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。購読会員は学会誌「環境変異原研究」の購読のみを行うものとする。

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

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

第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。

1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
2. 学会賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行った会員および将来の成果が期待される会員(原則として個人)に授与する。
3. Mutation Research誌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. 学会誌「環境変異原研究」を発行する。
6. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。

第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。

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

評議員は正会員の投票により選ぶ。
会長は評議員の互選によって定める。

庶務幹事、会計幹事、國際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。
この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。

役員および評議員の任期は2年とする。
役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

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6年1月1日より施行する。
2. 本会の事務所を

東京都世田谷区上用賀 1-18-1

国立衛生試験所内に置く。

3. 正会員、学生会員、賛助会員および購読会員の会費は、それぞれ年額7,000円、5,000円および1口50,000円および年額10,000円とする。ただし、Mutation Research誌の配布を希望するものは、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6～7年役員名簿

会長	祖父尼俊雄
庶務幹事	林真
会計幹事	田中憲穂
国際交流幹事	大西克成
編集幹事	長尾美奈子
会計監査	佐藤茂秋 菊池康基
賞等選考委員	渡部烈 若林敬二 常盤寛 武部啓 須藤鎮世
編集委員	島田弘康 後藤純雄 菊川清見 鈴木潤三 瀧谷徹
企画委員	山添康 葛西宏 秋山実利 能美健彦

日本環境変異原学会平成6～7年評議員名簿

氏名	所属
石館基	オリンパス工業(株)染色体研究センター
大西克成	徳島大学医学部
葛西宏	産業医科大学
菊川清見	東京薬科大学
菊池康基	(株)ラビトン研究所
木苗直秀	静岡県立大学食品栄養科学部
黒田行昭	麻布大学環境保健学部
後藤純雄	国立公衆衛生院
瀧谷徹	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	九州女子大学栄養学科
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
能美健彦	国立衛生試験所
林真	国立衛生試験所
早津彦哉	岡山大学薬学部
一ツ町晋也	武田薬品工業(株)薬剤安全性研究所
松島泰次郎	日本バイオアッセイ研究センター
森田健	日本グラクソ(株)筑波研究所
吉川邦衛	三菱化成(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

(五十音順)

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、許諾を求めるなければならない。

6. 校正

著者校正是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附加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りは著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申し込み書に 50 部単位で申し込むこと。

環境変異原研究執筆規定

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

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

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

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

3. 投稿論文の記述は、第 1 頁は表題、著者名、所属および所在地、第 2 頁は要約（Summary）およびキーワード（5 語以内）、第 3 頁以下、緒言（Introduction）、実験材料および方法（Materials and Methods）、結果（Results）、考察（Discussion）、謝辞（Acknowledgements）、参考文献（References）、表・図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明はすべて英文とする。
4. 学名、遺伝子記号などはイタリック（原稿に赤字でアンダーライン表示）とし、その他まぎらわしい記号については原稿に適宜指示を与える。
5. 化学物質名は原則として英語とし、一般名を用いる。また、CAS 番号を文中に表示する。文中に用いる英語の単語あるいは句は固有名詞を除いて小文字で書きはじめる（文頭の場合は大文字）。また文中の英語はすべてタイプするかまたは活字

体で書く。

6. 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
7. 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。
8. 表、図（写真）は本文と別にし、それらの挿入箇所を本文の右余白に明示する。グラフ、写真、線画等はすべて図とし、一連の番号 Fig. 1, 2…を付し、説明文を別紙に添える。
9. 図と写真は原図またはキャビネ大の光沢写真版とし、裏面に Fig. 1, 2… および上下を鉛筆書きし、A4 版の台紙に一枚ずつ軽く糊付けする。台紙の下部に Fig. (一連番号) および説明を付す。
10. 表は表の上部に Table (一連番号) と説明を記入すること。表には縦野を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するときは表示の語句の右肩に a, b, c… を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。
11. 本文中の文献引用は著者名および年号をもつてする。

12. 引用文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名は Chemical Abstracts の記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁（単行本の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁）の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。

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

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

藤川和男、梁 治子、近藤宗平（1984）ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目される短期試験法、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	印		
ローマ字つづり			
生年月日、性別	年	月	日
	男	女	

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

学歴	学部	学部学校名	卒業年次		年
大学院	課程	学校名	修了年次		年
学位					取得年年
研究領域 (下記にあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)					
1. 変異原 2. 検出系 3. 毒性 4. 発生異常 5. 汚染 6. 疫学 7. 遺伝 8. がん 9. 微生物 10. 高等動物 11. 高等植物 12. 食品 13. 気体・粉じん 14. 医薬品 15. 農薬 16. 代謝 17. 分子機構 18. その他()					

研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)

加入学会名 (本学会以外の)

推薦者 (日本環境変異原学会評議員)

氏名 (署名)

印

入会申込者との関係 (数行ご記入ください)

住 所 · 所 屬 等 变 更 届

平成 年 月 日

日本環境変異原学会
事務局 御中

下記変更がありましたのでお届け致します。

フリガナ	
氏名	(印)
旧所属	

新 所屬機関 部局 職名	(和)
	(英)
新 所屬機関 所在地	〒 電話 内線 () FAX (和)
	(英)
新 自宅 住所	〒 電話 内線 () FAX (和)
	(英)

会誌送付先

① 所屬機関

② 自宅

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

エームステストシステム CA-11・CA-7II・PCA-11

〈微生物を用いる変異原性試験〉

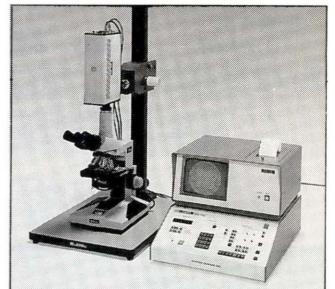
コロニーカウントからデータの保存、試験結果表
濃度別グラフの作成までを自動で高速処理します。



自由に選べるラインナップ。

顕微鏡システム

CA-7MI グレイン計測システム



CA-7MII

- 不透明な培地、色のついた培地上のコロニー計測
 - 粉・異物・トナー・インク・カーボン等混在コロニー計測
 - 自由に倍率を変えての拡大計測
 - 計測データの自動補正
 - 豊富なソフトウェア
 - 背景データの検索プログラム
 - 生育阻害編集機能
 - 一太郎、ロータス1-2-3対応

*依託試料の測定を行ってあります。お気軽にご相談下さい。

製造発売元



システムサイエンス株式会社

本社・工場／〒197 東京都福生市福生 1253-16
TEL 0425(52)5956(代表)

6員環を持つ世界初のH₂-受容体拮抗剤です。

帝国臓器製薬



薬価基準収載

【効能・効果】
胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群、逆流性食道炎、麻酔前投薬、下記疾患の胃粘膜病変（びらん、出血、発赤、浮腫）の改善

急性胃炎、慢性胃炎の急性増悪期

【使用上の注意】

1.一般的な注意
治療にあたっては経過を十分に観察し、症状に応じて治療上必要最小限の使用にとどめ、本剤で効果がみられない場合には他の療法に切りかえること。なお、肝機能、腎機能、血液像等に注意すること。

2.次の患者には慎重に投与すること

①薬物過敏症の既往歴のある患者 ②肝障害のある患者 ③腎障害のある患者（血中濃度が持続するので、投与量を減ずるか投与間隔をあけて使用すること。）

3.副作用

①過敏症=ときに発疹、発痒感等があらわれることがあるので、このような場合には投与を中止すること。②血液=ときに白血球減少があらわれることがあるので、異常が認められた場合には投与を中止すること。ときに好酸球增多があらわれることがある。

潰瘍（胃潰瘍、十二指腸潰瘍）に1日2カプセル・胃炎（急性胃炎、慢性胃炎の急性増悪期）に1日1カプセル

H₂-受容体拮抗剤
アルタット[®]カプセル75
(塩酸ロキサチジンアセタートカプセル)

■資料請求先=〒107東京都港区赤坂2-5-1 帝国臓器製薬株式会社・医薬学術部

バイオラボラトリーの自動化を目指す東洋測器

CA-90S

コロニーアナライザー

—コンパクトサイズ、グッドデザイン＆ロープライス—

シャーレ上のコロニーをアッと言ふ間にカウントします。



コロニー計数表示……0～99999
最小測定コロニー径……0.01mm(オプションレンズ使用)
寸法(mm)……………本体：420(W)×630(D)×395(H)
モニター：268(W)×350(D)×200(H)

特長

- 高感度、超高速コロニーカウント
- 場所を取らず外光の影響のないニューデザイン
- マッキントッシュ、NEC9801用の豊富なコンピューターソフトウェア
- 高性能で低価格

用途

- エームス試験
- 食品の細菌検査
- 抗菌剤試験
- 細菌の発育試験
- 各種バクテリアコロニー数の計測
- がん等の細胞コロニー数の計測
- MIC(最小発育阻止濃度)測定
- 阻止円測定

定価：3,900,000円

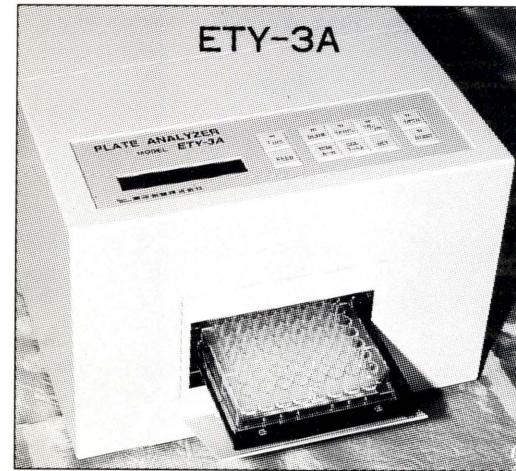
ETY-3A

プレートアナライザー

ETY-3WS

プレートウォッシャー

—マイクロプレート用ELISA測定器+ウォッシャー—



- 測定時間、たったの5秒の超高速測定
- 測定波長:400～700nm
- 充実したコンピュータープログラム
- 簡単操作で低価格
- 場所をとらないA4サイズに高精度を結集

定価 1,200,000円

ETY-3WS プレートウォッシャー

96マイクロプレート用小型自動洗浄器、ELISA測定が更に便利に!!

定価 690,000円

Toyo SOHII 東洋測器株式会社

〒228 神奈川県座間市ひばりヶ丘5-5436-12
TEL. (0462)55-1356(代表) FAX. (0462)55-7973

広告掲載会社一覧

システムサイエンス株式会社

帝国臓器製薬株式会社

東洋測器株式会社

(50音順)

環境変異原研究 第15巻 第2号 1993年

平成6年4月10日 印刷

平成6年4月20日 発行

発行者 日本環境変異原学会

発行責任者 祖父尼俊雄

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