

環境変異原研究

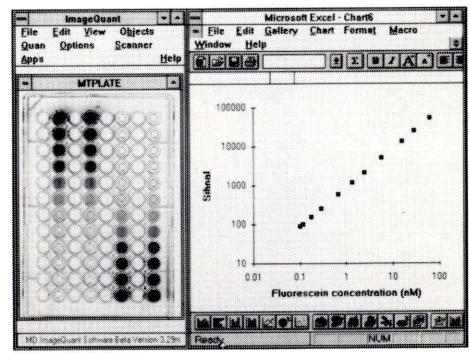
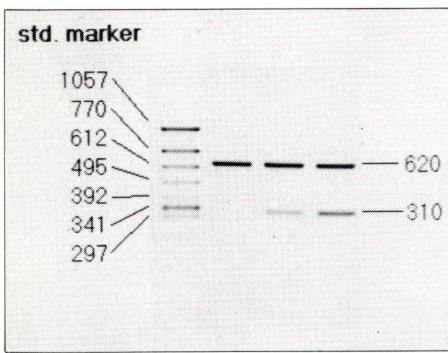
Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol.16 No.1 1994

新世代の蛍光イメージアナライザー FluorImager



2波長のイメージスキャニング方式(レーザースキャン方式・光ファイバー集光装置)により電気泳動ゲル、メンブレン、TLCプレート、マイクロタイタープレート等を用いた蛍光標識された生体成分分離の検出操作を可能にしました。



- 分子量の測定——MW
●サンプルの定量——Integration・File Conversion
●RFLP解析

試薬キット

専用の試薬キットにより、信頼性と再現性のある結果を得ることが出来ます。
(発売中) FluorKit CAT (Fluorescent CAT Assay)
(近日発売予定) FluorKit KIN (Fluorescent Kinase Assay)
FluorKit DFA (DNA Fragment Analysis)
FluorKit DQS (DNA Quantitation System)

In-Gel Hybridization System
Transcription Factor Binding Analysis
Fluorescent Primer Extension System
One-dimension protein analysis
Two-dimension protein analysis
他 多数

※デモンストレーションご希望の方はご連絡下さい。

日本総発売元

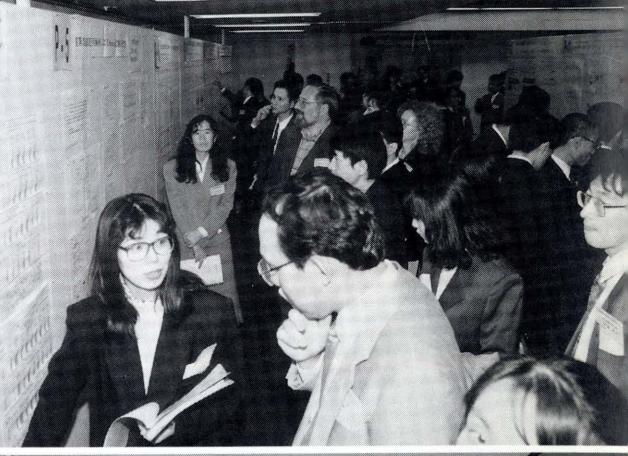
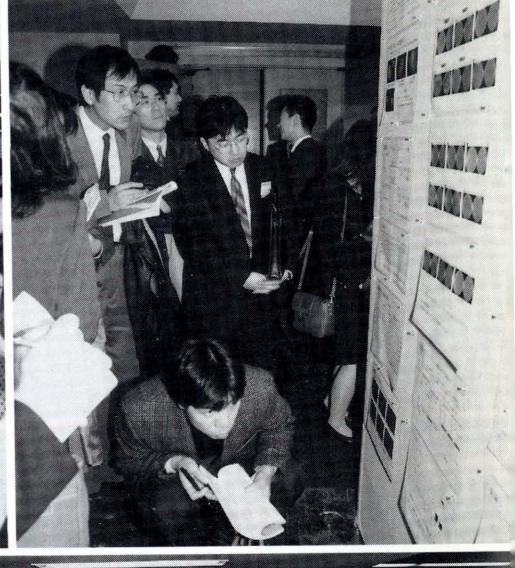
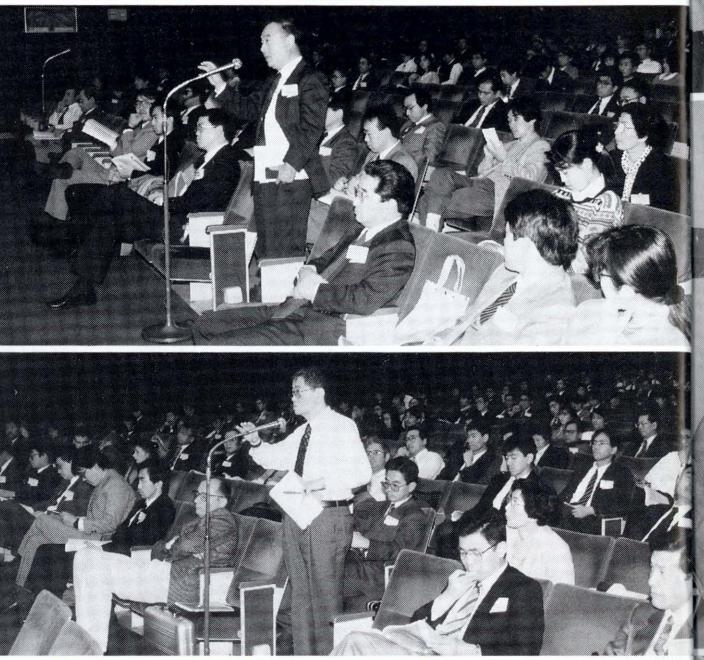
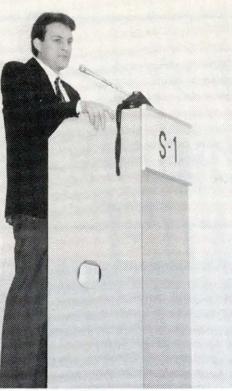
モレキュラーダイナミクスジャパン 株式会社

〒175 東京都板橋区成増1-28-12 シモダビル6F TEL.(03)3976-9692/FAX.(03)3976-8845

日本環境変異原学会 第22回大会

1994 東京 大会会場での一こま







環境変異原研究

Environmental Mutagen Research Communications

Volume 16, Number 1 1994

目 次

総 説

奨励賞授賞講演

変異原物質の腸内菌による代謝に関する研究

木内武美…… 1

奨励賞授賞講演

食品中の変異原物質の分離同定

糠谷東雄…… 17

奨励賞授賞講演

変異原物質の代謝的活性化に関するチトクローム P-450 の基礎的・
応用的研究

鎌滝哲也…… 31

一般論文

In vitro 染色体異常試験における濃度設定のための細胞毒性試験法の比較

杉木靖子, 山崎奈緒美, 松岡厚子, 鈴木孝昌, 林 真, 祖父尼俊雄…… 37

特別企画 第 22 回大会シンポジウム

「トランスジェニックアニマルを用いる *in vivo* 遺伝子突然変異試験—意義と問題点」

Plasmid-Based Transgenic Animal Models for Mutagenicity Studies:

Increased Sensitivity and Higher Efficiency

Gossen, J. A., H.-J. Martus and J. Vijg…… 45

トランスジェニックマウスを用いた環境変異原検定系の開発

権藤洋一, 池田由美子, 茂手木淑子, 竹下 綾, 高橋美千江,
中尾和貴, 勝木元也…… 53

遺伝子突然変異と小核誘発の同時検出系

林 真, 鈴木孝昌, 祖父尼俊雄…… 67

特別企画 第 22 回大会パネルディスカッション

「変異原性試験の役割とその評価」

一般化学物質に関する変異原性試験の機能と役割

馬場恒夫…… 79

農薬の安全性評価における変異原性試験の有用性と問題点

原 正樹…… 91

医薬品（特に制がん剤）開発における変異原性試験の意義

大内田昭信…… 97

変異原性試験の役割と限界—RDS 試験による非変異・肝がん原性物質

の検出一 高沢博修, 杉山明男, 馬場 博, 宇野芳文, 宮川 誠, 吉川邦衛…… 113
化粧品における変異原性試験の役割とその評価

杉山千代美…… 127

特別企画 第 22 回大会トピックス

「変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点:

メルボルン国際ワークショップの報告を中心に」

微生物突然変異試験

能美健彦, 太田敏博…… 137

| | | |
|--|------------|-----|
| <i>In vitro</i> 染色体異常試験の国際的標準化の現状と問題点 | 森田 健, 近藤耕治 | 141 |
| 哺乳動物細胞を用いる遺伝子突然変異試験—メルボルン国際ワークショップ合意— | 西 義介 | 151 |
| 不定期 DNA 合成 (UDS) 試験 | 降旗千恵, 森 秀樹 | 161 |
| げっ歯類の赤血球を用いる <i>in vivo</i> 小核試験 須藤鎮世, 林 真, 島田弘康 | 165 | |
| ICH (薬事規制の調和のための国際会議) について | 菊池康基 | 173 |

付記

| | |
|-----------------|-----|
| 日本環境変異原学会 会則 | 177 |
| " 平成 6~7 年 役員名簿 | 178 |
| " " 評議員名簿 | 179 |
| 環境変異原研究 投稿規定 | 180 |
| " 執筆規定 | 181 |
| 日本環境変異原学会入会申込書 | 182 |
| 住所・所属等変更届 | 184 |
| 賛助会員 | 185 |
| 広告 | 186 |

広告掲載会社一覧

| |
|----------------------------|
| 家田貿易株式会社 |
| KS オリンパス株式会社 (表 4) |
| システムサイエンス株式会社 |
| 住友金属工業株式会社 |
| 帝国臓器製薬株式会社 |
| 東洋測器株式会社 |
| 株式会社ベックス |
| 株式会社ペリタス |
| モレキュラーダイナミクスジャパン株式会社 (表 2) |
| (50 音順) |

Environ. Mut. Res. Commun., 16: 1-16 (1994)

総

説

奨励賞授賞講演

変異原物質の腸内菌による代謝に関する研究

Metabolism of environmental mutagens by intestinal microflora *in vivo* and *in vitro*

木 内 武 美
Takemi Kinouchi

徳島大学医学部
〒770 徳島市蔵本町 3 丁目 18-15

Department of Bacteriology, School of Medicine, The University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto-cho Tokushima-shi, Tokushima 770, Japan

(受付: 1994 年 2 月 20 日; 受理: 1994 年 2 月 20 日)

Summary

The intestinal microflora can metabolize a wide range of environmental chemicals including mutagens, carcinogens, drugs and food additives either directly or after metabolic alteration in the liver. To elucidate the roles of the intestinal microflora in the metabolism of foreign compounds *in vivo* we established a method of antibiotic treatment to reduce microfloral activities such as enzymic action of β -glucuronidase, cysteine conjugate β -lyase (β -lyase) and nitroreductase. The glutathione conjugates of 1-nitropyrene oxides detoxified in the liver were excreted into bile and degraded to cysteine conjugates in the upper intestinal tract by γ -glutamyltransferase and aminopeptidase excreted from the pancreas. The cysteine conjugates were then degraded in the lower intestine by β -lyase which was derived from intestinal bacteria such as *Peptostreptococcus magnus* and *Eubacterium limosum*. As a result, the DNA-binding activity of the cysteine conjugates was enhanced *in vivo* and *in vitro*. β -lyase also plays an important role in absorption of metabolites of glutathione conjugates from the intestine. On the other hand, the sulfate conjugates of nitropyrenols in bile were deconjugated by pancreatic juice and bacteria such as *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Proteus* that easily colonize the abnormal biliary duct, and changed to mutagenic nitropyrenols. This phenomenon is considered to be one of the reasons for the high incidence of biliary carcinoma in patients with an anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct. Small-intestinal ulcers were induced by a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) in specific-pathogen-free rats and gnotobiotes of *E. coli* or *Eubacterium limosum* but not in germ-free rats, antibiotic-treated rats or gnotobiotes of *Lactobacillus acidophilus* or *Bifidobacterium adolescentis*. Furthermore, the distribution of the intestinal microflora in rats with ulcers was changed, and the ulcer formation in the rat intestine was prevented by giving them cultures of *L. acidophilus* or *Bifidobacterium adolescentis* or yoghurt containing *B. breve* and *Streptococcus thermophilus* as drinking water, suggesting that the normal intestinal microflora is important for prevention of NSAID-induced small-intestinal ulcer formation.

Keywords: intestinal microflora, 1-Nitropyrene, method of antibiotic treatment, cysteine conjugate β -lyase, Phase III reaction, NSAID-induced small-intestinal ulcer

1. はじめに

変異・癌原物質の毒性発現や発癌のメカニズムの解明に関する大部分の研究は、主として哺乳動物を使った *in vivo* の実験か、哺乳動物の各種臓器や細胞、さらに分子レベルの実験によって行なわれている。しかし、変異・癌原物質の生体内代謝を考える場合において、重要な代謝系である腸管内での腸内菌叢の酵素活性が、しばしば無視されている。

生体外の異物、例えは環境変異原物質、発癌物質や一般薬物などがヒト体内に入る経路として、経口、経皮および経気道が考えられるが、この中で経口的に侵入する場合が最も多い。生体内に入った脂溶性が高く、極性の少ない化学物質は、生体膜を容易に通過し、吸収されて、肝臓に運ばれ、そこで親水性の物質に変換され、胆汁や尿中へ排泄される。経口的にに入った化学物質の一部につい

ては、腸内菌の代謝を直接受けた後吸収される場合もある。

化学物質の生体内変換は、薬物代謝酵素と言われる酵素群による一連の反応として行なわれるが、大きく第Ⅰ相反応と第Ⅱ相反応とに分かれれる。第Ⅰ相反応は官能基導入反応といわれる活性化反応で、酸化、還元、加水分解などの反応が含まれ、チトクローム P-450 が代表的な酵素である。これらの反応によって、反応性に富んだ活性化物質が生成され、DNA などの生体内高分子と結合する。DNA と結合した活性化体は、遺伝情報の混乱を引き起こし、突然変異を誘発したり、発癌作用や細胞致死作用を示すようになる。第Ⅱ相反応は第Ⅰ相反応で生成された活性化体をグルクロン酸、グルタチオン、硫酸、グリシンなどの内因性の物質と抱合させ、極性をさらに高めて、水溶性にして排泄されやすい化合物に変え

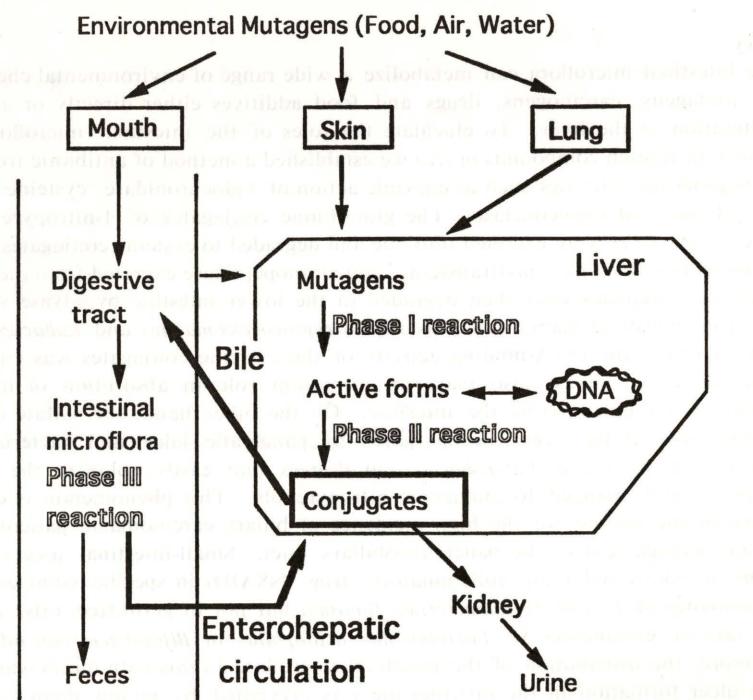


Fig. 1. Metabolism of environmental mutagens and enterohepatic circulation.

The environmental mutagens are taken into the human body through the mouth, lung or skin. The compounds are activated (phase I reaction) and conjugated (phase II reaction) in the liver. The conjugated, detoxified compounds are excreted into the bile and metabolized by intestinal bacteria in the intestinal tract (phase III reaction). After deconjugation by the intestinal bacteria, the compounds are absorbed in the intestinal tract and then metabolized again in the liver (enterohepatic circulation).

る反応で、抱合反応と呼ばれ、一般に不活性化(解毒)反応である。代表的な酵素としては、グルクロン酸転移酵素、グルタチオン S-転移酵素、硫酸転移酵素などがある。またどの抱合体が、尿中へ排泄されるか、胆汁中へ排泄されるかは分子量の違いにより決定される(加藤, 1983)。

胆汁中へ排泄された各種抱合体は、腸管内で腸内菌の持つ β -glucuronidase や sulfatase などの脱抱合酵素で加水分解された後に、再び脂溶性の活性化物質となり、腸粘膜より吸収されて、肝臓へ送られ再度代謝される。この生体内での化学物質の移動を「腸肝循環」と呼んでいる(Fig. 1)。この腸肝循環により、化学物質の生体内滞留が長くなり、毒性の増加につながる可能性がある。また、主として腸内菌が担う抱合体の分解反応は、第Ⅲ相反応と呼ばれており、我々はその重要性に注目している。

本稿では、まず、生体内代謝への腸内菌叢の関与を調べる方法の1つである、抗生物質処理動物を用いる場合の抗生物質処理条件に検討を加えたのでその結果について報告する。次に、環境変異原物質 1-nitropyrene (1-NP) をモデル化合物として選び、その生体内代謝、特に腸内菌が関与する解毒抱合体の毒性発現について報告する。さらに、環境変異原以外の一般薬剤の毒性発現にも、腸内菌が重要な役割を果たしている例として、非ステロイド系抗炎症剤による小腸潰瘍形成について説明する。

2. 腸内菌叢とその代謝の特徴

一般にヒトの腸管内は、生まれた直後は無菌である。生後、生体が外界と接触している皮膚や気道、さらに消化管などの粘膜面にいろいろな種類の微生物が定着し、それぞれの部位に特徴的な常在菌叢を形成する。その中で腸内にすむ菌を腸内菌と呼び、その集団を腸内菌叢と呼ぶ。ヒトの腸管内には、100種、100兆個を超える菌が住み着いており(Finegold et al., 1974; Drasar and Barrow, 1985)、宿主側臓器相当の重量があり、酵素の種類も豊富で、肝臓に存在する酵素の種類を上回るとされており、生体臓器の一つとしての役割を果たしている(Sheline, 1973; Rowland, et

Table 1. Metabolic activities of intestinal microflora against foreign compounds (Sheline, 1973)

1. Hydrolysis of glycosides
 - a. Glucuronide
 - b. Other glycosides
2. Hydrolysis of sulfate esters
3. Hydrolysis of amides
4. Hydrolysis of esters
5. Hydrolysis of sulfamates
6. Hydrolysis of nitrates
7. Hydrolysis of peptides
8. Decarboxylation
9. Dealkylation
 - a. O-alkyl compounds
 - b. N-alkyl compounds
 - c. Other alkyl derivatives
10. Dehalogenation
11. Deamination
12. Dehydroxylation
 - a. C-hydroxyl compounds
 - b. N-hydroxyl compounds
13. Heterocyclic ring fission
 - a. O-containing ring system
 - b. N-containing ring system
14. Reduction of double bonds
15. Reduction of nitro group
16. Reduction of azo group
17. Reduction of aldehyde
18. Reduction of ketones
19. Reduction of alcohols
20. Reduction of N-oxide
21. Reduction of arsenic acids
22. Reduction of sulfoxides
23. Reduction of epoxide to olefins
24. Aromatization
25. Nitrosamine formation
26. Nitrosamine degradation
27. Acetylation
28. Esterification
29. Methylation
30. Ketone formation

al., 1985)。その構成菌は、*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*などの嫌気性菌(酸素が存在すると増殖できずに死滅する菌)が最優勢であり、大腸菌のような好気性菌の100倍以上も存在している。腸内菌の持つ代謝活性の種類を Table 1 に列挙した(Sheline, 1973)。生体、特に肝臓での代謝が酸化と合成を主とし、グルクロン酸抱合や硫酸抱合あるいはグルタチオン抱合の様な水溶性の物質を生成するのに対し

て、腸内菌による代謝は還元と加水分解が主で、ニトロサミンやケトンの合成の例を除けば合成はまれであって、非極性の脂溶性物質を生成するのが特徴である。一方、腸内菌叢の代謝活性は、食事、薬物、ストレスなどによって影響を受けることも知られている (Goldin *et al.*, 1978; Goldin *et al.*, 1980; Rowland, *et al.*, 1985)。

3. In vivo での腸内菌代謝の研究方法

生体内での代謝に腸内菌叢が関与しているかどうかを調べる方法として以下の 3 つの方法が考えられている。

①化学物質の投与経路による比較：経口投与とその他の投与経路、腹腔内投与や静脈内投与による代謝産物や毒性発現を比べる方法である。経口投与以外は腸内菌の関与が少ないと考えての実験である。しかし、経口投与以外でも腸管へは胆汁を介して (enterohepatic circulation)，あるいは腸管粘膜から排泄され (entero-entero circulation)，腸内菌によって代謝を受けるので、完全に腸管を経ない経路にはなっていない。そのため細菌の酵素による代謝なのか、生体側酵素による代謝なのかはっきりと区別できない場合がある。

②ノトバイオート (無菌動物を含む) と通常動物の比較：有用な方法であり、cycasin (methylazoxymethanol- β -D-glucoside) の毒性発現に腸内菌が関与していることが証明されている。我々も、1-NP の生体内代謝の研究において、この方法を用いて、腸内菌は、ニトロ還元反応と、脱抱合反応に関与し、肝臓では、酸化反応や抱合体の形成およびアセチル化が起こることを証明した (Kinouchi *et al.*, 1986a)。しかし、ノトバイオートを取り扱うためには、アイソレーターが必要で取り扱いや滅菌に手間がかかり、実験費用の点に問題がある。

③抗生素質処理動物と通常動物との比較：抗生素質での前処理で腸内菌の活性を抑制した動物に、化学物質の投与実験を行ない、抗生素質処理動物で代謝産物が減少すれば、主として腸内菌がその酵素反応を担っていたと考える。実験期間中は、食糞に注意し、滅菌水、滅菌食を与

Table 2. Antibiotics used (Kinouchi *et al.*, 1993)

| Group | Antibiotics | Dose/mouse/kg of body weight |
|-------|---------------|------------------------------|
| I | None (saline) | — |
| II | Bacitracin | 200 mg |
| | Neomycin | 200 mg |
| | Streptomycin | 200 mg |
| III | Bacitracin | 400 mg |
| | Neomycin | 400 mg |
| | Tetracycline | 200 mg |
| IV | Neomycin | 500 mg |
| V | Kanamycin | 250 mg |
| VI | Kanamycin | 200 mg |
| VII | Erythromycin | 200 mg |
| | Kanamycin | 200 mg |
| | Lincomycin | 200 mg |
| | Tetracycline | 200 mg |

Mice were given saline or various kinds of antibiotics orally twice a day by intragastric gavage for 5 days.

え、菌の再定着に気をつける必要がある。また、この時の抗生素質によって動物が下痢をしたり、抗生素質と投与した化合物が反応したりして、化合物の吸収が悪いと同様な結果ができるので注意しなければならない。また腸管からの吸収の少ない抗生素質を使用し、生体への影響を少なくすることも大切である。

我々は、各種抗生素質 (Table 2) をマウスに 5 日間、1 日 2 回胃内にゾンデで投与し、生菌数 (Table 3) および腸管内の酵素活性の変化 (Table 4) を測定した (Kinouchi *et al.*, 1993)。IV 群および V 群のアミノグリコシド系抗生素質の単独投与では、対照群である I 群に比べて、好気性菌の減少には有意差がみられたが、嫌気性菌の菌数変化には有意差がみられず、腸管内の優勢菌である嫌気性菌には効果がないことを示している (Table 3)。また、腸管内容物の各種酵素活性を粗抽出液を用いて比較すると、主に生体側細胞に由来する酵素である γ -glutamyltransferase と aminopeptidase の酵素活性にはどの抗生素質処理群でも影響を与えたかった。実際に、脾液のこれら酵素活性は非常に高かった。また細菌細胞由来の酵素の中では、 β -glucuronidase 活性はどの抗生素質処理によても減少したが、嫌気性菌が強い活性を持つニトロ還元酵素 (Kinouchi *et al.*,

Table 3. Effect of antibiotic treatment on bacterial counts of the upper and lower intestinal contents (Kinouchi *et al.*, 1993)

| Group | Bacterial count (\log_{10} CFU/g of intestinal contents) | | | |
|-------|---|----------------------|---------------------------|----------------------|
| | Upper intestinal contents | | Lower intestinal contents | |
| | Aerobic incubation | Anaerobic incubation | Aerobic incubation | Anaerobic incubation |
| I | 7.10±0.37 | 7.53±0.21 | 8.83±0.09 | 10.00±0.08 |
| II | 3.53±0.05** | 3.77±0.17** | 3.47±0.19** | 3.13±0.59** |
| III | 2.15±0.15** | 2.15±0.15** | 2.70±0.10** | 2.15±0.15** |
| IV | 4.80±0.36** | 7.16±0.46 | 5.00±0.14** | 9.67±0.19 |
| V | 5.80±0.30* | 7.40±0.10 | 6.80±0.30** | 9.55±0.05 |
| VI | 5.63±0.17** | 6.20±0.37* | 5.73±0.17** | 7.33±0.31** |
| VII | 2.73±0.31** | 2.53±0.21** | 3.20±0.36** | 2.43±0.19** |

* Significantly different from control group I ($p < 0.05$)

** Significantly different from control group I ($p < 0.01$)

Table 4. Effect of antibiotic treatment on various enzymes of the upper and lower intestinal contents (Kinouchi *et al.*, 1993)

| Group | γ -Glutamyltransferase (nmol/min/mg) | Aminopeptidase (nmol/min/mg) | β -Glucuronidase (μ g/h/mg) | β -Lyase (mol/min/mg) | Nitroreductase (nmol/min/mg) |
|----------------------------------|---|------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
| Upper intestinal contents | | | | | |
| I | 28.1±12.3 | 14.1±3.5 | 7.4±0.7 | 0.24±0.05 | 0.18±0.03 |
| II | 22.2±3.3 | 13.0±6.1 | 5.6±1.0 | 0.07±0.005* | 0.08±0.01* |
| III | 17.0±1.8 | 14.4±0.3 | 9.2±0.8 | 0.20±0.07 | 0.13±0.03 |
| IV | 15.8±2.6 | 12.4±3.3 | 8.7±1.3 | 0.14±0.06* | 0.11±0.03 |
| V | 18.5±0.9 | 11.1±2.4 | 8.5±0.8 | 0.23±0.04 | 0.14±0.11 |
| VI | 23.2±6.4 | 10.9±1.4 | 6.7±0.4 | 0.20±0.19 | 0.13±0.08 |
| VII | 19.4±3.3 | 9.3±1.5 | 6.4±1.3 | 0.20±0.02 | 0.15±0.06 |
| Lower intestinal contents | | | | | |
| I | 8.2±0.7 | 4.6±1.5 | 74.8±16.8 | 9.5±3.0 | 1.1±0.2 |
| II | 8.0±2.1 | 4.7±1.5 | 6.2±2.0* | 0.3±0.2* | 0.1±0.02* |
| III | 13.6±0.9 | 6.1±2.3 | 9.2±0.8* | 0.6±0.4* | 0.02±0.01* |
| IV | 8.2±1.7 | 4.6±1.2 | 5.8±1.2* | 1.6±0.2* | 0.4±0.04 |
| V | 10.2±1.5 | 3.6±0.5 | 18.1±3.5* | 5.8±0.5 | 0.6±0.02 |
| VI | 12.7±4.9 | 7.6±2.4 | 7.2±1.0* | 0.3±0.1* | 0.1±0.1* |
| VII | 7.3±1.2 | 2.9±0.4 | 3.8±1.3* | 0.3±0.1* | 0.03±0.02* |

* Significantly different from control group I ($p < 0.05$)

1982; Kinouchi and Ohnishi, 1983; Kinouchi *et al.*, 1986b) と β -lyase 活性 (Kinouchi *et al.*, 1990) はアミノグリコシド系抗生素質の単独投与では有意に減少しなかった (Table 4)。また、どの抗生素質処理群でもトリチウムラベルしたグルコースの腸管からの吸収や肝臓の酵素活性に影響しなかった。以上の結果および腸管からの抗生素質の吸収がないことから、第 II 群の抗生素質処理がよいと考えた。また、飲料水として抗生素質処理を行なう場合は、第 II 群の抗生素質を、各 2~2.5 mg/ml の濃度になるように溶解させた水溶液で、化学物質投与 3 日前より処理を行なうと十分

な腸内菌抑制効果が得られた (Ohnishi *et al.*, 未発表)。

4. モデル化合物 1-nitropyrene について：環境中の存在とその代謝について

1-NP は、ディーゼルエンジン (Manabe *et al.*, 1985; Ohnishi *et al.*, 1985) や石油ストーブ (Kinouchi *et al.*, 1988) の排出粒子、給油所排水 (Manabe *et al.*, 1984), 使用済みエンジンオイル (Manabe *et al.*, 1984), 燃鳥などの食物 (Kinouchi *et al.*, 1986c; Ohnishi *et al.*, 1985; Ohnishi *et al.*, 1986) などから検出され、環境中に広く分

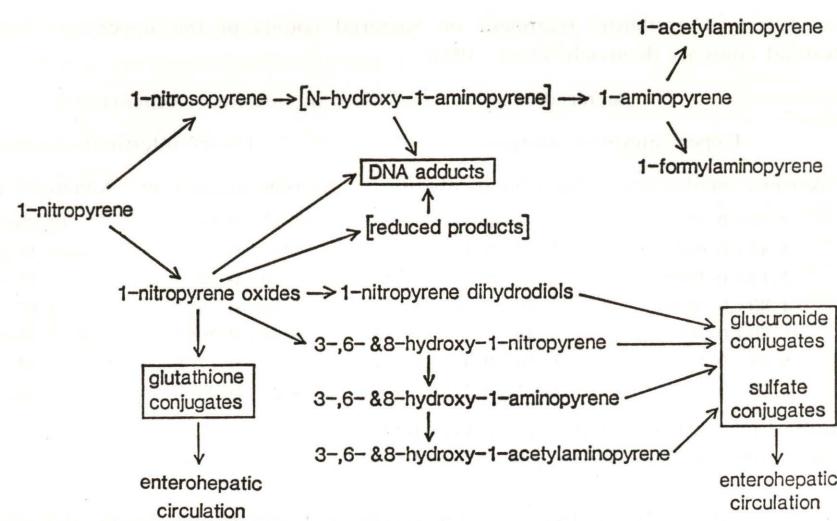


Fig. 2. Possible pathways for metabolic activation and inactivation of 1-NP *in vivo* (Ohnishi *et al.*, 1991).

1-NP is metabolized through reductive and oxidative pathways. During the reductive metabolism of 1-nitropyrene a metabolite, *N*-hydroxy-1-aminopyrene, is formed and bound to DNA. In the oxidative pathway, 1-NP 4,5-oxide and 1-NP 9,10-oxide are oxidatively activated metabolites and they are mutagenic and are responsible for reaction with DNA. On the other hand, 1-NP 4,5- and 9,10-oxides are detoxified as glutathione conjugates in the liver and excreted via the bile into the intestinal tract.

布する変異原物質で不完全燃焼過程で生成される (Tokiwa and Ohnishi, 1986). また大気中でピレンと二酸化窒素の反応により、容易に生成される (Tokiwa *et al.*, 1981) ほか、二酸化窒素暴露下のマウスにピレンを腹腔内投与しても、生体内でのニトロ化によって生成される (Kanoh *et al.*, 1987; Kanoh, *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.*, 1991; Kinouchi *et al.*, 1994). また 1-NP はエームス試験において、ネズミチフス菌 TA98 株 (-) S9 で高い変異原性を示し、実験動物に対しても腫瘍原性を示すという報告がある (Tokiwa and Ohnishi, 1986).

1-NP の生体内での代謝活性化経路としては、ニトロ基の還元とピレン環の酸化反応が考えられており、還元代謝経路での活性化体は、*N*-hydroxy-1-aminopyrene (Howard *et al.*, 1983; Kinouchi *et al.*, 1986b), 酸化的代謝経路での活性化体は 1-NP の K-領域エポキシドである 1-NP 4,5-oxide と 1-NP 9,10-oxide (Djurić *et al.*, 1986; Fifer *et al.*, 1986; Heflich *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1990; Kataoka *et al.*,

1991) だと考えられている (Fig. 2). どちらの代謝経路が生体内で主要な役割を果たしているのかを、1-NP を投与した B6C3F1 マウス肝より DNA を抽出し、ポストラベル法で DNA 付加体を調べることで検討した。その結果、1-NP 投与動物の DNA 付加体は、*in vitro* で合成した 1-NP oxides の DNA 付加体と同じ挙動を示した。また 1-NP の還元代謝経路によって生じる DNA 付加体である *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-1-aminopyrene はほとんど検出されず、生体内での主要な付加体は酸化的活性化体によるものと考えられた (木内ら, 1990; Kinouchi *et al.*, 1992)。現在、他の系統のマウスやラットで同様の実験を行なっているが、DNA 付加体形成には系統差があることが明らかになりつつある (Kinouchi *et al.*, 未発表)。

グルタチオンは、生体内に存在するトリペプチドであり、エポキシドなどの親電子化合物と酵素的または非酵素的に反応してグルタチオン抱合体を生成する。当然 1-NP oxides もグルタチオン抱合体として胆汁中に解毒排泄されるはずである。

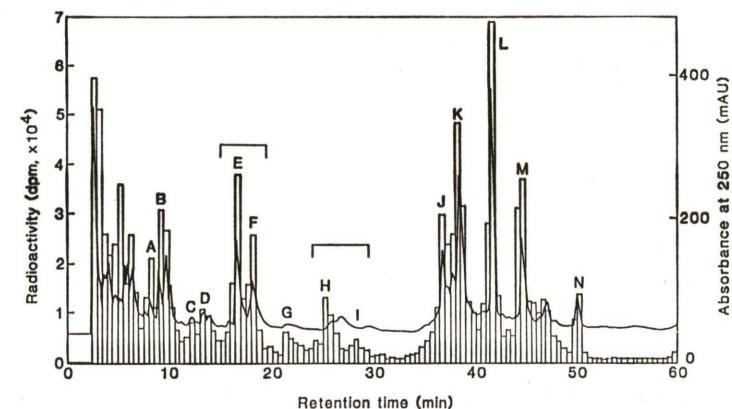


Fig. 3. HPLC elution pattern of biliary metabolites from rats administered 1-NP by gavage (Kinouchi *et al.*, 1990).

When the bile was directly analyzed by HPLC, 14 major radioactive peaks were observed. Peaks E and F are the glutathione conjugates of 1-NP 4,5-oxide and peaks H and I are the glutathione conjugates of 1-NP 9,10-oxide. The radioactivity of glutathione conjugates and their metabolites in peaks B-I accounts for 21.4% of the total radioactivity excreted into the bile. The glucuronide and sulfate conjugates (peaks J-M) constitute 27.5% and 5.5%, respectively.

我々は、1-NP 投与ラットの胆汁を分析 (Fig. 3) し、胆汁中の 21.4% がグルタチオン抱合体およびその代謝産物 (システイニルグリシン抱合体およびシステイン抱合体) であることを明らかにした (Kinouchi *et al.*, 1990; Kataoka *et al.*, 1991)。その他の 3/6/8-nitropyrenols や 1-nitro-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene などのグルクロン酸および硫酸抱合体はそれぞれ 27.5% と 5.5% であった (Kinouchi *et al.*, 1986a; Ohnishi *et al.*, 1986)。

5. 解毒抱合体の腸管内の代謝

(1) グルクロン酸および硫酸抱合体

1-NP 投与ラット胆汁中のグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体は、腸内菌の持つ β -glucuronidase や arylsulfatase によって分解され、アグリコンである 3/6/8-nitropyrenols や 1-nitro-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene が遊離していく。さらにその代謝産物は腸内菌の持つニトロ還元酵素によってアミノ体に変換された後、一部は再吸収される (Kinouchi *et al.*, 1986a; Kinouchi *et al.*, 1987)。

(2) グルタチオン抱合体

(i) グルタチオン抱合体の分解活性 (γ -glutamyl-transferase 活性)

グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体では脱抱合によって抱合されているものと同じ生成物が遊離していくのに比べて、グルタチオン抱合体の場合は、その代謝によって生成物が異なるので興味ある対象となる。グルタチオン抱合体の分解活性を各種腸管内容物で比べると、小腸内容物に強い活性があり下部腸管には強い活性はなかった。小腸内でのグルタチオン抱合体の代謝を調べると、まずグルタチオン抱合体の減少とともにシステイニルグリシン抱合体が上昇し、ついでシステイン抱合体がシスティン抱合体へと変換されることがわかった (Kinouchi *et al.*, 1990)。その分解活性を各種好気性菌および嫌気性菌、腸管粘膜、胆汁および脾液について測定すると、脾液が著しく強い活性を示した (Table 5)。腸管粘膜や小腸内での優勢菌である *Lactobacillus* などには強い活性がなかったことから小腸内でのグルタチオン抱合体の分解活性には脾液が重要な役割を果たしているものと考えられた。

Table 5. Degradation activity of intestinal bacteria, mucosa, bile and pancreatic juice against glutathione conjugates of 1-nitropyrene oxides and cysteine conjugates of 1-nitropyrene oxides (Kinouchi et al., 1990)

| Enzyme source | Specific activity (nmol/hr/mg protein) | | | |
|---|--|--------------------|---------------------|---------------------|
| | Glutathione conjugates | | Cysteine conjugates | |
| | 1-NP 4,5-oxide-SG | 1-NP 9,10-oxide-SG | 1-NP 4,5-oxide-Cys | 1-NP 9,10-oxide-Cys |
| Anaerobes | | | | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> GAI 0624 | 0.08 | 0.07 | 1.5 | 2.2 |
| <i>B. gingivalis</i> 381 | 0.03 | 0.05 | 4.1 | 5.0 |
| <i>B. thetaiotaomicron</i> 5482 | N.D. | 0.03 | 0.6 | 1.2 |
| <i>B. uniformis</i> 0061 | 0.21 | 0.08 | 5.6 | 3.9 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703 | 0.37 | 0.15 | 1.6 | 1.7 |
| <i>Clostridium perfringens</i> GAI 0668 | 0.14 | 0.01 | 0.1 | 1.7 |
| <i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8480 | 0.06 | N.D. | 175.7 | 135.4 |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> F-1 | 1.25 | 0.46 | 6.4 | 19.3 |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337 | 0.39 | 0.10 | 5.4 | 7.8 |
| <i>P. magnus</i> GAI 0663 | 0.12 | 0.14 | 58.3 | 1554.3 |
| Aerobes | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> W 3110 | 0.76 | 0.11 | 32.8 | 4.3 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> KUB 13 | 7.54 | 0.84 | 0.4 | N.D. |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 | 0.65 | 0.09 | 0.5 | 0.2 |
| <i>L. brevis</i> ATCC 8287 | 0.05 | 0.06 | 0.1 | N.D. |
| <i>L. casei</i> IAM 1043 | 0.23 | 0.07 | 4.2 | 3.4 |
| <i>Proteus mirabilis</i> KUB 22 | 9.50 | 1.36 | 1.8 | 3.5 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UTC 55 | 14.43 | 1.36 | 0.7 | 0.5 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 | 1.02 | 0.33 | 0.4 | 0.4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P | 0.04 | 0.04 | 0.6 | 0.3 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> UTB 74 | 0.06 | 0.05 | 24.2 | 16.5 |
| Intestinal mucosa | | | | |
| Small intestine (upper) | 0.66 | 0.86 | 0.1 | N.D. |
| Small intestine (lower) | 0.26 | 0.63 | 0.4 | 1.5 |
| Cecum | N.D. | 0.48 | N.D. | 0.4 |
| Large intestine | N.D. | N.D. | 0.5 | 0.9 |
| Bile | 1.41 | 1.67 | 0.7 | 2.5 |
| Pancreatic juice | 6.33 | 16.36 | N.D. | 0.1 |

N.D., Not detected

(ii) システイン抱合体の分解活性 (cysteine conjugate β -lyase 活性)

胆汁中に排泄されたグルタチオン抱合体は小腸内でシステイン抱合体まで分解されて下部腸管に移行するのでシステイン抱合体の分解活性を各種腸管内容物で測定した。その結果、システイン抱合体の分解活性は盲腸および大腸内容物が強く、小腸内容物にはないことがわかった。その分解活性は、cysteine conjugate β -lyase (β -lyase) の阻害剤である aminoxyacetic acid の添加で阻害された。この酵素活性を各種好気性菌および嫌気性菌、腸管粘膜、胆汁および胰液について測

定すると、腸内菌叢に由来していることがわかった。特に、*Eubacterium limosum* と *Peptostreptococcus magnus* が強い活性を持っていた。また一般的に嫌気性菌の方が好気性菌よりも強い活性を示した (Table 5)。

(iii) グルタチオン抱合体の腸管からの吸収

グルタチオン抱合体が、代謝を受けても腸管から吸収されずに、糞便中へ排泄されれば生体にとって完全な解毒になる。そこで、トリチウムラベルした 1-NP oxides のグルタチオン抱合体を合成し、上記 II 群の抗生物質処理マウスおよび無処理マウスに経口投与し、血中の放射能活性を

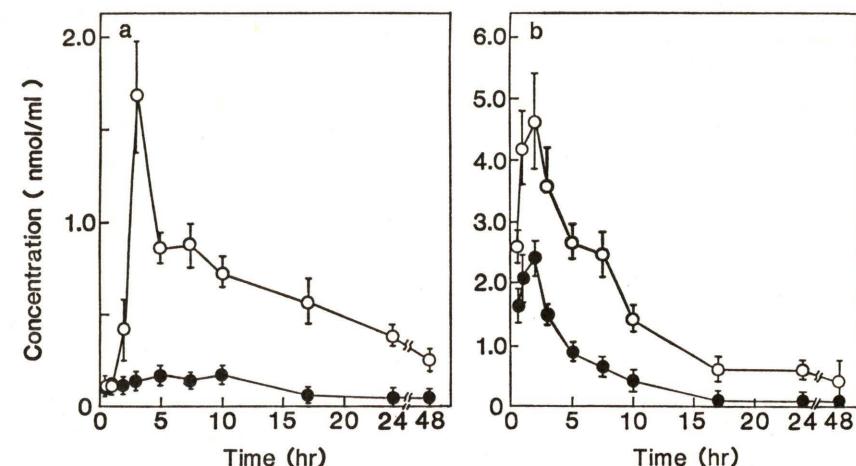


Fig. 4. Time-courses of radioactivity in the blood after oral administration of glutathione conjugates (Kinouchi et al., 1993).

Glutathione conjugates of [3 H]1-NP 4,5-oxide (a) or of [3 H]1-NP 9,10-oxides (b) were administered by gavage and blood samples were withdrawn from the tail vein at the indicated times. ○, control group; ●, antibiotic-treated group.

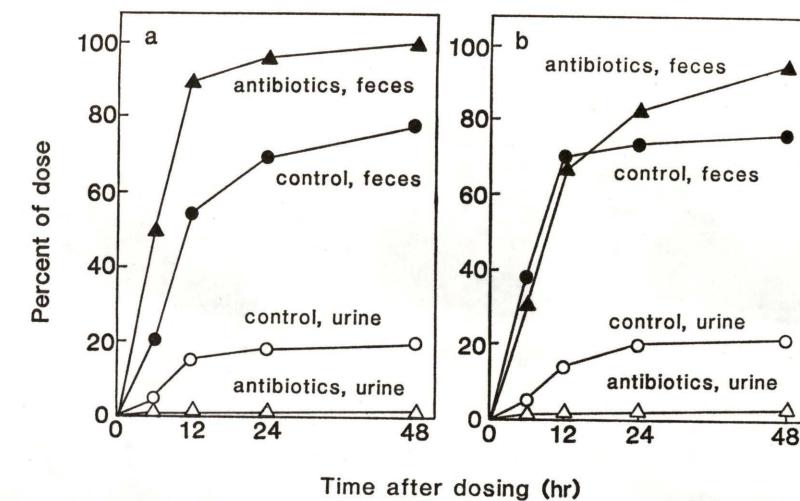


Fig. 5. Radioactivity excreted in urine and feces after oral administration of glutathione conjugates (Kinouchi et al., 1993).

Glutathione conjugates of [3 H]1-NP 4,5-oxide (a) or of [3 H]1-NP 9,10-oxides (b) were administered by gavage.

測定した。抗生物質無処理マウスでは、放射能レベルは上昇し、投与後 2~3 時間後に最高値を示した後、減少したが、抗生物質処理マウスでは血中放射能濃度の上昇は少なく、腸管からの吸収に腸内菌叢の関与が明らかになった (Fig. 4)。また、尿中へは 48 時間で、無処理マウスは投与量の約 20% を排泄したが、抗生物質処理マウスでは 2%

以下であった。逆に糞便中への排泄は、抗生物質処理マウスで 95% 以上、無処理マウスで 80% 以下であった (Fig. 5)。

(iv) グルタチオン抱合体の活性化

エーモス試験による 1-NP oxides のグルタチオン抱合体の変異原性は未抱合体の 1/150 以下であったが、システイン抱合体まで分解されると変

Table 6. Effect of cysteine conjugate β -lyase on mutagenicity of 1-nitropyrene 9,10-oxide (Kinouchi *et al.*, 1992)

| Cysteine conjugate (nmol/plate) | β -Lyase | Aminooxyacetic acid | Revertants/plate | |
|---------------------------------|----------------|---------------------|------------------|-------------|
| | | | TA 98(-)S9 | TA 100(-)S9 |
| 0 | — | — | 39 | 123 |
| 5 | — | — | 112 | 153 |
| 5 | + | — | 1088 | 583 |
| 5 | + | + | 125 | 156 |

Table 7. Effect of β -lyase on binding of cysteine conjugates of 1-NP oxides (Kinouchi *et al.*, 1992)

| Xanthine oxidase (0.1 U/ml) | Allopurinol (1 mM) | β -Lyase | Aminooxyacetic acid (1 mM) | Binding (pmol/mg DNA/hr) | |
|-----------------------------|--------------------|----------------|----------------------------|--------------------------|---------------------|
| | | | | 1-NP 4,5-oxide-Cys | 1-NP 9,10-oxide-Cys |
| — | — | — | — | 6.0 | 7.2 |
| + | — | — | — | 18.6 | 44.6 |
| + | + | — | — | 5.7 | 28.9 |
| — | — | + | — | 9.0 | 14.4 |
| + | — | + | — | 76.9 | 153.3 |
| + | + | + | — | 33.0 | 47.3 |
| + | — | + | + | 34.0 | 51.6 |
| + | + | + | + | 14.0 | 27.0 |

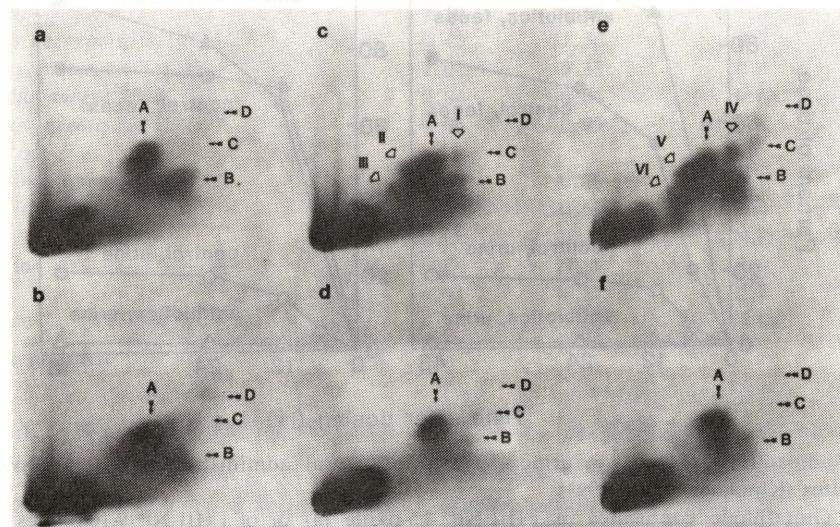


Fig. 6. DNA adducts in the lower intestinal mucosa after administration of glutathione conjugates (Kinouchi *et al.*, 1993).

Mice treated with antibiotics (b, d, f) or untreated (a, c, e) were given saline (a, b), glutathione conjugates of 1-NP 4,5-oxide (c, d) or glutathione conjugates of 1-NP 9,10-oxides (e, f) by gavage. DNA was extracted from the lower intestinal mucosa and the DNA adducts were analyzed by the 32 P-postlabelling method.

異原性は、グルタチオン抱合体の 10 倍の強さにまで上昇した。またシスティン抱合体の変異原性を測定するときに *Peptostreptococcus magnus* よ

り精製した β -lyase (Kataoka *et al.*, 未発表) を加えるとさらに変異原性が増加した。この変異原性の増加は、aminooxyacetic acid の添加で抑制

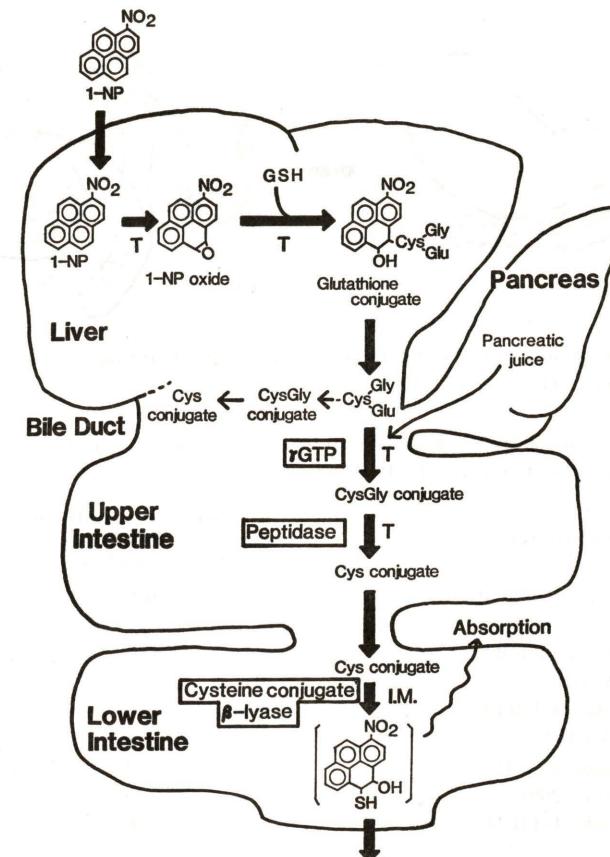


Fig. 7. Proposed oxidative pathways of 1-nitropyrene *in vivo*.

1-NP oxides are oxidatively activated products of metabolism of 1-NP by cytochrome P-450 in the liver. 1-NP oxides are detoxified as glutathione S-transferase and excreted via the bile into the intestinal tract. The glutathione conjugates are stepwise cleaved in the small intestine by γ -glutamyltransferase and aminopeptidase which are excreted mainly from the pancreas. As a result, the products reach the lower intestine and the cysteine conjugates are further metabolized by cysteine conjugate β -lyase of the intestinal microflora.

された (Table 6)。つまりシスティン抱合体は β -lyase によって分解されて再活性化されることがわかった。

In vitro でシスティン抱合体の DNA への結合を調べると、 β -lyase とニトロ還元酵素である xanthine oxidase が共存すると非常によく DNA に結合することがわかった。また、この結合は、aminooxyacetic acid や xanthine oxidase の阻害剤である allopurinol の添加によって抑制された (Table 7)。つまりシスティン抱合体は、腸内菌が強い活性を持つ β -lyase やニトロ還元酵素によって再活性化される可能性があることが明らかに

なった。

実際にシスティン抱合体が腸内菌によって再活性化されるかどうかについて、前述のグルタチオン抱合体を投与した抗生物質処理および無処理動物より下部腸管粘膜を取り出し、DNA を抽出し、ポストラベル法で DNA 付加体を調べた。その結果、抗生物質を投与しないマウス下部腸管粘膜で、抗生物質処理マウス下部腸管粘膜細胞 DNA にみられない少なくとも 3 種の DNA 付加体が検出された (Fig. 6)。グルタチオン抱合体は上部腸管内で主に脾液中の酵素でシスティン抱合体にまで分解されるので、これらの DNA 付加体は、シ

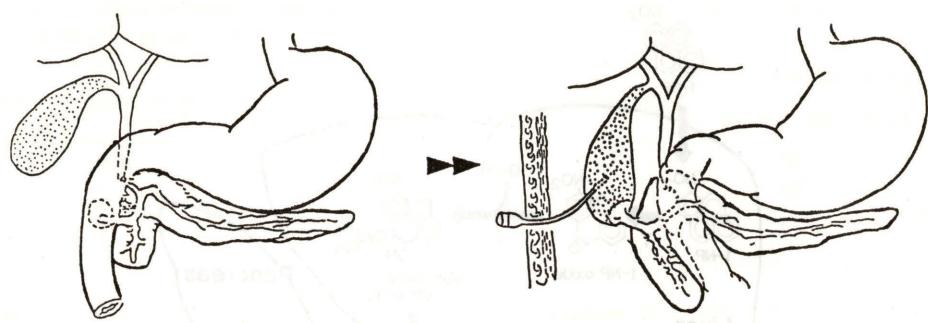


Fig. 8. Production of anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct in dogs by pancreatico-cholecystomy (Dong et al., 1993).

Table 8. β -glucuronidase and sulfatase activity in pancreatic juice and cell-free extracts of various bacteria (Dong et al., 1993)

| Enzyme source | Specific activity (nmol/hr/mg protein) | |
|--|--|-----------|
| | β -Glucuronidase | Sulfatase |
| Pancreatic Juice from a normal dog | <0.8 | 3.5 |
| Aerobes | | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> KUB 7 | 6.6 | 3.3 |
| <i>Escherichia coli</i> W 3110 | 297.5 | 5.0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> KUB 13 | 6.6 | 66.0 |
| <i>Proteus mirabilis</i> KUB 22 | 9.1 | 3.3 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UTC 55 | 8.3 | 0.7 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P | 5.0 | 0.7 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> UTB 74 | <0.8 | 2.7 |
| Anaerobes | | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> GAI 0624 | 5.8 | <0.3 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703 | 9.1 | 6.3 |
| <i>Clostridium perfringens</i> GAI 0668 | 9.1 | 1.0 |
| <i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8480 | 9.1 | 3.3 |

ステイン抱合体が腸内菌によって分解された産物が腸管粘膜細胞内で活性化されて生じたものと考えられた。

1-NP の酸化的代謝経路における第 I 相、第 II 相および第 III 相反応についてのまとめを Fig. 7 に示した。

(3) 脾管胆道合流異常と硫酸抱合体

先天性の脾管胆道合流異常のヒトは、胆道癌発生率が普通のヒトに比べて高率であることが知られている (Komi et al., 1984; Suda et al., 1979)。この理由の 1 つとして、胆汁中に抱合体として排泄された変異原物質の解毒体が、脾液中の酵素や腸管から胆道中へ移行した腸内菌が、解毒抱合体の分解を行い再活性化する結果であろうと考え、モデル犬を用いて実験した (Dong et al., 1993)。

イヌの脾管を胆囊に吻合して人工的に脾管胆道合流異常状態 (APBD dog, anomalous arrangement of the pancreaticobiliary duct) にした後 (Fig. 8), 1-NP を腹腔内に投与し、胆囊胆汁を採取した。一方で、1-NP を投与した正常犬の胆囊胆汁も採取し、それらの変異原性を比較すると、異常犬の方が 2 倍以上に高い値を示した。1-NP を投与したイヌの胆汁中には、3/6/8-nitropyrenols の硫酸抱合体が排泄されるので、イヌの脾液および胆道感染をよく引き起こす菌の sulfatase 活性を測定すると、*Klebsiella pneumoniae* が最も強い活性を持っていた。また脾液にも sulfatase 活性が検出された (Table 8)。採取した胆汁を有機溶媒で抽出し、高速液体クロマトグラフィーで

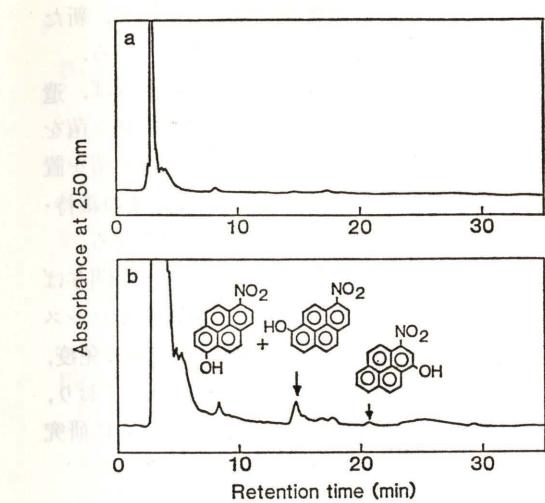


Fig. 9. HPLC patterns of diethyl ether extracts of bile from a normal dog (a) and an APBD dog (b) (Dong et al., 1993).

分析すると、正常犬胆汁からは脱抱合された化合物は検出されなかったが、異常犬胆汁からは脱抱合された 3/6/8-nitropyrenols が検出され、すでに胆汁中で脱抱合が起こっていることが確認された (Fig. 9)。このことは、脾管胆道合流異常症では、解毒抱合体に脾液と感染細菌の sulfatase が作用して、抱合体の再活性化が胆道内で起こっていることを示したもので、脾管胆道合流異常症のヒト

での胆道癌の発生率が高い原因の一つが明らかになった。

6. 非ステロイド系抗炎症剤の副作用である小腸潰瘍の形成への腸内菌叢の関与

非ステロイド系抗炎症剤による胃潰瘍や十二指腸潰瘍形成はよく知られていたが、最近小腸にも潰瘍が形成され、小腸穿孔を起こして死亡する症例の統計が報告され注目されている (Allison et al., 1992)。我々は、非ステロイド系抗炎症剤である 5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(4-methylsulfonylphenyl)thiophene が誘発するラット小腸潰瘍形成と腸内菌叢の関係について調べた。その結果を Table 9 に示した。この薬剤を投与 (1,000 mg/kg 体重) したラットは 7 匹中 5 匹 (71%) に小腸潰瘍が形成されたが、上述 II 群の抗生素処理したラットや無菌ラットでは小腸潰瘍形成は観察されなかった。しかし、無菌ラットに *Eubacterium limosum* や *Escherichia coli* を腸管内に定着させて作成したノトバイオートでは、潰瘍がそれぞれ 100% および 67% 形成された。これらのノトバイオートに抗生素処理をして菌数を抑制すると、潰瘍は全く形成されなくなった。一方で、*Bifidobacterium adolescentis* や *Lactobacillus acidophilus* を定着させたノトバイオートに抗炎症剤

Table 9. Effect of intestinal microflora and various treatments on small intestinal ulceration induced by a nonsteroidal anti-inflammatory drug, 5-bromo-2-(4-fluorophenyl)-3-(methylsulfonyl)thiophene (Uejima et al., in preparation)

| Rat | Treatment | Ulceration No. positive/total (%) |
|-------------------------------------|-------------|-----------------------------------|
| Specific pathogen free | None | 5/7 (71) |
| | Antibiotics | 0/7 (0) |
| Germ-free | None | 0/5 (0) |
| <i>Gnotobiote</i> | | |
| <i>Eubacterium limosum</i> | None | 5/5 (100) |
| | Antibiotics | 0/2 (0) |
| <i>Escherichia coli</i> | None | 4/6 (67) |
| | Antibiotics | 0/4 (0) |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | None | 0/5 (0) |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | None | 0/5 (0) |
| Specific pathogen free | None | 7/7 (100) |
| | Antibiotics | 1/7 (14) |
| <i>Bifidobacterium culture</i> | 1/7 (14) | |
| <i>Lactobacillus culture</i> | 2/7 (29) | |
| Yoghurt | 2/7 (29) | |

を投与しても潰瘍は形成されなかった。さらに specific pathogen free (SPF) ラットで潰瘍が 100% 形成された場合でも, *Bifidobacterium adolescentis* や *Lactobacillus acidophilus* の菌液や *Bifidobacterium breve* と *Streptococcus thermophilus* が入ったヨーグルト (ビフィール) を、薬剤投与前より飲料水代わりに与えておくと、潰瘍の形成がそれぞれ 14%, 29% および 29% に抑制された。また、小腸潰瘍が発生しているラットの小腸内容物中の細菌は、最優勢菌である *Lactobacillus* が減少し、正常ではほとんど検出されない *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella* および *Bacteroides* が増加しており、菌叢が変化していた。他の非ステロイド系抗炎症剤である diclofenac sodium によるラットでの小腸潰瘍の誘発も抗生素質処理により抑制された (大西ら, 1992)。これらのこととは、非ステロイド系抗炎症剤により誘発される小腸潰瘍形成に腸内菌叢が重要な役割を果たしていることを示したものであり、腸内菌叢のバランスを崩さないことの大切さをも示している。

7. おわりに

環境中に広く分布し、腫瘍原性と高い変異原性を持つ 1-NP をモデル化合物として選び、その生体内代謝および毒性発現への腸内菌叢の関与について、特に第 III 相反応の重要性について述べた。その中で、腸内菌の研究法としての抗生素質処理条件を決定した。アミノグリコシド系抗生物質によって、腸内菌を抑制して実験したという論文をみかけるが、アミノグリコシド系抗生物質は、腸内菌叢のほとんどを占める嫌気性菌には無効であり、菌の活性を抑えたことにはなっていないことに注意する必要がある。

腸内菌は環境変異原物質ばかりでなく、一般的な薬物代謝を考える上でも重要な役割を果たしている場合が多い。つまり、ある化学物質の生体内毒性が検出されたときには、腸内菌によってその毒性誘起物質が生成されており、腸内菌の作用によって再吸収が促進されて毒性が発揮されており、腸内菌が毒性を誘起・促進したりする場合を考えられるからである。従って、化学物質の毒性

実験には、抗生素質処理群を加えることで、新たな知見が得られる可能性があると考えている。

また毒性の発現に関与する酵素がわかれれば、遺伝子操作によってその酵素のみを欠失させた菌を作成し、腸内菌のバランスを崩すことなく菌を置き代えて腸内菌叢の改善をはかれば、健康の維持・増進を計ることができると期待できる。

腸内菌は、生体外異物の生体内代謝への関与ばかりでなく、生体内成分、例えは胆汁酸やコレステロール、アミノ酸などの代謝にも関与し、免疫、発癌、老化などとも関係が深いと考えられており、非常に興味深い研究分野である。今後さらに研究を進めたいと思っている。

謝 辞

今回の日本環境変異原学会奨励賞受賞は、多くの方々の御協力によるものであり、終始御指導下さいました大西克成教授をはじめ教室員、共同研究者および試料提供者（立石 满博士、富沢宏樹博士、松田佳子教授）の方々に感謝申し上げます。また、早津会長、賞等選考委員会の皆様をはじめ関係各位、さらに御指導、御助言いただきました会員の皆様に感謝致します。本研究は、下記の方々との共同研究の成果であり、その一部は文部省科学研究費、厚生省がん研究助成金、乳酸菌研究会研究助成金、日米医学協力研究会研究助成金、International Cancer Research Technology Transfer Project (UICC, Switzerland) および徳島新聞安芸花江医学研究助成金の援助を受けました。

共同研究者：片岡佳子、宮西幸一、秋本 茂、植島基雄、平岡 功、董 喬、國友一史、M. A. Matin, 古味信彦、大西克成

参考文献

- Allison, M.C., A.G. Howatson, C.J. Torrance, F.D. Lee and R.I. Russell (1992) Gastrointestinal damage associated with use of non-steroidal antiinflammatory drugs. N. Engl. J. Med., **327**, 749-754.
- Djurić, Z., E.K. Fifer, P.C. Howard and F.A. Beland (1986) Oxidative microsomal metabolism of 1-nitropyrene and DNA binding of oxidized metabolites following nitroreduction, Carcinogenesis, **7**, 1073-1079.
- Dong, Q., T. Kinouchi, K. Kunitomo, K. Kataoka, M.A. Matin, S. Akimoto, N. Komi and Y. Ohnishi (1993) Mutagenicity of the bile of dogs with an experimental model of an anomalous arrangement of the pancreatico-biliary duct, Carcinogenesis, **14**, 743-747.
- Drasar, B.S. and P.A. Barrow (1985) The bacterial flora of the normal intestine. In: B.S. Drasar and P.A. Barrow (Eds.), Intestinal Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 19-41.
- Fifer, E.K., P.C. Howard, R.H. Heflich and F.A. Beland (1986) Synthesis and mutagenicity of 1-nitropyrene 4,5-oxide and 1-nitropyrene 9,10-oxide, microsomal metabolites of 1-nitropyrene, Mutagenesis, **1**, 433-438.
- Finegold, S.M., H.R. Attebery, V.L. Sttutter (1974) Effect of diet on human fecal flora: Comparison of Japanese and American diet, J. Clin. Nutr., **27**, 1456-1469.
- Goldin, B.R., J. Dwyer, S.L. Gorbach, W. Gordon and L. Swenson (1978) Influence of diet and age on fecal bacterial enzymes, Am. J. Clin. Nutr., **31**, 136-140.
- Goldin, B.R., L. Swenson, J. Dwyer, M.S. Sexton and S.L. Gorbach (1980) Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements of human fecal bacterial enzymes, J. Natl. Cancer Inst., **64**, 255-261.
- Heflich, R.H., J.R. Thornton-Manning, T. Kinouchi and F.A. Beland (1990) Mutagenicity of oxidized metabolites of 1-nitropyrene in Chinese hamster ovary cells, Mutagenesis, **5**, 151-157.
- Howard, P.C., R.H. Heflich, F.E. Evans and F.A. Beland (1983) Formation of DNA adducts *in vitro* and in *Salmonella typhimurium* upon metabolic reduction of the environmental mutagen, 1-nitropyrene, Cancer Res., **43**, 2052-2058.
- Kanoh, T., M. Fukuda, E. Hayami, T. Kinouchi, K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Nitro reaction in mice injected with pyrene during exposure to nitrogen dioxide, Mutat. Res., **245**, 1-4.
- Kanoh, T., M. Fukuda, I. Mizoguchi, T. Kinouchi, K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1987) Detection of mutagenic compounds in the urine of mice administered pyrene during exposure to NO₂, Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **78**, 1057-1062.
- Kataoka, K., T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1991) Species differences in metabolic activation and inactivation of 1-nitropyrene in the liver, Cancer Res., **51**, 3919-3924.
- 加藤隆一 (1983) 薬物代謝酵素と薬物の薬効・毒性、薬物代謝の比較生化学 加藤隆一, 鎌瀬哲也編, 清至書院, pp. 3-20.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyanishi, S. Akimoto and Y. Ohnishi (1992) Role of intestinal microflora in metabolism of glutathione conjugates of 1-nitropyrene 4,5-oxide and 1-nitropyrene 9,10-oxide, Tohoku J. Exp. Med., **168**, 119-122.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyanishi, S. Akimoto and Y. Ohnishi (1993) Biological activities of the intestinal microflora in mice treated with antibiotics or untreated and the effects of the microflora on absorption and metabolic activation of orally administered glutathione conjugates of K-region epoxides of 1-nitropyrene, Carcinogenesis, **14**, 869-874.
- Kinouchi, T., K. Kataoka, K. Miyanishi, P.C. Howard, T. Kanoh and Y. Ohnishi (1994) Effect of nitrogen dioxide exposure on formation of nitrated metabolites in animals treated with polycyclic aromatic hydrocarbons. Proceedings of the Second Asia-Pacific Symposium on Environmental and Occupational Health—Toxicological Studies—, in press.
- 木内武美、片岡佳子、宮西幸一、大西克成 (1990) 腸肝循環による変異物質の活性化・不活性化、環境変異原研究, **12**, 291-303.
- Kinouchi, T., Y. Manabe, K. Wakisaka and Y. Ohnishi (1982) Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria, Microbiol. Immunol., **26**, 993-1005.
- Kinouchi, T., M. Morotomi, M. Mutai, E.K. Fifer, F.A. Beland and Y. Ohnishi (1986a) Metabolism of 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats, Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **77**, 356-369.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1987) *In vitro* intestinal microflora-mediated metabolism of biliary metabolites from 1-nitropyrene-treated rats, Microbiol. Immunol., **31**, 1145-1159.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji and Y. Ohnishi (1990) Biliary excretion of glutathione conjugates of 4,5-epoxy-4,5-dihydro-1-nitropyrene and 9,10-epoxy-9,10-dihydro-1-nitropyrene in rats administered 1-nitropyrene orally and their further metabolism in the intestinal tract, Carcinogenesis, **11**, 1381-1387.
- Kinouchi, T., K. Nishifuji, H. Tsutsui, S.L. Hoare and Y. Ohnishi (1988) Mutagenicity and nitropyrene concentration of indoor air particulates exhausted from a kerosene heater, Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **79**, 32-41.
- Kinouchi, T. and Y. Ohnishi (1983) Purification

- and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 596-604.
- Kinouchi, T. and Y. Ohnishi (1986b) Metabolic activation of 1-nitropyrene and 1,6-dinitropyrene by nitroreductases from *Bacteroides fragilis* and distribution of nitroreductase activity in rats, *Microbiol. Immunol.*, **30**, 979-992.
- Kinouchi, T., H. Tsutsui and Y. Ohnishi (1986c) Detection of 1-nitropyrene in yakitori (grilled chicken), *Mutat. Res.*, **171**, 105-113.
- Komi, N., T. Tamura, Y. Miyoshi, K. Kunitomo, H. Udaka and H. Takahara (1984) National-wide survey of cases of cholelithiasis. Analysis of coexistent anomalies, complication and surgical treatment in 645 cases, *Surg. Gastroenterol.*, **3**, 69-73.
- Manabe, Y., T. Kinouchi and Y. Ohnishi (1985) Identification and quantification of highly mutagenic nitroacetoxypyrenes and nitrohydroxypyrenes in diesel-exhaust particles, *Mutat. Res.*, **158**, 3-18.
- Manabe, Y., T. Kinouchi, K. Wakisaka, I. Tahara and Y. Ohnishi (1984) Mutagenic 1-nitropyrene in wastewater from oil-water separating tanks of gasoline stations and in used crankcase oil, *Environ. Mutagen.*, **6**, 669-681.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Kataoka, E. K. Fifer, F. A. Beland, T. Kanoh, M. Fukuda and I. Mizoguchi (1991) Metabolic formation and inactivation of 1-nitropyrene oxides and the effect of pyrene administration during nitrogen dioxide exposure on the formation of 1-nitropyrene metabolites. In: M. Cooke, K. Loening and J. Merritt (Eds.), *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Measurements, Means, and Metabolism*, Battelle Press, Columbus, Ohio, pp. 641-655.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Kataoka, K. Miyamoto, T. Kanoh and M. Fukuda (1990) Metabolism of 1-nitropyrene oxides and effect of nitrogen dioxide on arene activation. In: P. C. Howard, S. S. Hecht and F. A. Beland (Eds.), *Occurrence, Metabolism and Biological Impact of Nitroarenes*, Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 85-93.
- 大西克成, 木内武美, 片岡佳子, 宮西幸一, 植島基雄 (1992) ニトロビレンの代謝的活性化機構—腸内菌の役割の重要性—, *環境変異原研究*, **14**, 33-39.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, Y. Manabe, H. Tsu-

- tsui, H. Otsuka, H. Tokiwa and T. Otofugi (1985) Nitro compounds in environmental mixtures and foods. In: M. D. Waters, S. S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss and S. Nesnow (Eds.), *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV*, Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 195-204.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, K. Nishifumi, E. K. Fifer and F. A. Beland (1986) Metabolism of mutagenic 1-nitropyrene in rats. In: N. Ishinishi, A. Koizumi, R. O. McClellan, W. Stöber (Eds.), *Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam, pp. 171-183.
- Ohnishi, Y., T. Kinouchi, H. Tsutsui, M. Uejima and K. Nishifumi (1986) Mutagenic nitropyrenes in foods. In: Y. Hayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Takayama, L. Tomatis, L. W. Wattenberg and G. N. Wagan (Eds.), *Diet, Nutrition and Cancer*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo/VNU Science Press B. V., Utrecht, pp. 107-118.
- Rowland, I. R., A. K. Mallett and A. Wise (1985) The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **16**, 31-103.
- Sheline, R. R. (1973) Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms, *Pharmacol. Rev.*, **25**, 451-523.
- Smith, B. A., R. H. Heflich, Y. Ohnishi, A. Ohuchida, T. Kinouchi, J. R. Thornton-Manning and F. A. Beland (1991) DNA adduct formation by 1-nitropyrene 4,5- and 9,10-oxide. In: P. C. Howard, S. S. Hecht, and F. A. Beland (Eds.), *Occurrence, Metabolism and Biological Impact of Nitroarenes*, Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 181-187.
- Suda, K., T. Miyano, I. Konuma and T. Kobayashi (1979) Carcinoma arising in the wall of congenital bile duct cysts, *Cancer*, **52**, 2086-2088.
- Tokiwa, H., R. Nakagawa, K. Morita and Y. Ohnishi (1981) Mutagenicity of nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide, *Mutat. Res.*, **85**, 195-205.
- Tokiwa, H. and Y. Ohnishi (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 23-60.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 17-30 (1994)

奨励賞授賞講演

食品中の変異原物質の分離同定

Isolation and structural determination of mutagens in food

糠 谷 東 雄

Haruo Nukaya

静岡県立大学薬学部

422 静岡市谷田 52-1

University of Shizuoka School of Pharmaceutical Science,
52-1 Yada, Shizuoka 422, Japan

(受付: 1994年2月4日; 受理: 1994年2月4日)

Summary

The adoption of a bioassay is essential to search for principals that are biologically active and present in very small quantities. In addition, there is no isolation method that generally applies to all mutagens in the environment. The concentration and purification procedures suitable for each mutagen must be chosen for each case. α -Dicarbonyl compounds contained in many kinds of foodstuffs and beverages were found as principals that showed direct-acting mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA100. The methylglyoxal mutagenicity was markedly enhanced in the presence of hydrogen peroxide. The mechanism of the enhancement of the mutagenicity was investigated by means of the reactivity of α -ketonaldehyde with hydrogen peroxide. Another new mutagen (7,9-DiMeIgQx) contained in beef extract was isolated from a mixture of creatine, threonine and glucose heated in ethylene glycol at 200°C for 5 h. 7,9-DiMeIgQx has a linear structure of the aromatic ring system in contrast with other known heterocyclic amines which have angular structures.

Keywords: mutagen; heterocyclic amine; α -dicarbonyl; hydrogen peroxide; isolation

1. はじめに

人の発癌については日常の食品及びそれに含まれる発癌性物質が重要な因子の一つであると考えられている。食品中の発癌物質の一つとして、蛋白性食品を加熱したときに生成する変異原・がん原性の heterocyclic amine (HCA) が知られている (Sugimura, 1986). これらはサルモネラ菌を使った変異原性試験を指標に加熱調理した肉や魚, アミノ酸やタンパク質の加熱分解物から分離, 構造決定された (Yahagi *et al.*, 1977; Wakabayashi *et al.*, 1992; 1993). 20種を越す HCA が報告されており, そのうち 10種についてラット, マウスに対して発癌実験がなされ, それら全てに発癌性のあることが証明されている (Ohgaki *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1991).

食品中の変異原物質は, サルモネラ菌を使った変異原性試験により大きく 2種に分類できる (Nagao *et al.*, 1977). すなわち, TA98 株に対して S9mix の代謝を受けてフレームシフト型の変異原性を示すタイプと TA100 株に対して代謝活性化を必要とせずに変異原性を示す塩基対置換型の変異原物質がある。前者を代表する HCA については, 原因物質の解明, 食品中の含量, 生成機構, 変異原性発現機構, DNA 修飾, さらに不

活性化など詳細な研究結果が数多く報告されているが、後者についてはまだ解明が十分でない。これらは主として、炭水化物の食品が加熱された際に生成し、食品としてはコーヒーが代表的に取り上げられる (Nagao *et al.*, 1979)。また、この種の変異原物質は加熱食品のみでなく、アルコール飲料、発酵食品、乳製品など多種類の食品に幅広く含まれている (Nagao *et al.*, 1981; Sugimura *et al.*, 1983)。これらは発癌のイニシエーターとしてばかりでなく、発癌プロモーターとしての作用も持つと予想されている。このタイプの変異原物質が発癌と関係があるか否かを明らかにすることは、がん予防の面からも大切であろう。そこで、我々が行った TA100 株に対する直接変異原物質の研究と HCAについて最近行った研究を紹介する。

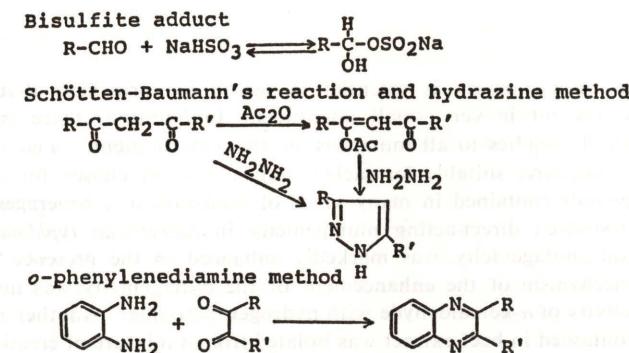


Fig. 1. 変異原物質の誘導体合成法。

Table 1. 糖加熱分解物中の変異原物質と変異原性。

| $R' = H$ | R | R | R' |
|---|-----|--|---|
| $R-C(=O)-CHO$ | | $R-C(=O)-C(=O)-R'$ | |
| $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{O} \end{array}$ | | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{O} \end{array}$ | |
| $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$ | | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$ |
| $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$ | | $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$ | |
| $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$ | | $\begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{O} \end{array}$ | |
| | | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O} \end{array}$ | |
| | | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$ | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$ |

| $R\text{-CO-CHO}$ | glyoxal | methyl- | ethyl- | propyl- | furyl- |
|--|---------|---------|--------|---------|--------|
| mutagenicity (rev./mg) TA-100 - S9mix | 20,000 | 100,000 | 25,000 | 35,000 | 5,700 |

| $R\text{-CO-CO-R}'$ | diacetyl | 2,3-pentane-dione | 1,2-cyclopentanedione |
|------------------------|----------|-------------------|-----------------------|
| mutagenicity (rev./mg) | 2,000 | 200 | 100 |

間を費したが、分離研究の過程で示されたそれらの化学的な性質より、最終的にアルデヒド類か α -ジケトン化合物あるいは β -ジケトン化合物であるとの推論に達した。そこで、これらをそのままの状態で分離することを断念し、Fig. 1 に示した誘導体に導くことで安定化した後に分離精製することにした。その結果、変異原性の主な原因物質が α -ジカルボニル化合物であることを明らかにすことができた。これらの化合物を合成し、その変異原活性を調べた結果、 α -ジカルボニル化合物の中でも methylglyoxal (MG) のような α -ケトアルデヒド類が特に強い変異原性を示した (Table 1) (Nagao *et al.*, 1986)。

(2) 食品中の変異原物質の分析

炭水化物の加熱分解により生成する変異原性の α -ジカルボニル化合物の中で、特に強い変異原性を示す α -ケトアルデヒド類は、加熱食品のみならず TA100 株に変異原性を示す他の多くの食品中にも含まれている (Kasai *et al.*, 1982; Nagao *et al.*, 1986)。それらの含量を分析した例を Table 2 に示した。変異原性の最も強いコーヒーには α -ジカルボニル型の変異原物質が最も多量に含まれている。パンも、焼いてあるので当然これらを含む

が、トーストすることによりその含量が増加する。一方、長尾らはコーヒーの変異原性にはコーヒー中に生成する過酸化水素 (H_2O_2) が関与していることを報告した (Fujita *et al.*, 1985a)。そして、 α -ケトアルデヒドの含量と変異原性の強さから換算して、コーヒーの変異原性はこれらの化合物だけでは説明できないことから、両者の相互作用を検討した (Nagao *et al.*, 1986)。そして、MG の変異原性が H_2O_2 の共存により最も多い時で 30 倍にも増強され、増強された変異原性をコーヒーの変異原性と単純に比較するとその大半を説明できるとも報告した (Fujita *et al.*, 1985b)。ここに、 α -ケトアルデヒドの変異原性と、それらと H_2O_2 の共存により上昇した変異原性が、コーヒーの変異原性の主因と考えるに至った。

(3) α -ジカルボニル化合物と過酸化水素の反応

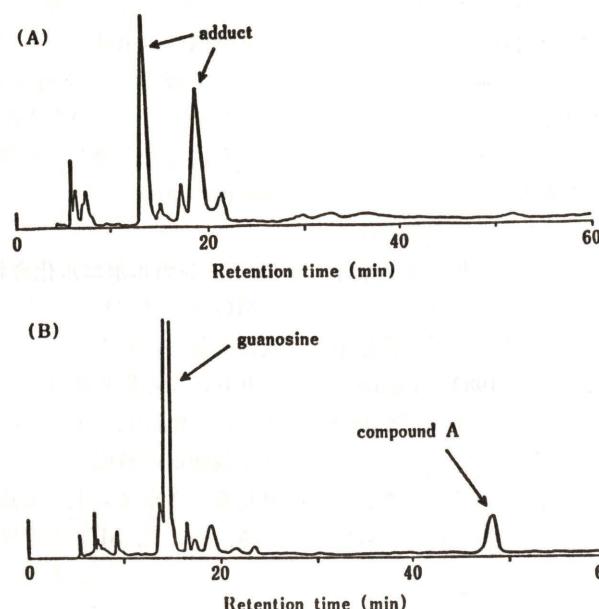
MG 及び H_2O_2 が、その含量はともかくとして共に生体内に存在する化合物であるだけに、両者の共存による変異原性の増強機構を明らかにすることは、食品中の α -ジカルボニル化合物の変異原性発現機構の解明だけでなく、一般の変異原、癌原物質を考察する上でも意義のあることと考えられる。そこで、MG の変異原性が H_2O_2 により増

Table 2. 食品中の α -ケトアルデヒド化合物の含量

| sample | | glyoxal | methylglyoxal | ethylglyoxal | furyl glyoxal |
|--------------------------|-------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| instant coffee | one cup (1g) | 22.6 μ g | 104 μ g | 46.9 μ g | 10 μ g |
| coffee beans (drip type) | one cup (20g) | 65.4 | 1390 | 257 | 25 μ g |
| whisky (American) | 100ml | 39.0 μ g | 154 μ g | 41.9 μ g | 10-25 μ g |
| whisky (Japanese) | 100ml | 17.5 | 55.8 | 47.0 | |
| brandy (A) | 100ml | 12.1 | 64.0 | 74.4 | |
| wine | 100ml | 97.7 | 57.5 | 92.5 | |
| Japanese sake | 100ml | 29.1 | 25.6 | 70.7 | |
| mugi-cha | wheat 10g | 35.7 μ g | 70.2 μ g | 72.0 μ g | |
| black tea | leaves 2g | 0.96 | 2.41 | 4.90 | |
| green tea | leaves 5g | trace | trace | 68.0 | |
| roasted tea | leaves 5g | 4.14 | 38.1 | 51.5 | |
| bread | | | | | |
| toast | one piece (50.6g) | 15.1 μ g | 39.5 μ g | 19.4 μ g | |
| | one piece (43.0g) | 21.4 μ g | 106 μ g | 30.5 μ g | |

Table 3. α -ジカルボニル化合物の分解生成物と収率

| α -Dicarbonyl compound | Products (% yield) | |
|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| | With 10 eq of H_2O_2 | With 1/10 eq of H_2O_2 |
| Methylglyoxal | Acetic acid (81) Formic acid (79) | Diacetyl (0.25) |
| Glyoxal | Formic acid (62) | |
| Diacetyl | Acetic acid (83) | |
| 1-Phenyl-1,2-propanedione | Benzoic acid (91) Acetic acid (83) | Benzil (0.2) |

Fig. 2. グアノシンとメチルグリオキサールの反応生成物の HPLC による分析。
(A) H_2O_2 の非存在下、(B) H_2O_2 の存在下。

強される機構について、MG 及び α -ジカルボニル化合物の反応性の面から検討した (Nukaya et al., 1993)。

MG をはじめとする α -ジカルボニル化合物は H_2O_2 の共存下、リン酸緩衝液 (pH 6.86) 中、37°C で速やかに分解し、10 倍量の H_2O_2 の存在で 1 時間以内に半分以下に減少した。分解生成物を Table 3 に示したが、主生成物としては出発物質に対応するカルボン酸が得られた。また、MG 及び 1-phenyl-1,2-propandione に 1/10 等量の H_2O_2 を加えた場合には、カルボン酸と共に微量の diacetyl 及び benzil の生成がそれぞれ認められた。これは分解過程で生成した acetyl radical および benzoyl radical が重合してできたと考えられる。

これらのラジカルの生成はラジカルトラッピング剤として di-tert-butylperoxyxoxalate を使った ESR の研究によって確認された。

(4) Methylglyoxal と過酸化水素共存下での核酸塩基の修飾

α -ジカルボニル化合物は H_2O_2 との反応により速やかに分解し、ラジカル生成などの反応を経て主生成物としてカルボン酸を生じることが明らかとなった。変異原性発現の第 1 段階は変異原物質による核酸塩基の修飾と考えられている。 α -ジカルボニル化合物と H_2O_2 の反応系に見られたように、反応性の高い基が生成すれば、それにより核酸塩基が修飾を受けることが十分に考えられる。

そこで、MG と H_2O_2 の反応系に nucleoside を加え、それがどのような修飾を受けるか検討した。

MG と H_2O_2 のリン酸緩衝溶液 (pH 6.86) 中、37°C では、nucleoside のうち guanosine だけが顕著な変化を受けることが明らかになった。そこで、guanosine について詳細に検討し、その HPLC による分析の結果を Fig. 2 に示した。すなわち、同条件下で、guanosine 溶液に H_2O_2 だけを加えても guanosine には全く変化がみられないが、(A) に示したように guanosine 溶液に MG のみを加えた反応系では、guanosine の大半が付加体を形成し、二本のピークとして検出される。(B) に示したように、これに H_2O_2 を加えた系では付加体のピークはほとんど消失し、大部分が guanosine の形で存在することが明らかになった。これは H_2O_2 により MG が分解され、付加体が分解して guanosine を再生する方向に平衡が移動したためと考えられる。この事実は guanine と MG の付加体生成と変異原性発現との関連を否定するものではないが、 H_2O_2 による

MG の変異原性増強と付加体生成量とは関係がないことを示すものである。

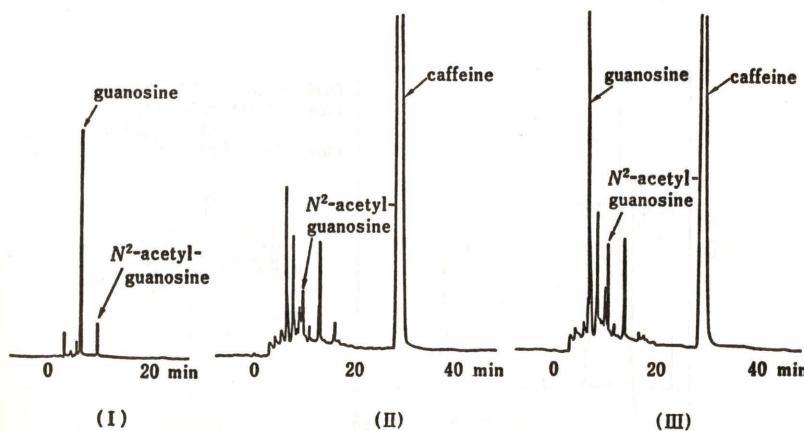
H_2O_2 を加えた系 (B) には、HPLC の保持時間 48 分の処に guanosine が修飾されたと予想される化合物 (compound A) のピークが検出された。この化合物は H_2O_2 を加えない系では生成されなかった。そこで、この化合物を分離し、各種のスペクトルによる構造解析を行った。その結果、この化合物は guanosine の 2 位のアミノ基がアセチル化された N^2 -acetylguanosine であることが推定され、合成した標品との比較により決定された。

次に、リン酸緩衝液の pH を変えて反応を行い、 N^2 -acetylguanosine の生成量を HPLC により経時的に定量した。 H_2O_2 による MG の分解と同様に、 N^2 -acetylguanosine の生成は反応初期に早く、24 時間後までは経時に微増し、その後はほとんど変化しないことが分かった。また、pH の高い方がその収量は高く、変異原性試験で用いる緩衝液と同じ pH 7.4 の条件下、24 時間後におけ

Table 4. 嗜好品の変異原性

| 嗜好品 | 復帰変異コロニー数/ 10^6 細胞 |
|------------------------|----------------------|
| インスタント・コーヒー(1杯; 150ml) | 42,000 |
| レギュラー・コーヒー(1杯; 150ml) | 195,000 |
| 紅茶(1杯; 150ml) | 28,500 |
| 緑茶(1杯; 150ml) | 15,750 |
| スコッチウイスキー(シングル; 30ml) | 2,970 |
| 紙巻きタバコ(1本) | 4,000* |

Salmonella typhimurium TA100株(-S9mix)に対する変異原性。
* 紙巻きタバコのみ、S.typhimurium TA98株(+S9mix)を使用。

Fig. 3. コーヒー溶液中でのグアノシンのアセチル化反応と HPLC。
(I) 標品、(II) 反応生成物、(III) 両者の混合物。

る取率は約 1.4% であった。なお、このアセチル化反応は 2'-deoxyguanosine でも同様に起こり、その收率は 2.4% であった(Nukaya *et al.*, 1990)。

(5) コーヒー溶液中における guanosine のアセチル化

本研究の発端となったコーヒーは、長い間癌との関係が議論されており、また、TA 100 株に対し嗜好品の中では最も強い変異原性を示す(Table 4)。普通のインスタントコーヒー溶液は 1 mlあたり約 1.5 µg の MG と、見かけ上同じく約 1.5 µg の H₂O₂ を含有する。そこで、コーヒー溶液中に加えた guanosine にもアセチル化が起こるか否か検討した。インスタントコーヒー 100 mg を 0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.8) 5 ml に溶解し、これに guanosine 3 mg を加え 37°C で 24 時間反応させた。未反応の guanosine を除去するために、反応液を DIAION HP-20 を用いて精製を行い、吸着部の methanol 溶出部について HPLC による分析を行った。その結果、コーヒー溶液中でもアセチル化が起こり、N²-acetylguanosine が生成していることが明らかになった(Fig. 3)。

(6) 過酸化水素共存下での methylglyoxal による DNA の修飾

リン酸緩衝液中、H₂O₂ の共存下で MG により、また、インスタントコーヒーのリン酸緩衝液中で、guanine の 2 位のアミノ基がアセチル化

される反応は、H₂O₂ による MG の変異原性増強及びコーヒーの変異原性発現に関連した化学修飾であることを示唆するものである。そこで、MG と H₂O₂ が共存する系において、DNA 中の guanine のアミノ基に対しても同じ化学修飾が起るか否かを ³²P-ポストラベル法を用いて検討した。Guanine の N² 位のアセチル化が nucleotide にとってそれほど大きな化学修飾ではないためには、従来より行われている ³²P-ポストラベル法では、アセチル化された nucleotide と正常の nucleotide とを分離することが困難であった。そこで、HPLC 法による精製を組合せることにより、この修飾 nucleotide を検出することにした。まず、分析に必要な標準化合物 N²-acetyl-2'-deoxyguanosine、その 3'-リン酸および 3',5'-ジリン酸を合成した。これらの標準物質を使って分析条件を決定した後、3'-リン酸化合物を ³²P-ポストラベル化すると 3',5'-ジリン酸化合物に変換することを明らかにし、次に、in vitro で MG と H₂O₂ で処理した DNA 中の N²-acetyl-2'-deoxyguanosine の生成を分析した。すなわち、子牛胸腺の double 或いは single stranded DNA をリン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解し、これに 20 倍モルの MG、引き続き同量の H₂O₂ を加え、37°C で 3 時間インキュベーションした。この反応により生成した 2'-deoxyguanosine の N²-アセチル体の検出を次のように行った。すなわち、反応後の DNA を酵素で 2'-deoxyguanosine 3'-phosphate に分解後、HPLC で 2 回分取を繰り返し、得られたアセチル

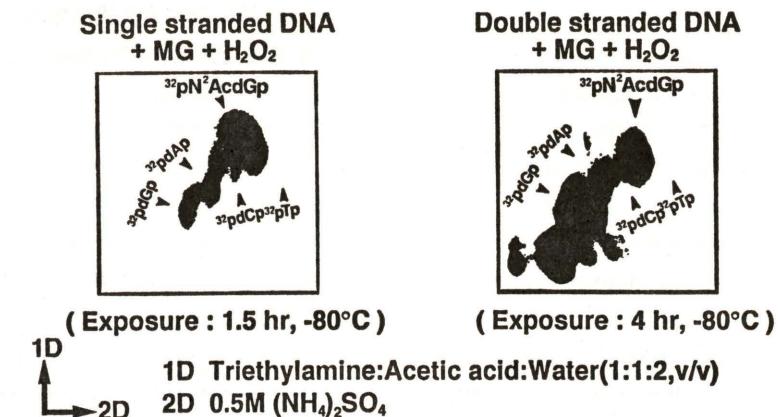
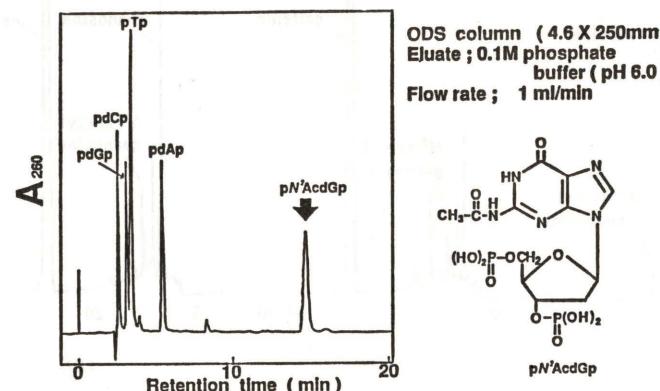
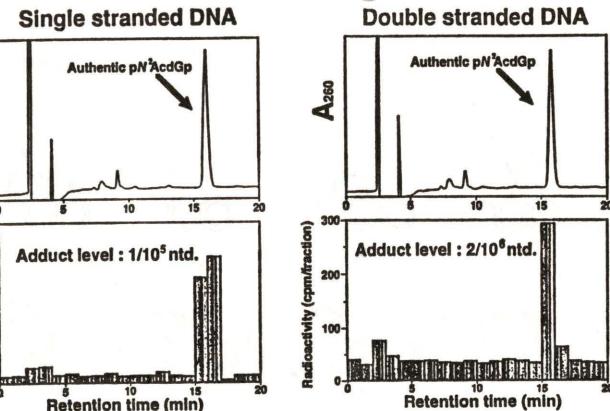
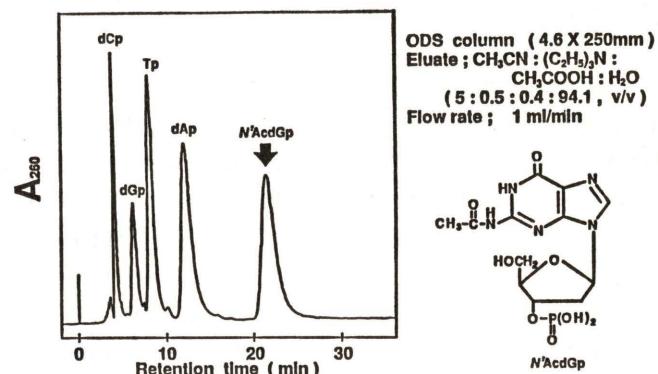


Fig. 5. デオキシリボヌクレオシド 3',5'-ジリン酸のオートラジオグラム。



体画分を同様に ³²P-ポストラベル法に供した。ここで行われた HPLC [I] の条件及びクロマトグラムを Fig. 4 に示した。溶出溶媒にリン酸緩衝液な

どの無機塩溶液を用いると、より高い分解能を期待できる。しかし、得られたアセチル体画分に無機塩を含むと以後の酵素反応に障害となるので、

エバボレートにより除去の可能な組成の溶媒を用いた。³²P-ポストラベル法は、nucleoside の 3',5'-ジリン酸を分離する為の 2 次元の TLCにおいて、最初の展開溶媒が異なることを除いて、ほぼ常法と同じ条件で行った。しかし、この条件でも Fig. 5 に挙げたオートラジオグラフで示したように N²-acetyl-2'-deoxyguanosine 3',5'-diphosphate と正常 nucleotide である 2'-deoxycytidine 3',5'-diphosphate のスポットが重なって観察された。そこで、このスポットを 1 M リン酸水素二ナトリウム水溶液で抽出し、Fig. 6 に示した HPLC 条件 [II] で再度分離を行い、保持時間ごとに放射活性を測定した。各画分の放射活性を Fig. 7 に示したが、いずれも N²-acetyl-2'-deoxyguanosine 3',5'-diphosphate と同一の保持時間の画分に放射活性が検出された。ここで分析結果より、H₂O₂ が共存する条件で、MG と DNA の反応で、single stranded DNA では核酸塩基の 10⁵ 個に 1 個、double stranded DNA では 10⁶ 個に 2 個の割合でアセチル化が起こっていることが明らかになった。

このアセチル化反応が *in vitro* ではあるが、DNA にも起こる化学修飾であることを証明した。現在、この DNA に対する修飾反応が *in vivo* においても起こっているか否か検討を加えている。

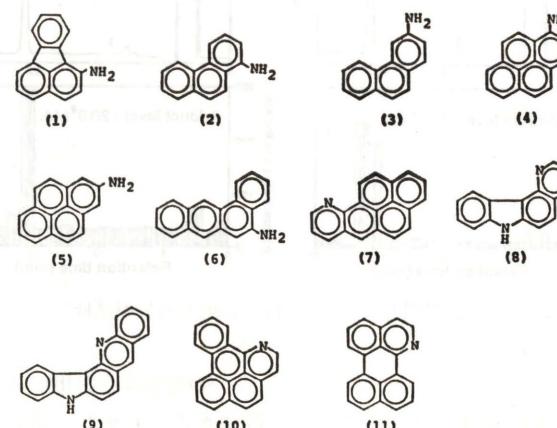


Fig. 8. コールタール塩基性画分中の変異原物質。

3. TA98 株に対する変異原物質

(1) 塩基性変異原物質の濃縮法と分離法

環境中の変異原物質研究の一環として、コールタールに含まれる変異原物質について、芳香族炭化水素以外の変異原物質の検索を行い、塩基性画分より 11 種の多環芳香族アミンと含窒素多環芳香族化合物を単離同定した (Fig. 8) (Kosuge *et al.*, 1982)。この研究で塩基性の変異原物質を、構造上大きく 3 種に分類できることが分かった。すなわち、含窒素多環芳香族化合物と多環芳香族アミン、それに加熱食品から分離された HCA である。この結果をもとに、変異原物質群を非変異原物質から分離すると同時に、これら 3 種の変異原物質を選択的に分離することを試みた。

これまでに構造が決定され、後の研究で発癌性であることが明らかになった HCA は、いずれも三環以上の含窒素多環芳香族アミンで、分子内に 2-aminopyridine または 2-aminoimidazole の部分構造を持っている (Wakabayashi *et al.*, 1992; Felton *et al.*, 1986; Becher *et al.*, 1988; Knize *et al.*, 1990, 1991; Nukaya *et al.*, 1991; Kurosaka *et al.*, 1992)。そこで、この部分構造における環窒素の α 位に結合したアミノ基と、通常の芳香族アミノ基との化学的性質の違いを検討したところ、このアミノ基のアセチル体は、他の芳香族アミノ基より緩和な条件で脱アセチルされることが明らかになった。すなわち、Table 5 に示したように、8-acetylaminofluoranthene など通常の芳香族アミンのアセチル体では、脱アセチルに塩

Table 5. 3 タイプのアミノ基の脱アセチル条件の相違

+: 加水分解される条件,
-: 加水分解に抵抗する条件。

| Type | Solvent Acetate Temp. (1 hr) | 5N AcOH-EtOH (1:1 v/v) | | HCl-EtOH (1:1 v/v) 0.1N 1N | | H ₂ O-EtOH | |
|------|--|---------------------------|--------|----------------------------------|--------|-----------------------|---|
| | | 100 °C | 100 °C | 121 °C | 180 °C | | |
| | 2-aminoquinoxaline Ac ₂ C Trp-P-2 | - | ± ± | ± + | - ± | + | + |
| | IQ MeIQ MeIQx | | | | | + | + |
| | 8-amino-fluoranthene | - | - | + | - | - | - |

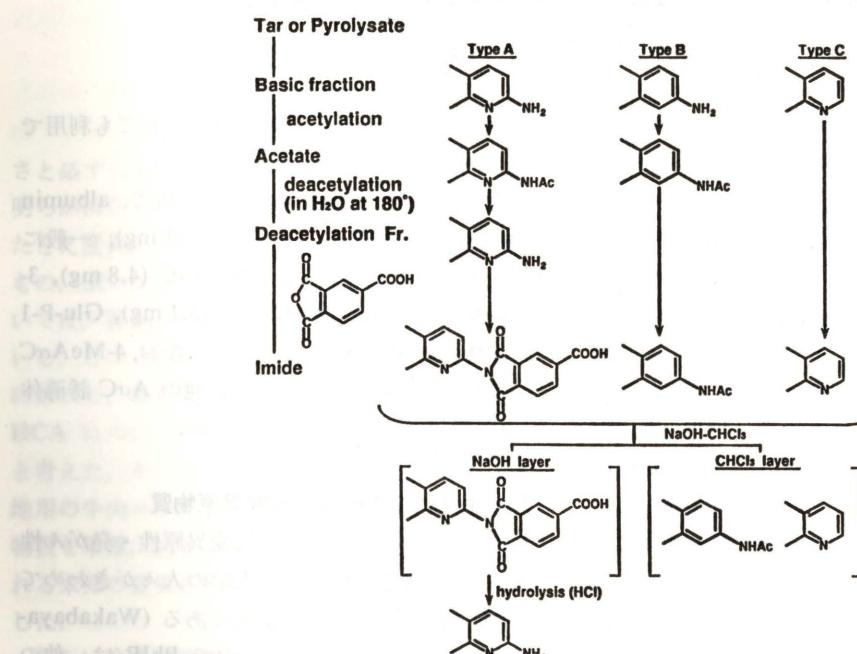


Fig. 9. 塩基性変異原物質の分離法。

酸などの強い酸が必要であるのに対して、環窒素の α 位に結合したアセチルアミノ基では中性条件でも、封管中 180 度に加熱することで加水分解され、脱アセチルされた。

そこで、この性質を利用して Trp-P-1, IQ など 2-aminopyridine または 2-aminoimidazole の部分構造を持った化合物を選択的に捕捉することを試みた。分離方法の概略を Fig. 9 に示した。常法

により、加熱分解物より塩基性物質を分離すると、この画分に含まれる化合物は 3 つのタイプ、すなわち、2-aminopyridine または 2-aminoimidazole の部分構造を持つタイプ A、芳香族アミンのタイプ B、アザ化合物のタイプ C となる。まず、これらの混合物を氷酢酸中無水酢酸でアセチル化すると、A と B タイプのみがアセチル化される。次に、このアセチル体を水-Ethanol (1:1) を溶

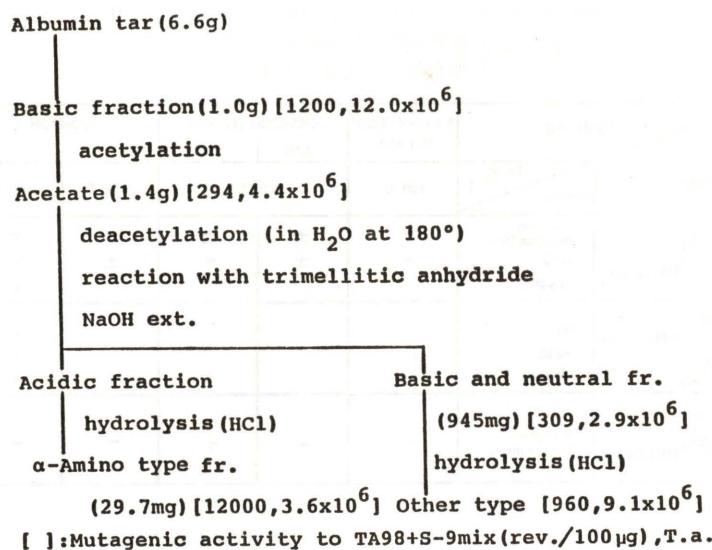


Fig. 10. アルブミン加熱分解物中の変異原物質の濃縮。

媒として、封管中 180 度で加熱すると、A タイプのみが脱アセチルされ、B タイプは脱アセチルされない。ここで、A タイプの化合物を分離する手段として、この混合物を trimellitic anhydride と反応させると、脱アセチルされたアミノ基を持つ A タイプのみがイミドを形成し、その誘導体はカルボキシル基を持つことになる。そこで、この誘導体をアルカリで抽出し、他の塩基性の化合物から分離することができる。

次に、この方法を応用して実際に albumin 热分解物の塩基性画分の分離を行った。分離方法を Fig. 10 に示したが、ここで収量を () 内に、活性を [] 内に total activity と共に示した。ここで得られた α -amino タイプの画分は 100 µgあたり 12000 rev. と分離前の塩基性画分の 10 倍高い活性を示した。なお、この活性画分を GC で分析したところ各成分がピークとして検出できた。また、albumin 加熱分解物に標品の 4-MeAαC および Trp-P-2 を加え、回収率を求めたところ、それぞれ 92% と 39% であった。この方法は、Trp-P-2 や IQ タイプの化合物の回収率を上げるための改良や Glu-P-1 のように他の変異原物質に比べ不安定な化合物について、より緩和な条件の設定が必要であるが、加熱焙焼された食品中に含まれる変異原性物質のような、微量成分の GC や

HPLC による分析の前処理方法としても利用できる。

先に得られた α -amino 画分の分析で、albumin 1 kgあたりの収量は、AαC (31 mg)、一般に MeAαC と呼ばれている 3-MeAαC (4.8 mg)、3-ethylAαC (2.6 mg)、4-MeAαC (3.1 mg)、Glu-P-1 (45 µg)、Trp-P-2 (8 µg) であった。なお、4-MeAαC の変異原性は 2700 rev./µg で、他の AαC 誘導体の 10 倍以上の強さを示しました。

(2) 牛肉エキス中の新規変異原物質

これまでに明らかにされた変異原性・発がん性 HCA は、微量ではあるが大半の人々がきわめて日常的に摂取している化合物である (Wakabayashi *et al.*, 1992)。これらの中で PhIP は、他の HCA に比べ変異原性は比較的低いものの、食品中の含量は多く、更に発がん実験において他の HCA が主に肝がんを発生させるのに対して、この化合物は雄のラットに対して主に大腸がんを、雌のラットに対して乳がんを発生させるという興味ある事実を示した (Ito *et al.*, 1991)。また、これまでの変異原物質の検索研究は、結果的にではあるが、より強い変異原性を持つ化合物が分離、構造決定の対象になることが多かった。しかし、その後の研究で、発がん性の強さは変異原性の強

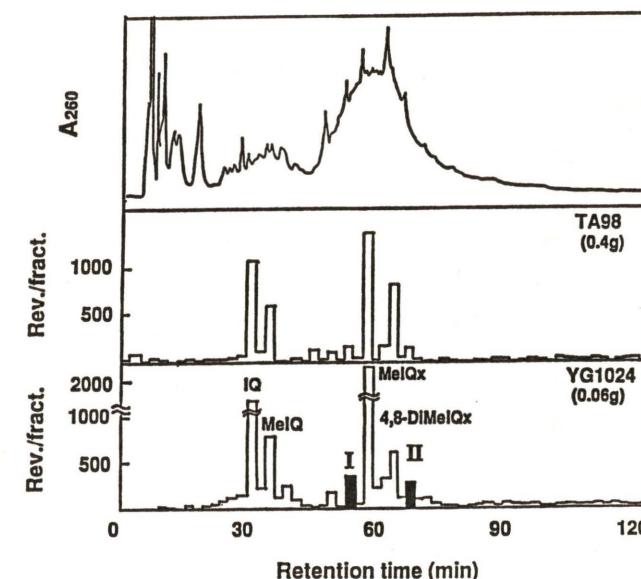


Fig. 11. 牛肉エキスの HPLC 画分の変異原性。

さと必ずしも比例するものではないという事実が明らかになってきた。この事実と PhIP の例は、たとえ変異原性が低くても、食品中の含量が多いもの、或いは特異的な発がん性を有するものについては、詳細に検討する必要があることを示している。このような経緯から、これまでの分離研究において、変異原性が低いが故に見逃されてきた HCA について、再度検討を加える必要性があると考えた。そこで、加熱肉食品のモデルとして培地用の牛肉エキスを選び、そこから新しい変異原物質を単離、構造決定することで、食品中に含まれる未知の変異原物質の解明の一助とすることにした。

新しい変異原物質の探索にあたり、芳香族アミンに対し特異的に高感受性を示す YG1024 株を使用した (Watanabe *et al.*, 1990)。牛肉エキス中には IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx 等の既知の強い変異原性の化合物が含まれている (Takahashi *et al.*, 1985a, 1985b)。そこで、これらとの混合物から相対的に弱い変異原性の HCA を逃さずに検出する為に、各種分離剤により分離した各サンプルを ODS とイオン交換の HPLC で精製し、変異原性の強い夾雜物の混入を極力排除すると共に、化合物の含量をピークの高さから予測しながら

分析を進めた。このようにして、新規変異原物質 Compound I 及び II の存在を明らかにした (Fig. 11)。

これらの分離研究を行うのに先立ち牛肉エキスの中の Compound I 及び II の含量を予測した。その際、Compound I 及び II が 4,8-DiMeIQx と同じ UV 吸収と分子量を持つと仮定すると、牛肉エキス 1 g 中にそれぞれ 6 ng 及び 4 ng 含まれることがわかった。スペクトル解析による化合物の構造決定に約 1 mg を必要とすると、牛肉エキス 250 kg を処理しなければならない計算になる。しかし、そのような大量の試料から微量物質を分離するのは困難であり、Compound I 及び II を多量に生成する方法を検討することにした。HCA は creatine, glucose, 種々のアミノ酸の加熱分解物中に生成することが報告されている (Jägerstad *et al.*, 1991)。そこで、その実験例を参考に種々の条件を検討し、最終的に Compound I については牛肉エキスに creatine を加えて加熱することで 10 倍に增量できた。Compound II については creatine, glucose と threonine を ethylene glycol 中で還流することにより 1000 倍近く生成することに成功した。その後に、これらをブルーコットン抽出、LH-20, CM-Sephadex カラ

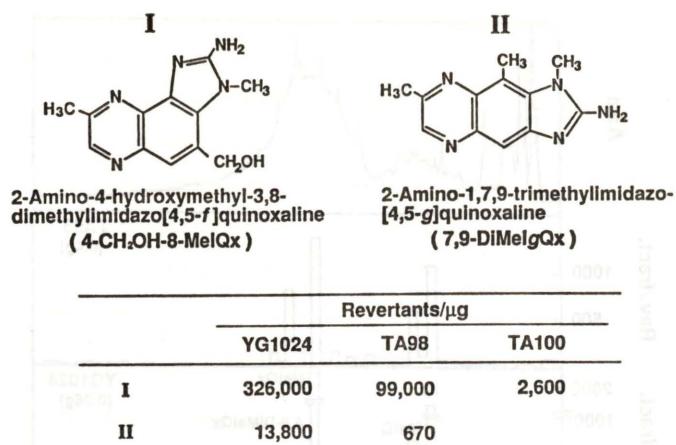


Fig. 12. 牛肉エキス中の新規変異原物質の構造と変異原性。

ムクロマトグラフィー、HPLCなどの分離手法により単離した。この構造については、Compound IはMSとUVよりDiMeIQxに水酸基の入った化合物であることが予想された。そこで、DiMeIQxをラットに投与して代謝産物を単離し、これと比較することにより、2-amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4-CH₂OH-MeIQx)と決定した(Kim *et al.*, 1994)。Compound IIについては各種スペクトル解析、X線結晶解析により、2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline (7,9-DiMeIQx)と決定した(Fig. 12)。これはimidazole環とquinoxaline環が直線状に結合した骨格を持つ点で、従来の化合物と異なっていた。

7,9-DiMeIQxはYG1024、TA98に対しS9mix存在下でそれぞれ13,800 rev./ μ g, 670 rev./ μ gの変異原性を示した。また、これを標品として牛肉エキス中の定量をしたところ、牛肉エキス1g中に53ng含まれていた。この量はIQ、MeIQxに匹敵するものであり、7,9-DiMeIQxもこれら同様に加熱食品中に広く存在するものと予想された。この化合物の食品中の含量は、東京都立衛生試験所の牛山の分析データでは、broiled beef中に4.2ng/gとPhIPの次に多い(Ushiyama, 1994)。なお、この化合物の合成は寺尾らによって発表された(Achiwa *et al.*, 1994)。また、国立がんセンターの落合は、この化合物を投与したラットで、DNAとのアダクトをポストラベル

法で検出している(Ochiai, 1994)。7,9-DiMeIQxは骨格的に既知のものとは異なる特徴を持つことから、この化合物の生物活性が他の変異原物質と異なることも予想され、この化合物の詳細な生物試験が必要である。

4. おわりに

以上食品中の変異原物質の分離について記した。結論として、食品中の変異原物質も環境中の変異原物質と同様に、分離研究を行うにあたり何を研究の対象に選択するかが最も大切である。研究対象が決まっている場合には、その成否は、構造研究に必要な量をいかに効率よく濃縮できるかに掛かっている。2番目に大切なのは、分離の指標となる生物試験の選択である。それも、できれば簡便な試験法が望ましい。しかし、この選択により、得られる結果に相違が生ずることが考えられ、その点も留意しなければならない。短期間に成果を挙げができるか否かは、この2点が特に大切であると考えている。

謝 辞

本研究は元静岡薬科大学学長の小菅卓夫先生、国立がんセンター名誉総長の杉村 隆先生の御指導と長尾美奈子先生の御協力によりなし得たものであり、また、国立がんセンター研究所及び静岡県立大学薬学部薬品資源学教室の共同研究者の協力による成果である。深甚なる謝意を表します。

参 考 文 献

- Achiwa, I., T. Shiozawa, H. Nukaya and Y. Terao (1994) Synthesis and mutagenicity of a new mutagen, 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline, and its analog, Chem. Pharm. Bull., **42**, 408-409.
- Becher, G., M. G. Knize, I. F. Nes and J. S. Felton (1988) Isolation and identification of mutagens from a fried Norwegian meat product, Carcinogenesis, **9**, 247-253.
- Felton, J.S., M. G. Knize, N. H. Shen, P. R. Lewis, B. D. Adresen, J. Happe and F. T. Hatch (1986) The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), Carcinogenesis, **7**, 1081-1086.
- Fujita, Y., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1985a) Characteristics of major mutagenicity of instant coffee, Mutat. Res., **142**, 145-148.
- Fujita, Y., K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1985b) Implication of hydrogen peroxide in the mutagenicity of coffee, Mutat. Res., **144**, 227-230.
- Ito, N., R. Hasegawa, M. Sano, S. Tamano, H. Esumi, S. Takayama and T. Sugimura (1991) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), Carcinogenesis, **12**, 1503-1506.
- Jägerstad, M., K. Skog, S. Grivas and K. Olsson (1991) Formation of heterocyclic amines using model systems, Mutat. Res., **259**, 219-233.
- Kasai, H., K. Kumeno, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, M. Nagao, Y. Fujita, T. Sugimura, H. Nukaya and T. Kosuge (1982) Mutagenicity of methylglyoxal in coffee, Jpn. J. Cancer Res., **73**, 681-683.
- Kim, I. S., K. Wakabayashi, R. Kurosaka, Z. Yamaizumi, F. Jinno, S. Koyota, A. Tada, H. Nukaya, M. Takahashi, T. Sugimura and M. Nagao (1994) Isolation and identification of a new mutagen, 2-amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4-CH₂OH-8-MeIQx), from beef extract, Carcinogenesis, **15**, 21-26.
- Knize, M. G., M. Roper, N. H. Shen and J. S. Felton (1990) Proposed structures for an aminodimethylimidazofuropyridine mutagen in cooked meats, Carcinogenesis, **11**, 2259-2262.
- Knize, M. G., E. Hopmans and J. A. Happe (1991) The identification of a new heterocyclic amine mutagen from a heated mixture of creatine, glutamic acid and glucose, Mutat. Res., **260**, 313-319.
- Kosuge, T., H. Zenda, H. Nukaya, A. Terada, T. Okamoto, K. Shudo, K. Yamaguchi, Y. Itaka, T. Sugimura, M. Nagao, K. Wakabayashi, A. Kosugi and H. Saito (1982) Isolation and structural determination of mutagenic substances in coal tar, Chem. Pharm. Bull., **30**, 1535-1538.
- Kosugi, A., M. Nagao, Y. Suwa, K. Wakabayashi and T. Sugimura (1983) Roasting coffee beans produces compounds that induce prophage λ in *E. coli* and are mutagenic in *E. coli* and *S. typhimurium*, Mutat. Res., **116**, 179-184.
- Kurosaka, R., K. Wakabayashi, F. Ushiyama, H. Nukaya, N. Arakawa, T. Sugimura and M. Nagao (1992) Detection of 2-amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[4,5-b]pyridine in broiled beef, Jpn. J. Cancer Res., **83**, 919-922.
- Nagao, M., T. Yahagi, T. Kawachi, Y. Seino, M. Honda, N. Matsukawa, T. Sugimura, K. Wakabayashi, K. Tsuji and T. Kosuge (1977) Progress in Genetic Toxicology, ed. by D. Scott, B. A. Bridges, and F. H. Sobels, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 259-264.
- Nagao, M., Y. Takahashi, H. Yamanaka and T. Sugimura (1979) Mutagens in coffee and tea, Mutat. Res., **68**, 101-106.
- Nagao, M., Y. Takahashi, K. Wakabayashi and T. Sugimura (1981) Mutagenicity of alcoholic beverages, Mutat. Res., **88**, 147-154.
- Nagao, M., Y. Fujita, K. Wakabayashi, H. Nukaya, T. Kosuge and T. Sugimura (1986) Mutagens in coffee and other beverages, Environ. Health Perspect., **67**, 89-91.
- Nukaya, H., T. Iwami, H. Ishida, K. Tsuji, Y. Suwa, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura and T. Kosuge (1990) N-2 Acetylation of 2'-deoxyguanosine by coffee mutagens, methylglyoxal and hydrogen peroxide, Mutat. Res., **245**, 251-257.
- Nukaya, H., H. Watanabe, H. Ishida, K. Tsuji, Y. Suwa, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura and T. Kosuge (1991) Isolation and structural determination of a mutagenic substance in creatine pyrolysate, Chem. Pharm. Bull., **39**, 533-535.
- Nukaya, H., Y. Inaoka, H. Ishida, K. Tsuji, Y. Suwa, K. Wakabayashi and T. Kosuge (1993) Modification of the amino group of guanosine by methylglyoxal and other α -ketoaldehydes in the presence of hydrogen peroxide, Chem. Pharm. Bull., **41**, 649-653.
- Ochiai, M., (1994) personal communication.
- Ohgaki, H., S. Takayama and T. Sugimura (1991) Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food, Mutat. Res., **259**, 399-410.
- Sugimura, T. and S. Sato (1983) Mutagens-

- Carcinogens in Foods, Cancer Res., **43** (Suppl.), 2415s-2421s.
- Sugimura, T. (1986) Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan, Science, **233**, 312-318.
- Takahashi, M., K. Wakabayashi, M. Nagao, M. Yamamoto, T. Masui, T. Goto, N. Kinae, I. Tomita and T. Sugimura (1985a) Quantification of 2-amino-3-methylimidazo-[4, 5-f] quinoline (IQ) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f] quinoxaline (MeIQx) in beef extracts by liquid chromatography with electrochemical detection (LCEC), Carcinogenesis, **6**, 1195-1199.
- Takahashi, M., K. Wakabayashi, M. Nagao, Z. Yamaizumi, S. Sato, N. Kinae, I. Tomita and T. Sugimura (1985b) Identification and quantification of 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo-[4,5-f] quinoxaline (4,8-DiMeIQx) in beef extract, Carcinogenesis, **6**, 1537-1539.
- Ushiyama, H. (1994) personal communication.

- Wakabayashi, K., M. Nagao, H. Esumi and T. Sugimura (1992) Food-derived mutagens and carcinogens, Cancer Res. (Suppl.), **52**, 2092s-2098s.
- Wakabayashi, K., H. Ushiyama, M. Takahashi, H. Nukaya, S. B. Kim, M. Hirose, M. Ochiai, T. Sugimura and M. Nagao (1993) Exposure to Heterocyclic Amines, Environ. Health Perspect., **99**, 129-133.
- Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1990) Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase levels, Mutat. Res., **234**, 337-348.
- Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella*, Mutat. Res., **48**, 121-130.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 31-36 (1994)

奨励賞授賞講演

変異原物質の代謝的活性化に関するチトクローム P-450 の基礎的・応用的研究

Studies on cytochrome P-450 responsible for the metabolic activation of promutagens

鎌 滝 哲 也
Tetsuya Kamataki

北海道大学薬学部代謝分析学講座
060 札幌市北区北 12 条西 6

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University Nishi-6,
Kita-12-jo, Kita-ku, Sapporo-shi Hokkaido 060, Japan

(受付: 1994 年 4 月 15 日; 受理: 1994 年 4 月 15 日)

Summary

Most genotoxic chemicals are metabolized in the body to exert their genotoxicity. Unlike enzymes involved in the intermediate metabolism, enzymes responsible for the activation of genotoxic chemicals show differences in the catalytic properties, resulting in the species differences in the *in vivo* genotoxicities. Thus, it was needed to use human enzymes to estimate the genotoxicities of chemicals to humans. In this respect, crude enzyme preparations including human liver microsomes have been added to the mutation assays. However, there are many problems in using human liver samples. To develop a new method which allows us to estimate genotoxicity of chemicals to humans, we established cell lines carrying human drug metabolizing enzymes. A Chinese hamster cell line, CHL were transfected first with cDNA coding for NADPH-cytochrome P-450 reductase. To this cell was further transfected with human CYP1A2 cDNA which we found in previous studies to be highly active to N-hydroxylate some typical heterocyclic amines such as IQ. In addition, NAT1 (monomorphic N-acetyltransferase) or NAT2 (polymorphic N-acetyltransferase) cDNA was transfected to the cell carrying the reductase and CYP1A2 cDNAs to establish ANM and ANP cell lines, respectively. Cytoxicity as well as mutation rates caused by the addition of IQ and some other heterocyclic amine compounds were increased rather specifically in ANP cells, indicating that these chemicals are activated by the reconstructed enzyme system including the reductase, CYP1A2 and NAT2.

Keywords: cytochrome P-450; metabolic activation; promutagens

1. はじめに

発癌のプロセスはがん原物質による DNA の化学修飾によるイニシエーションから始まる。化学修飾された DNA の多くは修復酵素によって修復されるが、たまたま元通りに修復されずに変

異が残ると発癌に結び付くこととなる。がん原物質はそのままの形で DNA を化学修飾することは極めて稀である。それはがん原物質がもとのままでは化学的に安定で DNA と反応できないためである。多くのがん原物質は生体内で代謝さ

れ、生成した化学的に反応性の高い活性代謝物がDNAと結合する。したがって、代謝的活性化のプロセスは化学物質の発がん性を決定する重要な因子と考えることが出来る。代謝的活性化には種々の酵素が関与する。これらの酵素の性質や量が活性代謝物の生成量を決定する。

がん原物質による発がんに動物種差や性差が存在することが知られている。化学物質による発がんの種差や性差は代謝的活性化の種差や性差と関していることから、発がんにおける代謝的活性化酵素の重要性が指摘されている。

がん原物質の生体内代謝に関与する酵素の中でもチトクロームP450は中心的な酵素である。チトクロームP450には多くの分子種が存在する(Nelson *et al.*, 1993)。がん原物質又は生体外異物の代謝にはチトクロームP450の内でもCYP1A-3A(4A)の関与も示唆されている。中心的には1A)が関与する。

ある化学物質の癌原性が実験動物で証明されたとしても、それがヒトにおいても癌原性である保証がない。また、動物では癌原性がなくともヒトでは癌原性があるかも知れない。ヒトにおける化学物質の発がんリスクを予測するためにはヒトの活性化酵素を用いて研究することが最善であるが、たとえばAmes系にヒトの肝臓のS-9などを添加して研究することは事実上不可能である。そこで、著者らはヒトの酵素の遺伝子を培養細胞系に導入して発現させ、ヒトの酵素によるがん原物質の発がんリスクの予測系として有用であるかについて検討することを企画した。ヒトの酵素を発現する細胞に変異原物質やがん原物質を与えたとき、細胞内で活性代謝物が生成し、細胞毒性や

遺伝子損傷が起こることが期待された。一方、導入した酵素がヒトにおいて遺伝的な多型があるとすれば、この酵素の遺伝的な多型が発がんリスクに相関することが予測される。この点についても研究の対象とした。

2. ヘテロサイクリックアミンの活性化酵素

加熱食品中には高い変異原性を示すIQなど多数のヘテロサイクリックアミンが存在することが日本において国立がんセンターの研究グループを中心に見いだされた。これらの変異原物質はサルモネラ菌を用いた変異原性試験で、PCBを投与したラットの肝9,000×g上清を活性化酵素として用いると強烈な変異原性を示すことから、PCBを投与したラットの肝臓に多量に存在する酵素が活性化に関与することが予想された。活性化酵素に関する研究から我々は当時まだ性質が明かでなかったチトクロームP-450の一種P-448-H(スペクトル的に高スピニ型のチトクロームP-450、現在はCYP1A2と呼ばれている)が高い選択性をもってこれらヘテロサイクリックアミンを活性化することを見いだした(Ishii *et al.*, 1981; Kamataki *et al.*, 1993; Yamazoe *et al.*, 1983, 1984)。Table 1にその例を示した。用いた変異原のTrp-P-2, Glu-P-1, IQ, 2-aminofluorene, 2-acetylaminofluorene, 4-aminobiphenylそれにaflatoxinB₁のいずれもCYP1A2はCYP1A1よりも効率良く活性化し、ことにGlu-P-1, IQおよび4-aminobiphenylは特異的と言えるほどCYP1A2によって効率良く活性化された。唯一、CYP1A1がCYP1A2よりも高い活性を示したのはbenzo(a)pyreneのみであった。もともとCYP1A2

Table 1. Mutagenic Activation of Promutagens by CYP1A2 and CYP1A1

| Promutagens | Tester Strain | CYP1A2 (rev. × 10 ⁻³ /nmol P-448) | CYP1A1 |
|--------------------------|---------------|---|--------|
| Trp-P-2 | TA 98 | 7810 | 3650 |
| Glu-P-1 | TA 98 | 5090 | 180 |
| IQ | TA 98 | 2410 | 202 |
| 2-Aminofluorene | TA 98 | 211.4 | 63.1 |
| 2-Acetylaminofluorene | TA 98 | 5.05 | 1.43 |
| 4-Aminobiphenyl | TA 98 | 11.50 | 1.58 |
| Aflatoxin B ₁ | TA 100 | 8.17 | 1.73 |
| Benzo[a]pyrene | TA 100 | 0.84 | 2.22 |

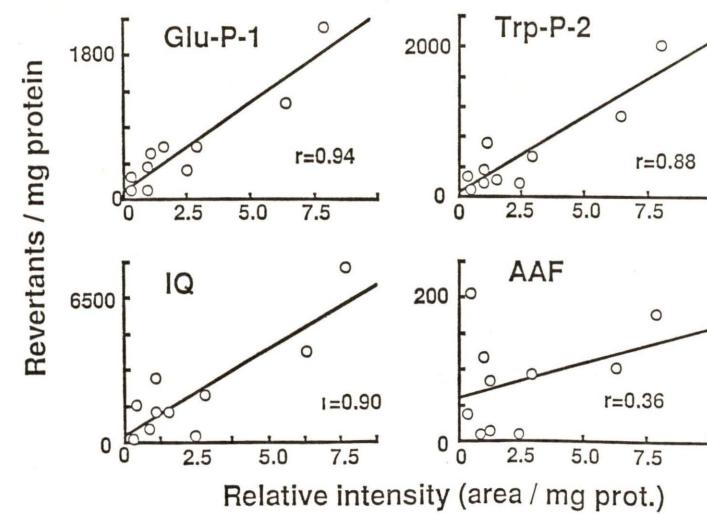


Fig. 1. Correlation between the metabolic activation of heterocyclic amines and the amount of P4501A2 in different human livers.

はウサギの肝臓に大量に存在し、ウサギの肝ミクロソームから初めて生成されたので、ラット以外の動物にも存在することは予測されていた。ラット以外の動物のCYP1A2がこれらのヘテロサイクリックアミンを活性化するかどうかは多くの研究者によって注目された。その後、ラットのCYP1A2のみではなく、ヒトを含む他の動物種でもCYP1A2がヘテロサイクリックアミンの多くを極めて効率良く活性化することが著者らの研究グループをはじめ他の研究グループによって証明されてきている(Kitada *et al.*, 1990; Ubukata *et al.*, 1992)。肝ミクロソームのなかでCYP1A2がヘテロサイクリックアミンの活性化に中心的な役割を果たしていることは以下の事実によって裏づけられた。すなわち、肝ミクロソームにCYP1A2の抗体を加えるとほとんどの活性が阻害され、多数のヒトの肝を用いてそのCYP1A2含量と活性化能の間の相関をとったときに高い相関係数を示し、しかもその直線が原点付近を通った(Fig. 1)。

一方、ヘテロサイクリックアミンの活性化メカニズムに関する研究から、これらの変異原はCYP1A2によってN-水酸化され、生じたN-水酸化体はサルモネラ菌体内に存在するO-アセチル転移酵素によってO-アセチル化され、このO-アセチル体が究極活性代謝産物であることが判明し

た。ヒトや動物においてはN-アセチルトランスフェラーゼとして従来知られている酵素によってO-アセチル化されることも明かとなった(Saito *et al.*, 1986)。

3. ヒトCYP1A2とO-アセチル転移酵素を発現する細胞系の樹立

CYP1A2とO-アセチル転移酵素がヘテロサイクリックアミンの活性化に中心的な働きをすることは精製酵素などを用いた研究で明かとなつたが、これらの酵素を哺乳動物の細胞内で発現させた場合にヘテロサイクリックアミンが細胞内で発現酵素によって活性化され細胞毒性や遺伝子の変異を起こすか否かを検討した。とくに、O-アセチル転移酵素(N-アセチル転移酵素と同一、NAT)にはヒトにおいて遺伝的な多型のないNAT1と多型性を示すNAT2の2種が存在することが知られており、そのいずれがヘテロサイクリックアミンの活性化に関与しているのかも重要であると考えられた。そこで、チャイニーズハムスター由来のCHL細胞にまずNADPH-チトクロームP-450還元酵素のcDNAを導入し、さらにヒトのCYP1A2(NIHのDr. Gonzalezより供与)のcDNAを導入した細胞(A2R)系を樹立した。この細胞にNAT1またはNAT2をコードするcDNA

Table 2. N-Acetyltransferase Activity in Cell Lines Transformed with NAT1 or NAT2 cDNA

| Cell line | Transformed with | | | Substrate | |
|-----------|------------------|------|------|-----------|---|
| | CYP1A2 | NAT1 | NAT2 | PABA* | Sulfamethazine (nmol/min/mg protein) |
| CR-68 | - | - | - | ND** | ND |
| A2R-5 | + | - | - | ND | ND |
| CNM-4 | - | + | - | 316 | 0.62 |
| ANM-13 | + | + | - | 46.4 | ND |
| CNP-16 | - | - | + | ND | 4.59 |
| ANP-25 | + | - | + | ND | 7.20 |

* p-Aminobenzoic acid. ** Not detectable.

(東京都神経科学研究所、出口博士より供与)をそれぞれ導入した(Sawada *et al.*, in press). NAT1とNAT2のcDNAを導入した細胞をそれぞれANMおよびANP細胞と命名した。これらの酵素が細胞内で発現しているのはウエスタンプロットやノーザンプロットで確認し、NAT1とNAT2の発現に関してはさらにp-アミノ安息香酸やスルファメタジンのN-アセチル化酵素活性で確認した(Table 2)。

4. ヒトCYP1A2とO-アセチル転移酵素を発現する細胞におけるヘテロサイクリックアミンの活性化

樹立された細胞のカルチャーメジウムにIQを添加し、これらのヘテロサイクリックアミンによる細胞毒性を調べた。NADPH-チトクロームP450還元酵素に加えCYP1A2とNAT2の両方を発現させた細胞にのみ強い細胞毒性が認められ

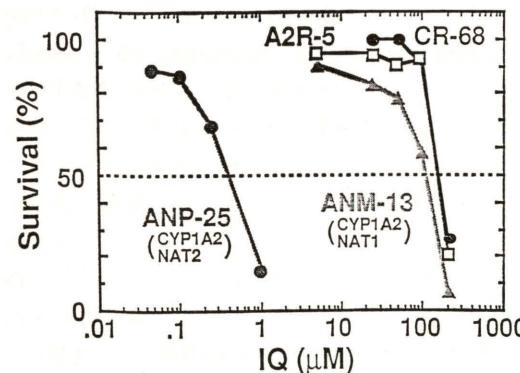


Fig. 2. Cytotoxicity of IQ in Cell Lines Expressing CYP1A2 and NATs.

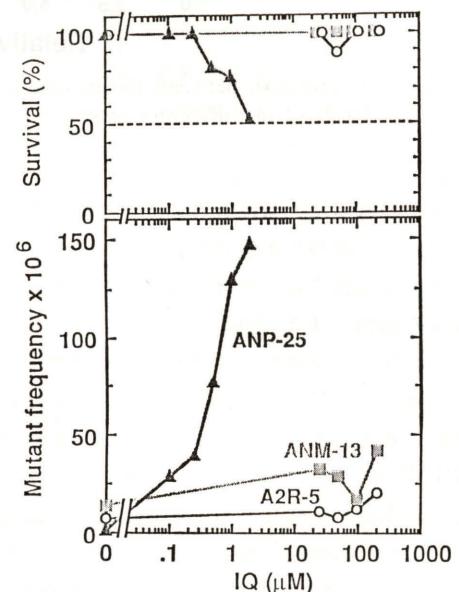


Fig. 3. Mutagenicity of IQ in ANP-25 Cells Expressing CYP1A2 and NAT2.

た(Fig. 2)。この細胞毒性は細胞の6-チオグアニン耐性突然変異と並行して起こっていた(Fig. 3)。細胞毒性はCYP1Aの強力な阻害剤であるα-naphthoflavoneを添加すると消失したことから、細胞内に発現したCYP1A2がIQをN-水酸化し、ついでNAT2がO-アセチル化したと考えられる。親株のCHL細胞に各変異原物質を添加したときのIC₅₀を1.0とおくと、ANP細胞ではIC₅₀値は380分の1であり、極めて少量のIQでも細胞内で活性化され細胞毒性や変異原性を示した。ANP細胞はIQのみでなくMeIQやMeIQxも活性化し、これらの変異原物質に対して親株に

Table 3. Relative Sensitivity to Heterocyclic Amines of Cell Lines Expressing CYP1A2 and NATs

| Cell line | Transformed with | | | Relative sensitivity* to | | |
|-----------|------------------|------|------|--------------------------|------|-------|
| | CYP1A2 | NAT1 | NAT2 | IQ | MeIQ | MeIQx |
| CR-68 | - | - | - | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| A2R-5 | + | - | - | 1.0 | 1.7 | 1.0 |
| CNM-4 | - | + | - | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| ANM-13 | + | + | - | 1.4 | 1.7 | 2.1 |
| CNP-16 | - | - | + | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| ANP-25 | + | - | + | 380 | 100 | 100 |

* Calculated from LD₅₀ values.

くらべ約100倍の高い感受性を示した(Table 3)。これらの結果は、与えたヘテロサイクリックアミンがヒトのCYP1A2と遺伝的多型を示すNAT2によって効率よく活性化されることを明確に示している。

5. まとめとして：活性化酵素とヒトにおける癌原性の予測系

変異原/癌原物質の活性化酵素に関する研究は歴史的にも重要視され、様々な研究が展開されてきている。我々はまず、1) 肝臓のミクロソーム画分などの粗酵素標品を用い、活性化酵素の必要性を証明し(Yamazoe *et al.*, 1983), 2) 如何なる酵素が活性化に関与するのか、酵素を精製して直接証明した(Kamataki *et al.*, 1983; Yamazoe *et al.*, 1983; Kawano *et al.*, 1985; Ohta *et al.*, 1989, 1990; Kitada *et al.*, 1989, 1991)。その後、3) 活性化に関与する酵素のcDNAを単離し、単離したcDNAを適当な発現ベクターにつなぎ、酵母等に発現させ、発現酵素を用いてその酵素の活性化酵素としての意義を確認した(Uchida *et al.*, 1990; Komori *et al.*, 1992)。そして更に新しい研究の展開として、4) 酵素を大量に調製して用いるのではなく、酵素を適当な哺乳動物の細胞に発現させ、細胞内で、しかも低濃度の変異/癌原物質で遺伝子損傷が起こるかを検証している。また、同時にヒトにおける癌原性の予測に意義ある研究として本稿で一例を示したように、ヒトの活性化酵素を細胞に発現させ、その意義を明かにすることを目指して研究を進めてきた(Kitamura *et al.*, 1992; Sawada *et al.*, 1992, 1993)。

現在可能な先駆的な研究として最後に、5) ヒトの

遺伝子を発現する遺伝子導入動物を作成し、それを用いてヒトにおける化学物質の発がんリスクを調べることが目標となった。演者らは遺伝子導入動物の樹立とその変異原試験への応用の研究にすでにショウジョウバエで成功をおさめ(三菱化成総合研究所、吉川博士らとの共同研究)(Komori *et al.*, 1993)、ヒトのチトクロームP-450の遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作出にも成功(九州大学、勝木教授らとの共同研究)、その発がんリスクとの関連など研究中である。

謝 辞

本研究は慶應大学医学部薬理学教室において、恩師、加藤隆一教授のご指導の下で開始され、北海道大学薬学部ではさらに大きく進展させることができた。慶應大学医学部と北海道大学薬学部の多くの共同研究者のお陰で成し遂げられたものである。個々の共同研究者のお名前は記さないが、ここに深く感謝の意を表したい。

参考文献

- Ishii, K., Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato (1981) Metabolic activation of glutamic acid pyrolysis products, Glu-p-1 and Glu-p-2, by purified cytochrome P-450, Chem.-Biol. Interns., 38, 1-13.
- Kamataki, T., K. Maeda, Y. Yamazoe, N. Matsuda, K. Ishii and R. Kato (1983) A high spin form of cytochrome P-450 highly purified from PCB-treated rats: Catalytic characterization and immunological quantitation in liver microsomes, Mol. Pharmacol., 24, 146-155.
- Kawano, S., T. Kamataki, K. Maeda, R. Kato, T. Nakao and I. Mizoguchi (1985) Activation and inactivation of a variety of mutagenic

- compounds by the reconstituted system containing highly purified preparations of cytochrome P-450 from rat liver, *Fund. Appl. Toxicol.*, **5**, 487-498.
- Kitada, M., M. Taneda, K. Itahashi and T. Kamataki (1991) Four forms of cytochrome P-450 in human fetal livers: Purification and their capacity to activate promutagens, *Japan. J. Cancer Res.*, **82**, 426-432.
- Kitada, M., M. Taneda, H. Ohi, M. Komori, K. Itahashi, M. Nagao and T. Kamataki (1989) Mutagenic activation of aflatoxin B₁ by P-450 HFLA in human fetal livers, *Mutat. Res.*, **227**, 53-58.
- Kitada, M., M. Taneda, K. Ohta, K. Nagashima, K. Itahashi and T. Kamataki (1990) Metabolic activation of aflatoxin B₁ and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline by human adult and fetal livers, *Cancer Res.*, **50**, 2641-2645.
- Kitamura, K., K. Sato, M. Sawada, S. Ito, M. Kitada, M. Komori and T. Kamataki (1992) Stable expression of cytochrome P-450IIIA7 cDNA in human breast cancer cell line MCF-7 and its application to cytotoxicity testing, *Archs. Biochem. Biophys.*, **292**, 136-140.
- Komori, M., R. Kitamura, H. Fukuta, H. Inoue, H. Baba, K. Yoshikawa and T. Kamataki (1993) Transgenic *Drosophila* carrying mammalian cytochrome P-4501A1: An application to toxicological testing, *Carcinogenesis*, **14**, 1683-1688.
- Komori, M., O. Kikuchi, M. Kitada and T. Kamataki (1992) Molecular cloning of monkey P-4501A1 cDNA and expression in yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **1131**, 23-29.
- Nelson, D. R., T. Kamataki, M. J. Coon, R. W. Estabrook, R. Gunsalus, K. Okuda, D. Waxman and D. W. Nebert (1993) The P-450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature, *DNA and Cell Biol.*, **12**, 1-51.
- Ohta, K., M. Kitada, T. Hashizume, M. Komori, H. Ohi and T. Kamataki (1989) Purification of cytochrome P-450 from polychlorinated biphenyl-treated crab-eating monkeys: High homology to a form of human cytochrome P-450, *Biochim. Biophys. Acta*, **996**, 142-145.
- Ohta, K., M. Motoya, M. Komori, T. Miura, M. Kitada and T. Kamataki (1990) Interspecies homology of cytochrome P-450: Purification and toxicological significance of a high spin form of cytochrome P-450 (P-450-D2) from liver microsomes of polychlorinated biphenyl (PCB)-treated beagle dogs, *J. Biopharm. Sci.*, **1**, 59-71.
- Saito, K., A. Shinohara, T. Kamataki and R. Kato (1986) N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase in hamster liver: Identity with arylhydroxamic acid N,O-acetyltransferase and arylamine N-acetyltransferase, *J. Biochem.*, **99**, 1689-1697.
- Sawada, M., R. Kitamura and T. Kamataki (1992) Stable expression of monkey cytochrome P-4501A1 cDNA in Chinese hamster CHL cells and its application for detection of mutagenicity of aflatoxin B₁, *Mutat. Res.*, **265**, 23-29.
- Sawada, M., R. Kitamura, S. Ohgiya and T. Kamataki (1993) Stable expression of guinea pig NADPH-cytochrome P450 reductase and monkey P4501A1 cDNAs in Chinese hamster cells: Establishment of cell lines highly sensitive to aflatoxin B₁, *Archs. Biochem. Biophys.*, **300**, 164-168.
- Ubukata, K., H. Ohi, M. Kitada and T. Kamataki (1992) A new form of cytochrome P-450 responsible for the mutagenic activation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in human livers, *Cancer Res.*, **52**, 758-763.
- Uchida, T., M. Komori, M. Kitada and T. Kamataki (1990) Isolation of cDNAs coding for three different forms of liver microsomal cytochrome P-450 from polychlorinated biphenyl-treated beagle dogs, *Mol. Pharmacol.*, **38**, 644-651.
- Yamazoe, Y., M. Shimada, T. Kamataki and R. Kato (1983) Microsomal activation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a pyrolylate of sardine and beef extract, to a mutagenic intermediate, *Cancer Res.*, **43**, 5768-5774.
- Yamazoe, Y., M. Shimada, K. Maeda, T. Kamataki and R. Kato (1984) Specificity of four forms of cytochrome P-450 in the metabolic activation of several aromatic amines and benzo[a]pyrene, *Xenobiotica*, **14**, 549-552.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 37-43 (1994)

In vitro 染色体異常試験における濃度設定のための細胞毒性試験法の比較

Comparison of six cytotoxicity tests to find optimal dose range for the *in vitro* chromosomal aberration test

杉木 靖子, 山崎奈緒美, 松岡厚子, 鈴木孝昌,
林 真, 祖父尼俊雄

Sugiki, Y., N. Yamazaki, A. Matsuoka, T. Suzuki, M. Hayashi and T. Sofuni

国立衛生試験所 変異遺伝部
158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

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

(受付: 1994年3月17日; 受理 1994年4月11日)

Summary

To find the optimal dose range of chemicals for the *in vitro* chromosomal aberration test using Chinese hamster cells, regulatory guidelines suggest some cytotoxic indicators, e.g., cell confluence, viable cell number, colony forming efficiency, and mitotic index. The cell growth inhibition test using "Monocellater", which measures all confluence is widely used in Japan. We compared six different cytotoxic indicators for dose-finding: 1) cell growth inhibition measured by Monocellater (Olympus Opt. Co., Ltd.), 2) cell growth inhibition by crystal violet staining using 96-well plates, 3) viable cell count by trypan blue staining, 4) measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from damaged cells into culture medium, 5) colony forming efficiency by direct and replating methods (CFE), and 6) mitotic index evaluation of the slides analyzed for chromosomal aberrations. A Chinese hamster lung fibroblast cell line, CHL/IU, was treated with four model chemicals (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG), potassium bromate, hydrogen peroxide, and cetylpyridinium chloride morohydrate) and analyzed by optimized protocols for each assay. To evaluate the relation of cytotoxic and clastogenic effect, the *in vitro* chromosomal aberration test was also performed using CHL/IU cells.

All assays showed dose-dependent cytotoxicity, to all model chemicals, except for the LDH assay, which responded only to cetylpyridinium chloride morohydrate. The CFE differ from the chromosomal aberration assay in test condition, and was the most sensitive among test studied. We could observe metaphase chromosomes, even when CFE value was reduced to almost 0%. Thus the LDH assay and the CFE have limited values for does selection. The other four cytotoxic endpoints appear to be acceptable for preliminary dosefinding tests in the *in vitro* chromosomal aberration test.

Keywords: chromosomal aberration; growth inhibition; colony forming efficiency; lactate dehydrogenase; mitotic index

緒 言

In vitro 染色体異常試験における濃度設定のためには、いくつかの細胞毒性試験法が採用されている。主な細胞毒性の指標には、生細胞数、コロニー形成率、細胞分裂指数などがあり (Scott *et al.*, 1990; OECD, 1990), 我が国においては、単層培養細胞密度計 (Monocellater, オリンパス光学工業(株)) を用いた細胞増殖抑制試験法 (祖父尼, 1991) が紹介されている。しかし、これらの試験法ではそれぞれ異なる指標を用いているため、検出感度もさまざまである。そこで、これらの試験方法に加えて、96 マルチウェルプレートを用いる細胞毒性試験法の中から、死細胞からの乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) の遊離を指標とする方法 (Sasaki *et al.*, 1992), およびクリスタルバイオレット染色による増殖抑制試験 (Saotome *et al.*, 1989) を実施して、4 種の化合物の細胞毒性を比較した。また、同一化合物について染色体異常試験を行い、構造異常の誘発と細胞毒性との関係を検討した。

材料および方法

1. 細胞

チャイニーズハムスター肺由来纖維芽細胞株 CHL/IU (JCRB 細胞バンク) を 10% 仔牛血清 (Cell Culture Lab.) を含むイーグル MEM 培地 (GIBCO BRL) を用いて、5% CO₂, 37°C 条件下で培養した。

2. 試験化合物

染色体異常誘発性があり、それぞれ異なる作用機序をもつ化合物の中から、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, CAS No. 70-25-7), potassium bromate (CAS No. 758-01-2), および hydrogen peroxide (CAS No. 7722-84-1) を使用した。また、明らかな細胞毒性を有する化合物として、cetylpyridinium chloride monohydrate (CAS No. 123-03-5) を用いた。これらの化合物を日局生理食塩液に溶解し、細胞毒性試験および染色体異常試験の検体を調製した。

3. 細胞毒性試験

3-1. Monocellater を用いる細胞増殖抑制試験 (Monocellater)

4 × 10⁴ 個の細胞をシャーレ (直径 3.5 cm) に播種し、24 時間培養後に検体を添加した (添加量 5 μl/ml)。さらに 48 時間培養後、シャーレを生理食塩液で洗浄し、10% ホルマリンで 10 分間固定し、0.1% クリスタルバイオレット溶液で 15 分間染色した。シャーレを水洗、乾燥し、Monocellater を用いて 555 nm における吸光度を測定した。溶媒対照のシャーレの吸光度を 100% として、各用量における細胞増殖率を求めた。

3-2. 96 マルチウェルプレートを用いるクリスタルバイオレット法 (CV)

2 × 10³ 個の細胞を各ウェルに播種し、24 時間培養後に検体を添加した。48 時間培養後、プレートを生理食塩液で洗浄し、10% ホルマリンで 15 分間固定し、0.1% クリスタルバイオレット溶液で 15 分間染色した。プレートを水洗、乾燥し、各ウェルに酢酸-50% エタノール混液 (1 : 99) を 0.2 ml 加えて色素を抽出し、プレートリーダーを用いて 620 nm における吸光度を測定した。溶媒対照群のウェルの吸光度の平均を 100% として、各用量群における細胞増殖率を算出した。

3-3. トリパンブルー色素排除法による生細胞の計数 (Cell number)

1 × 10⁵ 個の細胞をシャーレ (直径 6 cm) に播種し、24 時間培養後に検体を添加した。さらに 48 時間培養後、トリプシン処理で細胞を回収し、1~5 ml の新鮮培養液に再懸濁させた。さらに 0.4% トリパンブルー溶液で希釈した後、血球計算盤を用いて生細胞数を計数し、シャーレ 1 枚あたりの生細胞数を求めた。溶媒対照のシャーレの生細胞数を 100% として各用量における細胞増殖率を求めた。

3-4. 遊離 LDH 活性の測定による細胞生存率の算出 (LDH)

a. 試験化合物による LDH 活性阻害の検出

培養容器に単層に増殖した細胞を、マグネシウ

ムおよびカルシウムを含まない PBS で洗浄し、さらに少量の PBS を加えた後に凍結、融解を 3 回繰り返した。PBS を回収し、3000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清を LDH 標準液とした。この LDH 標準液を 96 マルチウェルプレートに 100 μl ずつ分注し、各濃度に調製した検体を 10 μl ずつ添加し、室温で 20 分間反応させた。処理後、各ウェルの LDH 活性を測定し (KYOKUTO 微量毒性試験試薬、MTX "LDH", 極東製薬工業(株)), 試験化合物による酵素活性の阻害がないことを確認した。

b. 細胞生存率の算出

2 × 10³ 個の細胞を 96 マルチウェルプレートに播種し、48 時間培養後、培養液をマグネシウムおよびカルシウムを含まない PBS と交換した。各ウェルに検体を添加し、室温で 20 分間処理した後、培養上清を採取し、上清中の LDH 活性を測定した。プレートリーダーを用いて 620 nm における吸光度を測定し、次式によって細胞生存率を求めた。陽性対照には tween 20 (最終濃度 0.05 v/v%) を用いた。

式：細胞生存率 (%)

$$= \{1 - (a - b)/(c - b)\} \times 100$$

a : 試験群の吸光度の平均値

b : 陰性対照群の吸光度の平均値

c : 陽性対照群の吸光度の平均値

3-5. コロニー形成率 (Colony forming efficiency, CFE)

Direct 法と Replate 法の 2 種類の方法で行い、それぞれ溶媒対照群での出現コロニー数を 100% として、各処理群におけるコロニー形成率を求めた。

a. Direct 法

200 個の細胞をシャーレ (直径 6 cm) に播種し、24 時間培養後に検体を添加した。さらに 6 日間培養後、メタノールで 5 分間固定、4.0% ギムザ液で 20 分間染色し、出現コロニー数を計数した。ただし、コロニーは 50 個以上の細胞で形成されているものを 1 つとしてカウントした。

b. Replate 法

1 × 10⁵ 個の細胞をシャーレ (直径 6 cm) に播

種し、24 時間培養後に検体を添加した。さらに 48 時間培養後、トリプシン処理で細胞を回収し、新鮮培養液に再懸濁させ、200 個ずつをシャーレに播種した。7 日間培養後、Direct 法と同様に固定・染色し、出現コロニー数を計数した。

3-6. 細胞分裂指数 (Mitotic index, MI)

染色体異常試験の観察に使用したものと同じ標本を用いた。1 用量につき少なくとも 1000 個の細胞を観察し、分裂細胞の割合 (MI) を求めた。また、溶媒対照の MI を 100% として、各用量における MI の低下を求めた。

4. 染色体異常試験

1 × 10⁵ 個の細胞をシャーレ (直径 6 cm) に播種し、24 時間培養した。各濃度に調製した検体を添加し、24 および 48 時間連続処理後、染色体標本を作製した。標本作製 2 時間前にコルセミド (GIBCO BRL, 終濃度 0.2 μl/ml) を加えた後、トリプシン処理で細胞を回収し、0.075 M KCl で 37°C, 15 分間の低張処理を行い、メタノール-酢酸 (3 : 1) 液で細胞を固定した。この細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し、通常の空気乾燥法で標本を作製し、2.0% ギムザ液で 15 分間染色した。1 用量につき 100 個の分裂中期像を観察し、構造異常および数的異常の分析を行った。

結 果

LDH 法を除くすべての細胞毒性試験法により、4 種の試験化合物の濃度依存的な細胞毒性を検出した (Table 1)。LDH 法では、用いた全ての試験化合物による酵素活性の直接阻害は、ほとんどないことが確認された。さらに、cetylpyridinium chloride monohydrate を処理した細胞群においてのみ、濃度依存的な LDH 活性の上昇が認められたが、他の 3 種類の化合物を処理した細胞群では、陰性対照と同程度の LDH 活性しか認められず、細胞毒性は検出できなかった (Fig. 1)。

LDH 法と CV 法を除いた試験の結果を、化合物ごとに Fig. 2 に示した。CV 法の結果は、Monocellater を用いた細胞増殖抑制の結果と比較的良く相關していたため、図には示さなかった。

Table 1. Comparison of *in vitro* cytotoxicity tests and chromosomal aberration test

| Sample | Dose (μ M) | Monocellater ^a | CV ^b | Cell number ^c | LDH | CFE ^d | | 24hour | | 48hour | |
|--------------------------------------|--------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------------|-------|------------------|---------|--------------------|-----------------|-------------|-----|
| | | | | | | Direct | Replate | MI(%) ^e | CA ^f | MI(%) | CA |
| MNNG | 0 | 100 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 9.4 (100.0) | 7 | 8.9 (100.0) | 3 |
| | 5.3 | 113 | NT | NT | NT | NT | NT | 5.9 (62.8) | 22 | 6.1 (68.5) | 22 |
| | 11 | 100 | 83.2 | 50.8 | 95.6 | 76.0 | 55.4 | 3.9 (41.5) | 56 | 4.8 (53.9) | 58 |
| | 21 | 87 | 76.9 | 34.6 | 103.3 | 19.7 | 11.0 | 2.3 (24.5) | 99 | 3.2 (36.0) | 75 |
| | 42 | 51 | 30.8 | 18.3 | 100.4 | 0.2 | 0.2 | 0.6 (6.4) | TOX | 1.5 (16.9) | 100 |
| | 85 | 44 | 12.1 | 5.8 | 95.5 | 0.0 | 0.0 | 0.1 (1.1) | TOX | 0.1 (1.1) | TOX |
| | 170 | 25 | 5.9 | 4.3 | 105.4 | 0.0 | 0.0 | TOX | TOX | TOX | TOX |
| Potassium bromate | 340 | 4 | NT | NT | NT | NT | NT | TOX | TOX | TOX | TOX |
| | 0 | 100 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 7.3 (100.0) | 3 | 6.4 (100.0) | 2 |
| | 47 | 98 | NT | NT | NT | NT | NT | 6.3 (86.3) | 3 | 7.1 (110.9) | 5 |
| | 94 | 93 | 103.8 | 88.2 | 105.6 | 104.6 | 98.2 | 5.4 (74.0) | 12 | 6.5 (101.6) | 13 |
| | 190 | 93 | 105.7 | 80.0 | 105.8 | 100.3 | 82.3 | 4.3 (58.9) | 23 | 4.9 (76.6) | 27 |
| | 370 | 69 | 87.2 | 57.5 | 103.7 | 62.3 | 66.1 | 4.0 (54.8) | 45 | 3.3 (51.6) | 43 |
| | 750 | 44 | 54.9 | 46.2 | 104.7 | 0.3 | 6.9 | 2.7 (37.0) | 89 | 1.0 (15.6) | TOX |
| | 1500 | 14 | 18.6 | 15.0 | 102.9 | 0.0 | 0.0 | 1.2 (16.4) | TOX | 0.0 (0.0) | TOX |
| Hydrogen peroxide | 3000 | 0 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| | 0 | 100 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 5.1 (100.0) | 7 | 7.6 (100.0) | 1 |
| | 6.9 | 91 | NT | NT | NT | NT | NT | 3.5 (68.6) | 8 | 5.8 (76.3) | 2 |
| | 14 | 96 | 52.5 | 92.6 | 99.1 | 95.8 | 105.8 | 2.3 (45.1) | 12 | 6.0 (78.9) | 6 |
| | 28 | 92 | 45.7 | 75.6 | 101.0 | 4.4 | 120.9 | 1.6 (31.4) | 41 | 5.8 (76.3) | 24 |
| | 55 | 77 | 19.4 | 36.3 | 101.4 | 0.0 | 86.4 | 0.1 (2.0) | TOX | 1.4 (18.4) | 51 |
| | 110 | 45 | 11.7 | 12.6 | 97.4 | 0.0 | 12.9 | TOX | TOX | TOX | TOX |
| | 220 | 19 | 5.7 | 2.0 | 98.3 | 0.0 | 0.5 | TOX | TOX | TOX | TOX |
| | 440 | 0 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| Cetylpyridinium chloride monohydrate | 0 | 100 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 5.1 (100.0) | 7 | 7.6 (100.0) | 1 |
| | 0.2 | 91 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |
| | 0.4 | 91 | NT | NT | NT | NT | NT | 6.2 (121.6) | 3 | 6.9 (90.8) | 3 |
| | 0.9 | 104 | 92.4 | 82.2 | 101.1 | 105.3 | 85.1 | 5.2 (102.0) | 1 | 5.5 (72.4) | 3 |
| | 1.7 | 77 | 82.5 | 72.3 | 97.3 | 100.9 | 75.8 | 4.1 (80.4) | 3 | 4.3 (56.6) | 1 |
| | 3.5 | 59 | 60.5 | 45.1 | 88.9 | 86.8 | 92.6 | 3.1 (60.8) | 2 | 3.7 (48.7) | 3 |
| | 7 | 37 | 35.3 | 34.8 | 70.1 | 47.5 | 89.1 | 2.5 (49.0) | 3 | 1.6 (21.1) | 1 |
| | 14 | 16 | 16.6 | 16.0 | 47.6 | 0.4 | 71.4 | 1.9 (37.3) | 1 | 0.6 (7.9) | TOX |
| | 28 | 10 | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT | NT |

^aCell growth inhibition measured by Monocellater.^bCell growth inhibition measured by crystalviolet staining method using 96-well plates.^cViable cell number measured by trypan blue dye exclusion method.^dColony forming efficiency.^eMitotic index (percentage of solvent control).^fFrequency(%) of chromosomal aberrations per 100 cells.

NT; not tested, TOX; few analyzable metaphase cells.

MNNG では、CFE, Cell number, および MI の結果はほぼ同様の用量反応曲線を示したが、Monocellater により求めた細胞毒性の結果は、これよりも弱いものとなった。MNNG で処理した場合には細胞が膨化し、溶媒対照と同等の細胞密度を示した濃度でも、実際の生細胞数は溶媒対照の 50% にまで減少していた。Potassium bromate で処理した細胞では、CFE の急激な減少が

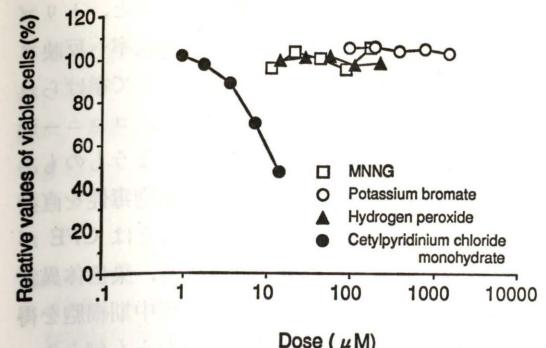


Fig. 1. Dose-response curves for 4 chemicals tested by LDH release assay. Only the cetylpyridinium chloride monohydrate showed dose-dependent cytotoxicity.

認められたが、他の指標による細胞毒性はほぼ同じ用量反応曲線を示した。Hydrogen peroxide では、それぞれの指標より異なった用量反応曲線が得られ、Monocellater による結果が最も弱く、MI と CFE の direct 法の結果が最も強い細胞毒

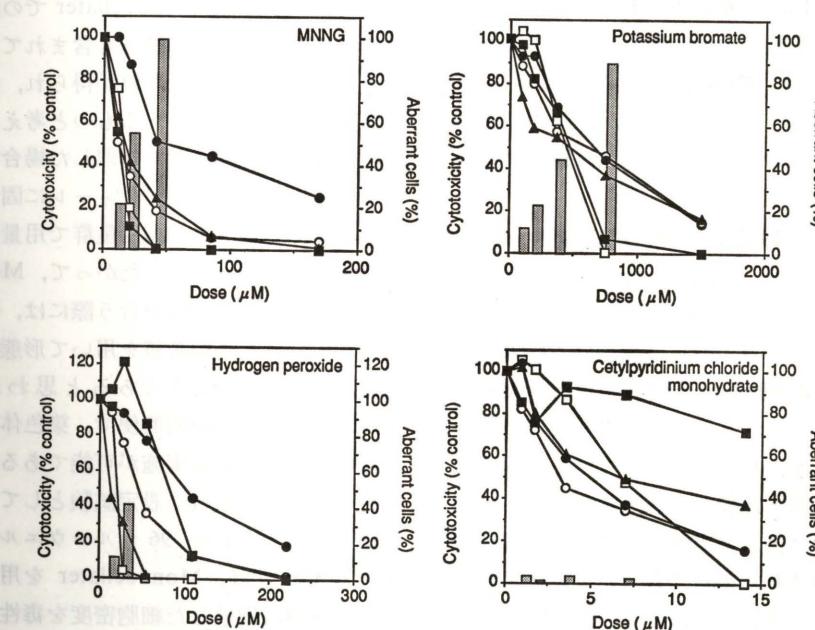


Fig. 2. The results of cytotoxicity tests and chromosomal aberration test in CHL/IU cells treated with MNNG, potassium bromate, hydrogen peroxide, and cetylpyridinium chloride monohydrate. Cell growth inhibition measured by monocellater (●) and viable cell number (○) were measured after 48 hours treatment. Mitotic index (▲) was counted after 24 hours treatment. Colony forming efficiency was tested both direct (□) and replate (■) method. Columns show the frequency of aberrant cells per 100 cells.

性を示した。特に MI は、細胞がほとんど死滅しているか、分裂細胞がほとんど無いため、高用量群での算出は不可能であった。Cetylpyridinium chloride monohydrate の場合には、ほとんどの試験法でほぼ同様の用量反応曲線を示したが、CFE の replate 法では濃度に依存した細胞毒性が認められなかった。

MNNG, potassium bromate, および hydrogen peroxide の処理によって、染色体の構造異常の出現頻度は濃度依存的に上昇した。しかし、cetylpyridinium chloride monohydrate では、分裂細胞がほとんど無くなり、観察が不可能になるような高濃度で処理しても、染色体異常の誘発は認められなかった。

全体的に CFE は他の試験法と比較して強い細胞毒性を示し、この傾向は Direct 法で特に強く認められた。また、Monocellater を用いて求めた細胞増殖抑制は、他の指標と比較して同程度、あるいは若干弱いものであった。その他の指標に

は、特定の傾向は認められなかった。

考 察

LDH 法は、主に界面活性剤の細胞毒性検出系として開発された試験方法である。この方法は、細胞膜破壊とともに遊離 LDH 活性を測定することにより、細胞死を直接的に定量できるという利点を有している。一方、添加した被験物質が、測定サンプルである培養上清に混在するため、被験物質が LDH 活性を直接阻害するような場合は測定が不可能となる。また、血清自身が LDH を多量に含んでいるため、血清存在下では試験の感度が著しく低下するという欠点をも持ち合わせている。そこで今回は、LDH 法の利点を生かすため、Sasaki らの方法 (1992) に従い、LDH 法が染色体異常試験の簡便な濃度設定試験となり得るかを検討した。しかし、今回試験に用いた化合物の中では、cetylpyridinium chloride monohydrate でのみ毒性反応が認められた。試験化合物による LDH 活性の直接阻害は認められなかったことから、LDH 法は界面活性剤のように速やかに細胞膜の融解を起こす化合物の毒性検出法としては優れているが、DNA に直接あるいは間接的に作用して細胞毒性を引き起すが、速やかに細胞膜の融解をもたらさない化合物には適さないことが確認された。

Armstrong ら (1992) は各種の細胞毒性と染色体異常の関係を調べ、CFE が最も感度の高い方法で、染色体異常試験の細胞毒性指標として最も適しているとしている。彼らの方法は、CHO 細胞を用い、検体処理時間は 3 時間で行われたもので、今回の試験プロトコールとは異なっている。我々の結果からも、CFE はすべての化合物において、他の試験法と比較して高感度であり、細胞毒性試験としては優れた方法であることが確認された。しかし、CFE の試験条件は、染色体異常試験とは異なる点が多いため、いくつかの問題点を持っている。Direct 法では検体添加時の細胞密度が低いことや検体の処理時間 (6 日間) が長いことが挙げられる。Replate 法は細胞密度や増殖状態、検体処理時間という点では、染色体異常試験の条件と適合しているが、処理後、細胞を播種

し直すため、試験方法が煩雑になること、トリプシン処理の影響が、後のコロニー形成率へ反映される可能性があることが問題点として挙げられる。染色体異常を持つ細胞の中には、コロニー形成の細胞分裂の過程で選抜されてしまうものもあり、必ずしも染色体標本作製時の細胞毒性を直接反映しないと考えられる。このことは CFE が 0% に近い値をとる濃度であっても、染色体異常試験の条件では、観察に必要な分裂中期細胞を得ることができる場合があったことからも伺える。そのため、50% コロニー形成阻害濃度を染色体異常試験の処理濃度とすることには問題があると考えられた。

MI は、分裂細胞の割合を直接求める方法であるため、染色体観察の可否を直接反映している。しかし、濃度設定のための予備試験として考えた場合、観察に時間を要し、簡便性に欠ける方法である。

Monocellater を用いた細胞密度の測定による細胞増殖抑制試験は、他の指標と比較して低感度であった。これは、Monocellater での測定結果には培養の過程で死んだ細胞も含まれており、実際の生細胞数よりも大きな値が得られ、細胞毒性の検出感度としては低くなるものと考えられる。また、被験物質を高濃度で処理した場合には、急激な毒性作用のため細胞がシャーレに固定された状態となり、見かけ上、高用量群で用量反応曲線が上昇することがある。したがって、Monocellater を用いて増殖抑制試験を行う際には、細胞を固定する前に、位相差顕微鏡を用いて形態や増殖状態を確認することも必要であると思われる。しかし、本試験法は比較的簡便で、染色体異常試験と同様の条件での試験実施が可能であるため、被験物質の試験濃度領域の設定試験として使用できる方法であった。また、96 マルチウェルプレートを用いる CV 法は、Monocellater を用いる方法と同様、単層に増殖した細胞密度を毒性の指標としているため、両者の間には高い相関性が認められ、直接法の場合には、CV 法が染色体異常試験の濃度設定試験として利用できることがわかった。しかし、代謝活性化を行う場合や揮発性の化合物を試験するときなど、解決すべき問題点もある。

タルバイオレット染色を用いる方法 (CV 染色法)、細胞トキシコロジー試験法 (黒田行昭ら編), 朝倉書店, pp. 73-75.

Sasaki, K., N. Tanaka, M. Watanabe and M. Umeda (1991) Comparison of cytotoxic effects of chemicals in four different cell types, *Toxicol. In Vitro*, **5**, 403-406.

Sasaki, T., K. Kawai, K. Saijo-Kurita and T. Ohno (1992) Detergent cytotoxicity: simplified assay of cytolysis by measuring LDH activity, *Toxicol. In Vitro*, **6**, 451-457.

Scott, D., B. J. Dean, N. D. Danford and D. J. Kirkland (1990) Metaphase chromosome aberration assays in vitro, In: Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended procedures, D. J. Kirkland (Ed.), 62-86. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

祖父尼俊雄 (1991) 培養細胞を用いる染色体異常試験、毒性試験講座 12 変異原性、遺伝毒性 (石館基編), 地人書館, pp. 79-87.

渡辺正己 (1991) コロニー形成阻害、細胞トキシコロジー試験法 (黒田行昭ら編), 朝倉書店, pp. 77-81.

第22回大会シンポジウム

「トランスジェニックアニマルを用いる *in vivo* 遺伝子突然変異試験—意義と問題点」

Plasmid-Based Transgenic Animal Models for Mutagenicity Studies: Increased Sensitivity and Higher Efficiency

J. A. Gossen^{1,2}, H.-J. Martus¹ and J. Vijg^{1,2}

¹Harvard Medical School, Beth Israel Hospital, 330 Brookline Avenue,
Massachusetts 02215 and ²Ingeny B.V., Einsteinweg 5,
P. O. Box 685, 2300 AR Leiden, The Netherlands

(Received on Feb. 22, 1994; Revised on Feb. 22, 1994)

Summary

Gene mutations have been implicated in the etiology of cancer, developmental anomalies, genetic disease and aging. Many different methods for mutation detection have been developed and applied to obtain a more fundamental insight in the chain of molecular events that ultimately lead to mutations. Most of these methods, however, can only be applied to cultured cells and therefore do not allow comparative analysis of mutations in various organs and tissues in an intact organism. The main difficulty in studying mutagenesis in chromosomal DNA is to identify and isolate mutated genes with a high efficiency. Recently, bacteriophage lambda LacZ and LacI transgenic mouse models have been described for studying, in different organs and tissues, spontaneous or induced mutations. Such models allow study of the induction of DNA damage, repair, mutagenesis, and carcinogenesis in one animal system. Unfortunately, these models are only able to detect small mutations; deletions and insertion type of events go undetected except when they are very small. Here we describe a more complete plasmid-based LacZ transgenic mouse model that allows the detection of the complete spectrum of mutations in an efficient was and at low cost.

Keywords: transgenic animal models; deletions; insertion; complete spectrum of mutations

Introduction

In view of the alleged causal relationship between the mutagenic action of chemicals and their carcinogenicity, *in vitro* test systems have been developed for the assessment of the mutagenic potential of compounds. The *in vitro* assay most extensively used for testing the mutagenicity of chemicals is the Ames Salmonella test (Ames *et al.*, 1973; Maron and Ames, 1983). This assay is based on the use of a set of histidine-requiring strains of the bacterium *Salmonella typhimu-*

rium. It is called a reverse-mutation assay because the bacterial strains used in this assay are mutated in one of the genes of the histidine biosynthetic pathway and, consequently, cannot synthesize histidine, an essential amino acid. An additional mutation is required to revert the cells to histidine independence. One of the limitations of using prokaryotic assays is that bacteria lack many of the metabolic enzyme pathways present in mammalian cells, some of which may actually convert compounds into muta-

Address for correspondence: J. Vijg, Harvard Medical School, Beth Israel Hospital, 330 Brookline Avenue, Massachusetts 02215; TEL 617 735 4580; FAX 617 735 3346

genic agents. Mammalian metabolism can be mimicked *in vitro* by adding rodent liver homogenate (S9) to the assay. The enzymes in this homogenate may activate compounds that would otherwise be non-mutagenic.

It has now been shown that the Ames test has a sensitivity (percentage of established carcinogens identified as mutagens) of 54% and a specificity (percentage of non-carcinogens identified as non-mutagens) of 70% (Zeiger *et al.*, 1987). Similar results were obtained by Tennant *et al.* (1987) who reported that the Salmonella assay would only identify about 45% of the established carcinogens. Although the Ames test has been reevaluated using more stringent criteria, which resulted in an increased specificity, the sensitivity was also significantly reduced (Prival and Dunkel, 1989). In addition, inclusion of three other short-term *in vitro* assays (the mouse micronucleus assay, chromosome aberrations and sister chromatid exchanges), did not significantly improve the performance of *in vitro* assays for predicting rodent carcinogenicity (Tennant *et al.*, 1987; Haseman *et al.*, 1988).

To test for the carcinogenic effect of a chemical *in vivo*, the long-term rodent carcinogenicity assay now serves as legislated standard for assessing carcinogenic risk, and the specific locus test serves as the standard for the assessment of heritable damage. In the long-term carcinogenicity assay, rodents are treated acutely or subchronically with a chemical and the animals are monitored during their life-time for the occurrence of tumours. Large studies have shown that this assay has a low specificity but a high sensitivity; all definite human carcinogens tested were positive (Ennever *et al.*, 1987). However, long-term rodent carcinogenicity studies are expensive, time-consuming (3 to 4 years), require high numbers of experimental animals and are often conducted at high, near toxic doses that do not reflect the low dose ranges humans are exposed to. Attempts to extend these investigations to lower dose ranges, however, are limited since these are even more time-consuming and expensive because of the still larger number of animals that would be required.

Recently, Ames and Gold suggested that treating rodents with near toxic doses of a test chemical for long periods of time may cause chronic mitogenesis (Ames and Gold, 1990a and 1990b), which may account for the high number of chemicals positive in the long-term rodent carcinogenicity assay (50% of all chemicals tested so far; Abelson, 1990; 1992). This view has been contested (Hay, 1991; Weinstein, 1991), but a definite conclusion cannot be reached since data on rodent carcinogenicity at low dose levels are scarce, and comparison with *in vivo* mutagenesis data is virtually impossible because of lack of data (except for the HPRT and HLA-A locus).

In order to study the mutagenic effects of potential mutagenic agents in germ cells, the mouse specific locus test was developed (Russell, 1951). This method is the most efficient one to screen for transmitted germ-cell mutations, and it has provided important information on factors affecting the mutation rate in germ cells. The method involves mating homozygous wild type mice, treated or controls, to untreated tester stock mice, homozygously recessive at seven marker loci. Six of these loci control coat pigmentation color or pattern and the seventh locus controls the size of the external ear. The offspring is subsequently analyzed for phenotypic changes due to a mutation in one or more of the seven marker loci. In the newer biochemical specific locus test, mutagenic effects are determined by assaying changes in the electrophoretic pattern in selected, accessible gene products. The advantage of this biochemical test is that mutagenic effects in 33 different loci are determined, increasing the potential sensitivity of the test as well as reducing the numbers of animals needed. The advantages of these assays are that methods to screen for mutations are simple and fast and, since the animals are alive, presumed mutations can be subjected to genetic analysis. The general disadvantages of these assays, however, are that they require thousands of animals and treatments are usually performed using high doses of a potential mutagen.

In summary, other systems for the assessment of the mutagenicity of chemicals are

needed, yielding results that are more relevant for the mammalian (human) situation than the present assays do and/or are less demanding with respect to costs, time or the number of animals. Preferably, these systems should detect mutations in genes present in the mammalian genome and—if possible—should be applicable in *in vivo* experiments.

Transgenic Mouse Models for Studying the Mutagenic/Carcinogenic Effects of Chemicals

Transgenic animal technology has been applied in developing improved mutagenicity/carcinogenicity testing systems (for a review, see Cordaro, 1989). The approaches used include germline transmission of oncogenes to increase the sensitivity for chemical-induced tumor formation. The transgenic mice described are characterized by high levels of expression of e.g. the *myc* oncogene (Stewart *et al.*, 1984) and *pim-1* oncogene (Breuer *et al.*, 1989). Studies in which *pim-1* transgenic mice were treated with ethylnitrosourea (ENU) indicate that such a transgenic mouse model can be used as sensitive system for studying the carcinogenicity of chemicals. However, since these oncogenes control development of only a fraction of all possible tumors in a limited number of tissues, the applicability of these models as a short-term carcinogenicity assay is very limited (Tennant *et al.*, 1993). In addition, assays based on the use of these animals are still time-consuming, require histo-pathological examination and are painful for the animal.

A second approach is based on the use of shuttle vectors, harboring a bacterial reporter gene, to study gene mutations *in vivo*. Two different types of such transgenic mouse models are presently available and are described separately.

Bacteriophage Lambda-Based Transgenic Mouse Models

A transgenic mouse model based on the use of a bacteriophage lambda shuttle vector containing the bacterial *lacZ* gene as a target for mutagenesis was first described by Gossen *et al.* (1989). This transgenic mouse model was constructed by micro-injection of about 150 copies of the bacteriophage lambda gt10-

LacZ shuttle vector into fertilized CD 2 mouse oocytes. Transgenic mice which develop from such micro-injection experiments usually carry multiple copies of the foreign DNA in a head-to-tail arrangement at a single site in the genome. Rescue of these vectors is performed by exposing total genomic DNA, isolated from different organs or tissues, to an *E. coli* *in vitro* packaging extract. During the process, the terminase enzyme present in the packaging extracts recognizes and cuts the lambda cos-sites, resulting in the formation of single lambda molecules each of which is packaged into an empty phage-head. Phages are then plated on a LacZ⁻ *E. coli* strain in the presence of the chromogenic substrate X-Gal for selection of mutant and non-mutant LacZ phages. Initial rescue efficiencies, however, were extremely low which appeared to be due to the fact that the bacteriophage lambda shuttle vectors integrated in chromosomal DNA of transgenic mice were highly methylated (Gossen *et al.*, 1989). An attempt was, therefore, made to improve the rescue efficiency by the use of MCR-A⁻ and MCR-B⁻ *E. coli* hosts. MCR-A and MCR-B are methylation-dependent host restriction systems present in *E. coli* K12 which attack and degrade DNA that is methylated at specific positions. Raleigh *et al.* (1988) demonstrated the importance of using MCR-A⁻ and MCR-B⁻ *E. coli* K12 strains for cloning methylated DNA fragments. However, methylated DNA from the mammalian genome can not be efficiently rescued and cloned by using such strains. Indeed, only by using *E. coli* C, a strain which appeared to lack the ability to restrict foreign DNA (Wood, 1966), in combination with packaging extracts derived from the same or other host restriction negative *E. coli* strains, high rescue efficiencies were obtained (Gossen and Vijg, 1988). The importance of *E. coli* C and other comparable *E. coli* strains for the rescue of genomic DNA from eukaryotes, has since then amply been confirmed (Grant *et al.*, 1990; Kohler *et al.*, 1990).

Mutation frequencies for a particular organ or tissue are determined as the ratio between colorless (mutated) and blue (non-mutated) plaques. More recently a selective system

has been developed which allows the growth of mutant LacZ phage only. This system is based on the use of a GalE⁻ *E. coli* host which is highly sensitive for galactose (Gossen and Vijg, 1993). Since the β -galactosidase enzyme encoded by the LacZ gene converts lactose into galactose, non-mutant LacZ phages are unable to propagate when plated on this strain in the presence of lactose or lactose analogues such as phenyl- β -D-galactoside: the GalE⁻ *E. coli* host cells lyse before the LacZ phages have time to multiply and infect neighboring cells. The applicability of this system to reproducibly detect low numbers of LacZ⁻ phage among large numbers of LacZ⁺ phage on one 9-cm petri dish was tested by plating different mixtures of LacZ⁺/LacZ⁻ phage on selective and non-selective medium. The results (Gossen and Vijg, 1993), indicate that LacZ⁻ phage are easily detectable, even in the presence of a 3×10^3 fold excess of LacZ⁺ phage. The laborious task of analyzing large numbers of plaques to accurately determine mutation frequencies has therefore become redundant.

On the basis of the same principle other transgenic mutation models have been described. One of these models was not based on LacZ as the mutational target gene but on LacI (Kohler *et al.*, 1991). The LacI gene encodes the Lac repressor protein which, by binding to the operator sequence in front of the LacZ gene, is able to negatively regulate LacZ expression. Consequently, infection of LacZ⁺ *E. coli* host cells with phages containing a non-mutant LacI gene will give rise to colorless plaques, and phages containing a mutant LacI gene will give rise to blue plaques. Also for this system methods are presently under development to select phage containing a mutant LacI gene, thereby reducing the amount of time and labor to determine mutation frequencies (Lundberg *et al.*, 1993).

Plasmid-Based Transgenic Mouse Models

In addition to lambda-based models, more recently transgenic mouse models for mutagenesis studies based on the efficient rescue of plasmid vectors from genomic DNA, has been generated. In this approach, rescue of

LacZ-containing plasmid vectors is based on the binding of the Lac repressor protein to the operator sequence located in front of the LacZ gene. LacZ containing plasmids are released from the genomic DNA by excision with a restriction enzyme, followed by coupling to the Lac repressor protein which is conjugated to a magnetic support particle. The use of a magnetic particle concentrator then allows to specifically recover LacZ plasmid sequences. After circularization, the concentrated plasmids are transferred into a bacterial host by means of electroporation (Gossen *et al.*, 1993b). Using the same GalE⁻ *E. coli* C strain as described for the bacteriophage lambda-based system, also this system allows to select for colonies harboring mutant vectors (Gossen *et al.*, 1992). This selection system allowed us to reproducibly detect low numbers of LacZ⁻ *E. coli* cells on one 9-cm diameter petri dish among large numbers of LacZ⁺ *E. coli* cells, when different mixtures of LacZ⁺/LacZ⁻ cells were plated on selective and non-selective medium. The sensitivity of the system was such that LacZ⁻ colonies were easily detectable, even in the presence of a 10^3 fold excess of LacZ⁺ colonies (Gossen *et al.*, 1992).

Plasmid vectors offer the distinct advantage of having a size which is only 1/10 of a bacteriophage lambda vector; the average size of a LacZ-containing plasmid is 5 kb and that of a bacteriophage lambda vector 50 kb. Due to the large size of the latter and the fact that some of the bacteriophage lambda-based transgenic mice carry up to 80 copies at a single genomic site (4×10^6 bp), high molecular weight DNA must be isolated in order to rescue intact vectors with reasonable efficiencies. In general, however, the average size of genomic DNA isolated from organs or tissues is about 200–300 kb, indicating that multiple double strand breaks will be present within the lambda concatemer. Because of the relatively small size of plasmid vectors, the presence of double strand breaks every 200–300 kb will not interfere with plasmid rescue.

A second advantage of plasmid rescue is that, owing to the high capacity of LacI repressor magnetic beads, large amounts of

DELETION DETECTION IN TRANSGENIC ANIMAL MODELS

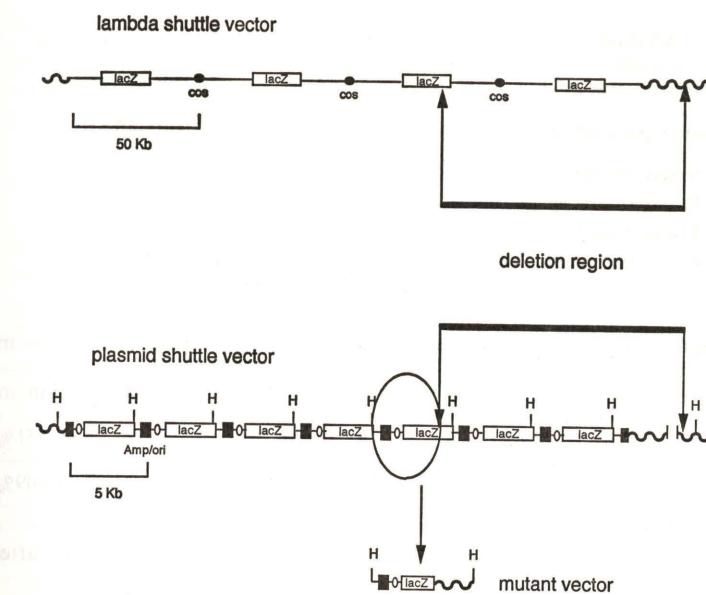


Fig. 1. Schematic representation of the plasmid vector cluster integrated in the mouse genome. Deletion mutations can occur within the cluster or can include mouse chromosomal DNA. These mutations can all be detected provided the origin of replication (O) and the ampicillin resistance gene (black box) are kept intact (illustrated in the figure). Large deletions in the bacteriophage lambda vector always go undetected because such vectors can no longer be packaged; plasmids do not suffer from that problem. Note also the dramatically smaller size of the plasmid cluster as compared to the phage cluster.

plasmid can be purified from restriction-enzyme digested genomic DNA in a single step. Although bacteriophage lambda vectors also can be purified from genomic DNA, using field inversion gel electrophoresis of genomic DNA digested with a restriction enzyme which cuts outside the lambda concatemer (Gossen *et al.*, 1989), the inclusion of this complex procedure is time-consuming. Finally, the major advantage of plasmid systems involves their potential in detecting large mutations. Bacteriophage lambda models have proven to be incapable of detecting large mutational events. In part this can be explained by the size-limitation in packaging such vectors; when they are smaller than about 42 kb they will not be packaged. With plasmid systems there is no such size limitation; provided a deletion event will not remove the origin of replication and the antibiotic resistance gene, the resulting

construct can be cloned. This is not only true for deletions in the plasmid cluster, but also for deletions involving mouse genomic DNA. This is illustrated in Fig. 1.

However, the size limitation of bacteriophage lambda rescue does not explain the lack of size mutations in the order of a few kb or less. A possible explanation for this phenomenon could be the large stretch of prokaryotic DNA encompassed by the vector cluster in the mammalian genome. It is tempting to speculate that such a large stretch of silent DNA inhibits the occurrence of large mutational events, which is an argument to keep the vector cluster as small as possible. The availability of several plasmid-containing transgenic mouse lines allowed us to test the distinct advantages predicted above.

Table 1 shows the efficiency of the magnetic bead system in rescuing the vector contain-

Table 1. Plasmid and bacteriophage lambda rescue efficiencies from transgenic mouse liver DNA

| Method | # Colonies/Plaques | Rescue efficiency ¹ |
|-----------------|------------------------|-----------------------------------|
| Plasmid rescue | 2,375,000 ² | 237,500 ³ cfu/ μ g |
| Phage packaging | 78,750 ⁴ | 10,500 ⁵ pfu/ μ g |

¹ Based on about 40 copies integrated in the mouse genome.

² Based on 10 μ g genomic DNA in a single experiment.

³ Transformation efficiency is 10¹⁰ cfu/ μ g plasmid DNA.

⁴ Based on 7.5 μ g genomic DNA in multiple experiments.

⁵ Packaging efficiency is 10⁹ pfu/ μ g lambda DNA.

Table 2. Spontaneous mutation frequencies and the percentage of deletion mutants

| Tissue | Spont. Mut. frequency ¹ | # Mutants analysed | # Deletion mutants ² |
|--------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| Brain | 8.5±1.3×10 ⁻⁵ | 61 | 31 (51%) |
| Liver | 8.5±3.8×10 ⁻⁵ | 72 | 35 (49%) |

¹ Average of 4 animals.

² About 0.1 kb or larger as detected by 1% agarose gel electrophoresis after double digestion with Pst I and Sac I.

ing the mutational target gene from mouse genomic DNA. In this particular experiment the DNA was obtained from a CD2 transgenic mouse model harboring approximately 40 copies of the LacZ-containing plasmid. Each plasmid was inserted into a bacteriophage lambda vector in order to allow direct comparisons of the efficiencies. Clearly, the plasmid system is an order of magnitude more efficient calculated on a per copy basis.

One possible reason for not being able to detect deletion-type of mutations in bacteriophage lambda models besides the size-restrictions for packaging is the large vector cluster, encompassing more than a million bp of prokaryotic DNA. Indeed, even deletion-type of mutations involving only one or a few kb were never found. For this reason we generated C57Bl/6 transgenic mice with LacZ-containing plasmids alone in limited copy number. Table 2 shows that about 50% higher spontaneous mutation frequencies were found as compared to the bacteriophage lambda models. It turned out that this excess of spontaneous mutations can be explained by the occurrence of large mutational events, predominantly deletions (Table 2). Indeed, some so-called complex mutations were demonstrated to contain mouse genomic DNA

as predicted from the schematic representation in Fig. 1 (see also: Gossen *et al.*, submitted for publication).

Future Prospects

In general, the results obtained so far with LacZ transgenic mice indicate that various organs and tissues, including germinal cells, can be analyzed for mutations. Such transgenic mouse models therefore allow direct correlation of mutations—the ultimate molecular endpoint of DNA damage and its (attempted) repair—with important physiological processes thought to be causally related to mutations, e.g. cancer (Loeb, 1989) and aging (Vijg, 1990). With respect to aging, significant increases in mutation frequencies have already been demonstrated in both the HPRT and HLA-A test for human lymphocytes (Trainor *et al.*, 1984; Grist *et al.*, 1992). For cancer, evidence has recently been obtained that specific chemicals leave mutational fingerprints in the tumors. Studies on mutant p53 tumor suppressor genes, isolated from breast (Runnebaum *et al.*, 1991), skin (Brash *et al.*, 1991) and hepatocellular (Bressac *et al.*, 1991) cancers of people exposed to cigarette smoke, UV light and aflatoxin B1, respectively, indicated that the mutational spectra found

were characteristic for the agents to which the different organs had been exposed. Transgenic mouse models can now be applied to confirm and significantly extend such studies, since they allow comparative analysis of mutations in many organs and tissues of the same animal.

To study the potential mutagenic effect of chemicals in relation to carcinogenesis, a number of validation studies are now in progress to test the applicability of transgenic genic mouse models as short-term *in vivo* mutagenicity assays. An important advantage of these transgenic mice is that studies on the mutagenicity of chemicals can be performed using low dose levels. Such an experimental approach would be more representative for the human situation, would overcome side effects like sustained tissue injury due to high dose treatments which may lead to chemicals being falsely identified as mutagens (Ames and Gold, 1990a; 1990b), and would no longer require to extrapolate data obtained in mice to low doses in humans. Ultimately transgenic mouse mutation models might even provide an alternative for long-term rodent bioassays.

Additional applications would be to generate mouse models which, in addition to bacterial reporter genes, would harbor genes encoding (human) drug metabolizing enzymes, like P-450. Such transgenic mouse models would combine metabolic with mutagenic endpoints and may provide a sensitive system to study the complex pathways of mutagen metabolism in humans. Alternatively, potential risk factors such as genes encoding DNA repair enzymes or tumor suppressor genes, like p53, could be inactivated by means of homologous recombination. The possibility to directly correlate risk factors with mutagenic endpoints would provide more insight in the role of each of these enzymes in the processes which ultimately lead to mutations.

Acknowledgements

This research was supported by the PBTS Grant BIO 91076 from the Dutch Ministry of Economic Affairs, Pepper Center Grant AG08812 and National Institutes of Health/

National Institute on Aging grant 1PO1 A610829-01.

References

- Ames, B. N., F. D. Lee and W. E. Durston (1973) An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 782-786.
- Ames, B. N. and L. S. Gold (1990a) Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 7772-7776.
- Ames, B. N. and L. S. Gold (1990b) Too many rodent carcinogens: Mitogenesis increases mutagenesis, Science, **249**, 970-971.
- Abelson, P. H. (1990) Testing for carcinogens with rodents, Science, **249**, 1357.
- Abelson, P. H. (1992) Exaggerated carcinogenicity of chemicals, Science, **256**, 1609.
- Brash, D. E., J. A. Rudolph, J. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin and J. Ponton (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 10124-10128.
- Bressac, B., M. Kew, J. Wands and M. Ozturk (1991) Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa, Nature, **350**, 429-431.
- Breuer, M., R. Siebos, S. Verbeek, M. van Lohuizen, E. Wientjes and A. Berns (1989) Very high frequency of lymphoma induction by a chemical carcinogen in pim-1 transgenic mice, Nature, **340**, 61-63.
- Cordaro, J. C. (1989) Transgenic mice as future tools in risk assessment, Risk Analysis, **9**, 157-168.
- Ennever, F. K., T. J. Noonan, H. S. Rosenkranz (1987) The predictivity of animal bioassays and short-term genotoxicity tests for carcinogenicity and non-carcinogenicity to humans, Mutagenesis, **2**, 73-78.
- Gossen, J. A., W. J. F. de Leeuw, C. H. T. Tan, P. H. M. Lohman, F. Berends, D. L. Knook, E. C. Zwarthoff and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying gene mutations *in vivo*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 7971-7975.
- Gossen, J. A., A. C. Molijn, G. R. Douglas and J. Vijg (1992) Application of galactose-sensitive *E. coli* strains as selective hosts for LacZ-plasmids, Nucleic Acids Res., **20**, 3254.
- Gossen, J. A. and J. Vijg (1988) *E. coli* C: a convenient host strain for rescue of highly

- methylated DNA, Nucleic Acids Res., **16**, 9343.
- Gossen, J. A. and J. Vijg (1993) A selective system for LacZ⁻ phage using a galactose-sensitive *E. coli* host, BioTechniques, **14**, 326-330.
- Gossen, J. A., W. J. F. de Leeuw, A. C. Molijn and J. Vijg (1993) Plasmid rescue from transgenic mouse DNA using LacI repressor protein conjugated to magnetic beads, BioTechniques, **14**, 624-629.
- Grist, S. A., McCarron, A. Kutlaca, D. R. Turner and A. A. Morley (1992) *In vivo* human somatic mutation: frequency and spectrum with age, Mutat. Res., **266**, 189-196.
- Haseman, J. K., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger and R. W. Tennant (1988) Do short-term tests predict rodent carcinogenicity? Science, **241**, 1232-1233.
- Hay, A. (1991) Carcinogenesis: Testing times for the tests, Nature, **350**, 555-556.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, Sorge, D. L. Putman and J. M. Short (1991) Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the LacI gene in transgenic mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 7958-7962.
- Loeb, L. A. (1989) Endogenous carcinogenesis: Molecular oncology into the twenty-first century—Presidential address, Cancer Res., **49**, 5489-5496.
- Lundberg, K. S., P. L. Kretz, G. S. Provost and J. M. Short (1993) The use of selection in recovery of transgenic targets for mutation analysis, Mutat. Res., **301**, 99-105.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutat. Res., **113**, 172-215.
- Prival, M. J. and V. C. Dunkel (1989) Reevaluation of the mutagenicity and carcinogenicity of chemicals identified as "false positives" in the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay, Environ. Molec. Mutagen., **13**, 1-24.
- Raleigh, E. A., N. E. Murray, Revel, R. M. Blumenthal, D. Westaway, A. D. Reith, P. W. J. Rigby, J. Elhai and D. Hanahan (1988) McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning, Nucleic Acids Res., **16**, 1563-1575.
- Runnebaum, A., M. Nagarajan, M. Bowman, D. Soto and S. Sukumar (1991) Mutations in p53 as potential molecular markers for human breast cancer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 10657-10661.
- Russell, W. L. (1951) X-ray-induced mutations in mice. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **16**, 327-356.
- Stewart, T. A., P. K. Pattengale and P. Leder (1986) Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MMTV/myc fusion genes, Cell, **38**, 627-637.
- Tennant, R. W., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger, J. K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, B. Anderson and R. Minor (1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays, Science, **236**, 933-941.
- Tennant, R. W., G. N. Rao, A. Russfield, S. Seilkop and A. G. Braun (1993) Chemical effects in transgenic mice bearing oncogenes expressed in mammary tissue, Carcinogenesis, **14**, 29-35.
- Trainer, K. J., D. J. Wigmore, A. Chrysostomou, J. L. Dempsey, R. Seshadri and A. A. Morley (1984) Mutation frequency in human lymphocytes increases with age, Mech. Age. Develop., **27**, 83-86.
- Vijg, J. (1990) DNA sequence changes in aging: How frequent, how important? Aging., **2**, 105-123.
- Weinstein, B. (1990) Mitogenesis is only one factor in carcinogenesis, Science, **251**, 387-388.
- Zeiger, E. (1987) Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 53-65 (1994)

第22回大会シンポジウム

「トランジエニックアニマルを用いる *in vivo* 遺伝子突然変異試験—意識問題点」

トランジエニックマウスを用いた環境変異原検定系の開発

Development of new risk assessment test by using transgenic mice

権藤洋一¹, 池田由美子², 茂木淑子^{2*}, 竹下綾³,

高橋美千江⁴, 中尾和貴¹, 勝木元也¹

Gondo¹, Y., Y. Ikeda², Y. Motegi^{2*}, A. Takeshita³, M. Takahashi⁴,
K. Nakao¹ and M. Katsuki¹

¹九州大学生体防御医学研究所 〒812 福岡市東区馬出3-1-1, ²北里大学衛生学部分子生物学教室 〒228 相模原市北里1-15-1, 東海大学医学部分子生命科学, ³共同利用研究室機能形態部門 〒259-11 伊勢原市望星台, ⁴三菱化成生命科学研究所生殖工学開発室 〒194 町田市南大谷11号(現住所)

¹Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812,
²Laboratory of Molecular Biology, School of Hygienic Sciences, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Sagamihara 228, ³Division of Molecular Life Science and ⁴Laboratories for Structure and Function Research, Tokai University, School of Medicine, Bohseidai, Isehara 259-11, *Present Address: Reproductive Engineering Section, Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, 11 Minami-Ooya, Machida 194, Japan

(受付: 1994年3月25日; 受理: 1994年3月25日)

Summary

We have developed HITEC (hypersensitive *in vivo* test of carcinogenicity) mice by using transgenic techniques. The transgene contains the wild-type *rpsL* gene of *E. coli* in a form of a shuttle plasmid vector, pML4. The wild-type of the *rpsL* gene exhibits a dominant trait of streptomycin sensitive in the *E. coli* system. Thus, when the pML4 plasmid is introduced into streptomycin-resistant *E. coli* cells, it will transform the host cells to the streptomycin sensitive phenotype. If a forward mutation is arisen in the *rpsL* gene, however, the mutant phenotype becomes streptomycin resistant. The pML4 carrying a mutant *rpsL*, therefore, no longer transforms the host *E. coli* cells to streptomycin sensitive; rather, they will remain streptomycin resistant. In this principle, we can detect the mutations of the *rpsL* transgene in the HITEC mouse genome by the efficient recovery of the shuttle vector from the genome followed by the transformation of the host *E. coli* with the rescued shuttle vector. Consequently, the HITEC system could provide a quick-and-easy risk assessment test for tissue-specific mutagenicity.

We have established more than 20 HITEC mouse lines so far. Some of them carried more than 300 copies of the pML4 transgene as a head-to-tail tandemly repeated structure. We tested the applicability of the system for the actual assay, by using one of the established HITEC mouse lines that contained such high copy numbers of the shuttle vector. We found that an electroporation method gave rise to a sufficient transformation efficiency of *E. coli* with the shuttle vector rescued from HITEC DNA, and that the background mutation rate was low enough (less than 5×10^{-5}).

Keywords: mutagenesis, transgenic mouse; somatic mutation, risk assessment

1. 序

環境変異原の検定やその発がんリスクの評価は、環境汚染や食品添加物の問題を抱える現代生活にとって緊急で切実な課題である。この課題に応えるためこれまで多くの努力と研究がなされてきた。我々もマウス個体を対象にして簡便鋭敏に変異原の検定が行なえる方法を開発している。マウス個体の体細胞突然変異の測定は、標的すべき遺伝子を簡単に取り出すことが難しく、实际上不可能である。そこで、モニター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成することとした。モニター遺伝子として、大腸菌にて突然変異を容易に検出できる野生型 *rpsL* 遺伝子を選んだ。この野生型 *rpsL* 遺伝子は大腸菌系で優性のストレプトマイシン感受性を優性伝達し、ストレプトマイシン耐性の宿主大腸菌をストレプトマイシン感受性に形質転換する。このとき *rpsL* 遺伝子に突然変異が生じていると、この形質が失われるため、遺伝子が導入されても宿主大腸菌はストレプトマイシン耐性のままとなり、容易に検出できる。実際に、この系は大腸菌系での突然変異機構の解析に用いられており、真木、関口らによって報告されている (Mo ら, 1991)。

我々は、野生型 *rpsL* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成した。このマウス個体は全ての体細胞にこのモニター遺伝子をもつ。そこで、このトランスジェニックマウスに突然変異を誘発すれば、導入遺伝子である野生型 *rpsL* 遺伝子にも同様に突然変異が誘発されると考えられる。トランスジェニックマウスの各組織から導入遺伝子 *rpsL* を回収し、ストレプトマイシン耐性の宿主大腸菌に形質転換法を施せば、トランスジェニックマウス個体内で生じた突然変異をストレプトマイシン耐性コロニーとして、容易かつ鋭敏に検出できるであろう。

実験を簡便にするため、野生型 *rpsL* 遺伝子を含んだ大腸菌プラスミド全体をシャトルベクターとして導入し、トランスジェニックマウスを作成した。すなわち、トランスジェニックマウスからモニター遺伝子を回収し、簡便に形質転換ができる。我々は、このトランスジェニックマウス系統を HITEC (hypersensitive *in vivo* test of

carcinogenicity) マウスと呼んでいる。

HITEC マウスを用いて、体細胞に誘発される突然変異を高い精度で検定するためには以下の条件が必要である。1) マウス細胞あたり、モニター遺伝子が多く存在している方がわずかな突然変異も検出できる可能性が高まる。これには、シャトルプラスミドを多コピー導入した HITEC マウス系統を確立すればよい。導入シャトルベクターはマウスゲノムの一部として、安定に子孫へ伝わらねばならない。2) HITEC マウスのゲノムから効率よくシャトルベクターを回収し、より多くの大腸菌コロニーを形成させることで、突然変異を高度よく検出できる系とする。3) また、いかに多くのコロニーを検定できても、バックグラウンドの突然変異頻度自体が高いと誘発された突然変異は隠されてしまうので、バックグラウンドを可能な限り低く抑える解析方法を確立しなければならない。4) 最終的に、複数の HITEC マウスを用いて、様々な変異原の影響を、なるべく短期間内に検定できて初めて実用可能となるわけであるから、大規模な解析が可能となるよう、全検定手順は時間的、労力的にみても簡便容易でなければならぬ。

2. 新しいシャトルベクターとトランスジェニックマウスの作成

我々は、Hashimoto-Gotoh ら (1986) によって構築された野生型 *rpsL* 遺伝子を持つ pHSG664 をシャトルベクターとする、HIT003 および HITEC マウス系統を確立し、以下の知見を報告した (権藤ら, 1993)。HIT003 系統のシャトルベクターは安定に子孫へメンデルの法則に従って遺伝していた。PCR を用いれば、シャトルベクターの全長 2.7 kb を効率よく增幅回収できた。しかし、大腸菌を形質転換したところ高い突然変異頻度が観察され、PCR 過程における DNA 複製の誤りがバックグラウンドとして多く現われたものと考えられた。そこで、HIT003 ゲノムを、制限酵素を用いて消化し、電気泳動ゲルにて分画するという方法で、二倍体のマウスゲノム 6×10^9 塩基対中わずかに存在するシャトルベクターを直接ゲノムから回収する方法を試みた。回収した

E.coli Shuttle Vectors

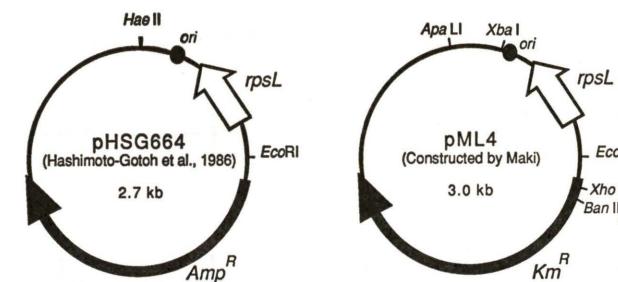


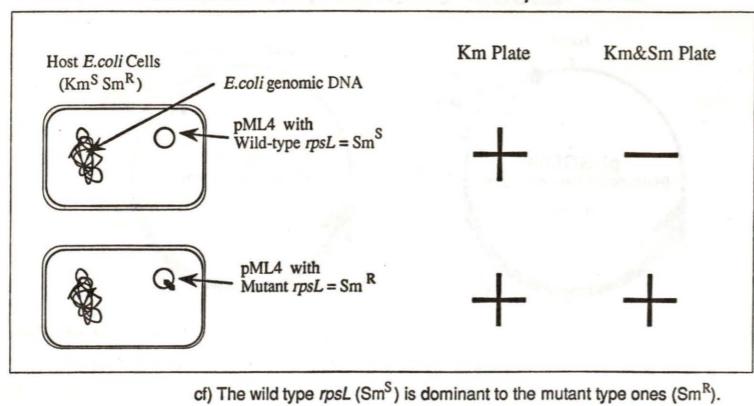
Fig. 1. シャトルベクター pHSG 664 と pML 4 の構造。pHSG 664 は Hashimoto-Gotoh ら (1986) によって開発された全長 2.7 kb の大腸菌の環状プラスミドであり、EcoRI, HaeII によって線状化できる。pML 4 は東大・分生研の真木寿治博士により構築された 3.0 kb の大腸菌の環状プラスミドで、EcoRI の他に ApaLI, XbaI, XhoI, BanII などで線状化できるが、HaeII の認識部位は複数あるので線状化には使えない。大腸菌内で活性をもつアンピシリン耐性遺伝子 *Amp^R*、カナマイシン耐性遺伝子 *Km^R*、ストレプトマイシン感受性遺伝子 *rpsL*、複製開始点 *ori* は、真核細胞では発現されない。全長 375 bp の *rpsL* が突然変異のモニター遺伝子である。pML 4 の *rpsL* の 6 番目のコドンはアンバーに置換されているが、アンバー・サブレッサーをもつ宿主大腸菌のなかではストレプトマイシン感受性形質を示す。

シャトルベクターで大腸菌を形質転換してみたところ、ひとつの臓器あたりに換算して 3×10^4 のコロニー相当数が得られた。しかし、分画に要する手間や、この得られたコロニー数から判断して、大規模な解析を行なうには無理がある。HIT003 はシャトルベクターを 2~5 コピー程度ゲノム内に導入遺伝子として持っており、また、上述の電気泳動分画では、約 100 倍ほどに導入遺伝子を濃縮している。この実験から次のことが考えられた。仮に 200~500 コピーを導入した HITEC マウス系統が樹立されれば、まず、ゲノム DNA 内で、すでに HIT003 よりも 100 倍濃縮されていることとなり、電気泳動による分画という繁雑かつ時間を要する作業は省くことが可能となる。さらに、1 臓器当たり得られる解析コロニー数も、HIT003 の 100 倍得られるはずで、大規模な解析が可能となるであろう (権藤ら, 1993)。以上的理由と、pHSG664 プラスミドの導入では、HIT003 の 1 系統しか確立できなかったことともあわせ、多コピーのシャトルベクターをもつトランスジェニックマウス系統を多数確立するための導入実験を新しく行なった。

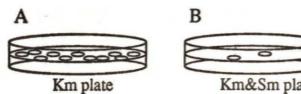
《シャトルベクター pML4》 新しく作成する HITEC マウスには、東大・分生研の真木寿治博士より供与された pML4 プラスミドを用いた。

この新しいシャトルベクターの構造を pHSG664 とともに Fig. 1 に示す。pHSG664 との大きな違いは、アンピシリン耐性遺伝子 (*Amp^R*) をカナマイシン耐性遺伝子 (*Km^R*) に置き換えていることである。アンピシリン耐性遺伝子やカナマイシン耐性遺伝子は、シャトルベクターが取り込まれた大腸菌総数を推定するために用いられ、突然変異を起こしたモニター遺伝子 *rpsL* の数は、ストレプトマイシンも含む培地にでてくるコロニー数から推定する。この原理を pML4 の場合を例として Fig. 2 に概説する。さて、HIT003 には pHSG664 を導入しており、アンピシリン耐性にて大腸菌の形質転換効率を測定していた。アンピシリン耐性のコロニーは、その周りに偽のサテライトコロニーを伴う (Sambrook ら, 1989) ことが知られている。この傾向はとくに多量の大腸菌をプレート上に播種して、そのなかからアンピシリン耐性コロニーを検出するとき顕著となる。眞のアンピシリン耐性コロニーと、偽のサテライトコロニーとの区別がつかなくなるのである。大多数のコロニーを検定しそのなかのわずかな突然変異コロニーを検出するという HITEC マウスの目的上、われわれは大腸菌およびシャトルプラスミドを必然的に高濃度で使用せざるを得ない。そのため、このサテライトコロニーの形成は、検定上大きな問題と

Positive Detection of Mutations in the *rpsL* Gene



The Number of Colonies and Estimation of the Mutation Frequency



$$\text{Mutation Frequency} = \frac{B}{A}$$

Fig. 2. ストレプトマイシン感受性の野生型 *rpsL* 遺伝子をもつ pML4 プラスミドを用いた突然変異の検出法の模式図。Fig. 1 に示すように、pML4 は、優性のストレプトマイシン感受性形質(野生型 *rpsL*)と優性のカナマイシン耐性形質(*Km^R*)を持っている。ストレプトマイシン耐性(*Sm^R*)かつカナマイシン感受性(*Km^S*)の宿主大腸菌に pML4 を導入すると、カナマイシンを含むプレートには生存できる(+)がカナマイシントストレプトマイシン両方を含むプレートには生存できない(-)。両方の薬剤を含むプレートには、pML4 の *rpsL* に突然変異が生じているときのみコロニーが形成される。この2つのプレートに生じるコロニー比から突然変異頻度を推定でき、ストレプトマイシン耐性コロニーから pML4 プラスミドを増殖回収し、*rpsL* 部分のシーケンシングを行ないどのような塩基配列の変化が生じているかも解析できる。

なっていた。また、pHSG664 (Hashimoto-Gotoh, 1986) は、ColE1 由来の pUC 派生体プラスミドであるにも拘らず、大腸菌内での増殖が難しい。このことは、とくに、塩基配列を決定して突然変異箇所を同定するために、突然変異コロニーからシャトルプラスミド DNA を調製する場合、大きな問題点となっていた。pML4 プラスミドを導入した大腸菌では、偽の耐性コロニーは現れず、また、プラスミド DNA の増殖率もよいので、上述の問題は pML4 を用いることで解決できる。さらに、pML4 に含まれる *rpsL* 遺伝子の第6番目のコドンをアンバーとしている(東大・分生研、真木博士、私信)ため、サブレッサー遺伝子(*supE*, *supF* など)を持たない宿主大腸菌を用いれば、*rpsL* 遺伝子の発現なしにプラスミドを調製することも可能となっている。

《多コピー導入 HITEC マウスの作成》 以上の

特徴をもつ pML4 をマウス受精卵にマイクロインジェクションによって導入し、トランスジェニックマウスの作製を行なった。その結果、25系統の新しい HITEC マウスがサザーン解析にて同定でき、最終的に 22 の系統を確立することに成功した。まず、シャトルベクターとなる pML4 プラスミドの導入コピー数を詳細に解析した。各系統から得られたゲノム DNA を、pML4 を1箇所のみ切断する EcoRI (Fig. 1 参照) にて消化後、pML4 をプローブとしてサザーンハイブリダイゼーションを行なった。導入遺伝子は通常ゲノムの一箇所にタンデムに重複した形で挿入される。データには示さないが、EcoRI で消化したゲノム DNA 中には、導入した pML4 の単位長である 3.0 kb のハイブリダイゼーションシグナルが実際に全ての系統から認められた。適切な濃度対照を設定して、この導入コピー数を推定した(方法は、勝木, 1987; 権藤ら, 1993 参照)。その結果、確立

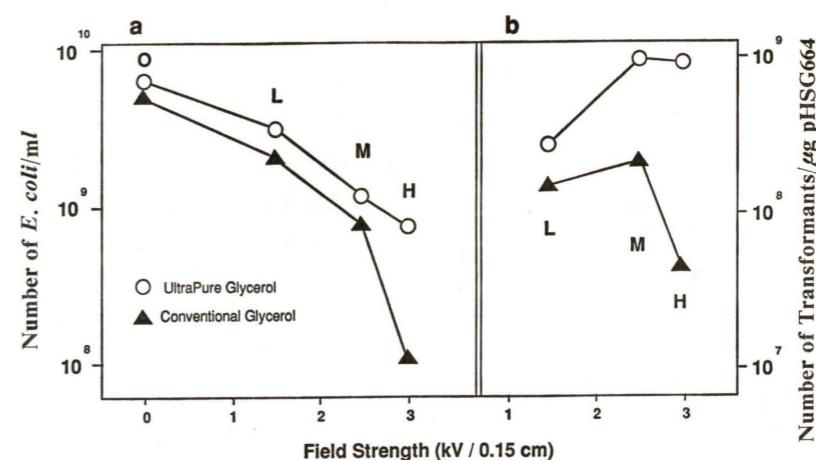


Fig. 3. エレクトロポレーションの電気強度と宿主大腸菌の生存率(パネル a)およびそのときの形質転換効率(パネル b)。電気強度を L(1.49 kV/0.15 cm), M(2.46 kV/0.15 cm), H(2.93 kV/0.15 cm) とあげていくと形質転換効率があがるが、強すぎると、おそらく生存率が下がりすぎるため、転換効率も下がる。特に特級試薬グルセロールを用いた場合(▲)は、その H 設定での生存率および形質転換効率の減少が著しい。パネル a の O は電気強度 0 での大腸菌生存数を示しており、対照実験である。縦軸は対数で表わしている。

された 22 系統のうち、HIT013, HIT017 の 2 系統はいずれも約 350 コピーほど pML4 が導入されており、また、HIT021 に至っては約 750 コピー導入されていることが確認された。これで、まず目的とする HIT003 よりも 100 倍以上にシャトルプラスミドが導入された HITEC マウスが確立されたといえる。現在までのところ、F1 世代において導入コピー数に変動がみられるものではなく、期待通り、安定に子孫に伝達されるとともに、ゲノムの 1 箇所にタンデムに挿入されていることが示されている。

3. エレクトロポレーションによる大腸菌の形質転換

HITEC マウスの検定においては、マウスゲノムから回収したシャトルベクターをいかに効率良く大腸菌に導入し、多くのコロニーを観察できるかが第2の鍵となることを述べた。すなわちプラスミド DNA を用いた大腸菌の形質転換効率を最大限にできる条件設定が必要である。そこで、通常のカルシウム法(Cohen ら, 1972)やその改良法(Hanahan, 1983)の 100 倍の形質転換効率を得ることができるといわれるエレクトロポレーション強度であれば生存率の高い条件の方が転換効率がよく、強度が強まると転換効率はいったん上がるものの、強すぎると逆に効率が減少する。大腸菌の調製に純度の高いグリセロール(UltraPure Glycerol, BPL 社)を用いると、同じエレクトロポレーション強度で処理しても、形質転換効率があがる(Fig. 3)。これは電気伝導度が低くなり同じ電圧で処理しても大腸菌の生存率があがるためと思われる。また、Fig. 4 に示すとおり、調製した大腸菌濃度も形質転換効率に大きく影響し、10¹¹/ml に調製した場合、1 μg の pHSG-

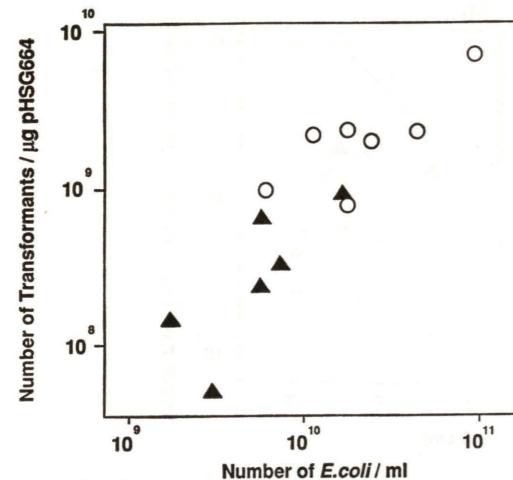


Fig. 4. エレクトロポレーションに用いる宿主大腸菌の濃度と形質転換効率。M 設定 (2.46 kV/0.15 cm) のもとで、大腸菌の濃度を変えた場合の形質転換効率を示している。両軸とも対数で示している。宿主大腸菌の濃度と形質転換効率との間に、強い正の相関がみられる。同じ大腸菌濃度では、高純度グリセロール(○)を用いて調製した大腸菌の方が、通常の特級試薬グリセロール(▲)を用いた場合より形質転換効率が良い。

664あたり 6×10^9 以上の効率が得られた。以上より、高純度グリセロールを用いて $10^{11}/\text{ml}$ 以上に大腸菌を調製し、電気強度 2.46 kV/0.15 cm (M 設定) で、以後エレクトロポレーションを行なった。データには示さないが、調製した大腸菌は再凍結保存しても形質転換効率に大きな影響はなく、また、菌濃度が低い場合は、軽く遠心後、上清のグリセロールを適量取り除き再懸濁濃縮すれば高い効率が得られるようになる。さらに、このエレクトロポレーションには、専用の使い捨てチャランバー(BRL社)を用いるが、1つのチャランバーを、繰り返し 10 回使用しても転換効率に影響は見られなかったので、同じ検体を続けて処理する場合は、10 回までは繰り返し同じチャランバーを用いることもできる。また、同様の実験を、塩化セシウム密度勾配超遠心法にて調製した pML4 プラスミド DNA を用いても行なった。Fig. 1 に示したように、pHSG664 ではアンピシリン耐性、pML4 ではカナマイシン耐性として異なる形質転換能を観察するにも関わらず、得られた結果

には全く違いが見られなかつたので、pML4 シャトルプラスミドのエレクトロポレーション導入も同じ条件にて行なつた。

4. HIT013 のシャトルベクターを用いた大腸菌の形質転換とバックグラウンド

《形質転換効率》 今回得られた新しい HITEC マウスのうち、約 350 コピーの pML4 が導入されていた HIT013 系統を用いて大腸菌の形質転換を行なつた。まず、HIT013 のゲノム DNA 9 μg を、前回と同様の方法(権藤ら、1993)を用いて解析した。EcoRI 消化後、電気泳動ゲル分画を行ない、シャトルベクター pML4 の 3.0 kb が含まれる分画を回収した。この DNA 分画の 100 分の 1 相当分を大腸菌 HB101 株に 2 回に分けてエレクトロポレーションし、そのうち、5 分の 1 はカナマイシンのプレートに、残り 5 分の 4 はカナマイシン及びストレプトマイシンの両方を含むプレートに播種し形質転換効率をみた。カナマイシンプレートには合計 1137 の耐性コロニーが現れた。すなわち、一つの臓器から通常得られる 1 mg のゲノム DNA を用いた場合、検定できるシャトルベクターの総数は 6.3×10^7 と期待される。これは、pHSG664 を数コピー導入した HIT003 の一臓器から期待された検定総数 3×10^4 (権藤ら、1993) と比べ、1000 倍以上感度を上げることになる。さて、カナマイシンとストレプトマイシン両方を含むプレート上には合計 105 コロニーが得られた。カナマイシンのみのプレートに播種した形質転換大腸菌の 4 倍量を、このプレートに播種していることを計算に入れると、ストレプトマイシン耐性を示すコロニー比、言い換えると求める突然変異頻度は、 2.3×10^{-2} という推定値が得られた。

《バックグラウンド突然変異の検討》 以上より、新しい多コピー導入の HITEC マウスを用いれば、臓器あたり 10^8 近くのシャトルベクターを検定でき、形質転換効率に関しては十分な結果が得られた。しかし、得られたバックグラウンドの突然変異頻度が 2.3×10^{-2} と、PCR で得られたバックグラウンド ($0.7 \sim 20\%$; 権藤ら、1993) とさほど変わらないため、何らかの操作上の問題があると考え

Table 1. Transformation of Various *E. coli* Strains by Electroporation

| Strain | <i>E. coli</i> cells/ml ($\times 10^{11}$) | Supercoiled Plasmid DNA | Transformation Efficiency ($\times 10^8/\mu\text{g}$) | Ratio of Sm (%) |
|--------|---|----------------------------|--|--------------------|
| HB101 | 0.31 | pHSG664 pML4 | 53 52 | 0.031 0.020 |
| RR1 | 3.2 | pHSG664 pML4 | 406 644 | 0.015 0.016 |
| JM83 | 3.6 | pHSG664 pML4 | 1.4 77 | 0.016 n.d.* |
| JM103 | 3.8 | pHSG664 pML4 | 1.1 133 | 0.022 0.014 |
| JM105 | 0.24 | pHSG664 pML4 | 1.4 0.87 | 0.016 n.d.* |
| NM554 | 2.7 | pHSG664 pML4 | 18 56 | 0.266 n.d.* |
| MY1 | 0.90 | pHSG664 pML4 | 2.2 9.0 | 0.101 0.029 |

Each *E. coli* strain was electroporated with the indicated plasmid DNA. Transformation efficiency was determined by the number of ampicillin- and kanamycin-resistant colonies for pHSG664 and pML4, respectively. The background mutation frequency was determined by the ratio of streptomycin-resistants (Ratio of Sm).

* JM83 and NM554 do not carry any amber-suppressor genes; thus, *rpsL* in pML4 will not be expressed and all transformants become streptomycin resistant. No colonies were found from pML4 introduction to JM105 because of low transformation efficiency.

られる。いずれにしても、このバックグラウンドでは、わずかな突然変異を鋭敏に検出するにはほど遠く、原因を検討してみた。まず、用いている宿主大腸菌によってバックグラウンドの突然変異頻度が影響を受けるかどうかを検討した。*rpsL* 遺伝子の解析に使う宿主大腸菌はストレプトマイシン耐性 (*rpsL*=*strA*) でなければならないので、いくつかの菌株入手し形質転換を行なつてみた。検討した大腸菌は、HB101 に加え、RR1, JM83, JM103, JM105, NM554, および、MY1 の 7 系統である。塩化セシウム密度勾配超遠心法にて調製した超らせん構造の pHSG664 および pML4 プラスミドを用いて形質転換効率およびバックグラウンドの突然変異頻度が菌株によって差がみられるかどうかを検討した。結果を Table 1 に示している。形質転換効率については明らかに系統間によつて 100 倍以上の違いがみられ、これまで使用している HB101 の形質転換効率は安定かつ高い方に属する。形質転換効率とは対照的に、現れる突然変異の割合は、pHSG664 を導入した NM554 と MY1 において 0.1~0.3% と高くみられるものの、その他の検定では 0.01~0.03% の一定の範囲に収まっている。Table 1 から明らかなように、HB101 より形質転換効率が高く、バックグラウンドの突然変異を低くできる可能性がある系統は、RR1 株である。RR1 株は、HB101 派生体で、違いは HB101 が *recA* であるのに対し、RR1 は野生型 *recA* を持つ点のみである。そこで、プラスミド DNA ではなく、HITEC マウスのシャトルベクターを用いても、RR1 がこのように高い形質転換効率を示すかどうかを検討した。まず、前回の報告で用いた、pHSG664 を少コピーホツト HIT003 の分画 DNA (権藤ら、1993) を、RR1 と HB101 にエレクトロポレーションしてみた。1 mg の HIT003DNA に換算して、HB101 では 1.8×10^4 , RR1 では 1.8×10^5 の形質転換効率を示し、確かに RR1 が 10 倍効率がよい。また、今回新しく得られた pML4 多コピー導入の HIT013 の分画 DNA を HB101 にエレクトロポレーションすると、1 mg の HIT003DNA に換算して、 6.3×10^7 の形質転換効率が得られたことを上述した。これも RR1 株にエレクトロポレーションを行なつてみたところ、 $5.1 \times 10^8/\text{mg}$ という値が得られ、やはり、HB101 を用いた場合より 10 倍近く効率がよい。この場合、バックグラウンドに関しては、HB101 を用いた場合の 2.3% に対し、RR1 では 3.8% と有意な差はみられなかつた。そこで、以後、HITEC マウスのシャトルベ

クター検定には RR1 を宿主大腸菌とした。

5. バックグランドの突然変異頻度を左右する要因

HITEC マウスを用いた突然変異の検定には、ゲノム DNA 抽出後, EcoRI 消化による単位長シャトルベクターの切り出しと、それを環状にするための T4DNA リガーゼ反応との 2 段階がある。そこで、それぞれの段階におけるバックグランド突然変異頻度への影響を検討した。まず、対照として、塩化セシウム密度勾配超遠心によって調製した超らせんプラスミド pML4 自体を用いて、宿主大腸菌にエレクトロポレーションを行なった。材料として、バックグランドの突然変異頻度が 10^{-4} を示すことがわかっている同一調製の pML4 プラスミドサンプルを用いた。まず pML4 プラスミドを、EcoRI にて線状化し、そのままリガーゼ反応にて環状に戻したのち、RR1 株にエレクトロポレーションを行なった。もし、リガーゼによる環状化反応の効率が悪いと、形質転換効率は下がる可能性がある。しかし、この一連の操

作がプラスミド、特に、そのなかの *rpsL* 遺伝子に影響しなければ、ストレプトマイシン耐性コロニーが現れる比、すなわち、バックグランドの突然変異頻度は変わらないはずである。結果は、無処理のプラスミドからは 1.0×10^{-4} のバックグランド値が得られ、EcoRI 消化後 T4DNA リガーゼ処理したものからは 4.7×10^{-5} のバックグランド突然変異頻度が得られた。すなわち、EcoRI, T4DNA リガーゼ処理の過程で約 50 倍ほどバックグランドが上がっていることが判明した。原因として、その制限酵素処理からリガーゼ処理までにいたる過程でプラスミドに「傷」が生じて突然変異を起こしている可能性が考えられる。そこで、この同一調製プラスミド pML4DNA を用いて以下の対照実験を行なった。

《リガーゼ反応における酵素量、反応温度、および、反応時間》まず、EcoRI にて線状化した DNA を材料として、T4DNA リガーゼを異なる 3 段階の濃度にて 3 種類ずつ反応チューブを設定した。1 セットは 4°C , 2 セット目は 16°C , 3 セット目は室温にて 48 時間反応させ、大腸菌 RR1 株を形質転換した。結果を Fig. 5 に示す。まず、

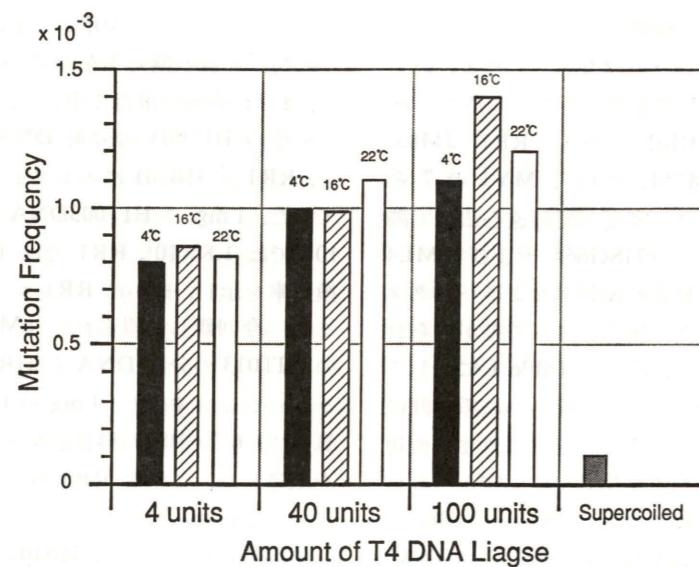


Fig. 5. リガーゼ量と反応温度のバックグランド突然変異に及ぼす影響。予め 1×10^{-4} のバックグランド突然変異を示すことが分かっている超らせん構造の pML4 プラスミド DNA を材料とした。EcoRI で消化したこのサンプル 100 ng を $100 \mu\text{l}$ 反応液中、図に示す温度および酵素量にて 2 日間反応させた。このうちの 50 pg を RR1 大腸菌にエレクトロポレーションを行い、Fig. 2 に示す原理にて突然変異率を推定した。対照として超らせん状 pML4 を 50 pg 同条件にて用いた。

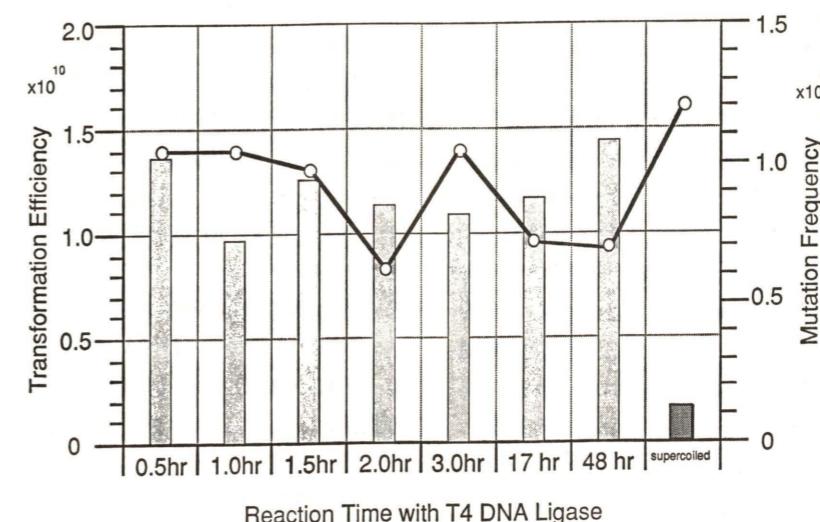


Fig. 6. リガーゼ反応時間のバックグランド突然変異に及ぼす影響。Fig. 5 における 4°C , 4 ユニットの条件にて、反応時間を 0.5~48 時間に変えて突然変異率を検討した。棒グラフで突然変異率、また、折れ線グラフでそのときの形質転換効率を表わしている。

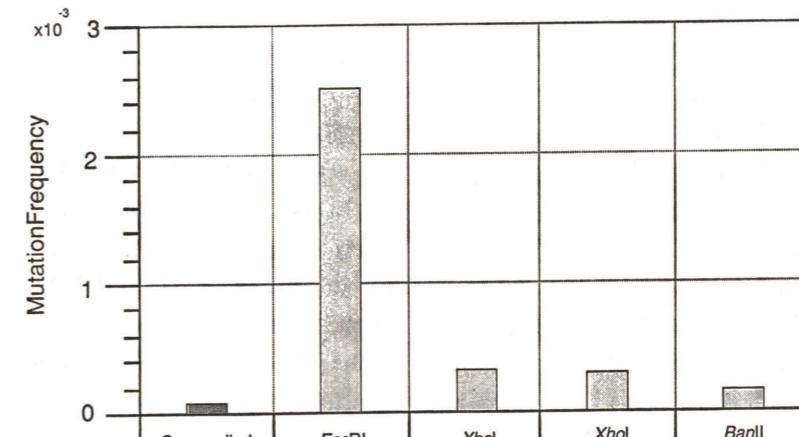


Fig. 7. pML4 の線状化に用いる制限酵素のバックグランド突然変異に及ぼす影響。Fig. 5 および 6 に用いた超らせん状 pML4 の 1 μg を $100 \mu\text{l}$ の反応液中に、EcoRI (32ユニット), XbaI (24ユニット), XhoI (40ユニット), BanII (20ユニット) 用いて一晩消化した。それぞれの 100 ng の線状化 pML4DNA を 200 ユニットの T4DNA リガーゼを用いて、 $200 \mu\text{l}$ 反応液、室温、40 時間以上処理後、エレクトロポレーションにて RR1 を形質転換した。

無処理の超らせん pML4 プラスミドを導入した対照実験では、 9.8×10^{-5} と再現性の高い値が得られた。反応温度が上がるにつれ、また、酵素濃度が高くなるにつれ、バックグランドの突然変異頻度が上昇する傾向があり、 4°C , 4 ユニットの T4DNA リガーゼ量で反応させた場合が最も低い突然変異頻度を示した。ここで、反応温度、酵

素濃度が低いためプラスミドの環状化が不完全となって形質転換効率そのものが減少しては意味がない。カナマイシン耐性コロニーの出現効率をみてみると、超らせん構造の pML4 以外の値はほぼ同じで 1 μg の pML4DNA あたり平均 $1.4 \times 10^{10}/\mu\text{g}$ であった。このとき 4°C , 4 ユニットにおける効率は $1.6 \times 10^{10}/\mu\text{g}$ だったので、十分にリ

ガーゼ反応は完了していることがわかった。つぎに、この4°C、4ユニットの条件にて反応時間を30分から48時間まで行なってみたところでは、さしたる違いはみられなかった(Fig. 6)。また、この場合も、カナマイシン耐性コロニー数で示される形質転換効率は30分でも、平均の $1.2 \times 10^{10}/\mu\text{g}$ より若干高いぐらいなので、環状化のためのリガーゼ反応は4°C、4ユニット、30分でも十分であることが示された(Fig. 6)。しかし、この条件においてもバックグラウンドの突然変異頻度は無処理の超らせんDNAを用いた場合の6~8倍であるため、さらにEcoRI消化のステップを検討した。

《制限酵素の違いによるバックグラウンド突然変異頻度の低下》これまで、シャトルプラスミドのゲノムからの切り出しには、pML4やpHSG-664に1箇所のみ認識部位が存在するEcoRIを用いてきた。pML4には他にもFig. 1に示すように、1箇所のみ切断する酵素がある。ApaLIはプラスミドを受精卵に導入する際に環状化するために用いており、導入末端となっているため修飾を受けている可能性がある。そこで、EcoRIを含め、XbaI, XhoI, BanIIを用いて、プラスミドのpML4を消化し、rpsLに突然変異が生じるかどうかを検討した。その結果をFig. 7に示す。明らかに用いた制限酵素によってストレプトマイシン耐性コロニーの現れる頻度に違いがみられ、BanIIを用いた場合が最も低く対照の超らせん状pML4そのものから得られる値に近くなることがわかった。

6. HITECプロトコールの確立

以上の実験事実から、HITECマウスのゲノムをEcoRI処理、さらに、T4DNAリガーゼ処理する段階で人為的にシャトルベクターのrpsL遺伝子にかなりの突然変異が生じていることが推測された。これを、BanIIで短時間処理したのち、T4DNAリガーゼ反応を、少ない酵素量で、4°C、30分間行なえば、かなりバックグラウンドが減少することが期待できる。また、これまでのHITECプロトコールでは、ゲノム中わずかに存在するシャトルベクターを、EcoRI処理後、電気泳

動ゲルにて分画しエレクトロエリューションを用いて回収濃縮するという繁雑かつ時間を要する方法を用いてきた。しかし、約350コピー導入したHITECマウス HIT013を用いれば、HIT003(権藤ら、1993)の1000倍以上の形質転換効率が得られ、これに、宿主大腸菌としてRR1を用いれば、さらにその10倍の形質転換効率が期待されることがわかった。そこで、バックグラウンドの要因となり得る電気泳動ゲルによる分画過程を省略し、HIT013ゲノムDNAをBanII消化後、直接、T4DNAリガーゼ処理し、そのまま、RR1大腸菌にエレクトロポレーションを行なってみた。

初代HIT013のF1個体で月齢約3カ月の雌マウスの肝臓より抽出したDNAを用いた。約200μgを350ユニットのBanII(Toyobo)を用いて400μl反応液中、37°C、2時間消化後、ただちに、フェノール抽出にて精製し、一部を濃度推定に使用し、6μgをT4DNAリガーゼにて処理した。リガーゼ反応は、600μl反応液中で、24ユニットのT4DNAリガーゼ(Toyobo)、4°C、30分で行なった。さらに、フェノール抽出にて精製後、6μlの0.5×TE(5mM Tris-HCl, 0.5mM Na₂EDTA, pH 8.0)に溶解し、1μg/μlとした。リガーゼ反応の効率を検討するために、この倍量にあたる12μgのHIT013DNAを同条件の600μl中でリガーゼ反応を行なって、最終的に12μlの0.5×TEに溶解し、同じく1μg/μlとしたサンプルも用意した。この2つのサンプル間に大きな違いは見られず、2回独立に行なった実験結果をTable 2に示す。実際にエレクトロポレーションを用いて導入したHIT013DNA量は1回目は10μg、2回目は2.8μgである。それぞれ、140ng, 98ng相当分をカナマイシンプレートに播種し、残りは全て、カナマイシンとストレプトマイシン両方を含むプレートに播種した。この比率を計算し、1回目は 4.9×10^{-5} 、2回目は 4.3×10^{-5} という再現性の高い値が得られるとともに、実用可能なレベルの低いバックグラウンド突然変異頻度がついに得られた。HIT013DNAの1mgあたりに換算した形質転換効率は、1回目が 2.3×10^7 、2回目が 7.0×10^7 であり、バックグラウンドが 10^{-5} の

Table 2. Summary of Spontaneous Mutation Frequencies in HIT013

| HITEC Mouse | Tested Age and Tissue | Experiment | Km resistants Used DNA | Sm&Km resistants Used DNA | Frequencies (10^{-5}) |
|-----------------------------|-----------------------|------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| HIT013 F1 ♀ (350 copies) | 111 day old Liver | a | 3157/140ng | 11/9,860ng | 4.9 |
| | | b | 6816/98ng | 8/2,702ng | 4.3 |

Two independent experiments a and b were performed. In experiment a and b, 10μg and 2.8μg of the prepared DNA were electroporated into the RR1 host E.coli cells, respectively. A small aliquot of the transformed E.coli was plated onto kanamycin (Km) plates and all the rest was plated onto the streptomycin (Sm) and kanamycin plates. "Used DNA" indicates the amount of DNA in the transformed E.coli on each type of the plates.

オーダーで現れることを考慮すると、10μgのHIT013DNAを一回の検定に用いれば十分であることがわかる。

7. 考察

今回350コピーのシャトルベクターpML4を導入したHITECマウスHIT013系統を確立し、体細胞突然変異の検出が現実的に短時間で簡単に行なえる解析系を開発した。鍵となったのは、多コピー導入のトランジェニックマウスが得られたことに加え、エレクトロポレーションによる大腸菌の形質転換効率を詳細に検討して、最大限に活用できるようになったことである。宿主大腸菌として、抜きんでて高い形質転換効率を示すRR1株を同定できたのも大きい。これにより、HITECマウスの全ゲノムDNAをそのまま用いても一臓器あたり 10^7 を越える十分な検定コロニー数が得られるようになった。この結果、これまでの検定の過程で最も繁雑かつ時間を要するステップであったシャトルベクターの分画濃縮を全く行なう必要がなくなり、大規模な検定を可能とする簡便迅速な系が確立できたといえるであろう。もうひとつ大きな鍵は、バックグラウンドの問題を解消できたことである。いかに、多数のコロニーを検定できてもバックグラウンドの突然変異密度が高くては精度の高い検定は不可能である。高いバックグラウンドの原因は、HITECマウスのゲノムDNAからシャトルベクターをEcoRI制限酵素で切り出し、T4DNAリガーゼにて環状化する段階にあることが判明した。しかし、BanII制限酵素を用いてシャトルベクターを切り出し、少量かつ低温でT4DNAリガーゼ反応を行うことによって、

バックグラウンド突然変異頻度を、これまでの 10^{-2} のオーダーから 10^{-5} のオーダーへと大きく減少できた。この値は、すでに報告されているトランジェニックマウスを用いた体細胞突然変異の系であるMutaTMMouse(Gossenら、1989)やBig BlueTM(Kohlerら、1991)と比べ遜色がない。一連の実験から、BanII処理は2時間、リガーゼ反応は30分でも十分であることがわかり、ここでも検定時間の大大幅な短縮が実現できた。最終的に、1日目で抽出したHITECマウスのゲノムDNAを、2日目にBanII処理、T4DNAリガーゼ処理後、エレクトロポレーションを施したのち、プレートに播種し、3日目にはコロニーとして結果が得られる系が確立できた。突然変異頻度の推定にはFig. 2に示すように、分子、分母となる値を2種類のプレートにて別々に推定するので、播種する量を適当に希釈して用いれば、コロニーを必要以上に数えずにすむ。

pML4を導入したHITECマウスは、HIT013の他に、350コピー導入のHIT017, 750コピー導入のHIT021を含め、様々な導入コピー数のものを21系統確立しているので、将来は、シャトルベクターの導入箇所や、導入コピー数の突然変異頻度に及ぼす影響なども解析できるであろう。現在、HIT013, HIT017, HIT021の各種臓器を用いて突然変異頻度を検討するとともに、化学発がん剤を投与することや、ストレプトマイシン耐性コロニーから得られたシャトルベクターのrpsL遺伝子部分をDNAシーケンシングによって同定し、突然変異箇所を分子レベルで解析することも始めている。さらに、異なる遺伝子の影響のもとでの体細胞突然変異の解析を行なうため、HI-

TEC マウスをいろいろな遺伝子欠損マウスと交配している。

8. 材料と方法

トランスジェニックマウスの作成

これは、勝木(1987)の方法にて、HIT003の作成(権藤ら, 1993)と同様になった。但し、pML4の線状化には *Apal*I (Fig. 1 参照) を用い、F1 交雑マウス BDF1 の交配から得られる受精卵にマイクロインジェクションを行なった。ゲノム DNA の抽出、サザーン解析法も権藤ら(1993)に従った。

大腸菌

宿主大腸菌として検討した系統は、HB101 (Takara) に加え、JCRBを通して入手した RR1, JM83, JM103, JM105 と、東大・分生研の真木寿治博士より供与を受けた MY1 および NM554 である。これらは全てストレプトマイシン耐性 (*rpsL*=*strA*) である。HB101 は F- Δ(*gpt-proA*)-62 *leu supE44 araI4 galK2 lacY1* Δ(*mcrC-mrr*)-*rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA13* であり、RR1 は HB-101 の *recA*⁺ 派生体である。JM83 は F- *ara* Δ(*lac-proAB*)*rpsL*[φ80dlac Δ(*lacZ*)M15], JM103 は F' *traD36 lacI*^q Δ(*lacZ*)M15 *proA*⁺*B*⁺/endA1 *supE sbcBC thi-1 rpsL* Δ(*lac-pro*)(P1)(r_K⁺m_K⁺r_{P1}⁺-m_{P1}⁺), JM105 は F' *traD36 lacI*^q Δ(*lacZ*)M15 *proA*⁺*B*⁺/thi *rpsL endA sbcB15 hsdR4(r*_K⁻*m*_K⁺) Δ(*lac-proAB*), NM554 は、F- *araD139* Δ(*ara-leu*)7696 *galE15 galK16* Δ(*lac*)X74 *rpsL hsdR2(r*_K⁻*m*_K⁺) *merA mcrB1 recA13*, MY1 は、DH1; F- *supE44 recA1 gyrA96 thi 11hsdR17(r*_K⁻*M*_K⁺) *relA* のストレプトマイシン耐性株である(Mo ら, 1991)。JM83 と NM554 はアンバー・サプレッサー遺伝子を持たず、pML4 の *rpsL* 遺伝子を発現させずにプラスミドを調製する (Fig. 1 参照) ためのものとして検討した。エレクトロポレーションを行なうために各々の大腸菌は BRL の仕様に従い次の様に調製した。まず、各菌株をプレートに播種し、得られたコロニーを 50 ml の SOB 培地 (Sambrook ら, 1989) にて一晩培養する。このうちの 0.5 ml を、500 ml の SOB 培地

にて 3 時間ほど培養し、遠心して 10% のグリセロール (Ultra Pure Grade, BRL) 液に懸濁することを 2 回繰り返した。最終的に少量の 10% グリセロール液に高濃度に懸濁して、1.5 ml のスクリューキャップ付きのプラスチック遠心チューブに 100~200 μl ずつ分注後、ドライアイス/エタノール中で凍結し、-80°C に保存した。

エレクトロポレーションによる大腸菌の形質転換

Smith ら (1990) による Cell-Porator *E. coli* System (BRL) を用いた。仕様に従い、0.5×TE (5 mM Tris-HCl, 0.5 mM Na₂EDTA, pH 8.0) に溶解した DNA を 1 μl と、調製した大腸菌 20 μl をまぜ、専用のチャンバー (BRL) に移しエレクトロポレーションを行なった。ここまでは 4°C の条件にて行なった。その後、プラスチックチューブ (Falcon 2059) に予め準備した 1 ml の SOC 培地 (Sambrook ら, 1989) に全量を移し、37°C, 200 rpm にて 70 分培養し、必要な場合は適当な培養液にて希釈後、プレートに播種した。プレートは LB 培地 (Sambrook ら, 1989) を用いて、カナマイシンおよびストレプトマイシンを加えるときはそれぞれ最終濃度 50 μg/ml および 100 μg/ml とした。各実験において、用いた調製大腸菌の濃度と、エレクトロポレーション後の生存率を、それぞれ一部分を希釈後、薬剤を含まない LB プレートに播種して推定した。

謝 辞

pML4 プラスミドおよび大腸菌 MY1 と NM-554 を東京大学分子細胞生物学研究所の真木寿治先生に供与いただきましたとともに HITEC マウスの開発にあたって貴重な御助言をいただきました。トランスジェニックマウスの作成には当時、実験動物中央研究所の横山峯介先生(現、三菱化成生命科学研究所)および長谷川孝徳先生(現、日本シソテックス)に多大な援助を頂きました。また、近畿大学原子力研究所の近藤宗平先生、国立衛生試験所の祖父尼俊雄先生、大阪大学細胞生体工学センターの田中亀代治先生にも本研究に対し助言と激励をいただきました。ここに感謝します。本研究は文部省科学研究費補助がん特別研究(2),

重点領域研究(1), 厚生省がん助成金、東海大学医学部研究助成金、福岡県対がん協会研究助成金、加藤記念研究助成金、および、高松宮妃癌研究基金研究助成金の援助によるものです。

参考文献

- Calvin, N. M. and P. C. Hanawalt (1988) High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation, *J. Bacteriol.*, **170**, 2796-2801.
Cohen, S. N., A. C. Y. Chang and L. Hsu (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110-2114.
Dower, W. J., J. F. Miller and C. W. Ragsdale (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
権藤洋一, 中尾和貴, 高橋美千江, 池田由美子, 茂手木淑子, 竹下綾, 勝木元也 (1993) トランスジェニックマウスを用いた変異原の高感度解析法の開発. 環境変異原研究, **15**, 39-49.
Gossen, J. A., W. J. F. deLeeuw, C. H. T. Tan, E. C. Zwarthoff, F. Berends, P. H. M. Lohman, D. L. Knook and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutation *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7971-7975.
Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
Hashimoto-Gotoh, T., A. Kume, W. Masahashi, S. Takeshita and A. Fukuda (1986) Improved vector, pHSG664, for direct streptomycin-resistance selection: cDNA cloning with G:C-tailing procedure and subcloning of double-digest DNA fragments, *Gene*, **41**, 125-128.
勝木元也編著 (1987) 発生工学実験マニュアル: トランスジェニックマウスの作り方, 講談社サイエンティフィック.
Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, J. A. Sorge, D. L. Putman and J. M. Short (1991) Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutation in the *lacI* gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7958-7962.
Mo, J.-Y., H. Maki and M. Sekiguchi (1991) Mutational specificity of the *dnaE173* mutator associated with a defect in the catalytic subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, **222**, 925-936.
Sambrook, J., E. F. Frisch and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed.
Smith, M., J. Jessee, T. Landers and J. Jordan (1990) High efficient bacterial electroporation: 1×10¹⁰ *E. coli* transformants/μg, *Focus*, **12**, 38-40.

第22回大会シンポジウム
「トランシジェニックアニマルを用いる *in vivo* 遺伝子突然変異試験—意義と問題点」

遺伝子突然変異と小核誘発の同時検出系

The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction

林 真, 鈴木孝昌, 祖父尼俊雄

Hayashi M., T. Suzuki and T. Sofuni

国立衛生試験所・変異遺伝部
東京都世田谷区上用賀 1-18-1

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

(受付: 1994年3月18日; 受理: 1994年3月18日)

Summary

We have developed an *in vivo* assay system which can detect clastogenicity and gene mutagenicity concomitantly by combining a peripheral blood micronucleus assay and a transgenic mouse (MutaTM Mouse) mutation assay. The genotoxic potential of mitomycin C(MMC), ethyl nitrosourea (ENU), ethyl methanesulfonate (EMS), and diethyl nitrosamine (DEN) were evaluated by this assay system. Mice were treated with each test compound and the micronucleus assay using acridine orange supravital staining method was performed with a small amount of peripheral blood collected 48 h after treatment. After 7 days or later, mice were killed and tissues were collected for the gene mutation assay. DNA was isolated from bone marrow and liver, and λ gt10 lacZ transgenes were recovered by the lambda packaging reaction. Mutations on lacZ genes were detected as colorless plaques on *E. coli* C (*lac*⁻). ENU and EMS induced strongly both micronucleated reticulocytes (MNRETs) and lacZ mutations in bone marrow. However, mutation induction by these chemicals was less efficient in the liver than in bone marrow. MMC induced MNRETs potently, while a weak mutation was observed in bone marrow only after 5 daily treatments. DEN was negative in the micronucleus assay with MutaTM Mouse as reported with other strains of mouse. The mutation was also negative in bone marrow but positive in liver, indicating a clear organ specificity of DEN. This assay system enabled us to detect micronucleus induction and gene mutation in the same mouse. The genotoxic characteristics of compounds indicated by this assay are important to understand genotoxic risk of environmental mutagens.

Keywords: *in vivo* gene mutation; micronucleus; transgenic mouse; genotoxic characteristics

1. はじめに

遺伝毒性の主な指標として、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA損傷性が考えられるが、これらの指標はこれまで、それぞれ独自の検出系を用いて評価されてきた。これらの検出系は、それぞ

れ固有に最適化されたプロトコールに従って試験されており、それらの試験系を組み合わせて、異なる指標を同時に検出する系をつくることは困難であった。特に *in vivo* で遺伝子突然変異を検出する系としては、特定座位試験 (Searle, 1975) と

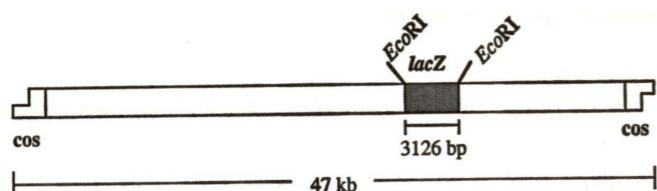


Fig. 1. Structure of the λ gt10 lac Z vector.

マウス毛色スポット試験 (Russell *et al.*, 1981) のみが知られている。これらの試験は、動物の交配が必要であったり、妊娠動物に投与してその子供を観察する試験であったりするのに対し、骨髄の染色体や小核を見る試験系は概して短期試験であり、動物を殺し、標本を作成するタイミングが異なるために組み合わせはほぼ不可能であった。

1980 年代の終わりに、遺伝子突然変異を検出するための外来遺伝子を組み込んだトランシジェニックマウスが紹介され、*in vivo* での新しい有望な遺伝子突然変異検出系が誕生した (Gossen *et al.*, 1989; Short *et al.*, 1990; Kohler *et al.*, 1991; 鈴木, 1992; Suzuki *et al.*, 1994). 一方、マウスを殺すことなく染色体異常誘発性を検出することができるアクリジンオレンジ超生体染色による末梢血小核試験を我々は 1990 年に発表した (Hayashi *et al.*, 1990). さらにこの末梢血を用いる小核試験系の有効性が本学会の MMS 分科会の大規模な共同研究によって実証され、実用の域に入った (CSGMT, 1992). この末梢血小核試験は動物を殺す必要がなく、トランシジェニックマウスを用いることにより、これら両試験系の組み合わせが可能となった。われわれはこれら 2 つの試験系を組み合わせることにより、同一実験条件下で、かつ、それぞれのプロトコールを最適に保ったまままで遺伝子突然変異と染色体異常誘発性を同時に検出できる系を開発した (Suzuki *et al.*, 1993a). 以下に、それぞれの系の特徴と、組み合せた試験結果、今後の課題について述べる。

2. MutaTM Mouse

Muta Mouse は、1989 年にオランダの Gossen らによって開発され、最初に実用化された変異原性試験用のトランシジェニックマウスである (Gossen *et al.*, 1989; Myhr, 1991). Fig. 1 に示

した λ gt10lacZ ベクターが CD2F₁ (DBA2 × BALB/C) マウスに導入されており、haploid 当たり 40 コピー、homozygous に細胞当たり 80 コピーを持つ系統として現在米国の Hazleton 社より市販されている。

導入遺伝子には、約 3 kb の大腸菌の lacZ 遺伝子が含まれ、これが突然変異検出のための標的遺伝子となる。Ames 試験とは異なり、forward mutation を検出する系であるため、この遺伝子内に起きた変異のうち、その転写産物である β -ガラクトシダーゼの酵素活性に影響を与えるような変異はすべて検出が可能である。よって比較的大きな欠失変異も 3 kb 以内であれば検出できる。この標的遺伝子はラムダファージ由来の λ gt10 ベクターに組み込まれているため、ラムダパッケージングにより、マウスゲノム DNA より容易に感染性を持つラムダファージの回収が可能であり、大腸菌内にて lacZ 遺伝子の変異の解析を行うことができる (Gossen and Vijg, 1988). また、導入遺伝子は適当なプロモーターを持たないため、マウス体内においては一切発現されていない。よってこのトランシジェニックマウスは生理的に通常のマウスとほぼ同一であり、マウスは、*in vivo* において遺伝子突然変異を解析するための“場”を提供することとなる。

3. Muta Mouse を用いる遺伝子突然変異検出法

試験法の概略を Fig. 2 に示す。従来、最終的な変異体の検出には β -ガラクトシダーゼによる発色反応 (color selection) が指標となっており、我々の実験でもこの方法を用いてきたので、ここでは color selection 法について述べ、最近開発された positive selection 法 (Myhr *et al.*, 1993) については後述する。

マウスを被験物質で処理し、突然変異の発現期

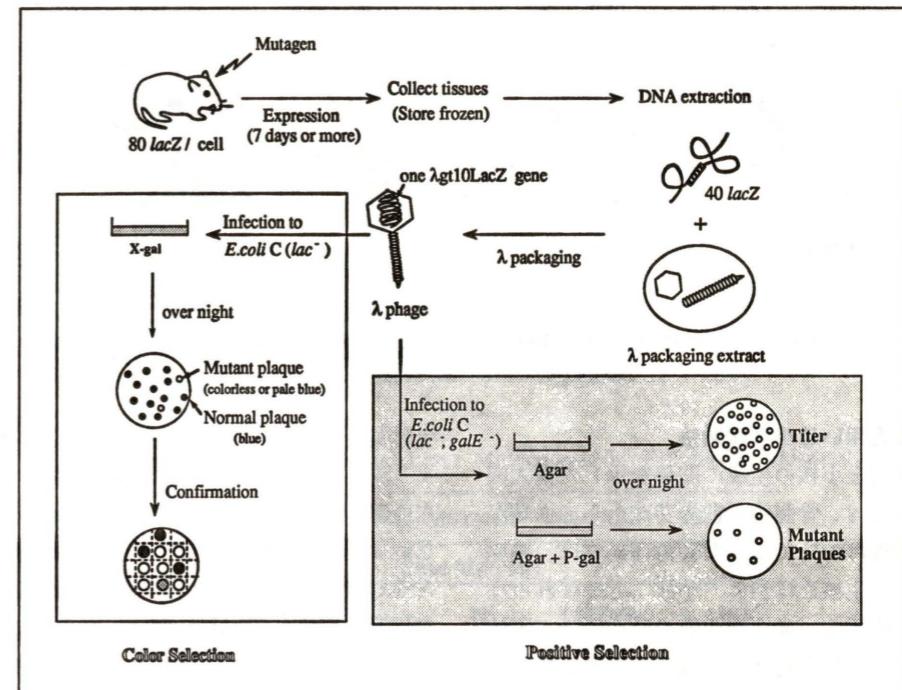


Fig. 2. A scheme of the MutaMouse assay.

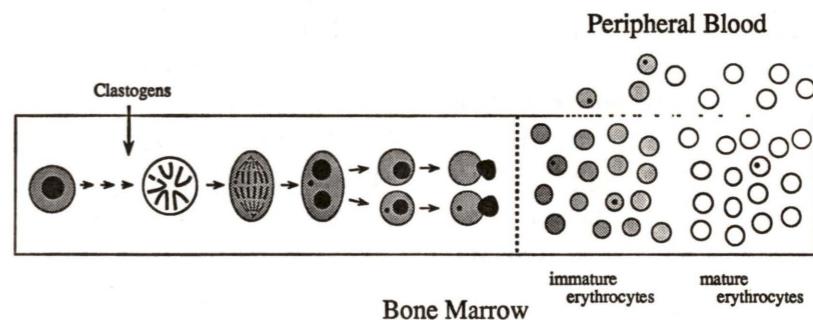


Fig. 3. A Model for the Micronucleated Erythrocytes Formation.

間として 1~2 週間飼育後、動物を屠殺して必要な臓器を取り出し、凍結保存する。トランシジェニックマウスでは、すべての細胞に導入遺伝子が組み込まれているため、生殖細胞も含めすべての臓器が解析の対象となり得る。必要な組織より DNA を抽出し、λパッケージング法により目的遺伝子を λ ファージに取り込む。λパッケージングには、市販の λパッケージングエクストラクト (Gigapack II Gold, Stratagene 社製) を用いた。これは、DNA 以外のラムダファージの構成要素から成り、そこに含まれるラムダファージの制限

酵素により、マウスゲノム DNA より 1 単位の λgt10LacZ ベクターが切り出され、一つの成熟ファージが形成される。Color selection では、これを lac 遺伝子が完全に欠損した大腸菌の C 株に感染させて、plaques をつくる。そのとき、培地に β -ガラクトシダーゼの基質となる X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside) を入れておくと、正常な λ ファージは青色の plaques をつくり、lacZ 上に突然変異が起きたものは透明または薄い青色の plaques をつくるので、変異頻度を求めることができる。

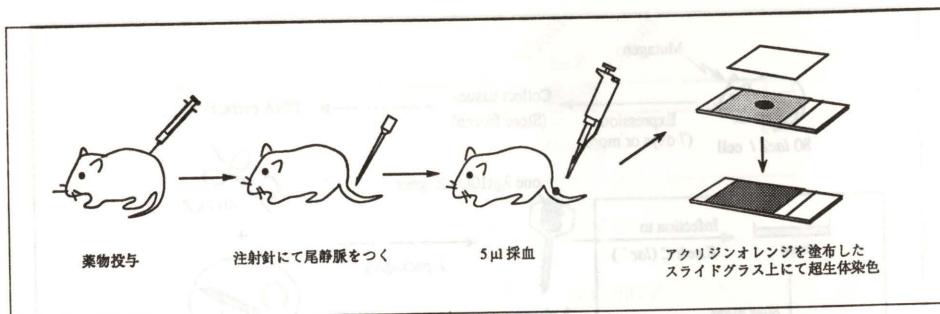


Fig. 4. A Method for the Peripheral Blood Micronucleus Assay Using Acridine Orange Coated Slides.

4. 末梢血を用いる小核試験法

染色体異常と小核の生成の関係を示した模式図を Fig. 3 に示す。骨髄中で前赤芽球から赤血球が作られる過程において生じた染色体異常は、細胞分裂を経て、主核とは別に“小核”と呼ばれる小さな核を生成する。赤血球成熟の最終段階で脱核が起きる。この際小核は取り残され本来無核の赤血球中に小さな核が出現する。小核試験では、従来、小核試験には骨髄細胞が用いられてきたが、小核を持った赤血球はかなり早い時点から確率的に末梢血流中に出てくるので、末梢血を用いても、骨髄と同様に小核の出現を正しく検出できることが報告されてきた (MacGregor *et al.*, 1980; 1990)。我々は、アクリジンオレンジ (AO) を塗布したスライドグラスを用いた超生体染色法による末梢血小核試験法を開発し (Hayashi *et al.*, 1990), その有効性も実証されている (CSGMT, 1992)。小核試験において末梢血を用いることの最大の利点は、動物を殺さずに試験が行なえることになり、これによって他の試験との組み合わせが可能となった。

5. AO 塗布スライドを用いる末梢血小核試験法

AO 塗布スライドグラスの作製は、スライドグラスをあらかじめホットプレートで 70°C 位に温め、AO 水溶液 (1 mg/kg) 10 μl を塗布、乾燥させる。Fig. 4 に示すように、マウスに被験物質を投与した後、48 時間後にマウスの尾部より 5 μl の末梢血を採取する。この末梢血を AO を塗布したスライドの中央付近に滴下し、ただちにカバーグラスをかける。細胞は直ちに蛍光染色され (超

生体染色), 蛍光顕微鏡で観察可能になる。AO により赤い蛍光を発する網状構造を持つ赤血球 (網赤血球; RET) が幼若な赤血球である。網赤血球を個体あたり 1000~2000 個観察し、小核を持った血球 (MNRET) の出現頻度を調べる。なお標本は冷蔵庫中で 2~3 日間は保存可能であり、ディープフリーザ中に保存すれば数か月間は使用可能である。

6. 遺伝子突然変異と小核誘発性の同時検出プロ

トコール

遺伝子突然変異と染色体異常を同時に検出するために、先程のトランスジェニックマウスを用いた試験系に末梢血小核試験を組み込んだ。Mutant Mouse に被験物質を投与し、原則として投与直前と投与 48 時間に採血し、小核誘発性を評価した。動物はそのまま飼育を続け、1~2 週間後に屠殺して必要な臓器を摘出して突然変異のアッセイを行った。この系を用いて幾つかの代表的変異原について解析を行ったので、以下にその一部を紹介する。

7. Ethyl nitrosourea (ENU)

代表的なアルキル化剤である ENU の小核試験結果を Table 1 に示す。50, 100, 200 mg/kg 投与後、24, 48, 72 時間に幼若赤血球 1000 個中に観察される MNRET を 1 群あたり 8 匹のマウスについて検討した。0 時間の MNRET は 1000 個中約 3 個であった。一方、ENU 投与 48 時間後には、control 値の約 20 倍という非常に強い小核の誘発が観察された。

Table 1. Micronucleus induction by a single ip treatment of ENU in Mutant Mouse

| Dose(mg/kg) | No. of Mice | MNRETs / 1000 RETs ± S.D. | | | |
|-------------|-------------|---------------------------|-----------|---------------|-----------|
| | | (0 h) | (24 h) | (48 h) | (72 h) |
| 50 | 8 | 3.0 ± 1.5 | 9.4 ± 4.6 | 45.8 ± 11.1 | 4.9 ± 3.2 |
| 100 | 8 | 2.5 ± 1.2 | 7.6 ± 4.2 | 65.8 ± 16.9 | 4.4 ± 1.9 |
| 200 | 8 | 2.9 ± 1.4 | 2.8 ± 2.1 | 38.0 ± 10.0 * | n.d. |

n.d.; no data because of the bone marrow suppression

* ; data from two mice, other mice showed bone marrow suppression

Table 2. Bone Marrow and Liver Mutagenesis by Ethyl Nitrosourea

| DOSE | MOUSE NO. | MUTANTS | PLAQUES | MF X 10 ⁶ |
|---------------|-----------|---------|-----------|----------------------|
| (Bone Marrow) | | | | |
| control | 3126 | 29 | 1,049,068 | 27.6 |
| | 3135 | 43 | 1,161,165 | 37.0 |
| | 3142 | 47 | 1,011,951 | 46.4 |
| 50 mg/kg | 5091 | 64 | 490,682 | 130 |
| | 5097 | 71 | 522,670 | 136 |
| 100 mg/kg | 5119 | 46 | 275,250 | 167 |
| | 5121 | 68 | 235,750 | 288 |
| 200 mg/kg | 5099 | 64 | 196,250 | 326 |
| | 5124 | 57 | 157,400 | 362 |
| (Liver) | | | | |
| control | 3126 | 14 | 689,286 | 20.3 |
| | 3135 | 28 | 643,523 | 43.5 |
| | 3142 | 29 | 864,963 | 33.5 |
| 100 mg/kg | 5119 | 31 | 950,586 | 32.6 |
| | 5121 | 34 | 1,050,057 | 32.4 |
| 200 mg/kg | 5124 | 10 | 130,520 | 76.6 |

投与 7 日後の lacZ 遺伝子の変異頻度を Table 2 に示す。骨髄の陰性対照における突然変異の発生率は、3 匹のマウスについてそれぞれ 100 万個以上のブラークを解析した結果、10⁶ あたり 30 個前後であった。これに対し ENU 投与群の突然変異率は用量相関的に上昇し、200 mg/kg において

は、陰性対照の約 10 倍の変異頻度が得られた。ENU 100 mg/kg 投与時の骨髄における変異頻度の経時変化の結果を Fig. 5 に示す。変異頻度は投与後 14 日目まで上昇したが、21 日目においていったん減少し、28 日目で再び上昇するというパターンが得られた。この経時変化の解釈は難し

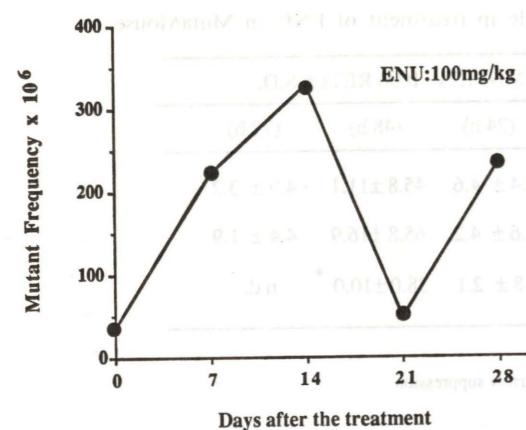


Fig. 5. Time-course of ENU-induced *lac Z* MF in Bone Marrow.

いが、投与後 14 日目まで変異頻度が上昇したのは変異を受けた細胞の分裂増殖に伴うもので、それらの細胞の寿命とともに変異頻度は一旦減少し、再び上昇するのは変異を受けた血液幹細胞由

來のものであると思われる。

陰性対照群における肝臓の突然変異率は骨髄とほぼ同じ値を示した。ENU処理による影響は骨髄に比べて低く、200 mg/kg投与群で対照群の約2倍程度であった。この結果は、ENUが白血病を誘発するという事実と対応しており、臓器特異性を反映しているものとして注目される。今後他の標的臓器とされる脳を含め、他の臓器について解析を進めたい。

8. Mytomycin C (MMC)

DNAの架橋形成剤の制癌性抗生物質であるMMCは、強い染色体異常誘発性を持つことが知られ、小核試験においてもしばしば陽性対照物質として使用されている。MutaMouseを用いた小核試験においても用量依存的に強い小核誘発性が認められた(Table 3)。MMCによる小核の出現頻度は、これまでに報告されている他の系統のマウス

Table 3. Micronucleus Induction in Peripheral Blood of MutaTM Mouse by Single I.P. Treatment with MMC

| Dose (mg/kg) | No. of Mice | MNRETs / 1000 RETs ± S.D. | | |
|-----------------|----------------|---------------------------|-------------|------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h |
| 0 | 4 | 3.0 ± 1.6 | 5.3 ± 2.2 | 4.3 ± 1.1 |
| 0.5 | 6 | 4.7 ± 1.6 | 13.3 ± 3.9 | 6.8 ± 2.1 |
| 1.0 | 6 | 7.3 ± 3.6 | 36.0 ± 8.6 | 15.0 ± 8.1 |
| 2.0 | 6 | 5.0 ± 1.9 | 58.3 ± 16.8 | 22.0 * |
| ENU, 100 | 8 | 7.6 ± 4.2 | 65.8 ± 16.9 | 4.4 ± 1.9 |

* Data from one mouse; other treated mice gave low RET numbers due to bone marrow suppression

Table 4. Micronucleus Induction in Peripheral Blood of MutaTM Mouse by Subchronic (5 Daily) I.P. Treatments with MMC

| Dose (mg/kg) | No. of Mice | MNRETs / 1000 RETs ± S.D. | | | |
|-----------------|----------------|---------------------------|------------|-------------|---------------|
| | | 48 h | 72 h | 96 h | 7day |
| 1.0 | 4 | 53.3 ± 8.3 | 56.5 ± 7.4 | 84.7 ± 12.4 | 13.5 ± 4.5 |
| 2.0 | 4 | 60.8 ± 5.6 | 94 * | n.d. | 15.5 ± 1.5 ** |

n.d. No data because of bone marrow suppression

* Data from one mouse

** Data from two mice

Table 5. Bone Marrow and Liver Mutagenesis by a Single MMC Treatment

| Time / Dose(mg/kg) | Mouse No. | Mutants | Plaques | MF X 10 ⁶ |
|--------------------|-----------|---------|-----------|----------------------|
| (Bone Marrow) | | | | |
| 7 day | 3130 | 9 | 503,420 | 17.9 |
| 1.0 mg/kg | 3133 | 4 | 648,900 | 6.2 |
| 7 day | 3153 | 19 | 549,678 | 34.6 |
| 2.0 mg/kg | 3155 | 9 | 507,968 | 17.7 |
| 14 day | 3132 | 11 | 629,500 | 17.5 |
| 2.0 mg/kg | 3139 | 5 | 513,970 | 9.7 |
| 21 day | 5086 | 2 | 154,400 | 12.9 |
| 2.0 mg/kg | 5093 | 2 | 77,750 | 25.7 |
| 7 day | 3126 | 29 | 1,049,068 | 27.6 |
| Control | 3135 | 43 | 1,161,165 | 37.0 |
| | 3142 | 47 | 1,011,951 | 46.4 |
| (Liver) | | | | |
| 7 day | 3153 | 9 | 501,590 | 17.9 |
| 2.0 mg/kg | 3155 | 9 | 512,475 | 17.6 |
| 7 day | 3126 | 14 | 689,286 | 20.3 |
| Control | 3135 | 28 | 643,523 | 43.5 |
| | 3142 | 29 | 864,963 | 33.5 |

Table 6. Bone Marrow and Liver Mutagenesis by Subchronic MMC Treatments

| Dose(mg/kg) | Time(day)* | Mouse No. | Mutants | Plaques | MF X 10 ⁶ |
|---------------|------------|-----------|---------|---------|----------------------|
| (Bone Marrow) | | | | | |
| 1.0 mg/kg | 3 day | 4658 | 27 | 563,527 | 47.9 |
| x 5 day | 10 day | 4666 | 29 | 535,590 | 54.1 |
| 2.0 | 3 day | 4656 | 36 | 516,630 | 69.7 |
| x 5 day | 3 day | 4671 | 46 | 543,533 | 84.6 |
| 2.0 | 5 day | 4676 | 48 | 557,448 | 86.1 |
| x 3 day | 5 day | 4658 | 14 | 555,875 | 25.2 |
| 1.0 mg/kg | 3 day | 4666 | 5 | 574,079 | 8.7 |
| (Liver) | | | | | |

* Days after the last treatment

スの値 (Hara, et al., 1993) とほぼ一致しており、MutaMouse が小核試験用のマウスとして使用可能であることを示した。また、5 日間の反復投与実験の結果を Table 4 に示す。反復投与により小核誘発率の弱い上昇が観察されたが、骨髓に対する毒性が強く現われ、高用量群では幼若赤血球の減少により観察ができない個体が多くなった。

MMC の単回投与による骨髓での遺伝子突然変異試験の結果を Table 5 に示す。いずれの用量、および時間においても *lacZ* 遺伝子の変異頻度の上昇は全く見られず、むしろ減少する傾向にあった。しかし、5 日間の反復投与試験においては、骨髓で 2~3 倍の上昇が認められた (Table 6)。

これらの結果より、MMC は染色体異常誘発性は強いが、突然変異誘発性は弱いと結論づけられる。これは MMC による DNA の架橋が、切断もしくは大きな欠失型の DNA 傷害を引き起こすことにより説明可能であろう。

9. その他の化合物を含めた結果のまとめ

我々は、ENU, MMC の他にも、Diethyl nitrosamine (DEN), Ethyl methanesulfonate (EMS), Benzene (BEN), X 線に関して同様の検討を行っており、これらの結果の一部を Fig. 6 に示す。小核誘発性に関しては、DEN を除くすべての化合物において明らかな陽性結果が得られた。DEN は強い肝発がん性を持つが、通常の小核試験では陰性の結果も報告されており (Heddle et al., 1983)，今回 MutaMouse を用いた小核試験にお

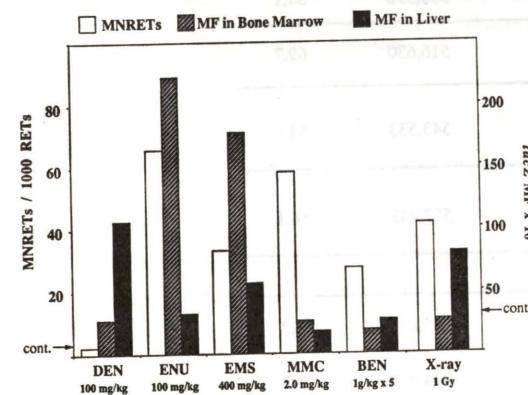


Fig. 6. Genotoxic Specificity of Chemical Mutagens in MutaMouse.

いても同様に陰性の結果となった。一方遺伝子突然変異に関しては、骨髓において陰性であったが、標的臓器である肝臓では明らかな陽性を示し、臓器特異性が認められた。DEN は肝臓において代謝活性化を受けて作用を現す (Tates et al., 1980) が、骨髓においていずれの試験も陰性であった原因是、活性体が骨髓まで到達できなかつたためであると推察できる。

EMS は、ENU と同様に骨髓において強い変異原性を示したが、肝臓での活性は弱いものであった。一方、BEN は MMC と同様強い小核誘発性を示したが、遺伝子突然変異誘発性は、骨髓、肝臓ともに認められなかった。

このように、それぞれの化学物質ごとに染色体異常誘発性と遺伝子突然変異誘発性のスペクトラムが得られた。このようなデータは、今後発がん性との相関を含め、被験物質の安全性評価に大きく貢献すると思われる。

10. トランジエニックマウスを用いる変異原性試験の問題点と今後の展望

トランジエニックスマウスを用いる変異原性試験の評価はしだいに高まってきているが、さらに広く普及した変異原試験法となるためには、解決すべき幾つかの課題が残されている (Suzuki et al., 1994)。中でも、突然変異のアッセイに手間と費用がかかり過ぎることが最も重要な課題である。理論的に非常に優れた試験系であるにもかかわらず、今一つその普及度が遅いのは主にこのことに起因しているものと考えられる。

実際の試験法は技術的に難しい点はなく、誰にでもできる手法である。問題なのは、色の変化により変異体の同定を行うため、主観的判断が要求されるとともに、充分な検出感度を保証するため 5×10^6 個程度のブラークが必要であるという点である。MutaMouse を用いた試験法では、15 cm のシャーレあたり 2,500 個のブラークをまくことができるが、 5×10^6 個のブラークを得るためにには 200 枚のシャーレが必要となる。従って、シャーレ、発色試薬である X-gal (比較的高価) やパッケージングキット等の消耗品にかかる費用も膨大となり、マウス自体の値段も含めかなり高

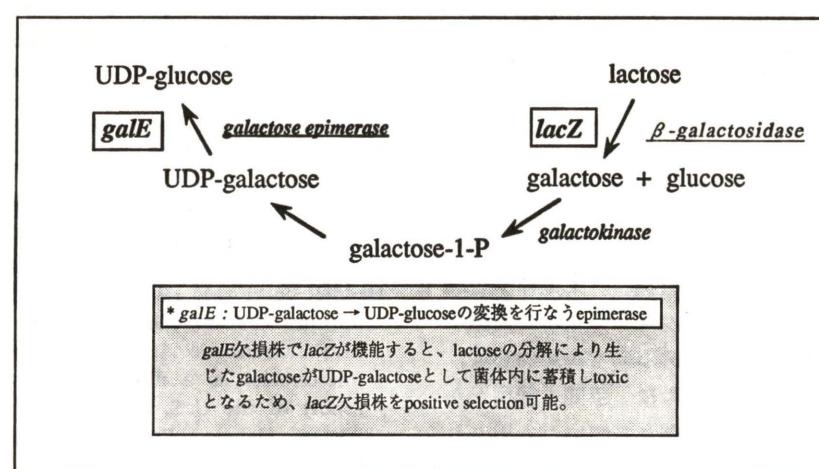


Fig. 7. A Principle for the Positive Selection of *lacZ* Mutants in a *galE* strain.

Table 7. Comparison of MF Obtained by the Color and the Positive Selection

| Sample | MF by color selection | MF by positive selection |
|---|--|--|
| EMS 400 mg/kg Bone Marrow (7 day) | 129×10^{-6} (33 / 255,220) | 178×10^{-6} (24 / 135,000) |
| (No. of plates) | 120 | 4 |
| (plaques / plate) | 2,127 | 33,750 |

価な試験である (Suzuki et al., 1993b)。

lacI 遺伝子を用いた Big Blue マウス (Kohler et al., 1991; Provost et al., 1993) では、色の識別に関して改善が図られているが、依然同様の問題がある。この問題点を解消するため、変異体のみを選別する *galE* 遺伝子の欠損した大腸菌株 (Gossen et al., 1992) をもちいたポジティブセレクション法が開発された (Myhr et al., 1993)。その原理を Fig. 7 に示す。*galE* は、大腸菌のガラクトース代謝にかかわる酵素である galactose epimerase をコードしている。この *galE* 遺伝子が欠損した株では、galactose の存在下 UDP-galactose の蓄積が起こり、これが菌体にとって致死的となる。よって *galE* 欠損の大腸菌に正常 *lacZ* 遺伝子を持つファージが感染した場合、 β -galactosidase の基質であり galactose 源となる P-gal (phenyl β -D-galactose) (lactose の代わりを用いる) 添加しておけば致死的となりブラーク

は生成しない。一方、 β -galactosidase 活性を失った変異 *lacZ* 遺伝子を持つファージが感染しても galactose が生成しないため菌は成育可能となりブラークをつくる。実際の実験操作は、使用する大腸菌が異なるだけで、Fig. 1 に示した従来の color selection 法とほぼ同じである。ただ、パッケージングの後、変異体分離用に P-gal を含むシャーレにまくが、このとき菌液の一部をとって P-gal を含まないシャーレに播いて、全体のブラーク数を求めなければならない。

我々の研究室において従来の方法と比較した例を Table 7 に示す。Positive selection 法によつても従来の color selection 法で得られた突然変異頻度とほぼ同程度の変異頻度が得られた。注目すべきは、必要なシャーレ数が 10 分の 1 以下である点である。これにより変異体の検出に要する手間および費用が大幅に削減できる。同様の検討は Big Blue マウスを用いてもなされており、近

く導入が予定されている。これら positive selection 法によるメリットは大きく、今後この試験系が普及していくことが期待される。その結果、データベースの充実にともない、最適な試験プロトコールの確立もなされるであろう。

まとめ

トランジエニックマウスという全く新しい試験法が生まれ、変異原研究の分野に新たな領域が開かれた。優れた試験法であるにもかかわらず、その浸透度がやや遅かったのは、手間と費用がかかるという現実的な障壁が関与していたと思われる。Positive selection 法の導入により、一層の普及が期待される。さらに末梢血を用いる小核試験との組み合わせにより、*in vivo* における遺伝毒性評価の確立が期待される。

謝 辞

MutaMouse を使った変異原試験法の技術を教授し、初期の研究の一部を分担していただいた Hazleton 社の Myhr 博士ならびにその研究室の皆様に感謝いたします。

参考文献

- CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS - MMS, *Mutat. Res.*, **278**, 83-98.
- Gossen, J. A. and J. Vijg (1988) *E. coli* C: a convenient host strain for rescue of highly methylated DNA, *Nucl. Acids Res.*, **16**, 9343.
- Gossen, J. A., W. J. F. de Leeuw, C. H. T. Tan, P. H. M. Lohman, F. Berends, D. L. Knook, E. C. Zwarthof and J. Vijg (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying gene mutations *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **86**, 7971-7975.
- Gossen, J. A., A. C. Molijn, G. R. Douglas and J. Vijg (1992) Application of galactosidase-sensitive *E. coli* strains as selective hosts for lacZ-plasmids, *Nucl. Acids Res.*, **20**, 3254.
- Hara, M., S. Nakagawa, E. Fujioka, E. Ayukawa and T. Izushi (1992) Detection of micronuclei in peripheral blood of mitomycin C-treated mice using supravital staining with acridine orange, *Mutat. Res.*, **278**, 175-179.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1984) Kinetics of micronucleus formation on relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, *Mutat. Res.*, **127**, 129-137.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.*, **245**, 245-249.
- Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salamone (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity, A report of the U.S. Environmental Protection Agency Genetox Program, *Mutat. Res.*, **123**, 61-118.
- Kohler, S. W., G. S. Provost, A. Fieck, P. L. Kretz, W. O. Bullock, J. A. Sorge and J. M. Short (1991) Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lacI* gene in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **88**, 7958-7962.
- MacGregor, J. T., C. M. Wehr and D. H. Gould (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test, *Environ. Mutagen.*, **2**, 509-514.
- MacGregor, J. T., C. M. Wehr, P. R. Henika and M. D. Shelby (1990) The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: Measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fund. Appl. Toxicol.*, **14**, 513-522.
- Myhr, B. C. (1991) Validation studies with MutaTMMouse: A transgenic mouse model for detecting mutations *in vivo*, *Environ. Mol. Mutagen.*, **18**, 308-315.
- Myhr, B. C., L. Custer, H. Khouri, G. Gesswein, S. Haworth, D. Brusick, J. Gossen and J. Vijg (1993) Positive selection for lacZ mutations in Muta-Mouse tissues, *Environ. Mol. Mutagen.*, **21**, suppl. 22, 50.
- Provost, G. S., P. L. Kretz, R. T. Hamner, P. L. Kretz and J. M. Short (1993) Transgenic systems for *in vivo* mutation analysis, *Mutat. Res.*, **288**, 133-149.
- Russell, L. B., P. B. Selby, E. von Halle, W. Sheridan and L. Valcovic (1981) Use of the mouse spot test in chemical mutagenesis: Interpretation of past data and recommendations for future work, *Mutat. Res.*, **86**, 355-379.
- Searle, A. G. (1975) The specific locus test in the mouse, *Mutat. Res.*, **31**, 277-290.
- Short, J. M., S. W. Kohler, G. S. Provost, A. Fieck and P. L. Kretz (1990) The use of a lambda phage shuttle vector in transgenic mice for development of a shortterm mutagenicity assay, In: M. L. Mendelsohn and R. J. Albertini (Eds.), *Mutation and the Environment, Part A*, Wiley-Liss, New York, pp. 355-367.
- 鈴木孝昌 (1992) トランジエニックマウスの変異原性試験への応用, *変異原性試験*, **1**, 3-18.
- Suzuki, T., M. Hayashi, T. Sofuni and B. C. Myhr (1993a) The concomitant detection of gene mutation and micronucleus induction by mitomycin C *in vivo* using lacZ transgenic mice, *Mutat. Res.*, **285**, 219-224.
- Suzuki, T., M. Hayashi and T. Sofuni (1993b) Current aspects of transgenic mice for mutation research. —Importance of the positive selection system—, *MMS commun.*, no. 7, 31-38.
- Suzuki, T., M. Hayashi and T. Sofuni (1994) Initial experiences and future directions for transgenic mouse mutation assays, *Mutat. Res.* (in press).
- Tates, A. D., I. Neuteboom, M. Hofker and L. den Engelse (1980) A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*, *Mutat. Res.*, **74**, 11-20.

第22回大会パネルディスカッション
「変異原性試験の役割とその評価」

一般化学物質に関する変異原性試験の機能と役割

Mutagenicity testing and toxicity assessment on commodity chemicals

馬場恒夫
Tsuneo Baba

ダイセル化学工業株式会社 総合研究所
671-12 姫路市網干区新在家 1239 番地

Division on Pharmacology and Toxicology, Research Center, Daicel Chemical Industries Ltd., 1239 Shinzaike, Abosi-ku, Himeji 671-12, Japan

(受付: 1994年2月17日; 受理: 1994年2月17日)

Summary

Chemicals and commodity chemicals afford us conveniences and comforts in our daily life. We may not survive another one day without their supply from chemical industries.

In order to prevent environmental pollution with chemicals which possibly be harmful to human health, the systematic screening test before manufacture and import of new chemicals is required by the Law concerning the examination and regulation of manufacture, etc. of chemical substances (Law No. 117) in Japan. According to the Law, new chemicals are classified into four categories in terms of the degree of biodegradability with microorganisms and bioaccumulation in fish, Class I specified chemical substances (non-biodegradable, high degree of bioaccumulation, chronic toxicity), Class II specified chemical substances (non-biodegradable, low degree of bioaccumulation, chronic toxicity) and the designated chemical substances (non-biodegradable, low degree of bioaccumulation, potential chronic toxicity) and unregulated safe chemical substances.

Toxicity screening tests including reverse-mutation assay, chromosomal aberration test in cultured mammalian cells and twenty-eight-day repeated dose toxicity in mammalian species are required to classify new chemicals in question into whether the designated chemical substances (a possible candidate of Class II chemical substances) or unregulated safe chemical substances.

In addition, reverse-mutation assay is also requisite screening test before manufacture or import of new chemicals under the Occupational Safety and Health Law in Japan to protect workers handling hazardous chemicals in industries. In this connection, Daicel's own safety-guideline principally based on mutagenicity and carcinogenicity of chemical substances will be introduced in this essay, for the assessment of the potential risks of chemicals and the protection of employee and customers from chemical exposure.

Commodity chemicals possess quite a different situation from that of fine chemicals such as medicines, pesticides, cosmetics, etc., because so many industries need them as intermediates, ingredients or raw materials to manufacture or process fine chemicals and expensive merchandise. And so, commodity chemicals are generally cheaper and produced in a massive amount and not necessarily utilized for particular purposes. Thus, extensive toxicity screening strategy may not directly be applicable to commodity chemicals as is to fine chemicals.

A prospective view of mutagenicity screening in chemical industries is discussed in terms of particular problems involved in routine assay on chemical substances and commodity chemicals.

Keywords: Mutagenicity, Chronic Toxicity, New Chemical Substances, Commodity Chemicals, Biodegradability, Bioaccumulation, Prevention of Environmental Pollution, Protection from Chemical Exposure, Law Concerning Regulations

1. はじめに

一般化学物質は、一般と言う名前の示す通り特定の目的のために製造される物質とは限らず、一般的にはそのままの形で消費者の目に触れることが多い。しかしながら、その一方では私達の生活に深く密着している物質であり現代社会においては、これなくしては生活基盤そのものが成り立つ得ない物質であると言っても過言ではない。

この点について、筆者が勤務しているダイセル化学工業株式会社(以下、ダイセル化学と略す)が製造・販売している化学製品群を例にとって見てみよう。化学製品の製造・販売を業としているダイセル化学が製造している製品の内、例えば、セルロース誘導体としての酢酸セルロース、硝酸セルロース、CMC や HEC 等は、写真フィルムやタバコフィルター、ラッカー塗料、接着剤や食品添加物等に、有機合成品としての酢酸、ソルビン酸、グリセリン、1,3-ブチレンジコール、アルキルアミン類は、化学合成原料、食品防腐剤、樹脂原料や化粧品、可塑剤や化粧品、農薬や塗料原料等に、プラスチックとしての ABS 樹脂や AS 樹脂、ナイロンフィルム、ジアゾ感光フィルムは、自動車や家庭電化製品部品、食品やタバコ及び医薬品等の包装材、各種印刷校正にそれぞれ加工され使用されている。このようにダイセル化学の製品群だけを見ても、一般化学物質は、私達の生活のあらゆる場面に登場して何らかの形で使用されていることが分かると思う。

一般化学物質は、ダイセル化学の例のように化学会合原料や化学中間体及び各種の製品素材として使用されることが多く、使用目的も極めて多彩且つ雑多である。また、製造量もトン単位で多量に生産される反面、最終製品ではないために価格が安く、医薬品や農薬のように高価な試験をそれ

ぞの製品についてすべて実施することは製品コストを考慮すると特別な場合を除き实际上不可能である。この点が一般化学物質の毒性特に変異原性試験を考える上での特徴であり、問題点と考えている。

2. 一般化学物質の安全性に関する歴史的背景

一般化学物質は、このように広範囲に使用されて私達の生活の便宜と限りない産業の発展に貢献している一方では、過去に、地球環境に対する多大な損傷と多くの尊い犠牲の上に現在の化学工業の隆盛があることも忘れてはならないと考えている。そこで、本題に入る前に、化学物質の安全性に関してこれまでの歴史を簡単に振り返ることにより、一般化学物質に関する毒性スクリーニング、特に変異原性試験の在り方を考える一助とした。

戦後の日本の産業の高度成長とともに昭和30年代になると、各地の工場より排出された産業廃棄物により大気汚染や海水汚染が進行して公害問題を引きし、酸性雨や赤潮等の深刻な環境汚染とともに地域住民の生活まで脅かすことになった。工場排水に含まれていた有機水銀による水俣病やカドミウムによるイタイイタイ病の発生はその良い例である。これらに対して、水質汚濁防止法や大気汚染防止法が公害防止のために制定され、工場排水や排煙に対して一定の規制がかかることになった。

ところが、昭和 40 年代になると新たな問題が全地球的規模で発生してきた。それは、製品に含まれていた化学物質の環境における残留性によって、自然界の長い食物連鎖の結果、化学物質が生体に濃縮して、やがてヒトや生物界に甚大な障害を及ぼすことが次第に明らかとなった。その典型的な例が優れた農薬として当時盛んに使用された

DDT や BHC であった。また、その優れた物理化学的特性のために、熱媒体や絶縁油として広範囲に使用されていた PCB による環境汚染であった。

DDT や BHC の使用によって多くの昆虫やそれを食べた鳥が絶滅に瀕した。さらに、PCB は、ヒトの母乳に高濃度で検出され、カネミ油症事件が発端となってその人体に対する慢性毒性が明らかとなった。

これらの化学物質は、製品として化学工場の表口から社会に供給され、その消費や使用、廃棄の過程で環境に放出されて自然環境の調和を乱したところに大きな特徴がある。

そこで、PCB 類似の難分解性で生物に蓄積性のある物質そのものに対してクローズドシステムによって規制する必要が生じたため、本邦においては昭和 48 年に世界に先駆けて、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(所謂、化審法)が制定され、この法律によって、PCB 類似の性質を有する物質は特定化学物質として製造そのものが規制されることになった。

さて、昭和 50 年代になると、化学物質は、新たな問題を生じさせた。その理由の第一として、先進各国においても次々に化学物質を規制する法律が制定されたが、各国の規制がバラバラであるために非関税壁として化学物質の自由な貿易を妨げる懸念が生じたこと、このため、OECD は、1981 年におよそ 70 項目にわたる OECD テスト

ガイドラインを発表した。さらに、翌年 1982 年には化学物質を製造・販売するに先立って、最低限必要なおよそ 40 項目の OECD-MPD (上市前最小安全性評価項目) を決定した。

第二として、国内において半導体工業等で広く使われていたトリクロロエチレンによる地下水汚染が頻発して、汚染した井戸水を継続的に摂取した場合の人体に対する健康被害が危惧された。トリクロロエチレンは、難分解性の物質であったが、PCB とは異なり生物における蓄積性がなかったために、化審法の規制から免れたものである。

このような化学物質に対する世界の情勢の変化やトリクロロエチレン類似の物質に対処するため、昭和 61 年に化審法の一部が改正され(改正化審法)、変異原性試験を含む毒性スクリーニングが導入された。そして、新たに新規化学物質は、第一種特定化学物質(PCB 類似の難分解性、高蓄積性の物質)、第二種特定化学物質(トリクロロエチレン類似の難分解性、低蓄積性の物質)及び指定化学物質(第二種特定化学物質の疑いのある物質)として規制されることになった。

3. 化審法の適用範囲と毒性スクリーニングフロー

それでは、化審法の適用される範囲について簡単に説明しよう。Fig. 1 で示したように、化審法は、医薬品や農薬等特定の化学物質を除き工業用として使用されるすべての新規化学物質を対象と

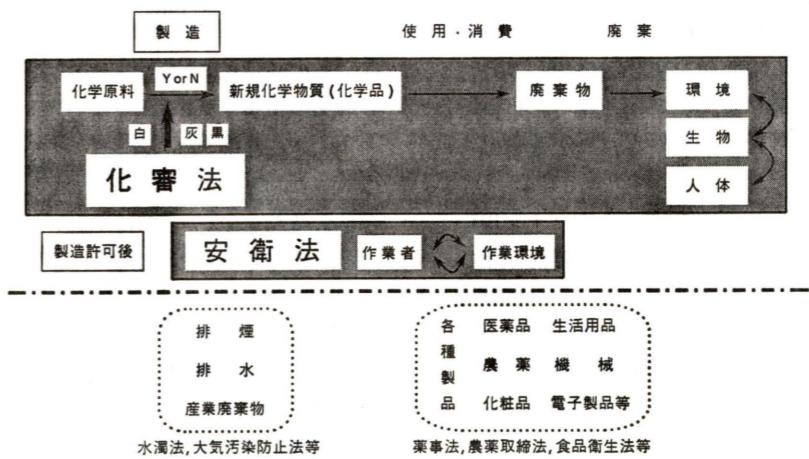


Fig. 1. 化審法の適用範囲。

Table 1. 化審法における化学物質の性状及び規制の概要

| 区分 | 第一種特定化学物質 | 第二種特定化学物質 | 指定化学物質 |
|-------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------|
| 分解性 | 難分解性 | 難分解性 | 難分解性 |
| 蓄積性 | 高蓄積性 | 低蓄積性 | 低蓄積性 |
| 継続的摂取 | 健康を損なうおそれ有り | 健康を損なうおそれ有り | 健康を損なうおそれ有り |
| 環境汚染 | 有り | 有り | 疑いが有る |
| 規制 | 製造、輸入の原則禁止 解放系用途への使用禁止等 表示義務等 | 製造、輸入予定数量の届出 技術上の指針の遵守 | 製造、輸入実績数量の届出 等 |

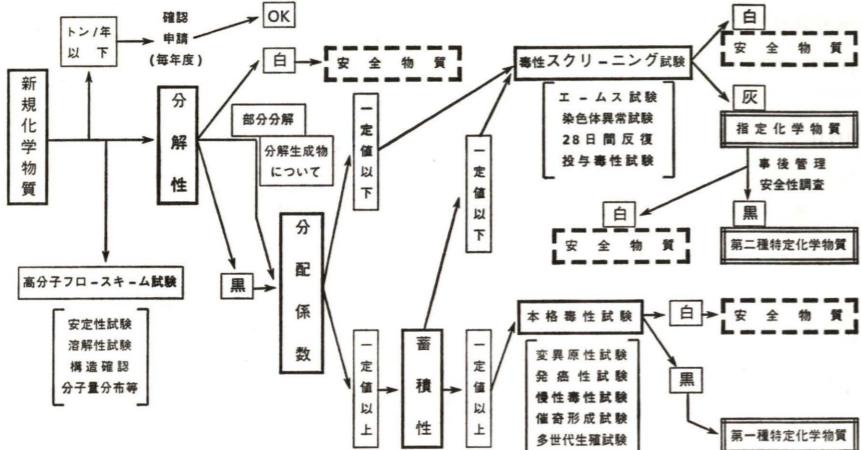


Fig. 2. 化審法におけるスクリーニングフロー。

して、その使用や消費、廃棄を通じて環境経由でヒトや生物に対する毒性を調べることにより、対象とする化学物質を製造していいかどうか審査するところに特徴がある。

これに対して、化学工場の排煙や排水等は公害防止に係わる法律で、医薬品や農薬等に使用される新規化学物質は薬事法、農薬取締法等でそれぞれ規制されることになる。一方、労働安全衛生法(安衛法)は、新規化学物質を製造する化学工場における労働者の安全を対象とする。安衛法に関連して、現時点における化学物質の変異原性をベースとするダイセル化学の取組については後述する。

化審法(改正化審法)における毒性スクリーニングの概要については、Fig. 2 に示した。製造量が年1トンをこえる新規化学物質については、まず、活性汚泥を用いて生分解性を調べ、化学物質が良く分解されれば安全物質となり製造・輸入は自由にできる。

一方、分解され難い場合は、魚のコイを用いて魚体への蓄積性を調べ、この値が一定値以下なら変異原性試験を含む毒性スクリーニング試験を行うこととなる。変異原性試験として、エームス試験及び染色体異常試験及び28日間反復投与毒性試験からなる毒性スクリーニング試験で何ら毒性が見出されなければ安全物質(白物質)となるが、毒性が見出された場合、指定化学物質となって事

後管理(毎年、月別製造量、地域別販売数量の報告義務及び安全性調査の指示等)によって規制を受けることになる(Fig. 2)。

もし、魚体への蓄積性が一定値以上の場合には、本格毒性試験を行うことになるが、一般化学物質は、原料や素材として汎用される性格上概して安価であり数億円も要する本格毒性試験を一々実施するのでは採算がとれない上に、第一種特定化学物質は原則的に製造できないので実際問題としてこの段階で製品の開発を断念する結果になる。

第一種特定化学物質、第二種特定化学物質及び指定化学物質の性状と規制の内容については、Table 1 に示した。これらの物質は、すべて PCB 類似の性質を有するため、難分解性であるが、生体における蓄積性については、第一種特定化学物質のみが高蓄積性であり、第二種特定化学物質及び指定化学物質は低蓄積性の性質を有している。

また、人体に対する影響については、指定化学物質は、ヒトの健康を害するおそれのある物質である。

第一種特定化学物質の製造・輸入については、原則的に全面禁止の措置がとられるが、代替物がない場合、閉鎖系用途に限って例外的に許可される場合がある。鉄道車両のトランクに用いられている PCB はその例である。

第二種特定化学物質については、製造量を始めとして使用や廃棄に至るまで細かい技術上の制限

Table 2. 安全性区分における対象物質及び管理の概要

| 1級(厳重管理) |
|--|
| (1) 対象物質:ヒトや実験動物に対し発癌性を有するかもしくは特に強い変異原性が認められる化学物質 |
| (2) 対応措置:安全性区分の1級に応じた対応措置により、厳重管理する。 |
| 2級(特別管理) |
| (1) 対象物質:ヒトの発癌に十分な因果関係がないが、1種類の実験動物に発癌性を有するかもしくは強い変異原性が認められる化学物質 |
| (2) 対応措置:局所排気等により暴露の防止をはかり特別管理する。ユーザーに対しても特別に注意情報を提供する。 |
| 3級(注意管理) |
| (1) 対象物質:ヒトや実験動物に対する発癌性が知られていないが変異原性を否定できない化学物質 |
| (2) 対応措置:2級に準じたハード措置により暴露の防止をはかり注意管理する。 |
| 4級(通常管理) |
| (1) 対象物質:実験動物に対する発癌性が知られてなく変異原性もない化学物質 |
| (2) 対応措置:漏洩防止、教育等一般的な注意事項について実施する。 |

が課せられる。また、最も規制のゆるい指定化学物質であっても、毎年、月別製造量や地域別販売数量の報告が義務づけられ、必要により安全性調査が開始されることになる。

4. 変異原性等に基づく化学物質の安全性指針について

さて、次に安衛法に関連して、現在、ダイセル化学で実施されている変異原性をベースとする化

Table 3. 発癌性と変異原性に基づく化学物質の安全性区分

| 安全性評価 | | | | 安全性区分 | |
|-------|------|------|-----|-----------|------|
| 発癌性 | | 変異原性 | | 新規(既存)製品等 | |
| ヒト | 実験動物 | エームス | 染色体 | 小核 | ユーザー |
| + | | | | | 1 |
| | - | | | | 4 |
| + | | | | | 2 |
| ++ | | | | | 1 |
| | - | - | - | | 4 |
| | - | - | + | | 3 |
| | - | + | - | | 4 |
| | - | + | + | | 2 |
| | - | ++ | - | | 3 |
| | - | ++ | + | | 2 |
| | + | - | - | | 4 |
| | + | - | + | | 2 |
| | + | + | - | | 3 |
| | + | + | + | | 2 |
| | + | ++ | - | | 3 |
| | + | ++ | + | | 1 |
| ++ | - | - | | | 3 |
| ++ | - | + | | | 2 |
| ++ | + | - | | | 3 |
| ++ | + | + | | | 1 |
| ++ | ++ | - | | | 2 |
| ++ | ++ | + | | | 1 |

学物質の安全性に対する取組、すなわち、変異原性等に基づく化学物質の安全性指針について紹介する。

この指針の目的は、ダイセル化学で取り扱っているすべての化学物質、すなわち、すべての製品、合成中間体、原料及び廃棄物等のすべての物質を対象として、これらの化学物質の安全性について変異原性試験を実施し、その結果に基づいて安全用具、設備改善等の対応措置を行い、それによって、作業者や取扱者の健康障害と環境汚染を防止するところにある。

この指針においては、当該化学物質の発癌性と変異原性の調査結果に基づいて、1級(厳重管理)、2級(特別管理)、3級(注意管理)及び4級(通常管理)まで安全性を区分することにより化学物質を管理するところに特徴を有する(Table 2)。

例えば、1級(厳重管理)の場合は、ヒトや実

験動物に対し発癌性を有するかもしくは特に強い変異原性が認められる化学物質が対象になり、2級(特別管理)の場合は、ヒトの発癌に十分な因果関係はないが、1種類の実験動物に発癌性を有するかもしくは強い変異原性が認められる化学物質である。また、3級(注意管理)の場合は、ヒトや実験動物に対する発癌性は知られていないが変異原性を否定できない化学物質である。発癌性や変異原性のない安全な化学物質は、4級(通常管理)にランクされる。

Table 3に示したように、化学物質の発癌性と変異原性データに基づいて安全性区分は、このように細かく決められる。例えば、小核試験のみに変異原性が認められる場合は、3級であるが、小核試験とエームス試験もしくは染色体異常試験のいずれかが十の場合は、2級に昇格する。さらに、これら3試験のすべてが十の場合は、2級である

Table 4. 化学物質の安全性区分ごとの基本的対応

| 対応項目 | 区 分 | 1級 | 2級 | 3級 | 4級 | 備 考 |
|--------------|-----------|------|------|------|------|------------|
| | | 厳重管理 | 特別管理 | 注意管理 | 通常管理 | |
| 製造・取扱 | 密閉式・遠隔操作 | ○ | | | | 特化則・有機則等準用 |
| | 局部排気 | ○ | ○ | ○ | | " |
| | 保護具 | ○ | ○ | ○ | | " |
| | 漏洩防止 | ○ | ○ | ○ | ○ | " |
| | 改造時の措置 | ○ | ○ | ○ | | " |
| | 廃棄 | ○ | ○ | | | " |
| 貯蔵・輸送 | | ○ | ○ | | | 安衛法・毒劇法等準用 |
| 管理 | 作業環境濃度の測定 | ○ | ○ | ○ | | 特化則・有機則等準用 |
| | 健康診断 | ○ | ○ | ○ | | " |
| | 点検 | ○ | ○ | ○ | | " |
| | 教育 | ○ | ○ | ○ | ○ | " |
| ユーザーへの特別注意情報 | | ○ | ○ | ○ | | " |

が、エームス試験もしくは染色体異常試験のいずれかが十の場合は、1級にランクされる。

このクラス分けに従って、それぞれの安全性区分ごとの対応措置の基準については、Table 4に示した。

Table 4に従って、安全性区分1級から4級までのクラスごとに製造・取扱い、貯蔵・輸送、健康診断等の管理、ユーザーに対する情報提供等が定められている。

5. ダイセル化学に於ける変異原性試験

それでは、ここでダイセル化学に於ける変異原性試験の実施状況から、一般化学物質に関する変異原性試験について若干考察を加えてみたい。

ダイセル化学が製造・販売を行うために、1990年から1993年の4年間に外部の受託試験施設で実施された新規化学物質を対象とする変異原性試験(エームス試験、染色体異常試験及び小核試験)並びにその他の毒性試験(28日間反復投与毒性試験)について、対応する法律、すなわち、化審法、安衛法及びその他(社内対応)並びに各試験ごと(SA: エームス試験、CA: 染色体異常試験、MN: 小核試験、28D: 28日間反復投与毒性試験)に分類し、総試験数に対してそれらの占める割合でそれを表すとFig. 3-A及びFig. 3-Bのように

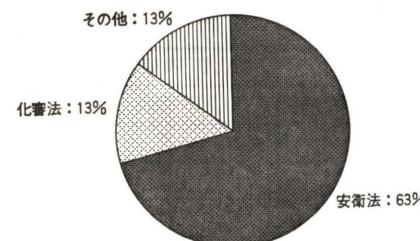
なる。

これらから、一般化学物質を対象とした変異原性試験の特徴を推察することができる。すなわち、新規化学物質の化審法に対応する変異原性試験を含む毒性試験の割合(13%)が安衛法に対応するそれ(63%)の2割程度と少ないのは、ダイセル化学の新規化学物質のほとんどは、前述したFig. 2の化審法に於けるスクリーニングフローの上で生分解性が良い環境中に残留しない化学物質であるからである(Fig. 3-A)。

従って、化審法上では、染色体異常試験、小核試験及び28日間反復投与毒性試験により毒性スクリーニングを実施しなければならない新規化学物質、すなわち、生分解性が悪く生体に何らかの蓄積性を示す化学物質は、そうでない化学物質に比較して著しく減少する結果になる(Fig. 3-B)。さらに、Fig. 3-Bから明らかであるように変異原性試験の内、染色体異常試験(13%)や小核試験(13%)に比較してエームス試験(68%)のみが突出しているのは、安衛法上でエームス試験が陰性の安全性の高い化学物質がほとんどを占める理由による。

さらに、私達の研究室で実際に行った変異原性試験についても、この傾向にほとんど変化は見られない。

A



B

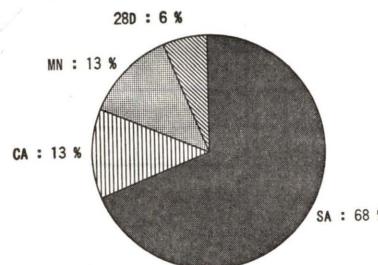


Fig. 3. 新規化学物質の変異原性試験における法律ごとの分類(A)と試験の内訳(B).

すなわち、Fig. 3において同様に 1990 年から 1993 年の間に実施された変異原性試験について調べてみると、染色体異常試験 (18%) や小核試験 (20%) に比較してエームス試験の実施数がやはり大半を占める結果となる (62%)。ここで、小核試験の頻度が、染色体異常試験のそれに比べてやや多い理由は、化学物質本来の性質としての変異原性を調べるためではなく、むしろヒトにおける暴露を想定した場合の *in vivo* における当該物質の変異原性を評価する目的で試験が実施された結果による。しかしながら、それぞれの試験のプロトコールについては、被検物質ごとに目的によって千差万別であり一様ではない。

例えば、新規化学物質の場合であっても、研究・開発のステップ上でそれが置かれている状況や目的等によって、標準プロトコールで実施されるとは限らない。また、前項で述べたように変異原性等に基づく化学物質の安全性指針に係わる場合や製造プロセスのスクリーニング等で実施する場合には、エームス試験の 2 菌株(TA100, TA98)のみを用いた変則的な試験として日常的に実施さ

れる。

さらに、変異原性試験とは異なるが、私達は化学物質の安全性評価に関連して、例えは、ユーザーへの情報提供を目的として、あるいは輸出における包装等級の判定 (IMO: 国際海事機関) のために、急性毒性試験や皮膚刺激性(腐食性)試験、接触アレルギー誘発性の指標である皮膚感作性試験等の毒性試験を実施する場合もある。

そして、このようにして得られた化学物質の安全性評価データは、MSDS(後述)に記載されることになる。

6. 一般化学物質に関する変異原性試験の役割

以上、これまで述べたダイセル化学における場合を参考にして、一般化学物質に関する変異原性試験の役割についてまとめてみたい。

第一は、化審法により新規化学物質の製造・輸入のために実施されるものである。また、それぞれの化学業界の自主規制もあるので、既存物質であっても変異原性試験を実施する必要が生じる場合もある。

第二は、安衛法による場合である。新規化学物質が年 100 kg を越えて製造・輸入される場合は、化学物質の有害性調査制度により変異原性試験が必要となる。

また、ダイセル化学における変異原性等に基づく化学物質の安全性指針に基づいて当該物質の安全性区分を決定するために実施する場合がある。これについては、製品や不純物のみならず反応廃液や排水も対象となる。

この場合、試験結果は、製造現場における保護具や設備改善及び設備投資等に係わることになる。

第三は、化学物質安全性データシート、すなわち、MSDS(Material Safety Data Sheet)に関連して、化学物質の有害性情報を入手するために実施する場合である。

現在、本邦においては MSDS の法制化には未だ至っていないが、1993年の四月から化学製品ごとに MSDS の作成、ユーザーへの交付及び化学品取扱教育の行政指導が既になされている。MSDS は、PL (Product liability: 製造物責任) とも

Table 5. MSDS における化学物質の有害性情報

| モノクロロアセタルデヒド ※見本※ | | |
|---|--|--|
| 有害性情報 | | |
| 皮膚感作性 [ラビット] (コメント:) | | |
| 刺激性 眼刺激 [ヒト] 不明 [ラビット] 不明 皮膚刺激 [ヒト] 不明 [ラビット] 不明 | | |
| 感作性 ラット (コメント: 不明) (コメント:) | | |
| 急性毒性 | | |
| 経口 [ラット] LD ₅₀ : 23 mg/kg 吸入 [ラット] LC ₅₀ : 不明 ppm (Hr.) 経皮 [ラット] LD ₅₀ : 不明 mg/kg | | |
| 、LDL ₀ : mg/kg 、LC ₅₀ : 不明 ppm (Hr.) 、LDL ₀ : 不明 mg/kg | | |
| 急性毒性に関する主な所見: - 不明 | | |
| 亜急性毒性 [ラット] 最大無作用量 (NOEL) 不明 mg/kg | | |
| 亜急性毒性に関する主な所見: 不明 | | |
| 慢性毒性 | | |
| 慢性毒性に関する主な所見: 不明 | | |
| 変異原性 | | |
| エーモス : [+] 文獻 1 発がん性 文獻 染色体異常: [+] OSHA : 記載無 小核試験: [-] NTP : 記載無 IARC : 記載無 日本産衛会 : 記載無 ACGIH : 記載無 | | |
| 変異原性に関する主な所見 労働安全衛生法の変異原性試験結果により、1991年2月有害物質に指定された。(労働省通達 基発 第 80 号) | | |
| 発がん性に関する主な所見 不明 | | |
| 催奇形性 [ラット] 最大無作用量 (NOEL) 不明 mg/kg | | |
| 催奇形性に関する主な所見: 不明 | | |
| その他 | | |

関連しているので、ダイセル化学の化学製品、特に毒性に関する項の一例を Table 5 に示した。一化合物についての MSDS は相当数の枚数があるが、化学物質の有害性情報として、変異原性や発癌性についても入手された情報についてはこの例のように記載される。

第四は、研究・開発のために実施する場合である。この場合、化学製品そのものの変異原性を試験の対象とする場合もあるが、架橋剤等反応試薬として製造される化学物質については、その化学的特性上本来変異原性を有しているものが多い。このような化合物については、化学製品そのものの変異原性よりはむしろそれによって製造された化合物における残留性が問題となる。同様に、製品の主成分以外に変異原性のある副生成物や不

純物を含まない、より安全な化合物の製造を目的として製造プロセスの開発・改良のために変異原性試験を実施する場合もある。

変異原性のないもしくは弱い化学製品は無論のことであるが、不純物としての変異原性物質を含まない化学製品は、その分だけ付加価値が高まることになり、商品の差別化に繋がることになる。

第五は、学術的な意味合いにおける原変異性試験である。これまで述べてきたように一般化学物質の用途は不特定多数である上に、変異原性試験の対象となるサンプルについても原材料、化学製品(有機合成品、溶媒、反応試薬、プラスチックペレット、フィルム等)、不純物、反応廃液、排水に至るまで評価の目的もその形状もまちまちであり、多様且つ雑多である。これに加えて、社内の

他部門から依頼されたサンプルについて、一定のプロトコールに従って変異原性試験を実施しているだけでは、どうしても受動的な側面を否定できない。

この結果は、当該サンプルが本来必要としているはずである変異原性試験の真の意味を見失いかねないし、試験の日常的ルーチン化によって、実験レベルに加え研究モラルにも問題を生じかねない。この点は、受託試験施設でも同様な悩みがあると思う。

現在、変異原性の研究が、試験の標準化、国際化の波とともに、大きなブレークスルーの時代を迎えてることは衆目の認めるところであり、本学会においても熱い議論が戦わされた。しかしながら、純粹に学問としての変異原性の研究は、企業の目的とは到底相反するものであり、仮に、特定の企業である時期に基礎的な研究ができたとしても例外であり、化学企業全体がそのようにできるとは限らない。

従って、学問と行政及び基礎研究と実用とを結び付けている日本環境変異原学会、哺乳類分科会におけるMMS共同研究は、この点で企業研究者にとっても、また、大学等の基礎研究者にとっても相互に適度の刺激を与えて益するところ極めて大であると考えている。今後も参加者の裾野を広げながら学問的にも高いレベルに発展してゆくことを強く期待している。

7. 一般化学物質の変異原性試験に求められる機能とは

それでは、化学工業における一般化学物質の変異原性試験について、一体どのような機能を期待したらよいのか筆者の経験を基にまとめてみたい。

まず、第一に、一化学企業の製造する化学物質の種類は多くその形状も様々であるので、一般化学物質の変異原性試験は、まずどんな物性の化学物質にも対応できる試験である必要がある。

第二として、不純物や反応廃液、排水の評価等、変異原性を製造プロセスのスクリーニングに利用する場合は、短期間におびただしい数のサンプルを評価することになるので、試験は簡単でスピー-

ディに且つ安全に実施できるものが良い。また、一般化学物質は、医薬品等と比べると製造量は多いけれども概して安いものである。従って、高価な試験では採算がとれないもの、試験コストは安い必要がある。

第三として、ダイセル化学の例で示したように製造現場における設備改善や反応物の暴露防止対策のために変異原性試験を利用する場合等、生物学とは無縁の機械分野の技術者や安全環境部等事務系分野の人にも容易に理解してもらう必要があるので、簡明な原理に基づいた明白な試験結果は常に求められる。

第四として、これに関連して化学分野の技術者の理解を得るために、状況証拠的な生物学的相対評価だけではなく、例えば、P-32ポストラベル法のような化学的な物質変化として変異原性を捉えられる絶対評価と成り得るような試験系の開発も必要ではないかと考えている。

最後に、化学物質を製造している化学工場の製造現場において最も重要なことは、いかに安全に作業に従事できるかどうかと言うことであるので、このレベルなら安全と考えられるようなヒトにおける安全性の閾値が算定され、変異原性の強さと危険性の程度（発癌）を明確に関係づけられる試験系である必要がある。

8. おわりに

一般化学物質は、原材料や化学中間体として用いられており、それらが試薬や溶媒として化学反応に使用されて特定の機能を有する最終製品ができるまでには幾多の変化、反応及びプロセスを受ける場合が多い。

すなわち、一般化学物質は、最終製品に至る途中の通過物質と言えなくもない。さらに、原材料であるがためにその価格は安価である。また、一般化学物質は素材としても使用されることが多いために、消費者の目に直接触れ難い物質である反面、歯磨用ペーストの成分にも糊料等として使用されていることから分かるように、薬は飲まなくとも一般化学物質なくして、私達の日常生活は一日たりとも成り立ち得ない程の強い影響力を合わせ持っている。

今後、一般化学物質を取り巻く社会環境は、PL問題を持ち出すまでもなく益々厳しい方向に進んでゆくことは確実であり、製品の安全性を考慮しない化学企業は到底生き残れない時代にさしかかっていると言えよう。

しかしながら、化学企業の製造する原料、中間体や反応試薬等は、本来毒性があり変異原性を有するものが多く、これらの言わば危険な化学物質を他産業の発展のために供給すること、ひいては人々の文明の利に資することは化学工業の社会的使命である。

このような一般化学物質が包含する特有な問題を踏まえて、必ず製品コストに反映するはずである試験実施による採算性の問題との接点を探りながら、より安全な化学物質を製造し社会に供給してゆくために、一般化学物質に対応する独自の変異原性の評価系があっても良いのではないかと思う。一般化学物質は、それを製造している一化学企業の問題というよりは、むしろ私達が必要としている最も身近な生活必需物質であることを考慮すれば、産官学が共同して一般化学物質に対する

適格で且つ合理的な変異原性試験系を構築する時期に来ているのではないかと考えている。

謝 辞

本発表の機会を与えて戴きました国立衛生試験所祖父尼俊男先生に深く感謝致します。

東京薬科大学渡部烈先生並びに第一製薬（株）中央研究所島田康弘博士に多くのご教示を戴きました。ここに深く感謝致します。

また、本発表に際しては、ダイセル化学工業（株）総合研究所竹中栄二、池田朱美、平尾勝美、後藤達乎、同社安全環境部内川育威、ダイセルテクノロジーサービス高野昭の各氏から多大なご助力を戴きました。ここに深く謝意を表します。

参考文献

- 通産省基礎産業局化学品安全課監修（1990）逐条解説化審法、第一法規出版株式会社。
厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修、大森義仁編（1987）化審法毒性試験法の解説、化学工業日報社。

第22回大会パネルディスカッション
「変異原性試験の役割とその評価」

農薬の安全性評価における変異原性試験の有用性と問題点
Mutagenicity testing for development of pesticides: A role
and issues

原 正 樹
Masaki Hara

住友化学工業(株)生物環境科学研究所
554 大阪市此花区春日出中 3-1-98

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

(受付: 1994年3月23日; 受理: 1994年3月23日)

Summary

A role of mutagenicity testing for development of pesticides is 1) to predict carcinogenic potentials of chemicals, 2) to assess the heritable genetic effects, and 3) to support and elucidate the results of long-term rodent carcinogenicity studies.

Ames test has been widely used as a useful short-term assay to predict carcinogenic potential of chemicals. We also conduct Ames test at an early stage of developing pesticides to screen nongenotoxic candidates. It is essential to develop a chemical negative in Ames test because its positive predictive value is relatively high.

From our data, about 50% of the chemicals which were negative in Ames test were detected positive in *in vitro* chromosomal aberration tests. However, their clastogenic potentials observed *in vitro* were not confirmed *in vivo* assays (chromosomal aberration or micronucleus induction in bone marrow). In addition, the Ames negative chemicals were negative in other mutagenicity tests (e.g., rec-assay, V79/HGPRT test, UDS tests).

For registration of pesticides a set of mutagenicity tests including Ames test is required, but the test items are different among Europe, the USA and Japan. It is desirable that attempts to harmonize a base set of mutagenicity testing, testing protocol and testing strategy should be made.

With regard to prediction of carcinogenic potentials of chemicals, mutagenicity testing has some limitations because it does not detect nongenotoxic carcinogens. It would be useful to examine cell proliferation or preneoplastic lesions at a target organ for development of pesticides.

Keywords: pesticide, genotoxicity, mutagenicity, carcinogenicity

1. はじめに

農薬に限らず、医薬品、化粧品、食品添加物、その他ほとんどあらゆる化学物質についてそれら安全性評価の一環として変異原性試験が実施されている。必要とされている変異原性試験はそれぞ

れの用途などに応じて異なるものの、その目的はそれら化学物質の DNA や染色体などの遺伝物質に対する影響を調べ、ヒトに対する遺伝的影響を評価したり発癌の危険性を予測することである。ここでは農薬の安全性評価において変異原性

試験が担っている役割とその評価、およびその問題点や今後の課題について、いくつかの具体例もまじえて述べる。

2. 農薬の安全性評価と変異原性試験の意義

農薬の安全性評価は主に哺乳動物毒性の評価と環境に対する影響の評価に分けられ、Table 1 に示すように極めて広範囲のデータが必要であり、その開発には多大な費用と長い期間が必要である。食物を経由してヒトが摂取する可能性のある農薬の場合には発癌性試験は必須項目であり、通常ラットおよびマウスを用いて長期発癌性試験が実施され、その結果により発癌性の有無が評価される。農薬の登録において変異原性試験はヒトに対する遺伝的影響の評価と動物での発癌性試験データのサポートという目的で実施される。遺伝的影響を評価する場合、細菌よりは動物細胞、*in vitro* より *in vivo*、体細胞より生殖細胞での結果を重視するのが基本的な考え方である (Dearfield *et al.*, 1991)。動物実験で発癌性が認められた場合、その化合物の開発は極めて困難となる。農薬の開発ではいかに発癌性のない化合物を選択するかは極めて重要なポイントである。農薬開発の初期の段階では変異原性試験、特に Ames 試験は発癌性的スクリーニング試験として重要な位置づけにある。

3. 農薬の開発と変異原性試験

1) Ames 試験によるスクリーニング評価

Ames 試験は発癌性の初期スクリーニング法と

Table 1. 農薬の登録に必要な安全性評価

| | |
|-----------------|--------------------------|
| 哺乳動物毒性 | 環境に対する影響 |
| ・急性毒性（経口、経皮、吸入） | ・水生生物毒性 (魚, ミジンコ, 藻類) |
| ・亜急性毒性 | ・環境での挙動 分解 (土壤, 水, 光) |
| ・慢性毒性 | 移動性 |
| ・発癌性 | ・植物代謝 |
| ・次世代に及ぼす影響 | ・残留 (作物, 土壤, 河川水) |
| 催奇形性 | |
| 繁殖性 | |
| ・眼, 皮膚の刺激性 | |
| ・皮膚感作性 | |
| ・変異原性 | |
| ・神経毒性 | |
| ・代謝 | |
| ・一般薬理 | |

して世界中で広く用いられている試験である。Ames 試験が開発された当初非常に高い発癌性との相関が報告された (McCann *et al.*, 1975)。これまで多くの研究者によって Ames 試験と発癌性との相関性に関する報告がなされ、現在では当初期待されたほど相関性は高くなかったことが明らかになってきた。しかし、決して発癌性のスクリーニング試験としての Ames 試験の重要性が低下しているわけではない。また、発癌性との相関性の点で Ames 試験は比較的高い陽性予測率を示すのが特徴であり (小木曾・三宅, 1993), 発癌性試験で陽性となる危険性を考慮すれば Ames 試験で陰性の化合物を開発するのが基本と考えられる。スクリーニング法として Ames 試験を利用して農薬の開発に成功した化合物として diethofencarb の例を紹介する (藤村ら, 1993)。Diethofencarb はフェニルカーバメートの基本骨格を持つ殺菌剤である。この基本骨格を有する化合物でフェニル基の 3 置換誘導体がすぐれた効力を持つものとして見いだされた。しかし、Fig. 1 に示すように Ames 試験で陽性の結果であった。TA100 株で直接法では陰性であったが、S9 の存在下で明らかな陽性を示した。化学構造からカーバメート結合が切断されて生成されるアニリン体がその原因と予想された。アニリン体も Ames 試験で陽性となり、また、*in vitro* や *in vivo* で代謝を調べたところアニリン体が生成することが確認された。種々の誘導体のスクリーニングを実施したが、フェニル基の 3 置換体は効力に優っていたがいずれも Ames 試験で陽性を示した (Table 2)。2 置

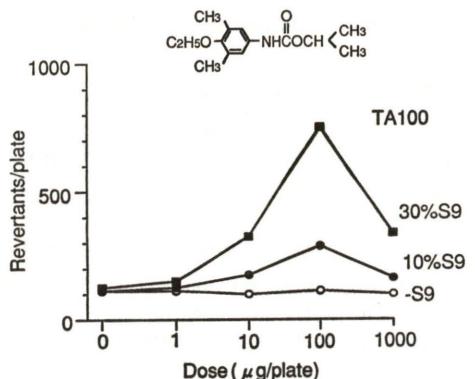
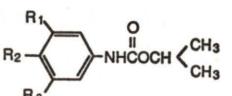


Fig. 1. フェニルカーバメート系化合物の Ames 試験結果の例.

サルモネラ TA 100 株を用いて PCB 誘導 S9 の添加量と変異原活性との関係を調べた。

Table 2. フェニルカーバメート系化合物の Ames 試験によるスクリーニングの結果 (サルモネラ TA 100 株)

| R1 | R2 | R3 | Ames試験結果 (+S9) | |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------|-------|
| | | | 親化合物 | アニリン体 |
| CH ₃ - | C ₂ H ₅ O- | CH ₃ - | + | + |
| Cl- | C ₂ H ₅ O- | CH ₃ OCH ₂ - | + | + |
| CH ₃ - | C ₂ H ₅ O- | CH ₃ OCH ₂ - | + | + |
| CH ₃ - | C ₂ H ₅ O- | C ₂ H ₅ O- | + | + |
| C ₂ H ₅ O- | C ₂ H ₅ O- | H- | - | - |



換体であるジエトキシ体は効力も良く、親化合物、アニリン体とも陰性を示し、最終的にこの化合物を選択した。

Ames 試験は化学物質の変異原性のポテンシャル

ルを検出する方法として最も有用な試験である。しかし、細菌を用いた系として特有な結果を示す場合もある。例えば、殺菌剤として開発した oxolinic acid は細菌の DNA ジャイレースの阻害剤として古くから知られ、その阻害作用によって抗菌性を示す (Cozzarelli, 1980; 澤瀉ら, 1993)。この化合物は通常の TA 系の菌株では変異原性は陰性であるが TA102 株で S9 非存在下で比較的低濃度で陽性となる (Levin *et al.*, 1984)。Table 3 にまとめたように、oxolinic acid は細菌と比較して動物細胞に対する毒性は著しく弱く、また、細菌の DNA ジャイレースに相当するトポイソメラーゼ II に対する阻害作用も非常に弱い (Barrett *et al.*, 1989)。変異原性試験では *in vitro* 染色体異常試験で析出が見られる条件で切断型を主体とする異常を増加させたが、他の *in vivo* を含めた試験では動物細胞に対する変異原性は認められなかった。細菌で認められた陽性の結果はおそらく oxolinic acid の有する酵素阻害に起因するものと考えられた (McCoy *et al.*, 1980)。

ここ数年のわれわれの Ames 試験による農薬関連の化合物のスクリーニングの結果では10数%の化合物が陽性となっているが、不純物による陽性が明らかとなった例も少なくない。Ames 試験は発癌性のスクリーニング試験として極めて有用な系であるが、各化合物の化学構造や生理活性なども考慮して変異原性を評価する必要がある。

2) Ames 試験陰性化合物の他の変異原性試験

農薬開発の初期の段階で Ames 試験によるスクリーニングを実施して陰性の化合物がさらに次

Table 3. Oxolinic acid の生物活性と変異原性

| | |
|------|--|
| 細胞毒性 | 細菌 $LC_{50} < 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ |
| 酵素阻害 | DNA gyrase $IC_{50} 10 \mu\text{g}/\text{ml}^a$ |
| 変異原性 | Ames (TA 102) + ^b Rec + |

^a Gellert, 1981.

^b Levin, et al., 1984.

| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| 哺乳動物細胞 | — |
| LC_{50} | > 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| Topoisomerase II | — |
| IC_{50} | 1300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ |
| 染色体異常 (<i>in vitro</i>) | ? |
| V79/HGPR | — |
| UDS (<i>in vitro</i>) | — |
| マウス小核 | — |
| SCE (<i>in vivo</i>) | — |

Table 4. Ames 試験陰性化合物の他の変異原性試験陽性率^a

| 試験 | 陽性率 |
|----------------------------------|-----------------|
| Rce-assay | 0% |
| 染色体異常 (<i>in vitro</i>) | 50% |
| 小核/染色体異常 (<i>in vivo</i>) | 8% ^b |
| V79/HGPRT | 0% |
| UDS (<i>in vitro, in vivo</i>) | 0% |

^a Ames 試験を含め 3 種類以上の試験を実施した化合物を選択した。化合物数は各試験により異なり 10~26 である。

^b マウス小核試験で陽性(大きな小核)であったが骨髄での染色体異常は陰性だった。

の段階へ進む。最終的に登録の時までには Ames 試験を含む数種類の変異原性試験が実施される。そこで主に農薬関連で候補化合物も含めた Ames 試験で陰性の化合物について他の変異原性試験での結果を比較してみた (Table 4)。Ames 試験で陰性の化合物の場合、Rec-assay, V79 細胞での遺伝子突然変異性試験、UDS 試験ではいずれも陰性を示している。*In vitro* 染色体異常試験では半数の化合物が陽性となったが骨髄での染色体異常誘発性はいずれも認められなかった。したがって、*in vitro* でみられた染色体切断作用 (clastogenicity) が *in vivo* で確認された例はなかった。2 化合物がマウス小核試験で陽性を示したが、紡錘糸形成阻害剤で観察されるような大きな小核の増加であった。また、骨髄細胞での染色体異常は認められず、いわゆる clastogen とは異なり、細胞分裂に影響を与えるような作用に起因すると推察された。

3) *In vivo* 試験と標的臓器での曝露

In vitro 染色体異常試験で陽性となった場合、*in vivo* での影響を調べるために一般的には骨髄を標的とした小核試験や *in vivo* での染色体異常試験が実施される。prallethrin はピレスロイド系の殺虫剤であり、Ames 試験、V79 を用いた遺伝子突然変異性試験で陰性であったが *in vitro* の染色体異常試験で陽性となった。マウス小核試験やラットの肝での UDS 試験はいずれも陰性であった (新庄ら、1989)。化合物の組織への到達性を調べるために、¹⁴C で標識した化合物を用いて最大

Table 5. Prallethrin の組織濃度^a

| 組織 | 組織濃度 ($\mu\text{g/g tissue}$) ^b | 相対比 |
|----|---|------|
| 血液 | 6.9 | 1 |
| 骨髄 | 4.5 | 0.65 |
| 脳 | 2.5 | 0.36 |
| 腎臓 | 21.7 | 3.1 |
| 肝臓 | 30.6 | 4.4 |

^a マウスに最大耐量 150 mg/kg (¹⁴C 標識) を経口投与後 6 時間に組織を摘出した。

^b 組織の湿重量 1 gあたりの親化合物換算量。

耐量を投与し各組織での放射能レベルを測定した (Table 5)。小核試験での標的組織である骨髄のレベルは血液の 60~70% であり、肝臓では血液の 4~5 倍であった。骨髄での小核試験や肝臓での UDS 試験で本剤は陰性を示したことから *in vivo* で変異原性を示すことはないと判断した。

最近、特に医薬品の毒性評価においてトキシコキネティックスが重要視され始めて来ている。医薬品のように比較的高濃度でヒトに投与されるのと異なり、農薬の場合は極めて低い曝露であり、医薬品のようなヒトでの曝露レベルと動物実験での曝露レベルとの比較による評価をそのまま農薬の評価に応用するのに無理な点もある。このようなデータを農薬の安全性評価にどう役立て行くか十分な議論が必要と思われる。

4. ガイドラインの問題点

日欧米の農薬登録における変異原性試験の要求項目を Table 6 に示した。いずれも Ames 試験を基本にしているが必要とされる最少の試験セットはそれぞれ異なっているのが現状である。殺虫剤として開発した幼若ホルモン様作用を有する priproxyfen の場合は各国での登録のためにこれ

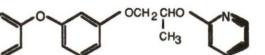
Table 6. 農薬の登録申請に必要な変異原性試験

| | 日本 | 米国 (1991) | 欧州 (1993) |
|----------------------------|----|--------------|--------------|
| Ames 試験 | ○ | ○ | ○ |
| rec-assay | ○ | | |
| 染色体異常 (<i>in vitro</i>) | ○ | | ○ |
| L5178Y/TK | | ○ | ○ |
| 小核試験 | | ○ | △ |
| UDS (<i>in vivo</i> ラット肝) | | | △ |

△: *in vitro* 試験で陽性の場合に実施

Table 7. Priproxyfen^aの変異原性試験とガイドライン

| 試験 | 試験条件 | 結果 | 日 | 米 | 欧 |
|------------------------|--------------------------|----|---|---|---|
| Ames 試験 | 5000 $\mu\text{g/plate}$ | — | ○ | ○ | ○ |
| Rec-assay | 20mg/disk | — | ○ | ○ | |
| 染色体異常(CHL) | 1mM | — | ○ | | |
| 染色体異常(CHO) | 0.3mM(-S9) 1mM(+S9) | — | ○ | ○ | |
| V79/HGPRT | 0.3mM(-S9) 1mM(+S9) | — | ○ | ○ | |
| UDS(<i>in vitro</i>) | 0.63mM | — | ○ | | |
| 小核試験 | CD-1マウス, 5000mg/kg, po | — | ○ | | |



まで 7 試験を実施している (Table 7). *In vitro* 染色体異常試験は日本と欧米用にそれぞれ CHL 細胞と CHO 細胞を用いた試験を行った。化学構造からは変異原性に関与すると推測される構造も含まれず (Ashby and Tennant, 1988), その変異原性の評価にこれだけ多くの試験が必要かは疑問である。医薬品で進められている国際的なハーモナイゼーション (ICH) が農薬の分野でも行われることが望まれる。

5. 変異原性試験と発癌性の評価

農薬ではすでに述べたように動物を用いた発癌性試験は通常必須な試験項目であり、その結果によって発癌性の有無が判断される。動物実験で発癌性が認められればヒトにも同様な危険性があると考えるのが基本原則である。一方、近年の発癌研究の進展により、実験動物に特異的と考えられ

Table 8. ヒトへの危険性が低いと推定される動物実験での発癌性

| | |
|----------|---------------------------------|
| マウス肝腫瘍 | 薬物代謝酵素誘導 (フェノバルビタール) |
| 肝腫瘍 | ペルオキシゾーム増生 (クロフィブレート) |
| ラット甲状腺腫瘍 | 甲状腺刺激ホルモン上昇 (チオウラシル) |
| 乳腺腫瘍 | プロラクチン上昇 |
| 膀胱腫瘍 | 結石 (ウラシル) アルカリ尿 (サッカリンナトリウム) |
| | ラット精巣間細胞腫 |

(高橋, 1990 より作表)

るような腫瘍の発生の場合や、ヒトに対しては発癌の危険が低く、曝露が低ければ安全であると考えられる場合も明らかになってきている (Table 8)。化学物質の発癌性のメカニズムを解明しヒトへの危険性を評価することは重要であると共に、その際その化合物がいわゆる変異原性のある発癌性物質 (genotoxic carcinogen) か変異原性のない発癌性物質 (nongenotoxic carcinogen) かはヒトへの危険性を評価する上で重要と考える。

6. 変異原性試験における今後の課題

すでに述べたように変異原性試験には化学物質のヒトに対する遺伝的影響の評価と発癌性の予測という大きく 2 つの役割がある。

変異原性試験の充実の点では、最近開発されたトランスジェニック動物の系は臓器特異性や生殖細胞への影響を容易に検出しうる系として今後期待される試験系であろうし、また、代謝活性化能を有する細胞の利用は簡便に高感度で変異原性物質を検出することを可能にしてきている。また、変異原性の本質が DNA や染色体と化学物質の相互作用であることを考えると化学構造からのアプローチも今後一層必要と考えられる。規制面では、現在医薬品で進められているような国際的なハーモナイゼーション (ICH) が農薬も含む他分野でも推進されるべきであろうし、その際試験項目や方法ばかりでなく評価体系も含めた総合的ハーモナイゼーションが必要であろう。また、発癌性のスクリーニングという点では、変異原性試験で検出できないいわゆる nongenotoxic carcinogen の予測であり、化合物の毒性や標的臓器を考慮して、RDS 法のような DNA 合成や細胞増殖を指標にする方法や伊東法のような中期発癌性試験などを実施して、より正確に発癌性の予測をしていく必要がある。一方、実験動物での発癌性試験自身にも最大耐量 (MTD) での投与の影響、化学物質に対する代謝・生体反応などの種差、実験動物自身の遺伝的特異性などの問題がある (高橋, 1990)。これらの諸課題を解決していくことによって、ヒトに対する化学物質の発癌性や遺伝的影響をより適切に予測し、評価していくものと思う。

参考文献

- Ashby, J. and R. W. Tennant (1988) Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP, *Mutat. Res.*, **204**, 17-115.
- Barrett, J. F., T. D. Gootz, P. R. McGuirk, C. A. Farrell and S. A. Sokolowski (1989) Use of *in vitro* topoisomerase II assays for studying quinolone antibacterial agents, *Antimicrob. Agent Chemother.*, **33**, 1697-1703.
- Cozzarelli, N. R. (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA, *Science*, **207**, 953-960.
- Dearfield, K. L., A. E. Auletta, M. C. Cimino and M. M. Moore (1991) Considerations in the U.S. Environmental Protection Agency's testing approach for mutagenicity, *Mutat. Res.*, **258**, 259-283.
- 藤村 真, 高橋淳也, 大石敏朗, 堀出文男, 原 正樹, 南部健二 (1993) 新殺菌剤ジエトフェンカルバの開発—負担関交差耐性の応用—, 住友化学 (1993-I), 15-31.
- Gellert, M. (1981) DNA topoisomerases, *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 879-910.
- 小木曾重文, 三宅幸雄 (1993) Ames 試験の問題点, 環境変異原研究, **15**, 83-87.
- Levin, D. E., L. J. Marnett and B. N. Ames (1984) Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA 102, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **81**, 4457-4461.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki and B. N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **72**, 5135-5139.
- McCoy, E. C., L. A. Petrullo and H. S. Rosenkranz (1980) Non-mutagenic genotoxins: Novobiocin and nalidixic acid, 2 inhibitors of DNA gyrase, *Mutat. Res.*, **79**, 33-43.
- 澤潟久方, 田中 慎, 小川雅夫, 小栗幸男 (1993) 新規細菌病防除剤スターの開発, 住友化学 (1993-II), 4-21.
- 新庄五朗, 矢野俊彦, 松尾憲忠, 梅村武明, 光田 賢, 関 高樹 (1989) 新規高ノック性ピレスロイド“エトック”的開発, 住友化学, (1989-II), 4-18.
- 高橋道人 (1990) 発がん性の外挿, 毒性試験講座1 安全性評価の基礎と実際 (林 裕造, 大澤仲昭編), 地人書館, pp. 247-258.

特別企画

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 97-112 (1994)

第22回大会パネルディスカッション
「変異原性試験の役割とその評価」

医薬品(特に制がん剤)開発における変異原性試験の意義 A role of mutagenicity tests in developing of ethical drugs, especially anticancer drugs

大内田昭信
Akinobu Ohuchida

大鵬薬品工業(株)安全性研究所
771-01 德島市川内町平石夷野 224-2

Drug Safety Research Lab., Tokushima Research Center, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., 224-2, Ebisuno, Hiraishi, Kawauchi-cho, Tokushima 771-01, Japan

(受付: 1994年2月3日; 受理: 1994年2月3日)

Summary

Many kinds of ethical drugs, including about 50 kinds of anticancer drugs, are used in clinical. As many anticancer drugs inhibit DNA from replicating, act metabolism of nucleic acids, and so on, there are some problems that most of these drugs also have mutagenic and carcinogenic potency. In this paper, the results of the mutagenicity and/or carcinogenicity tests on 78 anticancer drugs were summarized. The roles of mutagenicity tests in developing of ethical drugs were also discussed. The mutagenicity tests, including Ames, chromosomal aberration (CA) and micronucleus (MN) tests, are usually conducted as two purposes. One is screening tests of genotoxicity and carcinogenicity, the other is a part of evaluating tests on the toxicological characteristic. On the developing ethical drugs, excluding special drugs, e.g. anticancer drugs, a positive result on mutagenicity tests may be demerit, so these tests often play on the important role for the decision of its usefulness in clinical.

Many of alkylating drugs, antitumor antibiotics and platinum compounds showed positive on Ames, CA and MN tests. All of antimetabolites and vinca alkaloids were showed positive on CA and MN tests, but few were positive on Ames test. No reports showed positive on these tests of hormones, cytokines and immunoactivators. As to carcinogenicity, there were some positive reports on alkylating drugs, antitumor antibiotics, platinum compounds and hormones, while two negative reports on an antimetabolite and an antitumor antibiotic were able to be found.

It would be difficult to separate the mutagenic or carcinogenic potency from anticancer drugs, considering their action mechanism. However, there are some of anticancer drugs showing negative results on mutagenicity and carcinogenicity tests. So, we have to go to the goal of developing new anticancer drugs with few adverse effects, including mutagenicity and carcinogenicity, taking a prolongation of survival span and improvement of quality of life for cancer patients in consideration.

Keywords: anticancer drugs, mutagenicity tests, carcinogenicity tests

1. はじめに

現在、医療現場では数多くの医薬品が使用されている。こうした医薬品の中に約 50 品目の制がん剤があり、更に臨床治験中の薬剤が約 60 品目ある。医薬品は薬事法の規制の中で動物試験や臨床試験が行われ、その薬効とともに安全性が十分に確認された後、販売される。制がん剤もその例外ではない。がん患者は 1993 年の医療統計によると日本に約 52 万人いるといわれ、医療現場の努力にもかかわらず年間約 23 万人の人が亡くなり、死因の第 1 位となっている（厚生省人口動態統計課、1993）。急性白血病などの一部のがん種において制がん剤による奏効率は上昇しているが、まだがんに対する画期的な治療薬はなく、制がん剤全体としての奏効率は決して高くない。従って、

奏効率の高い制がん剤が医療現場では切望されている。

現在使用されている制がん剤の多くは DNA 複製や核酸代謝に作用することで、薬効を発現する。制がん剤の作用機序から鑑み、有害作用として変異原性やがん原性が問題となることが多いと思われる。そこで、臨床で使用されている制がん剤を中心に、報告されている変異原性やがん原性の結果についてまとめ、医薬品開発における変異原試験の意義について論ずる。

2. 医薬品開発の特徴

医薬品の開発には一般的には Fig. 1 に示したような開発のプロセスと期間を必要とする。スクリーニングのステージでは多数の候補化合物の中

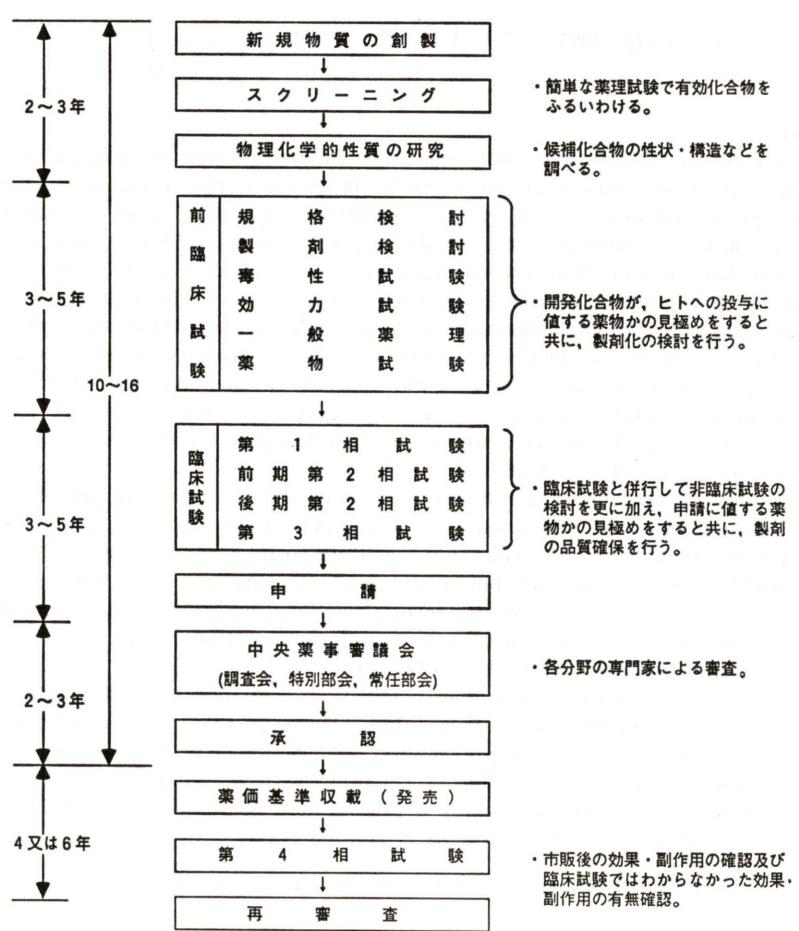


Fig. 1. 新薬開発のプロセスと期間.

から、期待される薬効の有無や強弱、変異原性を含む概略的な安全性に関する情報、製剤化の難易度などを検討し、開発化合物の絞り込みを行う。

前臨床試験のステージでは効力試験で更に薬効を確認する一方で、製剤上の規格を設定したのに、動物を用いた安全性試験、一般薬理試験、薬物動態試験等を実施する。安全性試験として毒性試験法ガイドラインと GLP に従って、一般的にはラットおよびイヌを用いた単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験 (Seg I), 変異原性試験などが行なわれる。制がん剤も基本的には同様の安全性試験を実施することになる。このステージで動物での効力と安全性を十分確認すると同時に、臨床試験を実施する上で必要な基礎的なバックアップデータの準備を行う。前臨床試験で有効性や安全性に問題がないことを確認した上で、社内外の倫理委員会の審査を経た後、臨床

試験ガイドラインと GLP に従って臨床試験を実施する。

臨床試験は3つのステップに大別されており、吸収・代謝・忍容性をみるための健常人での第1相試験、少数の患者で有効性や安全性を確認する第2相試験、多数の患者で類薬との比較、有効性および安全性をみる第3相試験が順次行われる。第1相試験は通常、健常人で実施されるが、がん剤では薬剤の性質上、がん患者で実施される。臨床試験の進みに合わせて、更に製剤の安定性試験、安全性試験、効力試験、薬物動態試験などを詳細に検討する。

以上のステージを経た後、厚生省に承認申請の出願を行うが、薬剤開発に取り組んでから申請までには 10~16 年という長い年月を要することになる。また、前臨床試験ステージに入った化合物すべて申請までにたどりつけるわけではなく、

Table 1. 新薬の承認申請時に添付される資料

| | | |
|--|--|---|
| イ 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料 | 1. 起源又は発見の経緯 2. 外国における使用状況 3. 特性及び医薬品との比較 検討等 | に関する資料 " " " |
| ロ 物理的化学的性質並びに規格及び試験方法等に関する資料 | 1. 構造決定 2. 物理的化学的性質等 3. 規格及び試験方法 | " " " " " " |
| ハ 安定性に関する資料 | 1. 長期保存試験 2. 苛酷試験 3. 加速試験 | " " " " " " |
| ニ 急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、催奇形性その他 の毒性に関する資料 | 1. 急性毒性 2. 亜急性毒性 3. 慢性毒性 4. 生殖に及ぼす影響 5. 依存性 6. 抗原性 7. 変異原性 8. がん原性 9. 局所刺激 | " " " " " " " " " " " " " " " " " " |
| ホ 薬理作用に関する資料 | 1. 効力を裏付ける試験 2. 一般薬理 | " " " " |
| ヘ 吸収、分布、代謝、排泄に関する資料 | 1. 吸収 2. 分布 3. 代謝 4. 排泄 5. 生物学的同等性 | " " " " " " " " " " |
| ト 臨床試験の試験成績に関する資料 | 臨床試験の試験成績 | " " |

医薬品製造指針(1992)より

申請まで到達できる薬剤は 1~2 割位だと思われる。

医薬品の申請には、Table 1 で示した開発の経緯、物性や規格、安定性に関する資料、安全性に関する資料、薬理作用に関する資料、吸排に関する資料、臨床試験成績に関する資料などの多くの資料が必要である。安全性に関する資料の中には一般毒性試験、生殖・発生毒性試験、抗原性試験、がん原性試験など 9 つの試験項目があり、その 1 つの試験項目として変異原性試験が要求されている。これらの資料が中央薬事審議会で審査され、効力・安全性の面で有用であると判断された薬剤が医薬品として、発売・使用されることになる。発売後も、第 4 相試験として、更に有効性と安全性について調査・報告し、再審査を受ける必要がある。

3. 医薬品開発における変異原性試験の位置付け

前述の通り、医薬品開発のステージの中で、変異原性試験はスクリーニングと前臨床試験の両ステージで行われることが多い。スクリーニングのステージでは本試験の多くが比較的簡便で、かつ短期間で行えることより遺伝毒性やがん原性などのスクリーニング試験として候補化合物の選択の参考にする目的で実施される。また、前臨床試験のステージでは一般毒性試験や生殖・発生毒性試験などと共に、安全性試験の一環として GLP 保証下で、その薬剤の毒性学的性質としての変異原性を明確にする目的で、Ames 試験、染色体異常試験および小核試験などが実施される。制がん剤などの一部の薬剤を除く医薬品では、変異原性が陽性というのは医薬品としての開発に大きなデメリットとなる可能性があるので、開発続行の是非を判断する上で、重要な役割を果たす場合がある。

4. 制がん剤の分類

制がん剤には DNA への直接的な障害あるいは核酸合成、DNA 複製や細胞分裂の阻害作用を示す cyclophosphamide などアルキル化剤、cis-platin などの白金錯体、fluorouracil などの代謝拮抗剤、mitomycin C などの抗腫瘍性抗生物質、

vincristine や etoposide などの植物成分製剤などがある。これら以外にもホルモンレセプターを介して作用するといわれている tamoxifen などのホルモン剤、免疫系を介して作用する interferon などのサイトカイン、krestin などの免疫賦活剤、その他の機序による L-asparaginase や procarbazine などに制がん剤は分類できる。

今回、臨床で使用されている制がん剤を中心におよそ一部、開発治験中の薬剤を含め 78 薬剤の変異原性とがん原性について報告されている結果をまとめ、その薬剤の作用機序別に Table 2 に示した。なお、試験成績の採否の基準は特に設定せず、結果の評価については文献の記述によった。また、文献によって陰性の結果と陽性の結果がある薬剤については陽性の結果を採用した。

5. 制がん剤の変異原性

各種制がん剤の変異原性試験の結果を作用機序分類別に Ames 試験、*in vitro* での染色体異常試験、*in vivo* での小核試験および染色体異常試験の 3 つに分けて Fig. 2 に示した。アルキル化剤で変異原性試験の結果報告があるものの中で Ames 試験では 11/13 薬剤が、染色体異常試験では 6/7 薬剤が、小核試験では 7/8 薬剤が陽性と報告されており、いずれの試験でも陽性となる薬剤の割合が高かった。代謝拮抗剤における染色体異常試験では 11/11 薬剤が、小核試験では 8/8 薬剤とすべての薬剤が陽性であったが、Ames 試験では 2/11 薬剤しか陽性の報告がなかった。抗腫瘍性抗生物質においても染色体異常試験では 8/8 薬剤が、小核試験では 5/5 薬剤とすべての薬剤が陽性であったが、Ames 試験では 7/9 薬剤が陽性であった。植物成分製剤では染色体異常試験では 3/4 薬剤が、小核試験では 6/6 薬剤が陽性であったが、Ames 試験では 2/6 薬剤しか陽性の報告がなかった。白金錯体では 1/4 薬剤が Ames 試験のみ陰性であった以外、3 種の試験とも全ての薬剤が陽性であった。ホルモン剤、サイトカインおよび免疫賦活剤では 3 種の試験とも調査した薬剤で陽性の報告例はなかった。なお、ホルモン剤の 1 つである tamoxifen で DNA 付加体試験が陽性であったとの報告があった (Han and Liehr, 1992)。

Table 2-1. 抗悪性腫瘍製剤 (アルキル化剤) の変異原性

| 一般名 | 略称またはコード名 | <i>In Vitro</i> 試験 | | | <i>In vivo</i> 試験 | | | 文 獻 |
|-------------------------------|-------------------|------------------------------------|---------|------|-------------------|------------------------|--|--------|
| | | Ames 試験 | 染色体異常試験 | 小核試験 | 癌原性 | | | |
| Ifosfamide | IFM | + | | | + (マウス) | 18, 28, | | |
| Nitrogen mustard-N-oxide·HCl | HN ₂ O | + | + | + | + (ラット) | 5, 11, 14, 28, | | |
| Nimustine·HCl | ACNU | + | | | | 36, | | |
| Carboquone | CQ | + | | | | 36, | | |
| Cyclophosphamide | CPA | + | + | + | + (マウス・ラット・ヒト) | 2, 11, 16, 18, 28, 36, | | |
| Dacarbazine | DTIC | + | + | + | + (マウス・ラット・ヒト) | 2, 11, 28, | | |
| Thiotepa | TESPA | + | + | + | + (マウス・ラット・ヒト) | 2, 11, 14, 16, 18, 28, | | |
| Impruulfan tosilate | 864-T | (変異原性およびがん原性に関する) (報告は検索できなかつた) | | | | | | |
| Busulfan | BUS | + | + | + | + (ラット) | 14, 16, 28, 36, | | |
| Mitobronitol | DBM | + | | + | | 24, 30, | | |
| Melphalan | L-PAN | + | + | + | + (マウス・ラット・ヒト) | 2, 11, 16, 20, 28, | | |
| Ranimustine | MCNU | + | | | + (マウス) | 28, | | |
| Estramustine sodium phosphate | | - | | | | 5, 28, | | |
| アトリムスチン (Bestraubucil) | KM2210 | - | | - | | 26, 32, 44, | | |

+：陽性報告あり、-：陰性報告あり、空欄：報告なし

Table 2-2. 抗悪性腫瘍製剤(代謝拮抗剤)の変異原性試験

| 一般名 | 略称 コード名 | <i>In Vitro</i> 試験 | | <i>In vivo</i> 試験 | | 癌原性 | 文献 |
|---------------------------------------|------------|------------------------------------|---------|-------------------|-------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | | Ames 試験 | 染色体異常試験 | Ames 試験 | 染色体異常・小核試験 | | |
| Fluorouracil | 5-FU | — | + | + | — (ラット・マウス) | 2, 11, 15, 16, 27, 36, 48, 53, | |
| Tegafur | FT | — | + | — | — | 14, 16, 53, | |
| Tegafur·uracil | UFT | — | + | — | — | 53, | |
| Carmofur | HCFU | — | + | — | — | 27, 36, | |
| Doxifluridine | S'-DFUR | (変異原性およびがん原性に関する) (報告は検索できなかった) | | — | + | — | 37, |
| Emitefur | BOF-A2 | — | + | + | — | 2, 11, 14, 16, 18, 22, 36, 53, | |
| Mercaptapurine | 6-MP | + | + | + | — | — | |
| Thioinosine (Mercaptapurine riboside) | 6-MPR | (変異原性およびがん原性に関する) (報告は検索できなかった) | | — | + | — | 2, 14, 16, 36, 53, 28, |
| Cytarabine | Ara-C | — | + | + | — | — | |
| Cytarabine ocfosfate | — | — | + | + | — | — | |
| Enocitabine | BH-AC | — | + | + | — | — | |
| Ancitabine·HCl | Cyclo-C | — | + | — | — | — | |
| Methotrexate | MTX | + | + | + | — | 2, 11, 16, 36, 8, | |
| Hydroxy carbamide | — | + | — | — | — | — | |

+: 陽性報告あり, -: 陰性報告あり, 空欄: 報告なし

Table 2-3. 抗悪性腫瘍製剤(抗腫瘍性抗生素質)の変異原性

| 一般名 | 略称 コード名 | <i>In Vitro</i> 試験 | | <i>In vivo</i> 試験 | | 癌原性 | 文献 |
|---|------------|------------------------------------|---------|-------------------|------------|-------------|------------------------|
| | | Ames 試験 | 染色体異常試験 | Ames 試験 | 染色体異常・小核試験 | | |
| Mitomycin C | MMC | + | + | + | + | + (ラット・マウス) | 2, 11, 14, 16, 28, 36, |
| Bleomycins | BLM | + | + | + | + | — | 2, 11, 16, |
| Peplomycin·H ₂ SO ₄ | PEP | + | + | — | — | — | 1, 39, |
| Daunorubicin·HCl | DNR | + | + | + | + | + (ラット・マウス) | 2, 16, 28, 36, 49, 50, |
| Doxorubicin·HCl | ADM | + | + | + | + | + (ラット) | 2, 11, 16, 28, 36, 52, |
| Epirubicin·HCl | epi-ADM | + | + | + | + | + (ラット) | 28, |
| Aclarubicin·HCl | ACR | — | + | — | — | — (ラット) | 40, 49, 50, 52, |
| Pirarubicin·HCl | THP | (変異原性あり, 試験項目不明) (報告は検索できなかった) | | — | — | + (ラット) | 28, |
| Chromomycin A ₃ | TY | (変異原性およびがん原性に関する) (報告は検索できなかった) | | — | + | + (ラット) | 11, 14, 16, 28, 36, |
| Actinomycin D | Act-D | — | — | — | — | + (ラット) | 11, 14, 16, 28, 36, |
| Neocarzinostatin | NCS | + | — | — | — | — | 46, |

+: 陽性報告あり, -: 陰性報告あり, 空欄: 報告なし

Table 2-4. 抗悪性腫瘍製剤(植物成分製剤)の変異原性試験

| 一般名 | 略称 または コード名 | In Vitro 試験 | In vivo 試験 | 癌原性 | 文献 |
|--|-------------------|------------------|------------|----------------|-----------------|
| | | Ames 試験 | 染色体異常試験 | 染色体異常・ 小核試験 | |
| Vincristine H ₂ SO ₄ | VCR | — | — | + | 2, 11, 16, 36, |
| Vindesine H ₂ SO ₄ | VDS | (変異原性なし, 試験項目不明) | — | — | 28, |
| Vinblastine H ₂ SO ₄ | VLB | — | + | + | 11, 16, 36, |
| Navelbine | KW-2307 | — | + | + | 45, |
| Etoposide | VP-16 | + | — | — | 11, 16, 25, 28, |
| Teniposide | VM-26 | — | — | + | 25, |
| Irinotecan·HCl | CPT-11 | — | + | + | 38, |

+ : 陽性報告あり, - : 隆性報告あり, 空欄: 報告なし

Table 2-5. 抗悪性腫瘍製剤(白金錯体)の変異原性試験

| 一般名 | 略称 または コード名 | In Vitro 試験 | In vivo 試験 | 癌原性 | 文献 |
|-------------|-------------------|-------------|------------|----------------|----------------------------------|
| | | Ames 試験 | 染色体異常試験 | 染色体異常・ 小核試験 | |
| Carboplatin | CBDCA | + | + | + | + (ラット) 7, 28, 43, |
| Cisplatin | CDDP | + | + | + | + (マウス) 2, 7, 11, 28, 29, 43, |
| — | 254-S | + | + | + | 29, 43, |
| Lovastatin | DWA2114R | — | + | + | 12, 19, 34, |

+ : 陽性報告あり, - : 隆性報告あり, 空欄: 報告なし

Table 2-6. 抗悪性腫瘍製剤(ホルモン剤)の変異原性試験

| 一般名 | 略称 または コード名 | In Vitro 試験 | In vivo 試験 | 癌原性 | 文献 |
|-----------------------------|------------------------------------|------------------|------------|----------------------------|----|
| | | Ames 試験 | 染色体異常試験 | 染色体異常・ 小核試験 | |
| Tamoxifen citrate | TAM | — | — | + (ラット) 28, 41, | |
| Fosfestrol | DSDP | (変異原性なし, 試験項目不明) | — | + (ヒト)? 28, | |
| Medroxyprogesterone acetate | MPA | — | — | + (イス・サル) 10, 11, 28, | |
| Mepitiostane | (変異原性およびがん原性に関する) (報告は検索できなかった) | — | — | + (ラット)? 3, 23, 28, 33, | |
| Epitiostanol | (変異原性およびがん原性に関する) (報告は検索できなかった) | — | — | + (ラット) 28, | |
| Leuprorelin acetate | TAR-144-SR | — | — | — | |
| Goserelin acetate | ZOL | (変異原性なし, 試験項目不明) | — | + (ラット) 28, | |
| Chlormadinone acetate | (変異原性およびがん原性に関する) (報告は検索できなかった) | — | — | — | |
| Mitotane | — | — | — | — | |

+ : 陽性報告あり, - : 隆性報告あり, 空欄: 報告なし

Table 2-7. 抗悪性腫瘍製剤(サイトカイン)の変異原性試験

| 一般名 | 略称 または コード名 | In Vitro 試験 | In vivo 試験 | 癌原性 | 文献 |
|-----------------|-------------------|------------------------------------|------------|----------------|-----|
| | | Ames 試験 | 染色体異常試験 | 染色体異常・ 小核試験 | |
| Interferon α | IFN α | — | — | — | 28, |
| Interferon α-2a | IFN α-2a | (変異原性およびがん原性に関する) (報告は検索できなかった) | — | — | 28, |
| Interferon α-2b | IFN α-2b | — | — | — | 28, |
| Interferon β | IFN β | — | — | — | 28, |
| Interferon γ-1a | IFN γ-1a | — | — | — | 28, |
| Celmoleukin | IL-2 | — | — | — | 28, |

+ : 陽性報告あり, - : 隆性報告あり, 空欄: 報告なし

Table 2-8. 抗悪性腫瘍製剤(免疫賦活剤)の変異原性

| 一般名 | 略称 コード名 | In Vitro 試験 | | In vivo 試験 | | 文献 |
|-----------|------------|----------------------------------|------------------|------------|----------------|------------|
| | | Ames 試験 | 染色体異常・ 小核試験 | Ames 試験 | 染色体異常・ 小核試験 | |
| Krestin | PSK | (変異原性およびがん原性に関する) 報告は検索できなかった | | | | |
| Picibanil | OK-432 | (変異原性およびがん原性に関する) 報告は検索できなかった | | | | |
| Lentinan | — | — | — | — | — | 28, |
| Ubenimex | SPG | (変異原性なし, 試験項目不明) | (変異原性なし, 試験項目不明) | — | — | 28, 28, |
| Sizofilan | MY-1 | — | — | — | — | 21, |
| — | Z-100 | — | — | — | — | 42, |
| — | LC9018 | — | — | — | — | 47, |

+ : 陽性報告あり, - : 陰性報告あり, 空欄: 報告なし

Table 2-9. 抗悪性腫瘍製剤(その他の製剤)の変異原性

| 一般名 | 略称 コード名 | In Vitro 試験 | | In vivo 試験 | | 文献 |
|--------------------|------------|-------------|----------------|------------|----------------|----------------|
| | | Ames 試験 | 染色体異常・ 小核試験 | Ames 試験 | 染色体異常・ 小核試験 | |
| Acetaglione | L-ASP | — | — | + | +(ラット・マウス・サル) | 36, |
| L-asparaginase | PCZ | — | — | + | +(ラット) | 2, 14, 16, 28, |
| Procarcabazine·HCl | MIT | + | — | + | +(ラット) | 28, |
| Mitoxantrone·HCl | YK-176 | + | + | + | — | 31, |
| ペントスチタシン | — | — | — | — | — | — |

+ : 陽性報告あり, - : 陰性報告あり, 空欄: 報告なし

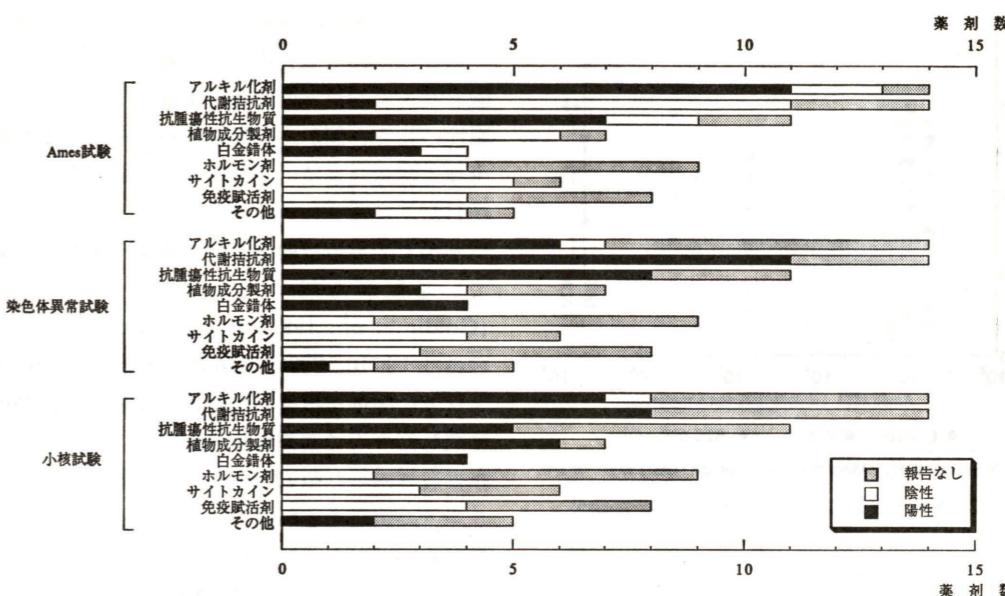


Fig. 2. 制癌剤の変異原性。

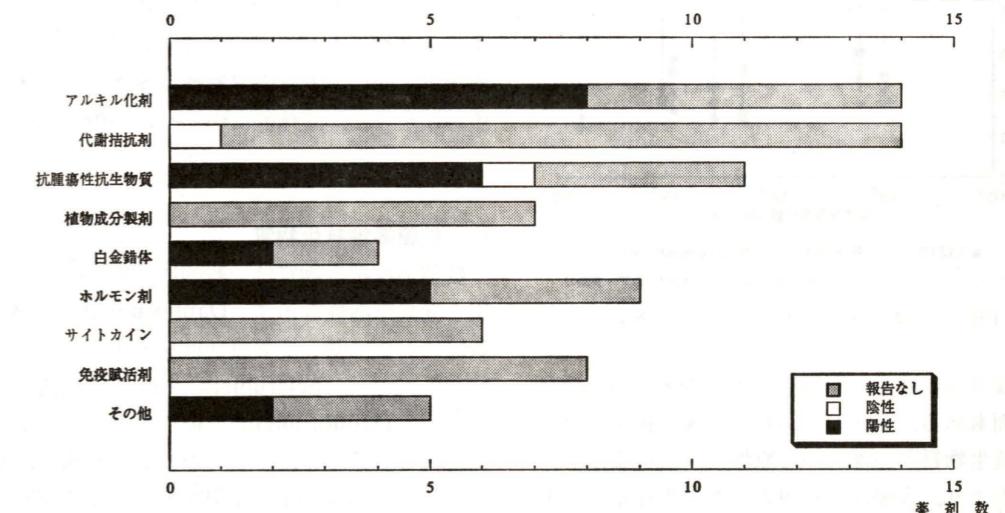


Fig. 3. 制癌剤の癌原性。

6. 制がん剤のがん原性

制がん剤のがん原性について報告されている結果を作用機序分類別に Fig. 3 に示した。アルキル化剤のうち 8 薬剤に、抗腫瘍性抗生物質のうち 7 薬剤に、白金錯体のうち 2 薬剤に、ホルモン剤のうち 5 薬剤にそれぞれ陽性の報告がある。一方、代謝拮抗剤のうち 1 薬剤に、抗腫瘍性抗生物質のうち 1 薬剤に陰性の報告があるが、これら以外の

制がん剤にはがん原性についての報告がなかった。Ames 試験で陽性の薬剤が多いアルキル化剤、抗腫瘍性抗生物質、白金錯体にがん原性陽性の報告例がみられ、Ames 試験で陰性を示し、染色体異常試験で陽性の報告が多い代謝拮抗剤や植物成分製剤ではがん原性が陽性であるという報告例はなかった。

以上のことから、制がん剤では、がん原性が陽

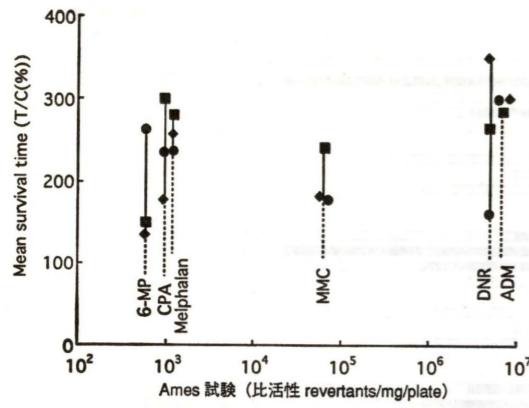


Fig. 4. Ames 試験における比活性と制がん効果.

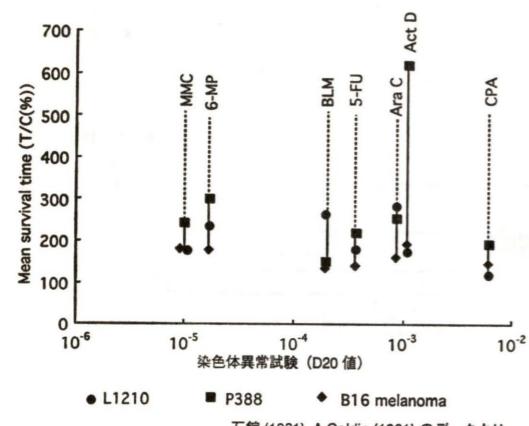


Fig. 5. 染色体異常誘発能と制がん効果.

性となることはその作用機序から考えて切り離せない面もある。しかしながら、代謝拮抗剤や抗腫瘍性抗生物質の一部にがん原性が陰性の薬剤もあることより、今後はがん患者の5年生存率の向上を考慮して、がん原性のない薬剤の開発をめざす必要があると思われる。

7. 制がん剤の変異原性と制がん効果

薬剤を含めた化学物質の Ames 試験での比活性や染色体異常試験での異常誘発能を調べた場合、類似の構造あるいは薬効を有するもの間でもその強さに大きな差があることが知られている。変異原性を示す制がん剤でも同様であると思われるので、変異原性の強さと制がん効果を比較

してみた。Ames 試験での比活性と制がん効果との関係を Fig. 4 に、染色体異常試験での異常誘発能と制がん効果との関係を Fig. 5 に示した。変異原性の強さと制がん効果を比較するには薬剤数が少なく明確な事はいえないが、一応参考のために示した。

制がん効果の指標として、米国 NCI で実施している制がん剤スクリーニング・パネルの結果 (Goldin *et al.*, 1981) の一部を用いた。グラフの縦軸は L1210, P388, B16 melanoma を移植したマウスに薬剤を投与した時の生存日数を、腫瘍を移植したのみで薬剤を投与しなかったマウスの生存日数で割った値 (*T/C*) をパーセントで示しており、この値が大きいほどマウスにおける制がん効果が強いことを示している。

ここで示した薬剤では Ames 試験および染色体異常試験のいずれもその強さに $10^3 \sim 10^4$ オーダーの開きがあるが、制がん効果にはあまり差はない、必ずしも両者に相関があるとはいえない結果であった。また、ここでは示していないが、治療効果においても、変異原性の強さとはあまり関係がなかった。具体的にいくつかの例について示す。

1) 抗腫瘍性抗生物質

抗腫瘍性抗生物質は一般的に非常に強い抗菌作用と変異原活性を示す。Daunorubicin でも Ames 試験において強い変異原活性を示すが、構造的に類似している aclarubicin では変異原活性を示さない。Daunorubicin の糖部分のアミノ基がメチル化されることによりこの変異原活性は低下する (Umezawa *et al.*, 1987)。一方、P388 腫瘍を移植されたマウスにこれらの薬剤を投与した場合、延命率の増加の程度は変わらず (Hori *et al.*, 1977)，制がん効果にはあまり差はなかった。

2) 代謝拮抗剤

代謝拮抗剤の多くは Ames 試験で陰性を示すが、染色体異常試験では陽性を示す。代表的な代謝拮抗剤である fluorouracil とその誘導体である tegafur およびそれに uracil を配合した UFT では染色体異常誘発能の強さに約 100 倍程度の違

いがある (Yajima *et al.*, 1981)。一方、マウスに移植された sarcoma 180 および Ehrlich carcinoma の縮小率や L1210 を移植されたマウスでの延命率の增加でみると UFT 投与群と fluorouracil 投与群とでは差はなかった。Tegafur 投与群との間でも効力を示す用量で 10 倍前後の差があるが、延命率の増加では差はなかった (Unemi *et al.*, 1981)。

3) 白金錯体

Cisplatin および carboplatin とで *in vitro* および *in vivo* での染色体異常試験において同程度の染色体異常を誘発する用量は約 15~20 倍異なるが、ED₅₀ 値あるいは MTD で比較するとほとんど差はない (高瀬ら, 1991) は述べている。一方、cisplatin 投与と carboplatin 投与での抗がん効果はがん種によって縮小率が異なっている (澤田ら, 1987) が、全体を平均してみれば、cisplatin と carboplatin とでがんの縮小率に明らかな差はみられなかった。すなわち、同程度のがん縮小効果を示す用量と染色体異常誘発を示す用量とで cisplatin と carboplatin を比較するとあまり差がなかった。

以上のように DNA や核酸合成などに直接作用する制がん剤でも、制がん活性と変異原活性とは必ずしも一致しているとは限らないと思われる。

8. 最後に

制がん剤は DNA への直接的な障害、核酸の合成阻害、DNA 複製の阻害、細胞分裂および細胞増殖の阻害、免疫系の活性化などの作用により、制がん効果を示すと考えられている。また、最近では、がんの分化誘導の促進、がんの増殖に必要な血管新生の阻害、がんの転移防止を目的とした制がん剤の開発も進められている。従って、制がん剤といつても薬剤によって作用機序が異なっており、一様には論じることはできない。しかし、現在の制がん剤の主流は DNA への直接的な障害や核酸の合成阻害などの作用により、がん細胞の増殖を阻害する薬剤である。こうした作用機序により、がん細胞の死滅、がんの増殖抑制あるい

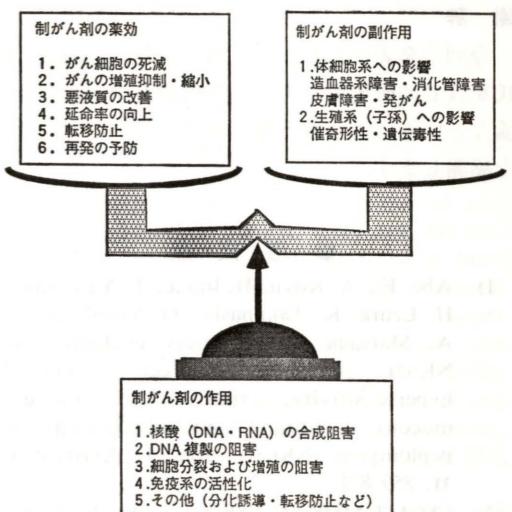


Fig. 6. 制がん剤の作用機序と効果・副作用.

は縮小、悪液質の改善、延命率の向上、更には転移防止や再発予防などの効果を期待して、制がん剤は使用されている。

一方、こうした薬剤の作用機序の面からもわかるように、正常細胞への悪影響も避けられない (Fig. 6)。すなわち副作用として、白血球や血小板減少などの造血器系障害、下痢・嘔吐などの消化管障害、脱毛や色素沈着などの皮膚障害や催奇形作用などがある。また、変異原性試験において陽性の薬剤も多く、がん原性を示す薬剤もある。このように制がん剤には同じ様な機序で効力と副作用が発現するものが多く、この両者を完全に分離することは極めて難しいと思われる。しかしながら、副作用が少なく、制がん効果の高い薬剤が臨床の場で切望されており、医薬品メーカーとしても効力と副作用のバランスの上に立ち、副作用がより少なく、有効性がより高い薬剤の開発をめざすことが使命である。がんという難しい疾患に対して、完治できる薬剤がない現状ではまず、より効力が優れた薬剤を数多く見いだし、その中でできるだけ変異原性を含めた安全性の高い薬剤を選択していくことが重要である。そして、選ばれた薬剤についてヒトへの外挿を考慮しながら、変異原性やがん原性を含めた安全性評価を充分していく必要があり、その上で変異原性試験の役割は重要で、試験実施の意義は充分ある。

謝 辞

今回の発表にあたって、岡 宏昭氏、山北 修氏をはじめ研究所の方々に文献調査や有意義な討論などいろいろな協力をいただいた。ここに協力を感謝します。

参 考 文 献

- 1) Abe, F., A. Koyu, H. Inoue, T. Yamashita, H. Ezura, K. Takahashi, O. Yoshioka and A. Matsuda (1978) Safety evaluation of NK631: Antigenicity, effect on delayed hypersensitivity, irritative effect on eye mucous membrane and mutagenicity of peplomycin (NK631), *Jpn. J. Antibiotics*, **31**, 859-871.
- 2) CSGMT/MMS, Collaborative Study Group for the Micronucleus Test of Mammalian Mutagenesis Study Group (1992) Evaluation of mouse micronucleus assay to screen carcinogens, *Mammalian Mutagenesis Study Group Commun.*, **6**, 1-55.
- 3) 藤川和夫, 中村 稔, 木村善昭, 鮫島賢二, 一つ町晋也 (1990) TAP-144-SR の変異原性試験(第2報), 一培養細胞を用いる染色体異常試験一, 薬理と治療, **18**, Suppl., 661-666.
- 4) Goldin, A., J. M. Venditti, J. S. Macdoald, F. M. Muggia, J. A. Henney and V. T. Devita (1981) Current results of the screening program at the division of cancer treatment, National Cancer Institute, *Europ. J. Cancer*, **17**, 129-142.
- 5) 浜州泰久, 岩倉啓子, 松村進午 (1980) Estramustine phosphate disodium (EMP) の Salmonella/microsome 系を用いた突然変異原性試験, 薬理と治療, **8**, 3979-3985.
- 6) Han, X. and J. G. Liehr (1992) Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen, *Cancer Res.*, **52**, 1360-1363.
- 7) Hannan, M. A., A. A. Al-Dakan, S. S. Hussain and M. H. Amer (1989) Mutagenicity of cisplatin and carboplatin used alone and in combination with four other anticancer drugs, *Toxicology*, **55**, 183-191.
- 8) Hill, A. B. and R. T. Schimke (1985) Increased gene amplification in L5178Y mouse lymphoma cells with hydroxyurea-induced chromosomal aberrations, *Cancer Res.*, **45**, 5050-5057.
- 9) Hori, S., M. Shirai, S. Hirano, T. Oki, T. Inui, S. Tsukagoshi, M. Ishizawa, T. Takeuchi and H. Umezawa (1977) Antitumor activity of new anthracycline antibiotics, aclacinomycin-A and its analogs, and their toxicity, *Gann*, **68**, 685-690.
- 10) IARC Working Group (1979) Medroxyprogesterone acetate, IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans 21, *Hormones* (II), 417-429.
- 11) IARC Working Group (1987) IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans IRAC Monograph, Suppl. 6, International Agency for Research on cancer, Lyon.
- 12) 井上 誠, 矢野まり子, 福田篤子, 松岡幸雄, 佐藤忠夫 (1992) DWA2114R のマウスにおける小核試験, 薬理と治療, **20**, Suppl., 931-935.
- 13) Ishidate, M., T. Sofuni and K. Yoshikawa (1981) Chromosomal aberration tests in vitro a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *Gann Monograph on Cancer Research*, **27**, 95-108.
- 14) 石館 基 (監修) (1987) 染色体異常試験データ集, エル・アイ・シー, 東京.
- 15) Iwagawa, M., M. Nakamura, K. Izumi and H. Otsuka (1991) Carcinogenicity testing of 5-fluorouracil in (C57BL/6 x C3H) F₁ mice, *J. Toxicol. Pathol.*, **4**, 129-135.
- 16) 賀田恒夫, 石館 基 (監修) (1980) 環境変異原データ集 1, サイエンティスト社, 東京.
- 17) 厚生省大臣官房統計情報部人口動態統計課 (1993) 平成4年人口動態統計(概数)の概況, 厚生の指標, **40**, 38.
- 18) Matney, T. S., T. V. Nguyen, T. H. Connor, W. J. Dana and J. C. Theiss (1985) Genotoxic classification of anticancer drugs, *Terato. Carcino. Mutagen.*, **5**, 319-328.
- 19) 松岡幸雄, 井上 誠, 佐藤忠夫 (1992) DWA-2114R の染色体異常試験, 薬理と治療, **20**, Suppl., 925-929.
- 20) Minnich, V., M. E. Smith, D. Thompson and S. Kornfeld (1976) Detection of mutagenic activity in human urine using mutant strains of *Salmonella typhimurium*, *Cancer*, **38**, 1253-1258.
- 21) 御園 等, 岩野広美, 元良善幸, 横山昌鶴 (1990) MY-1 の変異原性試験, 薬理と治療, **18**, Suppl., 1479-1489.
- 22) Mosesso, P. and F. Palitti (1993) The genetic toxicology of 6-mercaptopurine, *Mutat. Res.*, **296**, 279-294.
- 23) 中村 稔, 木村善昭, 中島由弥, 一つ町晋也 (1990) TAP-144-SR の変異原性試験(第3報)一マウスを用いる小核試験一, 薬理と治療, **18**, Suppl., 667-671.
- 24) Nakanishi, Y. and E. L. Schneider (1979) *In vivo* sister-chromatid exchange: A sensitive measure of DNA damage, *Mutat. Res.*, **60**, 329-337.
- 25) 中名生宏, 平岡聖樹, 白谷真弓 (1986) Eto-
- poside (VP 16-213) 及び Teniposide (VM-26) の変異原性試験, *J. Toxicol. Sci.*, **11**, 301-310.
- 26) 中島 圓, 春田由美江, 井上博之 (1986) KM-2210 (Bestrabucil) の変異原性試験—CHL/IU 細胞を用いた染色体異常試験一, 基礎と臨床, **20**, 2976-2980.
- 27) Neda, K. and Sato, H. (1980) Cytogenetic studies of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) *in vivo* in mice, 応用薬理, **19**, 363-368.
- 28) 日本医薬情報センター(編集) (1993) 医療薬日本医薬品集, 薬業時報社, 東京.
- 29) 西本洋司, 三宅幸雄, 白取治 (1991) 新白金錯体, cis-diamminedichloroplatinum (254-S) の変異原性試験(第1報)細菌を用いた復帰突然変異試験, 医薬品研究, **22**, 812-820.
- 30) Olah, E., K. Toth, J. Sugar, L. Hegedus and S. Somfai-Relle (1983) Effects of some sugar alcohol derivatives on mutation and induction of sister chromatid exchanges, *Cancer Res.*, **43**, 4530-4536.
- 31) 大塚雅則, 小椋正造, 岡田真理, 稲井恒彦, 梶原美次, 安心院祥三, 久保清明, 菊野 秩, 白石博子, 柿本敬次郎, 志垣隆道, 桑田茂喜, 梅橋操子 (1991) YK-176 の変異原性試験, 基礎と臨床, **25**, 1311-1320.
- 32) 斎藤 強, 坂内堅二, 浅野喜朗, 榎本聰, 堀田鉄也 (1986) KM2210 (Bestrabucil) の微生物を用いた復帰突然変異試験, 基礎と臨床, **20**, 1805-1809.
- 33) 坂本 豊, 永藪 治, 山本 清, 中村直美, 中島由弥, 菊池康基 (1990) TAP-144-SR の変異原性試験(第1報)一細菌を用いた復帰突然変異試験一, 薬理と治療, **18**, Suppl., 651-660.
- 34) 佐藤忠夫, 松岡幸雄, 井上 誠 (1992) DWA-2114R の微生物復帰突然変異試験, 薬理と治療, **20**, Suppl., 921-923.
- 35) 澤田益臣, 尾崎公巳, 本郷二郎, 広田義和, 稲垣 実, 谷口春生, 建石竜平, 森 陽一 (1987) ヌードマウス移植ヒト卵巣癌に対するプラチナ化合物の抗腫瘍効果, 癌と化学療法, **14**, 693-698.
- 36) Seino, Y., M. Nagao, T. Yahagi, A. Hoshi, T. Kawachi and T. Sugimura (1978) Mutagenicity of several classes of antitumor agents to *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, and TA92, *Cancer Res.*, **38**, 2148-2156.
- 37) Shibahara, T., E. Kaneko, T. Itoh, T. Awogi, G. Tsushimoto, N. Takahashi, R. R. Marshall and D. J. Kirkland (1993) Mutagenic and clastogenic properties of (3-[3-(6-benzoyloxy-3-cyano-2-pyridyloxycarbonyl)benzoyl]-1-ethoxymethyl-5-fluorouracil) (BOF-A2), a new 5-fluorouracil derivative with anti-
- tumour activity, *J. Toxicol. Sci.*, **18**, Suppl., 11-19.
- 38) 島田弘康, 服部千春, 佐藤利之, 恵比根 豊, (1990) 新癌化学治療剤 CPT-11 の変異原性に関する検討, 基礎と臨床, **24**, 7357-7366.
- 39) Slavutsky, I. and S. Knuutila (1989) Micro-nucleus formation in different lymphocyte subpopulations in peplomycin-treated and control cultures, *Mutat. Res.*, **219**, 257-261.
- 40) Steinheider, G., J. Westendorf and H. Marquardt (1987) Induction of chromosomal aberrations by the anthracycline antitumor antibiotics N, N-dimethyldaunomycin and aclacinomycin A, *Experientia*, **43**, 586-588.
- 41) Styles, J. A., N. H. White, S. Blowers and B. Phillips (1993) Studies on the mutagenicity of tamoxifen, Abstracts of 6th ICEM, p. 380.
- 42) 須藤鎮世, 中島 圓, 北沢倫世, 藤原正孝, 鈴木和利, 井上博之, 松田和夫 (1990) Z-100 の変異原性試験—細菌を用いた復帰突然変異試験, 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験ならびにマウスを用いる小核試験一, 薬理と治療, **18**, 1619-1630.
- 43) 高瀬史郎, 近藤耕治, 白取治 (1991) 新白金錯体, cis-Diammine (glycolate) platinum (254-S) の変異原性試験(第2報)ヒトリンパ球培養細胞及びマウス骨髄細胞を用いた染色体異常試験, 医薬品研究, **22**, 821-835.
- 44) 田中弘光, 坂内堅二, 鈴木聰一, 浅野喜朗, 榎本聰, 堀田鉄也 (1986) KM2210 (Bestrabucil) のマウスを用いた骨髄細胞染色体異常試験, 基礎と臨床, **20**, 1811-1815.
- 45) 田中一三, 中本貴美子, 藤田裕順, 出口隆志 (1993) KW-2307 の変異原性試験, 基礎と臨床, **27**, 1401-1412.
- 46) Tatsumi, K. and H. Nishioka (1977) Effect of DNA repair systems on antibacterial and mutagenic activity of an antitumor protein neocarzinostatin, *Mutat. Res.*, **48**, 195-204.
- 47) 徳光 崇, 尾上正治, 大山わか, 高取浩介, 坂本京子, 鈴木文子 (1989) LC9018 変異原性試験—復帰突然変異試験, 染色体異常試験および小核試験一, 薬理と治療, **17**, Suppl., 2151-2160.
- 48) 豊田和広, 佐藤秀隆, 古川文夫, 篠田和俊, 吉村博之, 高橋道人 (1990) 抗悪性腫瘍剤 5-fluorouracil のラットにおける癌原性試験について, 日本癌学会総会講演要旨集, p. 103.
- 49) Umezawa, K., M. Sawamura, T. Matsushima and T. Sugimura (1978) Mutagenicity of aclacinomycin A and daunomycin derivatives, *Cancer Res.*, **38**, 1782-1784.
- 50) Umezawa, K., M. Haresaku, M. Muramatsu and T. Matsushima (1987) Mutagenicity of anthracycline glycosides and bleomycins in *Salmonella* assay system, *Biomed. Pharmacol.*

- 41, 214-218.
- 51) Unemi, N., S. Takeda, K. Tajima, Y. Kawaguchi and A. Yasuda (1981) Studies on combination therapy with 1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil plus uracil. I, Chemotherapy, 29, 164-174.
- 52) Westendorf, J., H. Marquardt, M. B. Ketkar, U. Mohr and H. Marquardt (1983) Tumorigenicity *in vivo* and induction of Mutagenesis and DNA repair *in vitro* by aclacinomycin A and marcellomycin: Structure-activity relationship and predictive value of short-term tests, Cancer Res., 43, 5248-5251.
- 53) Yajima, N., K. Kondo and K. Morita (1981) Reverse mutation tests in *Salmonella typhimurium* and chromosomal aberration tests in mammalian cells in culture on fluorinated pyrimidine derivatives, Mutat. Res., 88, 241-254.

Environ. Mut. Res. Commun., 16: 113-126 (1994)

第22回大会パネルディスカッション
「変異原性試験の役割とその評価」

変異原性試験の役割と限界
—RDS試験による非変異・肝がん原性物質の検出—
Roles and limitations of mutagenicity tests—Detection of non-mutagenic hepatocarcinogens by means of RDS test—

高沢博修¹, 杉山明男², 馬場博¹, 宇野芳文¹,
宮川誠², 吉川邦衛¹

Takasawa, H.¹, A. Sugiyama¹, H. Baba¹, Y. Uno¹, M. Miyagawa²
and K. Yoshikawa¹

¹三菱化成(株)総合研究所, ²(株)三菱化成安全科学研究所, ^{1,2}〒227 横浜市緑区鶴志田町 1000

Toxicology Laboratory, Life Science Research Sector, Research Center, Mitsubishi Kasei Co., 1000 Kamoshida-cho, Midori-ku, Yokohama 277, Japan,

²Mitsubishi-Kasei Institute of Toxicological and Environmental Science, 1000 Kamoshida-cho Midori-ku, Yokohama 227, Japan

(受付: 1994年1月15日; 受理: 1994年1月15日)

Summary

To assess the efficacy of the *in vivo-in vitro* hepatocyte replicative DNA synthesis (RDS) test, 54 putative nongenotoxic (the Ames-negative) hepatocarcinogens and 25 noncarcinogens confirmed by National Toxicology Program were examined using male 9-week-old F344 rats and male 8-week-old B6C3F1 mice by means of an *in vitro* [methyl-³H]thymidine-incorporation technique. Animals were exposed with the maximum tolerated dose (MTD) and 1/2 MTD of each chemical by a gavage. After exposures of 24, 39, and 48 h, hepatocytes were prepared with a collagenase-perfusion technique. When a test sample induced the values of 1.0% or more RDS incidence (% of labelled nuclei per 2000 hepatocytes) in the rat and those of 0.4% or more RDS incidences in the mouse, the sample was judged as a positive response on the basis of the background data of spontaneous RDS incidences which were examined with 450 rats and 300 mice. Under these experimental conditions, the rat RDS test gave positive results for 18 hepatocarcinogens (positive sensitivity: 82%, 18/22) and negative results for 20 noncarcinogens (negative specificity: 80%, 20/25) with an overall concordance of 81%. The mouse RDS test donated positive results for 26 hepatocarcinogens (positive sensitivity: 81%, 26/32) and negative results for 19 noncarcinogens (negative specificity: 76%, 19/25) with an overall concordance of 78%. The RDS-positive nongenotoxic hepatocarcinogens are known to exert some biological effects such as the formation of covalently binding DNA, oxidative DNA adducts, inhibition of gap junctional intercellular communication, secretion of hepatocyte growth factor and overexpression of proto-oncogenes via nuclear receptors.

Keywords: replicative DNA synthesis (RDS), nongenotoxic hepatocarcinogens, cell proliferation

1. はじめに

非変異・がん原性物質や変異・がん原性物質とともに細胞増殖能力をもつことがすでに予想されている (Gold *et al.*, 1993). 筆者らは非変異・肝がん原性物質を短期間に検出するために、5年程前から肝細胞のDNA複製合成(replicative DNA synthesis, RDS)の促進を調べてきた。その間、スクリーニングに使用した化学物質は主に Ames 試験陰性の非変異・肝がん原性物質を対象としてきたために、RDS の誘発は非変異・がん原性物質に特異的な現象として、理解されてきた傾向がある。しかしながら、筆者らは肝 RDS の誘発は決して非変異・がん原性物質に特異的な現象ではなく、dimethylnitrosamine (62-75-9) のような Ames 試験陽性の変異・肝がん原性物質でも、肝 RDS が同様に誘発することを強調したい。また、筆者らは便宜的に非変異・がん原性物質を発がんプロモーターと同様なものとして取扱ってきたが、現在この考え方を修正する必要が生じてきた。

すなわち Perera (1991) は発がんプロモーターは多段階発がん誘発説における言葉であって、確かに非変異・がん原性物質とは哺乳動物細胞などに対する生化学的特徴は極めて類似しているが、この両者は同義語として使用できないことを警告している。その理由として、非変異・がん原性物質はがん原性試験で単独処理によって、がん原性を示した化学物質である。一方、発がんプロモーターは2段階のがん原性試験においてのみがん原性を示す化学物質である。したがって、この両者は厳密に区別して使用しなければならないとしている。筆者らもこれに同意する。

筆者らの肝 RDS 試験は動物にイニシエーターを前処理している試験法ではなく、被験物質の単独処理によって、その細胞増殖能力を直接的に調べている。この肝 RDS 試験は化学物質のもつ肝がん原性の有無を 80% 前後の精度をもって判別している。この事実は、非変異・肝がん原性物質や変異・肝がん原性物質の肝 RDS 誘発作用、つまり肝細胞の細胞増殖活性は初期のがん化の進行に対して、極めて重要な事象であることを示唆している。

In vitro 試験における変異原性のみでがん原性

物質とみなすのは危険である。筆者らが実施した肝 RDS 試験において、Ames 試験や染色体異常試験で陽性を示した非がん原性物質の 80% 以上のものが陰性結果を示した。つまり、変異原性活性のみではがん化は進行せず、同時に細胞増殖活性が働く必要性が示唆された。Nagao and Sugimura (1993) は Ames 試験すべて陽性結果を示す heterocyclic aromatic amines が、肝、胃や腸に臟器特異的ながん原性の誘発を示すことに対し、各化学物質がもつ細胞増殖能力が働く臟器・組織と密接な相関性があったことを報告した。さらに、この細胞増殖能力の原因は heterocyclic aromatic amines がもつ細胞毒性の影響によるものとした単純な解釈では説明ができないことも合わせて記載している。

発がん初期過程において、変異原性と細胞増殖が絡むのは米国の研究者の間でも指摘されつつある (Barret, 1993; Gold *et al.*, 1993; Perera, 1991; Tennant and Zeiger, 1993)。ただし、この細胞増殖効果が初期のイニシエーション段階において同時に必要とするのか、またイニシエーション段階の終了後に即必要とするのか、この点において未だ明瞭な意見の統一がなされていない。筆者らは上述したように、イニシエーション段階において同時に発揮する細胞増殖効果が、がん化の進行に重要な役割を果たしているものと推定している。

非変異・肝がん原性物質をより明確に、さらにより短期に検出しようとしたとき、何種類もの変異原性試験法を使用して検索するよりも、非変異・肝がん原性物質や変異・肝がん原性物質がもつ細胞増殖能力を利用して検出する方が遙かに有益である。本稿は、まず非変異・肝がん原性物質を対象とし、これを短期間に検出できるラットとマウスの肝 RDS 試験法の有用性について記載した。

2. ラット・マウスを使用した肝 RDS 試験結果

肝 RDS (replicative DNA synthesis) 試験は肝がん原性物質のもつ細胞増殖能力を調べるために開発したものである。被験物質の単回投与によって、RDS の誘発率が雄性的 F344 ラット (9 週齢) の肝において 1.0% 以上のとき (Uno *et al.*, 1992a; Uno *et al.*, 1992b), また雄性的 B6C3F1 マ

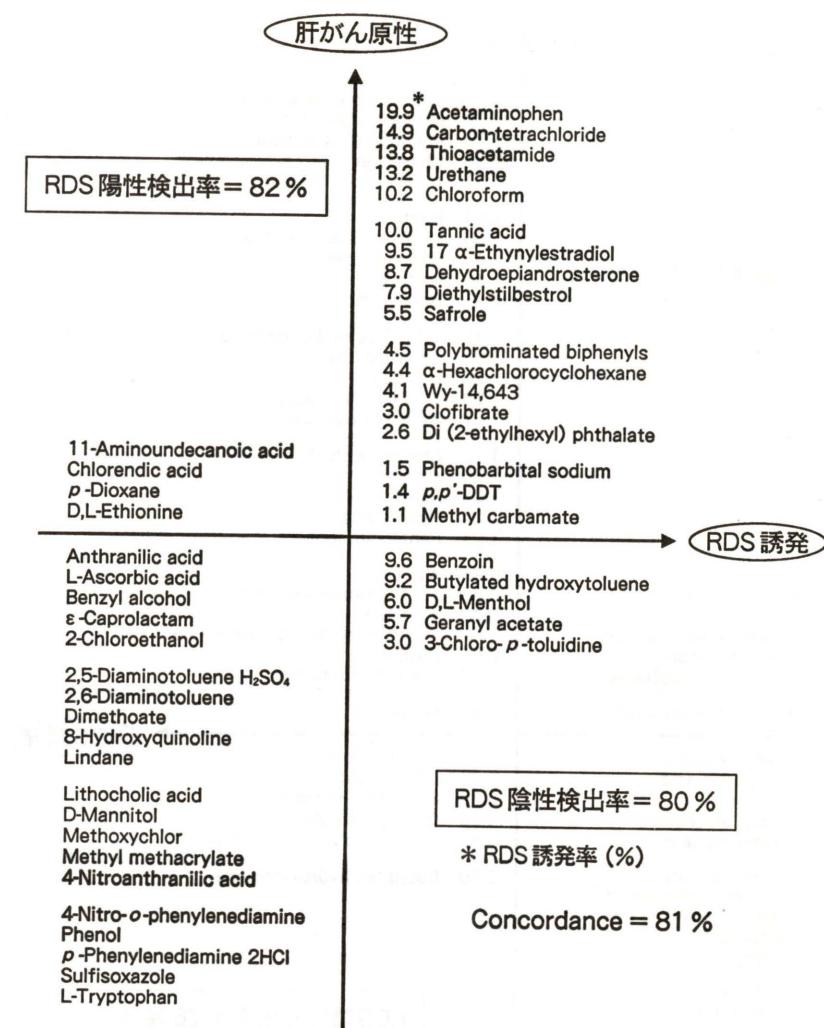


Fig. 1. 雄性ラットの肝細胞を使用した RDS 試験結果。

ウス (8 週齢) の肝において 0.40% 以上のとき (高沢ら, 1993), その被験物質は陽性として判定した。まず、Ames 試験陰性の非変異・肝がん原性物質を中心にしてスクリーニングを行った。つまり、非変異・肝がん原性物質のうち、ラットの肝がん原性物質はラットを使用し、マウスの肝がん原性物質はマウスで、さらにラットとマウスの肝がん原性物質はラットを用いて、肝 RDS の誘発を検討した。

ラットの肝 RDS 試験結果を Fig. 1 に、またマウスの肝 RDS 試験結果を Fig. 2 に示す。陽性検出率つまり肝がん原性を示し、さらに肝 RDS

| 肝がん原性 | |
|--|--------------------|
| | RDS陽性検出率 = 81 % |
| 8.53 * Chlorodibromomethane 2.78 Pentachloroethane 2.78 Phenobarbital sodium 2.33 Chlordane 1.87 <i>p</i> -Dichlorobenzene | |
| 1.84 Heptachlor 1.60 Di (2-ethylhexyl) phthalate 1.48 Benzyl acetate 1.43 Furfural 1.41 Benzofuran | |
| 1.41 1,1,2-Tetrachloroethane 1.36 Trichloroethylene 1.28 <i>p,p'</i> -DDE 1.28 1,1,2-Trichloroethane 1.21 Hexachloroethane | |
| 1.13 Chlorobenzilate 1.09 Aldrin 1.04 Mirex 1.04 Hydroquinone 1.01 Pentachlorophenol | |
| 0.95 <i>p,p'</i> -DDT 0.88 1,1,1,2-Tetrachloroethane 0.73 4,4'-Methylenebis (<i>N,N</i> '-dimethyl) benzenamine 0.61 Dieldrin 0.60 Tetrachloroethylene | |
| 0.54 Benzene | RDS誘発 |
| Anthranilic acid L-Ascorbic acid Benzoin Benzyl alcohol ϵ -Caprolactam 2-Chloroethanol 2,5-Diaminotoluene H ₂ SO ₄ 2,6-Diaminotoluene Dimethoate 8-Hydroxyquinoline Lindane D-Mannitol Methoxychlor Methyl methacrylate 4-Nitroanthranilic acid Phenol <i>p</i> -Phenylenediamine 2HCl Sulfisoxazole L-Tryptophan | |
| 2.05 Lithocholic acid 1.69 D,L-Menthol 0.89 3-Chloro- <i>p</i> -toluidine 0.88 Geranyl acetate 0.85 4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine | |
| 0.80 Butylated hydroxytoluene | |
| | RDS陰性検出率 = 76 % |
| | * RDS誘発率 (%) |
| | Concordance = 78 % |

Fig. 2. 雄性マウスの肝細胞を使用したRDS試験結果(1994年1月末日現在).

仮説を一部支持しているように思える。以上の実験結果から、ラットとマウスの両試験法の信頼性(concordance)はラット肝RDS試験において81%、またマウス肝RDS試験において78%の数値が示された。この事実はがん原性物質の検出に関する変異原性試験のほとんどが50~60%であることを考慮すると(Tenant and Zeiger, 1993)、極めて高い信頼性が得られている。

Figs. 3~6における肝RDS試験陽性を示した化学物質の化学構造から、その誘発に関わる主要因を以下に推測した。① carbon tetrachloride (56-23-5), diethylstilbestrol (56-53-1), hydroquinone (123-31-9), tannic acid (1401-55-4)などを始めとする活性酸素の生成に関与するもの。② tetrachloroethylene (127-18-4), trichloroethylene (79-01-6), safrole (94-59-7), urethane (51-

ハロゲン化炭化水素類 脂肪族

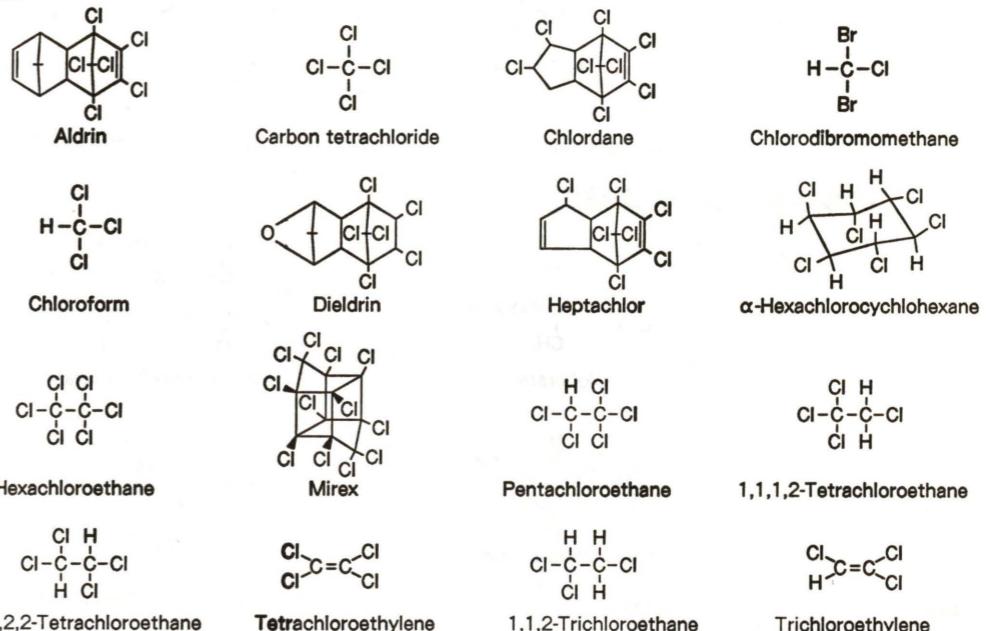


Fig. 3. ラット・マウスの肝RDS試験において陽性結果を示した非変異・肝がん原性物質(Ames陰性)の化学構造(I).

ハロゲン化炭化水素類 芳香族

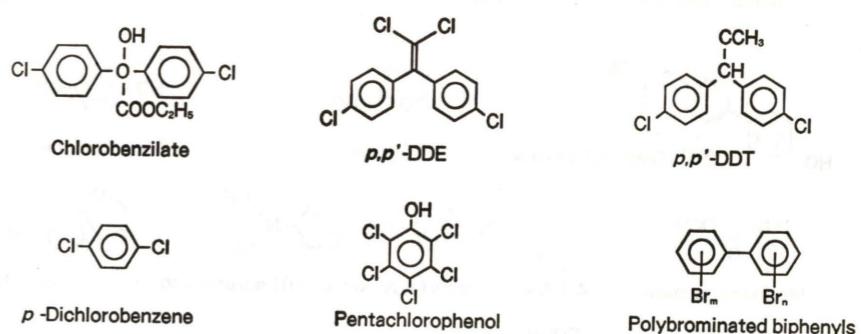


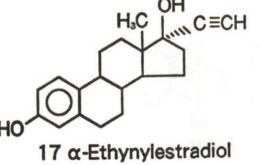
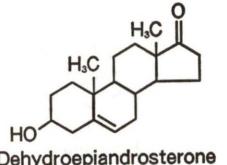
Fig. 4. ラット・マウスの肝RDS試験において陽性結果を示した非変異・肝がん原性物質(Ames陰性)の化学構造(II).

79-6)などを始めとする *in vivo* における代謝活性化の有益性に基づくもの。③合成ステロイドホルモン類、ペルオキシゾーム増殖剤、*p,p'*-DDT (50-29-3)などの本稿の5項に記載した細胞内や核内リセプターに関与するもの。以上の事柄が肝RDSの誘発原因として推測することができた。

ラットとマウスの本RDS試験において偽陰性(がん原性陽性でRDS試験陰性)と偽陽性(がん原性陰性でRDS試験陽性)とがいくつか存在した(Figs. 1, 2)。

まず、偽陰性を示した肝がん原性物質については以下の事柄が推定できる。RDS試験のような

合成ステロイドホルモン類



ペルオキシゾーム増殖剤

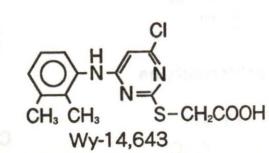
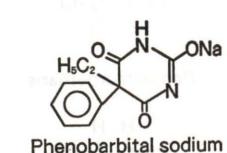
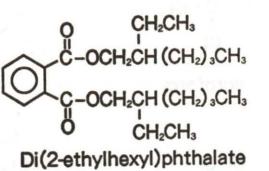
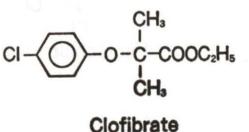


Fig. 5. ラット・マウスの肝 RDS 試験において陽性結果を示した非変異・肝がん原性物質 (Ames 隣性) の化学構造 (III).

その他

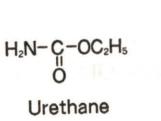
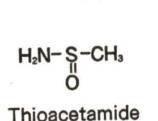
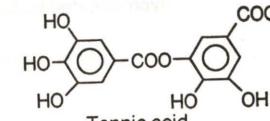
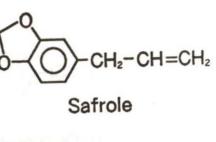
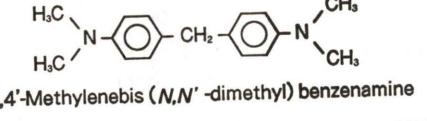
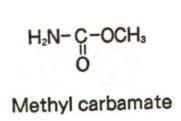
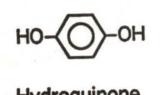
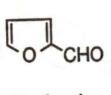
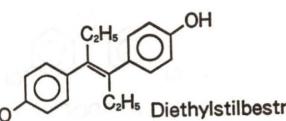
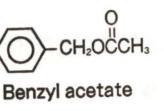
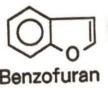
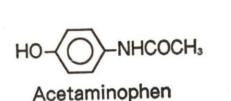


Fig. 6. ラット・マウスの肝 RDS 試験において陽性結果を示した非変異・肝がん原性物質 (Ames 隣性) の化学構造 (IV).

単回投与では肝傷害性が少なく、連続投与によってのみ肝傷害性を示す化学物質の場合である。例えは、ある化学物質が連続投与によって各種の薬物代謝酵素が誘導され、肝 RDS の誘発原因となる代謝物が生成されたとき、肝 RDS 試験のような短期間 (24~48 時間) で、しかも単回投与で

は、肝 RDS の誘発は期待できない。今後、偽陰性を示す肝がん原性物質を連続投与し、長期間における肝 RDS の誘発を観察する必要がある。

つぎに、偽陽性を示した非がん原性物質については、以下に記載する 4 つの事柄が推定できる。

第 1 に、急性毒性試験に類似している本 RDS 試験と長期慢性毒性試験のがん原性試験における用量の問題である。RDS 試験は単回投与で行われているために、長期のがん原性試験における用量に比較して、かなりの高用量を処理することができる。その結果、がん原性試験では認められないような肝傷害が RDS 試験では誘発され、肝細胞の RDS が 2 次的に誘発される場合がある。RDS 試験における偽陽性の問題の多くはがん原性試験との用量の差が原因となっている。この偽陽性の問題を避けるためには、用量を低く設定した長期間の投与における肝 RDS の誘発を調べる必要がある。

第 2 に、RDS 試験において偽陽性を示した非がん原性物質の一部はがん原性物質の可能性を秘めていることである。つまり、がん原性試験においてより高い用量を設定すれば、がん原性が誘発される可能性があるものとして benzoin (119-53-9) を指摘したい。その理由として、がん原性試験におけるラットの最大耐量 (MTD) が著しく低く設定されていた (Selkirk and Sharon, 1993)。

第 3 に、本 RDS 試験が陽性とする化学物質は細胞増殖能力のみをもつ発がんプロモーターを直接的に検出しているという可能性である。確かに butylated hydroxytoluene (BHT) (128-37-0) や lithocholic acid (434-13-9) は発がんプロモーターとしての報告がある (Rao *et al.*, 1989)。この内、BHT はがん原性試験における用量や処理法を工夫したとき、陽性となる可能性がある。実際に、BHT は 2 世代にわたるがん原性試験において陽性結果が報告されている (Olsen *et al.*, 1986)。本稿の最初に述べたように RDS の誘発は変異・がん原性物質にも共通した事象と考えている。したがって、本 RDS 試験が発がんプロモーターのみを検出しているとする推測に対して大きな疑問が残る。

第 4 に、hepatocyte growth factor (HGF) を

始めとする生体内の多種多様な増殖因子の挙動である。特に HGF と肝細胞の RDS との誘発は重要な関連性をもつものと考えている。つまり、RDS 試験における偽陽性の問題をこの背景から解析した場合、肝傷害性の全くない化学物質が肝以外の臓器・組織を損傷ないし刺激することで HGF を分泌したとき、肝細胞の RDS を誘発することが充分に想像できる。例えば、benzene (71-43-2) はラットやマウスのがん原性物質であるが、ラットの肝には明瞭ながん原性は知られていない。しかしながら、benzene はラット肝の RDS を誘発することを筆者らは経験している。この問題は急性毒性と慢性毒性における用量の問題として処理することは簡単であるが、HGF 分泌と肝 RDS の誘発との関連性を考えたとき、非常に複雑な背景がある。したがって、本稿の 6 項にこれを記載した。なお、本実験における非変異・肝がん原性物質は筆者らの調査から、既知の 84 化学物質の内、入手可能な 50 個をもって調べたものである (1994 年 1 月末日現在)。

3. 肝 RDS 試験における Ames 試験陽性の変異・肝がん原性物質の試験結果

RDS の誘発が非変異・がん原性物質と変異・がん原性物質とに共通した事象であることを確認するために、Ames 試験において陽性を示す肝がん原性物質について肝 RDS 試験を実施した。その結果を Table 1 に示す。使用した化学物質のすべてが RDS を誘発した。ここで使用した urethane は Fig. 1 に示したように、通常の Ames 試験で調べると陰性を示す非変異・がん原性物質

表 1. 変異・肝がん原性物質 (Ames 陽性) のラット・マウス肝 RDS 試験結果

| 変異・肝がん原性物質 | 肝 RDS 誘発率 (%) | |
|---------------------------|---------------|------|
| | ラット | マウス |
| Dimethylnitrosamine | 10.8 | |
| Safrole | 5.5 | |
| Trichloroethylene | 1.4 | 1.36 |
| Urethane | 13.2 | |
| 2-Methoxy-5-methylaniline | 6.0 | |
| 2, 4-Toluenediamine | 2.3 | |
| 2, 4, 5-Trimethylaniline | 2.5 | |

ラットは 1.0% 以上陽性、マウスは 0.40% 以上陽性

であるが、ハムスターの肝 S9mix を使用し、10 mg/plate 以上の高濃度を処理すると Ames 試験で陽性となっている (Zeiger *et al.*, 1992)。したがって、この項では変異・肝がん原性物質として取り扱った。以上の実験事実から、肝 RDS の誘発は非変異・肝がん原性物質に依存した現象ではなく、変異・肝がん原性物質にも共通した事象であった。この事実から、肝がん原性物質の肝細胞増殖活性はがん化の進行に必須な条件と推定した。

4. がん原性誘発における変異原活性と細胞増殖活性との関連

がん原性の誘発に変異原活性と細胞増殖活性とがどのような関連があるのかについて推測し、これを Table 2 に要約した。仮に、化学物質の A, B, C と D が存在するとする。

すなわち、変異原性もなく細胞増殖能力をもたない化学物質 (A) は非がん原性物質である。変異原性のみで細胞増殖能力のない化学物質 (B) もやはり非がん原性物質である。これは Fig. 1 と 2 に示したように、Ames 試験や染色体異常試験で陽性を示す多くの化学物質が非がん原性物質であった事実から推定している。化学物質 (C) の変異原性は [-] で表してある。その理由は Ames 試験では陰性であるが、他の変異原性試験では陽性となる可能性が秘められているためである。この (C) に細胞増殖能力が備わったとき、がん原性は陽性 (+) となる。つまり、本稿で取り扱った非変異・がん原性物質そのものである。肝 RDS 試験で陽性を示す非変異・肝がん原性物質の約 1/3 のものが、ラットやマウスの種差、系統差や性差に依存し、しかも臓器・組織に特異的にがん原性を誘発する傾向が示された。このような意味からも、+をもってがん原性の強度を表した。このようながん原性物質は一般的にヒトに対して安全であると思われているし、また筆者らもそのように考えたい。しかしながら、ここで強調すべきことは benzene を始めとするいくつかの非変異・肝がん原性物質はラットとマウスの 2 種間において、多臓器・組織にわたるがん原性を誘発する。要するに、非変異・肝がん原性物質のすべてが必要

表 2. がん原性誘発に対する仮説

| 化学物質 | 変異原性 (Ames, Drosophila) | Cell proliferation (RDS) | がん原性 |
|------|----------------------------|-----------------------------|------|
| A | - | - | - |
| B | + | - | - |
| C | [-] | + | + |
| D | + | + | ++ |

ずしも Table 2 に示した (C) に分類されないことである。今後、非変異・がん原性物質の安全性評価に大きな問題が残されている。化学物質 (D) は変異原性と細胞増殖能力を同時にもつものである。この場合、上述の動物に関する差は少なく、さらに多臓器にわたってがん原性が誘発する例が多いことから、++をもってがん原性の強度を表した。しかしながら、Ames 試験陽性のがん原性物質にも臓器・組織に特異的ながん原性を示す例がある。

5. 複製 DNA 合成 (RDS) の誘発機構に対する仮説

肝細胞における RDS の誘発を非変異・がん原性物質と変異・がん原性物質との場合にまず 2 つに大別して考えてみた (Fig. 7)。

非変異・がん原性物質はその化学物質がもつ mitogenic, apoptogenic や necrogenic な事象が閾値以下または silent mutation の作用よりも優先して、核外因子に影響を与え、さらに核内因子の proto-oncogenes や G₁ cycline genes の活性化を行い RDS を誘発するものと考えている。このとき、silent mutation を保持しながら、表面上では正常に近い細胞が細胞分裂を重ねることで、変異細胞への変換が行われている可能性がある。

変異・がん原性物質はその化学物質がもつ mutagenic な作用が上述の核外因子の事象よりも優先的に核内因子に影響を与える。すなわち、tumor-suppressor genes や他遺伝子の突然変異が主となり、proto-oncogenes や G₁ cycline genes の over expression は従になるものと思われる。このとき、変異細胞が存在する数は非変異・がん原性物質の場合に比較して、かなり多いことが容易に想像できる。以上の仮説を肝実質細胞にあてはめたとき、RDS 誘発の上昇はやがて肝細胞の分

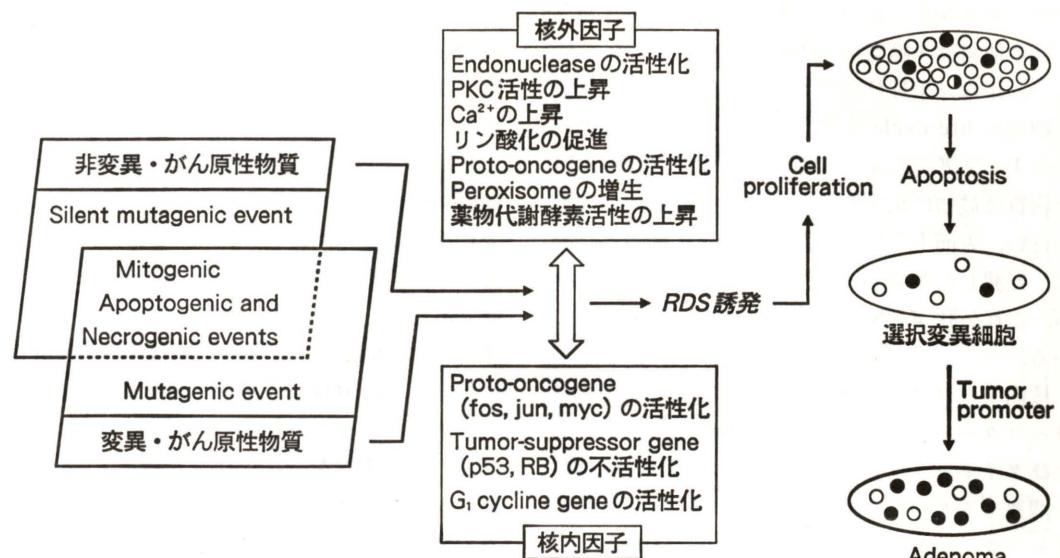


Fig. 7. がん原性物質による初期肝 RDS 誘発機構に対する仮説。

裂増殖を伴い、アポトーシス (Kerr *et al.*, 1972; Bursch *et al.*, 1992) によって、将来的には hepatocarcinoma に至る変異細胞が選択されるものと考えている。以下に Fig. 3 の詳細を記載する。

非変異・がん原性物質と変異・がん原性物質とともに、RDS の誘発を促進する因子として核外因子と核内因子とに分けてみた。核外因子として、ギャップ結合の阻害、細胞内リセプターと核内リセプターを挙げ、また核内因子として proto-oncogenes (*fos*, *jun*, *myc*) の活性化、tumor-suppressor genes (*p53*, *Rb*) の不活性化と G₁ cycline genes の活性化を挙げた (Fig. 7)。

核外因子の内、ギャップ結合の阻害は発がんプロモーターを検出するための指標として使用されてきた。ギャップ結合を介した細胞間連絡の阻害と細胞増殖とは密接に関連している (Holder *et al.*, 1993)。つまり、ギャップ結合の阻害は Ca²⁺ の上昇、c-AMP の増加、PKC (プロテインキナーゼ C) の活性化、活性酸素が関与する free radical の生成など (Trosko and Chang, 1989) が知られ、これらの事象を誘発する代表例として TPA (16561-29-8), *p,p'*-DDT, phenobarbital (50-06-6) などが挙げられている。筆者らはこれら上述の事象が Fig. 7 に示した核内因子に伝達され肝

RDS の促進に関与しているものと予想している。特に注目したいのは、非変異・がん原性物質の約半分以上を占めるハロゲン化炭化水素類 (Fig. 1) が恐らく carbon tetrachloride と同様に活性酸素を生成し、これがギャップ結合を阻害する原因となり、アポトーシスを起こし、細胞分裂の主要因となっていることが充分に予想される。

細胞膜リセプターを介して、肝 RDS の誘発と関連するのは HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF (insulin-like growth factor) などであろう。特に、HGF と肝細胞の増殖機構とは密接に関連していることが判明し (坪内ら, 1991; 松本ら, 1991), 今日 HGF の介入なしに肝 RDS 誘発機構の話はできない。したがって、詳細は 4 の項に記載し、ここでは HGF が細胞膜リセプターを通して、ギャップ結合の阻害と類似した事象が発生するとした予想範囲に止めた。

HGF の細胞膜リセプターは c-met proto-oncogene の遺伝子産物であることが知られるようになつた (Bottaro *et al.*, 1991)。この事実から明らかのように、肝細胞における HGF の誘導はがん化の進行に何らかの役割を果たしているよう思える。つまり、筆者らが成熟肝組織における肝

細胞の増殖異常に注目した理由は、がん原性物質が肝や他組織・臓器の proto-oncogenes を活性化し、正常な生理状態においてプログラムされた肝細胞の life cycle を乱すアポトーシスの促進をその 1 つと考えたからである。つまり、肝がん原性物質は最初に正常肝細胞のアポトーシスの促進を行い、表面上では正常な肝組織を保持するために、死滅した肝細胞は近傍の肝細胞を分裂させる。これが肝 RDS 誘発の原因の 1 つと推定している。

核内リセプターを介してステロイドホルモン様リセプター、ペルオキシゾーム増生リセプターおよびダイオキシンリセプターなどが RDS の誘発と関連するものと予想している。つまり、これらのリセプターが各リガンドと結合後(Green, 1992), 染色体上に作用し, *fos* や *jun* の proto-oncogenes の over expression を行い、RDS を促進するものと推定している。ここで重要なのは、これらの核内リセプターには既知のリガンド以外に、類縁の化学構造をもった非変異・がん原性物質がリガンドとして結合する可能性が秘められている事である(Poellinger et al., 1992)。例えば、ステロイドホルモン様リセプターには dehydroepiandrosterone (53-43-0) と 17 α -ethynodiol (57-63-6) が、ペルオキシゾーム増生リセプターには clofibrate (637-07-0), di(2-ethylhexyl)phthalate (117-81-7), phenobarbital sodium (57-30-7), simfibrate (14929-11-4) と Wy-14,643 (50892-23-4) が、さらにダイオキシンリセプターには *p,p'*-DDT や polybrominated biphenyls (67774-32-7) が、それぞれのリセプターに結合し、肝 RDS が誘発したものと推測している。

核内因子の内、proto-oncogenes (*fos*, *jun*, *myc*) の活性化(米山ら, 1993; 中別府, 1993)はがん細胞に焦点を合わせたとき、いずれもアポトーシスを制御することで、その増殖能力を維持しているものと考えられている(片岡ら, 1993)。また、tumor-suppressor genes (p53, Rb) の不活性化(田矢, 1992; 北川ら, 1993; 秋山, 1993)や G₁ cycline genes の活性化(安田, 1993)と肝 RDS 誘発との関連は確かに DNA や染色体と直線的な繋がりをもって解明がなされつつある。しかし

ながら、各遺伝子における遺伝子産物の連携に現在でも不明な点が多い。さらに、筆者らの専門領域を考慮すると、ここでは文献を挙げる程度に止めておくのが賢明と考える。

肝細胞の RDS の誘発を考えた場合、cell division cycle のどの時期を促進しているのかが、つぎに重要な課題になると思われる。成熟した肝、腎などの細胞は卵細胞、精細胞、消化管粘膜細胞などに比較して、stem cell 説が一般的に通用し難い。したがって、成熟肝細胞のすべては G₀ 期に相当し、肝 RDS の誘発は必ず G₁ 期を経て S 期に移行するものと考えている。しかしながら、最近の複製 DNA 合成の研究をみると、S 期の促進が G₂ 期や M 期の促進と決して無縁ではなく、各分裂サイクルを切り離して RDS の誘発を考えることができなくなった。各がん原性物質がどの期を刺激して、S 期の誘発を促進しているのかが明確になったとき、もう一步踏み込んだ RDS の誘発における意義や重要性が明らかになるものと思う。いずれにしても、本 RDS 試験の RDS 誘発は上述の各分裂サイクルにおける様々な DNA 合成の刺激を最終的には S 期の DNA 合成という事象を指標にしているものと現在考えている。

6. HGF (Hepatocyte Growth Factor) と肝 RDS 誘発機構に対する仮説

3 の項において、HGF の関与しない場合の肝 RDS 誘発について推測した。ここでは、先駆者の論文を基盤にして(中村, 1990; 坪内ら, 1991), 筆者らの HGF に関する僅かな知識をもって論じたい(Fig. 8)。

HGF がどこから分泌されるのかについて、2 つの過程が知られている。まず、HGF は肝組織の Kupffer 細胞や類洞壁内皮細胞からパラクリン的に分泌され(Kinoshita et al., 1989), 肝実質細胞の HGF リセプターに作用する過程と、他臓器これは主に腎、肺、胸腺などからエンドクリン的に分泌され、肝実質細胞に作用する過程とが知られている(Yanagita et al., 1992; Kono et al., 1992)。この HGF が分泌される原因として、化学物質による肝や他臓器への傷害が考えられている。化学物質が肝に HGF のパラクリン機構で肝

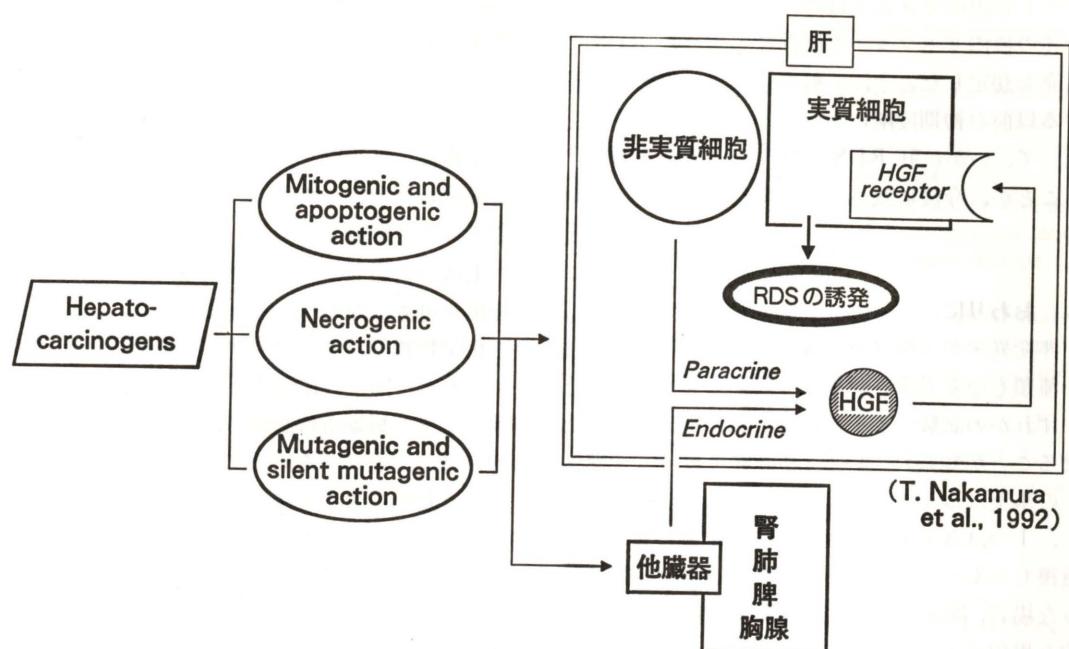


Fig. 8. ラット・マウス肝における RDS 誘発機構に対する仮説。

RDS の誘発作用を示したとき、その化学物質は肝傷害を前提としていると思われることから、肝がん原性物質としての可能性は非常に高いことが推定できる。また、化学物質が HGF のエンドクリン機構のみで肝 RDS の誘発作用を示したとき、肝細胞に mitogens として働く可能性がある。この場合に、2 つの事柄が考えられる。第 1 に、HGF の分泌原因がその臓器・組織のがん原性誘発の事象に基づいたものであれば、肝 RDS は他臓器・組織でのがん原性物質をも検出が可能となる(上述の benzene の例)。第 2 に、HGF の分泌原因がその臓器・組織のがん原性誘発の事象と関連のないものであれば、肝 RDS 試験において偽陽性となる。Fig. 1 と 2 における偽陽性の 1 部がこれに該当するものと思われる。

筆者らが本実験を開始した当初、化学物質による単なる肝傷害と肝 RDS 誘発とに関連する数多くの問合せがあった。ここで重要なのは肝傷害に対する解釈である。つまり、一般毒性的な概念としてのみの肝傷害を意味しているのか、または上述の HGF を始めとする本稿の 5 項に記載した

概念をも含んだ意味での肝傷害を指摘しているのかである。その質問の多くは一般毒性的な概念の域をでていないものであったが、もちろん一般毒性的な概念における肝傷害も肝 RDS が誘発する有力な 1 つの原因と考えている。なぜならば、すでに Ames が指摘しているように(Ames and Gold, 1990), がん原性試験における最大耐量での処理が肝傷害を引き起こす原因となり、つぎに肝細胞の増殖を伴い、その結果としてがん化に進行するとした仮説は筆者らもこれを支持する。さらに、筆者らは肝傷害物質の大部分が肝がん原性物質であるとの意見も支持する。しかしながら、筆者らの予備的な実験から、肝傷害の指標である GOT などの上昇が肝 RDS の誘発と必ずしも関連するものではなかったことを強調したい。

一方、本稿の 5 項に記載した概念をも含んだ観点から、肝 RDS の誘発をみた場合、一般毒性的な概念における肝毒性の発現とは自ずと分離して考えざるを得ない。つまり、筆者らは一般毒性的な肝傷害が肝 RDS を誘発することに対して何らの異論はないが、これだけで肝 RDS 誘発機構の

すべてを説明できるとは考えていない。例えば、上述の核内リセプターが関与するような RDS の誘発を想定したとき、一般毒性的な肝傷害に到達する以前の初期段階において、どのような機構をもって、いかに肝 RDS が誘発するのかを解析することが、今後に残された重要な課題と考えている。

7. おわりに

非変異・がん原性物質 (Ames 試験陰性) は何十種類もの変異原性試験法を使用して検討するといずれかの試験において、その内の90%が陽性となることが知られている (Jackson *et al.*, 1993)。この事実は以下に示す2つの事柄を意味していた。1つは各試験における偽陽性結果が都合良く重複したものとみなすか、他方は Ames 試験のような場合、閾値以下の突然変異や silent mutation 的な現象が示され、単に陰性結果となったにすぎないとみなすかである。筆者らは後者を選択したい。なぜならば、すべてのがん原性物質は変異原性と細胞増殖 (cell proliferation, mitogenesis) の両活性を、同時に合わせもつものと想定しているからである。したがって、Ames 試験で陽性や陰性を示すがん原性物質には細胞増殖活性を指標とする試験系が新たに必要と考えている。

非変異・肝がん原性物質に限らず、変異・肝がん原性物質でも RDS を誘発する。したがって、肝がん原性物質には RDS が共通な事象として存在するものと考えた。さらに、変異原性のみではがん化に進行せず、RDS つまり細胞増殖効果が初期のイニシエーション段階で同時に必要と考えている。非変異・がん原性物質と言えども、何かしらの変異原性試験において陽性結果を示す。しかしながら、ある化学物質に何十種類もの変異原性試験をあてて、その変異原性を検索することは非現実的な話である。現実的な話として、変異原性のみではがん化に進行しないという説に一見矛盾するようであるが、偽陽性の少ないとすることでその評価が高い Ames やショウジョウバエの試験を使用して、陽性の化学物質をまず振るい落とすことを勧める。つまり、Ames やショウジョウバエの試験において陽性結果を示したものは自ずと細

胞増殖能力をも合わせもっているとみなすことが賢明な策と考える。こうして残った化学物質についてのみ、細胞増殖能力を確かめることを勧めた。このスクリーニング過程を医薬、農薬、一般化学物質などに取り入れた場合、肝がん原性物質に限定したとき、80%以上の確率をもって検出できるものと確信している。

上述のスクリーニング過程において、100% の検出が可能とならない理由はがん原性試験における化学物質の投与量の問題が主要原因と思われる。すなわち、同一の化学物質において、肝 RDS 試験のような短期毒性試験ではその最大耐量は一般的に高く、逆にがん原性試験のような長期毒性試験では動物の生存を持続しなければならないことから、その最大耐量は低く抑制せざるを得ない。このような実験背景の相違を考慮すると、肝 RDS 試験陽性の化学物質の1部はがん原性試験では陰性となる可能性がある。このような潜在的ながん原性の誘発能力をもつ化学物質をどのように取扱うべきかは今後に残された大きな課題である。

この潜在的ながん原性物質の存在を考えた場合、この問題は肝 RDS 試験のみの問題ではなく、動物を使用したがん原性の短期予測試験のすべてにかかる問題でもある。つまり、これらの短期予測試験のすべては上述の用量に基づく偽陽性の問題にやがては遭遇する運命にある。この問題の解決には科学の進歩はもちろんのこと、ヒトに対する化学物質のがん原性をより合理的に判断しようとする人々の知恵と意見の統一が、この潜在的ながん原性物質の処置に、大きな役割を果たすものと考えている。

最後に、米国の心理学者の言葉を記載した谷村 (1994) の論文から「人間の欲望の原点は飢えと渴きをいやすことである。そして、それらが満たされると、つぎにその安全性を求めるようになる」を引用して、この「潜在的ながん原性物質」が現状の社会環境の中で、将来どのような取扱いがなされるべきかの指針にしたい。

参考文献

秋山 徹 (1933) 癌抑制遺伝子 Rb の機能と調節機構、最新医学、**48**, 392-397.

- Ames, B. N. and L. S. Gold (1990) Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 7772-7776.
- Barrett, J. C. (1933) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment, Environ. Health Perspect., **100**, 9-20.
- Bottaro, D. P., J. S. Rubin, D. L. Faletto, A. M.-L. Chan, T. E. Kmiecik, G. F. V. Woude and S. A. Aaronson (1991) Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product, Science, **251**, 802-804.
- Bursch, W., F. Oberhammer and R. S.-Hermann (1922) Cell death by apoptosis and its protective role against disease, Trends in Pharmacological Sciences, **13**, 245-251.
- Gold, L. S., T. H. Slone, B. R. Stern and L. Bernstein (1993) Comparison of target organs of carcinogenicity for mutagenic and non-mutagenic chemicals, Mutat. Res., **286**, 75-100.
- Green, S. (1992) Nuclear receptors and chemical carcinogenesis, Trends in Pharmacological Sciences, **13**, 251-255.
- Holder, J. W., E. Elmore and J. C. Barrett (1993) Gap junction function and cancer, Cancer Res., **53**, 3475-3485.
- Jackson, M. A., H. F., H. F. Stack and M. D. Waters (1993) The genetic toxicology of putative nongenotoxic carcinogens, Mutat. Res., **296**, 241-277.
- 片岡之郎, 鶴尾 隆 (1933) 抗癌剤とアポトーシス, 実験医学, **11**, 2324-2328.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, British J. Cancer, **26**, 239-257.
- Kinoshita, T., K. Tashiro and T. Nakamura (1989) Marked increase of HGF mRNA in non-parenchymal liver cells of rats treated with hepatotoxins, Biochem. Biophys. Res. Comm., **165**, 1229-1234.
- Kono, S., M. Nagaike, K. Matsumoto and T. Nakamura (1992) Marked induction of hepatocyte growth factor mRNA in intact kidney and spleen in response to injury of distant organs, Biochem. Biophys. Res. Comm., **186**, 991-998.
- 北川雅敏, 西村 邇 (1993) がんと細胞周期の阻害剤, cdc2 ファミリーキナーゼの特異的阻害剤, 最新医学, **48**, 418-424.
- 松本邦夫, 中村敏一 (1991) 肝細胞増殖因子 (HGF) の構造と機能, 代謝, **28**, 599-608.
- Nagao, M. and T. Sugimura (1993) Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development, Mutation Res., **290**, 43-51.
- 中別府雄作 (1993) fos 遺伝子とシグナル伝達, 細胞増殖の制御 (山本 雅, 高井義美編), 南江堂, pp. 150-110.
- 中村敏一 (1990) 肝細胞増殖因子の発見と構造決定, サイエンス, **20**, 6-17.
- Olsen, P., O. Meyer, N. Bille and G. Würzten (1986) Carcinogenicity study on butylated hydroxytoluene (BHT) in Wistar rats exposed in utero, Fd. Chem. Toxicol., **24**, 1-12.
- Perera, F. P. (1991) Perspectives on the risk assessment for nongenotoxic carcinogens and tumor promoters, Environ. Health Perspect., **94**, 231-235.
- Poellinger, L., M. Göttlicher and J.-Å. Gustafsson (1992) The dioxin and peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear receptors in search of endogenous ligands, Trends in Pharmacological Sciences, **13**, 241-245.
- Rao, V. R., Y.-T. Woo, D. Y. Iai, J. C. Arcos (1989) Database on promoters of chemical carcinogenesis, Environ. Carcino. Rev., **7**, 145-386.
- Selkirk, J. K. and S. M. Soward (1993) Compendium of abstracts from long-term cancer studies reported by the National Toxicology Program of the National Institute of Environmental Health Sciences from 1976-1992, Environ. Health Perspect., **101**, p. 113.
- 高沢博修, 宇野芳文, 宮川 誠, 井上由起, 村田妙子, 吉川邦衛 (1993) マウス肝 RDS (複製 DNA 合成) 試験法による非変異・マウス肝がん原性物質の早期検出, 日本環境変異原学会第22回大会要旨, p 109.
- 谷村顕雄 (1994) 安全な食品を求めて, Food and Food Ingredient Journal of Japan (FFI ジャーナル), No. 159, 2-4.
- 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.
- Tenant, R. W. and E. Zeiger (1993) Genetic toxicology: current status of methods of carcinogen identification, Environ. Health Perspect., **100**, 37-315.
- Trosko, J. E. and C. C. Chang (1989) Stem cell theory of carcinogenesis, Toxicol. Lett., **49**, 283-295.
- 坪内博仁, 合田栄一 (1991) 肝障害と肝再生, 代謝, **28**, 611-618.
- Uno, Y., H. Takasawa, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata, M. Ogawa and K. Yoshikawa (1992a) *In vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: I. Establishment of a standard protocol, Toxicol. Lett., **63**, 191-199.
- Uno, Y., H. Takasawa, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata, M. Ogawa and K. Yoshikawa (1992b) *In vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test using perfused rat livers as an early

prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: II. Assessment of judgement criteria, *Toxicol. Lett.*, **63**, 201-209.
 Uno, Y., H. Takahama, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata and K. Yoshikawa (1994) An *in vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test using rat hepatocytes as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: Screening of 22 known positives and 25 non-carcinogens, *Mutat. Res.*, **320**, 189-205.
 Yanagita, K., M. Nagaike, H. Ishibashi, Y. Niho, K. Matsumoto and T. Nakamura (1992) Lung may have an endocrine function producing

hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **182**, 802-809.
 安田秀世 (1993) サイクリンと cdc 2 キナーゼ, cdk 2, 最新医学, **48**, 411-417.
 米山光俊, 谷口維紹 (1993) サイトカインによる細胞周期制御, myc の役割, 最新医学, **48**, 384-391.
 Zeiger, E., B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor and K. Mortelmans (1992) Salmonella mutagenicity tests: V. results from the testing of 311 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **19**, 2-141.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 127-135 (1994)

第 22 回大会パネルディスカッション 「変異原性試験の役割とその評価」

化粧品における変異原性試験の役割とその評価

Utility and problems of mutagenicity testing in safety evaluation of cosmetic ingredients

杉山千代美
Chiyomi Sugiyama

(株)資生堂, 安全性・分析センター
223 神奈川県横浜市港北区新羽町 1050

Shiseido Co., Ltd., Safety & Analytical Research Center, 1050, Nippa-cho,
Kohoku-ku, Yokohama-shi 223, Japan

(受付: 1994 年 4 月 16 日; 受理: 1994 年 4 月 16 日)

Summary

Mutagenicity testing in safety evaluation of cosmetic ingredients is predictability of carcinogenic potency of materials. Ames test and chromosome aberration test *in vitro*, and two kinds of mutagenicity testing including mammalian cells, are chosen as the first screening tests, in Japan and in U.S.A., respectively. If the result is positive in either test, micronucleus test and skin painting carcinogenicity test may be required, in Japan and in U.S.A., respectively.

Two oxidizing agent, sodium bromate and potassium bromate used as food additive and as ingredient in cosmetic permanent wave formulations have been reported to be mutagenic and carcinogenic ingredients. Butylated hydroxyanisole (BHA), an antioxidant, also used as food additive and ingredient in cosmetics has been reported to induce forestomach tumors in rats. The estimation of carcinogenic risks of these carcinogenic ingredients to humans was discussed.

Keywords: mutagenicity; carcinogenicity; cosmetic ingredients, antioxidant

1. はじめに

日本では薬事法のもとに化粧品及び医薬部外品が規定されている。

「化粧品」とは「人の身体を清潔にし、美化し、魅力を増し、容貌を変え、又は皮膚若しくは毛髪をすこやかに保つために、身体に塗擦、散布その他これらに類似する方法で使用されることが目的とされている物で、人体に対する作用が緩和な物をいう」ただし、これらの使用目的のほかに「疾病の診断、治療又は予防に使用される」又は「身体の構造又は機能に影響を及ぼす」こともあわせて

目的とされている物及び医薬部外品を除く、とされている（薬事法第 2 条第 3 項）。

医薬部外品とされている物はその物の使用目的及び人体に対する作用等について一定の範囲が示されている。

- ・吐き気その他の不快感又は口臭若しくは体臭の防止を目的とする物
- ・あせも、ただれ等の防止を目的とする物、脱毛の防止、育毛又は除毛を目的とする物（薬事法第 2 条第 2 項）

また、使用目的や人体に対する作用面等、総合

的に見て、これらに準ずる取扱いが適当と考えられる物で、厚生大臣が指定した物として以下がある。

- ・染毛剤
- ・ペーマネント・ウェーブ用剤
- ・化粧品としての使用目的のほかに、にきび、肌荒れ、かぶれ、しもやけ等の防止又は皮膚若しくは口腔の殺菌消毒に使用されることもある目的とされている物
- ・浴用剤（浴用化粧品とは別である）
医薬部外品はその目的が予防的な物に限られ、人体に対する作用が緩和なものと規定されており、化粧品と医薬品の中間に位置づけられており、米国でいう OTC (over-the-counter) 薬とは異なる日本独自の分類に依っている。

薬事法で規定された化粧品及び医薬部外品は人体に対して緩和な作用を有するものであり、通常の使用方法において人体に強い作用を及ぼさず、通常予想される誤用の際にも人体に対する作用の緩和性がある程度必要であり、治療を目的とする作用の強い医薬品とはおのずから異なる。皮膚への適用の仕方も長く皮膚に止めておくもの、直ぐに洗い流してしまうものもあり、これらの特性を考慮して、化粧品の安全性における変異原性試験の位置づけ、発癌性との関係について、またどのような試験系を用いたら良いのか日本及び米国の実状の具体例を示しながら考察する。

2. 日本の化粧品の安全性試験項目と変異原性試験

日本では承認又は許可前例の無い原料・成分を配合した、医薬部外品及び化粧品の製造又は輸入の申請に際しては、必要な資料の提出をし、中央薬事審議会の審議を経て承認又は許可が与えられている。この安全性を含めた添付すべき必要な資料の範囲については薬事法施行規則第18条の3第1項2号（医薬部外品）及び3号（化粧品）にそれぞれ示されている。その詳細について1980年5月30日薬発700号によれば、安全性に関する資料として、化粧品、医薬部外品とも資料の範囲は同一であり、その項目は急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、生殖に及ぼす影響、抗原性（皮膚感作試験、光感作試験）、変異原性、癌原性、局所刺激性（皮膚刺激試験、粘膜刺激試験等）、吸収・分布・代謝・排泄とされている。

1986年に厚生省に安全性の専門家で構成された「化粧品原料及び化粧品の安全性項目設定のための基礎研究」の研究班が発足し、その成果が『新規原料を配合した化粧品の製造、または輸入申請に添付すべき安全性資料の範囲について』1987年6月18日の厚生省事務連絡（厚生省薬務局審査第二課）の報告資料となった（1987、工業会資料）。事務連絡の中で、厚生省は今後新規原料を配合した化粧品の製造又は輸入申請を行う場合に必要な安全性の資料の範囲は本報告の範囲に準じて取り扱う予定とした。報告書では「新規原料の安全性の評価は当該原料の配合される製品の使用法（使用部位、使用時間等）によるところが大きく、また、新規原料の類似物質の使用経験も大いに参考となる。これまでの得られた知見等を参考にして安全性の範囲をまとめた」と述べている。添付すべき安全性資料の範囲として、急性毒性、眼刺激性、皮膚一次刺激性、連続皮膚刺激性、感作性、光毒性、光感作性、変異原性、ヒトパッチテストの9項目の試験が必要とされ、皮膚、局所における安全性が重視されていることを示した。また、殺菌・防腐剤、酸化防止剤、金属封鎖剤、紫外線吸収剤、タル系色素等のように毒性についてより慎重に扱う必要があるものの場合にはこれらに加えて必要に応じ、亜急性毒性試験、慢性毒性試験、生殖毒性試験、吸収・分布・代謝・排泄試験等の資料を添付するものとしている。しかし、発癌性については具体的な記載が無く、変異原性がこれに替わるものと考えられる。従って変異原性試験は新規原料の発癌性予測試験として重要な位置付けにあると考えられている。各々の試験を解説した中で変異原性についての項では「すべての新規原料で変異原性試験を実施する。変異原性試験は発癌性、あるいは遺伝学的傷害性の有無を予測するスクリーニング試験法として知られている。種々の試験法があるが、比較的感受性の高いin vitro 試験系のうちから適切な手法を適用する。」と述べられ、具体的な試験方法には言及されていない。

1991年『新化粧品安全性評価指針』が発表された。厚生省研究班が1987年6月に添付すべき資料の範囲とした安全性9項目の安全性試験法ガイドラインの概要を示したものである（1991工業会資料）。変異原性試験のガイドラインでは「原則として、化粧品原料について微生物、及び哺乳類の培養細胞を用いる in vitro 試験を行い、これらの試験で変異原性が疑われた場合には、動物の個体を用いる in vivo 試験を追加する。なお、化粧品の特性から考慮して、変異原性試験を必要としないと判断される場合には、その根拠を明記する。

1. 細菌を用いる復帰変異試験
2. 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験
3. in vivo: マウスを用いる小核試験

以上3種の試験の用いる菌株、細胞、用量段階等の具体的な内容が示されている。

化粧品原料の変異原性について、ガイドラインから日本では2種の in vitro 試験で陰性であれば良いと判断されていること、変異原性が疑われた場合はマウス小核試験での陰性結果が重要視されていることを示唆している。

なお、同ガイドラインでは毒性についてより慎重に扱う必要がある新規原料については、短期及び長期の毒性の予備的な知見も得られる亜慢性毒性試験を行うことを記載している。期間は3ヶ月として経皮投与が望ましい（経口投与が困難なものについては経口投与とする）。その結果、明らかに慢性毒性を示すと推定されたものについては12ヶ月以上の慢性毒性/癌原性を組み合わせた試験及び催奇形性試験、経皮吸収試験等を必要とすることがあるとして、発癌性試験を否定しているものではない。

3. 米国における化粧品原料の変異原性、発癌性について: CIR の評価

米国では化粧品の安全性試験項目を特に定めた物はない。しかし、1967年に設立され、化粧品原料の安全性について見直しを行っている CIR (Cosmetic Ingredient Review) 化粧品原料評価機構という組織がある。CIR は CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) 化粧品、トイレタリー、フレグランス工業会によっ

て設立されたが化粧品に用いられている原料の安全性の見直し、評価を公開で、公平な専門的な方法により行っている。CIR 及びその評価過程は完全に CTFA 及び化粧品工業界から分離され、18年間にわたって化粧品の安全性を最高の水準に維持しようとの試みがなされている（CIR, 1993）。

CIR は原料の安全性データを見直し、評価する専門委員会（Expert Panel）を設立している。選ばれた7人の専門委員がおり、消費者、科学及び医学グループ、行政および業界によって公に推薦された人たちである。このほかに3名の連絡員、アメリカ消費者連合、CTFA 及び FDA (Food and Drug Administration) 食品医薬品局から各一名が参加している（CIR, 1993）。

専門委員会はまず安全性の文献資料の見直しを行い（Scientific Literature Review）、専門家会議を開催（Expert Panel Meeting）し、その結果を暫定報告書（Tentative Report）として公表し、意見を公募した後、最終報告書（Final Report）を公表する。最終報告書は次のような分類で原料についての安全性を層別している（CIR, 1992, 1993）。

- 評価分類: 安全 (Safe as Used)
条件付安全 (Safe with Limits)
データ不足 (Insufficient)
安全ではない (Unsafe)

1992年までに検討された原料は評価済み369品、暫定評価原料 11 品、継続検討原料 64 品となり（CIR, 1992）。1993年には、最終報告書 14 報を 19 物質について報告している。安全と評価したもの 3 品、条件付安全 12 品、データ不足 3 品、安全ではない 3 品であり、このうち 2 品はある使用方法では安全だがある使用方法では安全でないと結論されている（CIR, 1993）。これらの最終報告書は 1982 年以来 Journal of American College of Toxicology に収載、公にされている。

米国における化粧品の安全性における発癌性、変異原性の位置付けはこの CIR の一連の評価を通して知ることができる。CIR の 1993 年 5 月の会議の評価ではデータ不足とされたものは 5 品目でその中の cetrimonium chloride, cetrimonium bromide, steatrimonium chloride に対し必要とされる資料、データは、使用濃度、不純物、28 日

間皮膚反復投与試験、不定期 DNA 合成試験を含む遺伝毒性試験 2 種類、ヒト刺激性と感作性試験であり、遺伝毒性試験が陽性である場合は NTP (National Toxicology Program) 国立毒性機構の基準に従った発癌性試験が必要になるかもしれないとして述べている (The Rose Sheet, 14(22), 1993)。CIR の 1993 年 11 月の会議では potassium chloride について要求しているデータは 28 日間の皮膚塗布試験、眼刺激性試験、2 種類の遺伝毒性試験でその内一つは哺乳類を使用し、その結果が陽性ならばその発癌性データ、また、lauramine, stearamine のデータ不足としているのは、不純物の情報と 2 種類の遺伝毒性試験、その内一つは哺乳類を使用した試験であり、試験結果が陽性ならば、NTP の基準に基づく皮膚発癌性試験が要求される可能性があるとして述べている (The Rose Sheet, 14(48), 1993)。2 種類の遺伝毒性試験でその一つに哺乳類を用い、陽性となった場合は発癌性試験と言うのが CIR の化粧品の遺伝毒性、発癌性を評価する場合の基本的な姿勢と考えられる。

Urocanic acid は表皮の角化過程で生成されて表皮中に多量存在している (Baden et al., 1967)。trans-体は紫外線 (UV-B) により cis-体に変化することによって免疫抑制作用を示すために、urocanic acid を含有する化粧品に紫外線が当たると紫外線によって誘発する皮膚癌を亢進すると言う報告 (Reeve et al., 1989) がだされた。これは化粧品の発癌性に関する特徴を示す例である。CIR は urocanic acid に関する安全性のデータを募集した。この時提出された安全性試験項目の中で遺伝毒性、発癌性に関するものは、Ames 試験、不定期 DNA 合成試験、in vitro DNA-binding 試験、染色体異常試験と多種類の項目にわたり、更に、動物光発癌試験も提出された。しかし、CIR は 1993 年 11 月の会議でこれをデータ不足とし、動物光発癌試験の再追加と in vivo DNA-adduct 試験を必要とした (The Rose Sheet, 14(48) 1993)。CIR は遺伝毒性に関する試験について特に具体的に示していないが評価過程を通してその考え方の一端を知ることができ、日本の場合の AMES 試験、染色体異常試験とは若干ことなることを示している。

4. 変異原性陽性、発癌性原料の評価

既に変異原性、発癌性が報告されている化粧品原料をどのように評価するかについて、CIR 及び日本の例から考察する。

1) Sodium bromate 及び potassium bromate の CIR の評価

Sodium bromate 及び potassium bromate は酸化剤として用いられている。Sodium bromate は中和剤としてパーマネントウェーブに用いられるが、使用後は直ぐに洗い流されてしまうものである。また、potassium bromate は食品添加物としてパンの改良剤に日本では 30 ppm (食品添加物, 1992), 米国では 50 ppm (21 CFR 15.20) 用いられている。

Potassium bromate は Chinese hamster 肺由来線維芽細胞で染色体異常を誘発し (Ishidate et al., 1984), マウスで小核を誘発する (Hayashi et al., 1982). *Salmonella typhimurium* TA100 で、また、TA102 および TA104 で変異原性陽性である (Ishidate et al., 1984; Kurokawa et al., 1990)。Potassium bromate の発癌性は Fischer ラットに 250, 500 ppm 飲料水で 111 週間摂取させた結果、250 ppm で腎腫瘍が発生した (Kurokawa et al., 1982; 1983)。この発癌性データを基にリスク評価が行われ、発癌性のポテンシャルすなわち生涯の曝露上限量は 0.06 mg/kg/day と報告された (Bromine Compounds, LTD (BCL), January, 1992)。この上限値とパーマネントウェーブ剤の中和剤として使用した場合の毎日の平均摂取量からリスクの上限値が計算された。この時経皮吸収実験 (BCL July, 1992) の結果が参考として用いられた。10% の sodium bromate を皮膚に適用した場合 2% が皮膚に接触し、0.12% が吸収されることから、この経皮吸収量を基に行われたリスク評価は、使用頻度を年 3 回で 10 年間の場合 2.4×10^{-7} , 15 年間の場合 1.2×10^{-8} であった (BCL 1992; CIR March, 1993)。FDA は食品添加物成分の許容されるリスク上限値として 1.0×10^{-6} との政策をとっている (CIR March, 1993)。Sodium bromate をパーマネントウェーブ剤の中和剤として用いた時のリスクはこの値の範囲内であるこ

とを示している。一方、Hayashi et al. (1986) は Kurokawa et al. (1986) のデータを用いて potassium bromate の実際の安全量を計算し、0.95 ppm (3.8×10^{-8} mg/kg/day) と報告している。

局所適用した場合の皮膚塗布発癌実験も行われており、皮膚塗布では発癌性は認められないことが報告されている (Kurokawa et al., 1984)。

CIR は、臭素酸塩は経口摂取で発癌性があっても皮膚塗布試験で発癌性がない、ほとんど経皮吸収されない、適用回数が少ないとよりパーマネントウェーブ製品に sodium bromate として 10.17% を越えない濃度で使用することが出来る結論した (CIR, March 1993)。

2) BHA の日本の評価

Butylated hydroxyanisol, BHA は酸化防止剤として、化粧品、食品添加物に用いられる。しかし、1982 年に伊東等が発癌試験を行い、前胃に癌の誘発を認めた。発癌試験は Fisher ラットに、0.5, 2% 混餌、104 週間投与した結果、2% 群の前胃に偏平上皮癌が誘発した (Ito et al., 1983)。この結果、1982 年 8 月 2 日厚生省告示官報で「バーム油以外の食品に使用しない」1983 年 2 月 1 日より適用 (実際は適用されず) とされた。BHA を含有する化粧品等の取扱いについては 1982 年 5 月 20 日薬安第 81 号厚生省薬務局安全課から都道府県衛生主管部長宛に「BHA を使用せず、品質が確保される製品の研究・開発に早急に着手し、処方変更等を行うよう指導する」との通達がなされた。

一方、食品添加物として国際的には、1983 年の FAO (Food and Agriculture Organization)/WHO (World Health Organization) 食品添加物専門家会議で検討されたが結論は出されなかった。1988 年の FAO/WHO 食品添加物専門家会議はラットの前胃に対する発癌性の疑問の余地はないが前胃以外の消化器に発癌性を示さない。BHA の規制に関して当面その必要がないと結論した。この理由として、① BHA の発癌はラットやハムスターの前胃に限られており、ヒトには前胃に相当する臓器がない、②前胃と同じ重層偏平上皮である食道には腫瘍や過形成が発生しない、

③前胃をもたないイスやサルではラットのような作用がない、④発癌量が 2% と高く、これはヒトの摂取量に換算すると数万倍に達する、⑤ BHA を用いない場合に食品中に発生する過酸化脂質の危険性のほうがより問題である、などの根拠があげられている (伊東, 1989)。

日本では BHA の食品添加物として見直しが 1992 年行われ、同年 8 月 13 日厚告第 208 号において BHA は全面改正され、油脂、バター、魚介乾燥品、同塩蔵品、同冷凍品以外使用してはならないとされ、バターでは butylated hydroxytoluene, BHT と合わせて 200 ppm 以下、魚介冷凍食品では BHT と合わせて 1000 ppm 以下とされた。

食品添加物としてはこのような経緯で使用されているが BHA を含有する化粧品の日本の使用状況を 1992 年の 10 ヶ月間に発売された新製品について見ると国内メーカーで BHA を含有している製品は無く、海外メーカーでは 13 社、99 製品 (口紅 43 品等) に含有されており、1982 年 5 月 20 日薬安第 81 号により、日本の国内メーカーは使用していないことを示している。

5. 化粧品原料の変異原性試験を補完するもの

米国では 2 種類の遺伝毒性試験で陽性の場合は NTP の基準に基づく皮膚発癌試験を必要とする CIR は示唆しているが、日本の場合は in vitro の 2 種の試験のいずれか陽性が疑がわかった場合は in vivo 小核試験を実施することになっている。いわゆる 3 点セットの試験である。

In vivo 小核試験の発癌性の予測性と問題点は若田等 (1993) が述べているが、その中で臓器特異性に関して、肝臓、肺に特異的に癌を起こす物質は検出できない場合が多いこと、国際癌研究機構 (IARC) の発癌物質の発癌標的部位と小核試験での反応性について、特に、造血組織、局所あるいは肝臓について纏めている (Table 1)。局所あるいは肝臓が標的臓器とされたもので造血組織には癌を起こさないものについての小核試験の結果であるが、造血組織が標的臓器である発癌物質は陽性率 80% 以上、投与部位あるいは皮膚の塗布部位などの局所が標的である発癌物質では陽性率が

Table 1. IARC 発癌物質の標的臓器と小核試験での反応性 (化合物数)

| 標的臓器 | | |
|------|-------|-----------|
| 造血組織 | 局所 | 肝臓 |
| 陽性 | 23 | 14 |
| 陰性 | 5 | 13 |
| 陽性率 | 80%以上 | 50%以下 |
| | | 45% |
| | | 若田 (1993) |

50%, 肝では45%に下がっている(若田, 1993). 皮膚が標的の発癌物質の検出には小核試験を補完する試験の必要性を示唆している。我々は皮膚を標的臓器としたDNA損傷試験の検討を行い、マウス表皮を標的臓器とする不定期DNA合成(UDS)試験(森ら, 1993)及びアルカリ溶出法によるDNA一本鎖切断試験(小林ら, 1993)を用いて、皮膚を標的臓器とする発癌物質を検出できることを見いだしている。

培養細胞を用いる試験は感受性が高いが、生体内的事象を反映しているわけではない。陽性物質は *in vivo* 小核試験を実施するわけであるが小核試験の限界について、石館(1993)は陰性に終わった場合、骨髄に到達していない場合も考えられるので、さらに別の臓器組織を標的とする *in vivo* 法(例えば肝のUDS)を追加し、また、特に、*in*

vitro の染色体異常試験でかなり高い値(例えば染色体異常を20%誘発する濃度が0.1 mg/ml以下)が得られた場合には、たとえ、小核試験が陰性であっても、安全性が保証されたわけではないので、他の試験を追加する必要があると述べている。この他に、経皮吸収データ等考慮に入れ判断すべきと考えられる。

いずれにしても3点セットを補完する試験はまだ研究、議論が必要であり、urocanic acidの例に見られる様に化粧品原料においても様々な試験を考慮に入れる必要があると考えられる。

6. 変異原性試験の有用性

1) 変異原性のない原料の選択

化粧品原料は油性原料、粘液質、粉末(原料)、保湿剤、界面活性剤、紫外線吸収剤、薬剤、色剤、香料、金属イオン封鎖剤、酸化防止剤、抗菌剤等に大別されるが、変異原性で問題となる例は色剤等である。なんらかの原因で不純物が混入されるケースがある。色素そのものには変異原性はないが出発原料に含まれる不純物等が原因で製造された色素に変異原性が認められる場合がある。Ames試験を用いることにより、ロットの選択、製法の改良、精製の工程等の検討がなされ、変異原性のない原料を選択することができ、変異原性

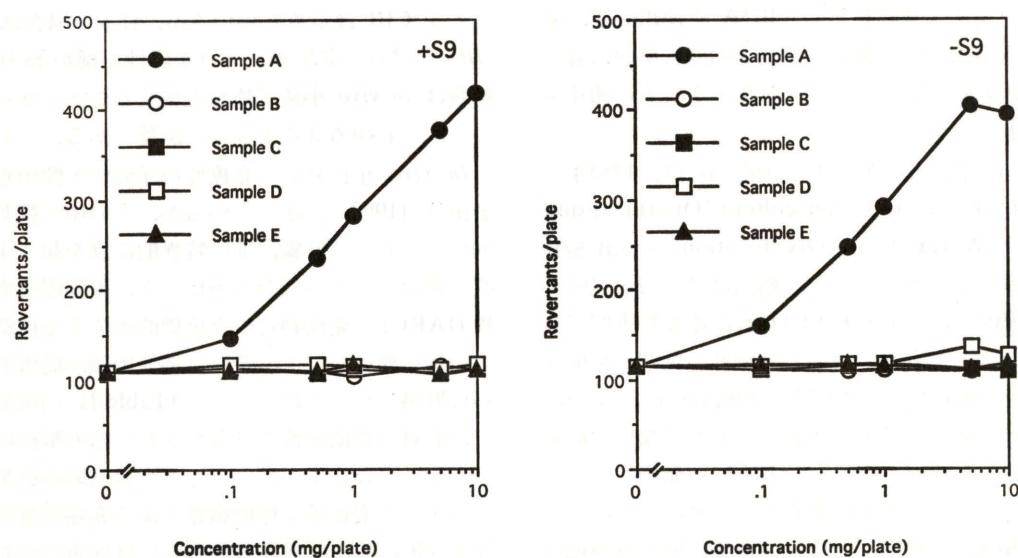


Fig. 1. Carbon-Blacks の試料の違いによる突然変異誘発性 (*Salmonella typhimurium* TA 100).

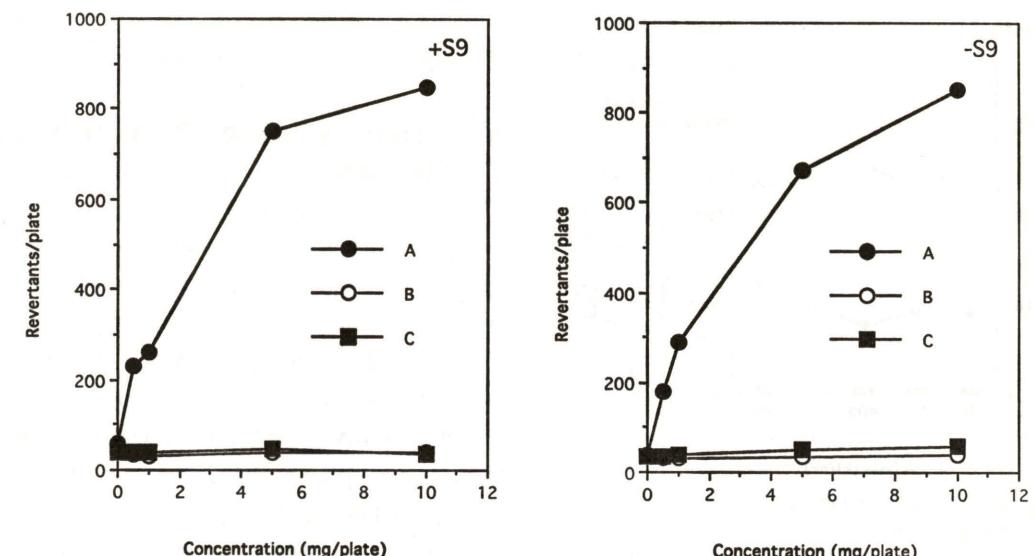


Fig. 2. Lithol Red Na の製法の違いによる突然変異誘発性 (*Salmonella typhimurium* TA 98).

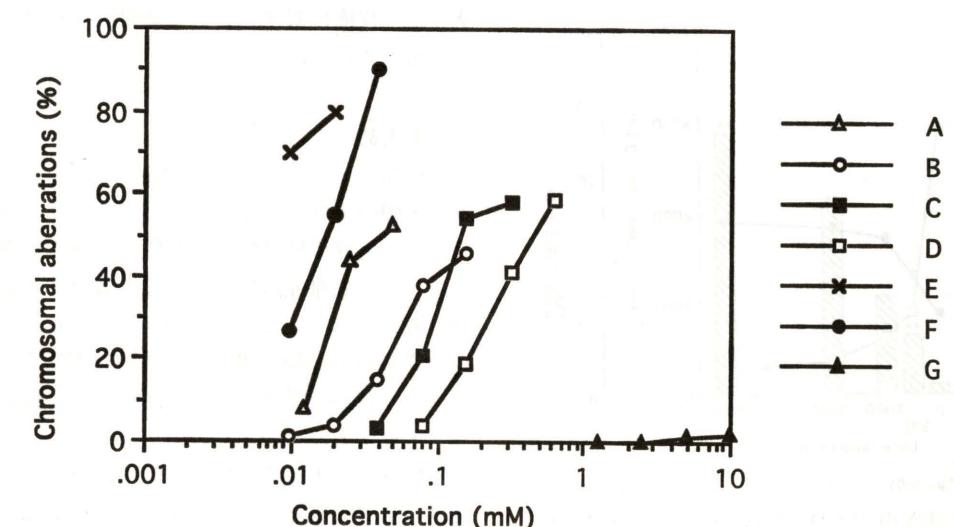


Fig. 3. 開発候補品の染色体異常誘発性 (Chinese hamster lung fibroblast cells, 48 時間処理).

試験は原料の品質保証に重要な役割を果たしている。Fig. 1 は carbon-blacks の 5 種類のものうち 1 種類のサンプル A のみに変異原性が認められた一例を示した。Fig. 2 は同じ出発原料から 3 種類の製造工程で合成された色素、lithol red Na である。A 工程では変異原物質が生成されることを示した。また、精製することにより、変異原物質が除かれた色の例もあった。(杉山, 1979)。

2) 開発でのスクリーニング

原料開発過程においては必ず変異原性試験のスクリーニングが行われる。一つの例を示すと、Ames 試験に掛けられた開発候補物質は 18 品あり、その結果は全て陰性であった。更に、*in vitro* 哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験が実施され、3 品が陰性であった他は 15 品が陽性であった。このうちの 7 品の結果を Fig. 3 に示した。サンプル G を除き、0.01 mM から 1 mM でい

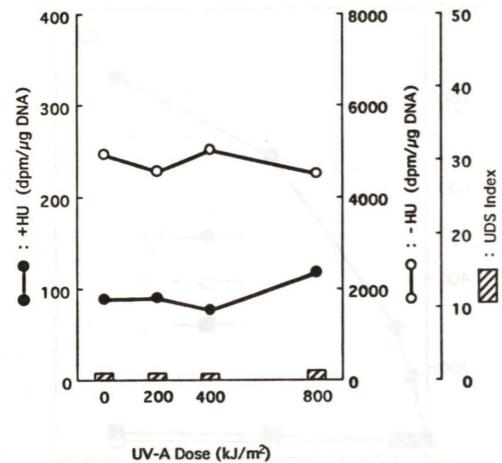


Fig. 4. UV-A の UDS 誘発性 (ヘアレスマウス表皮照射後 1 時間)。

+HU: Hydroxy urea 添加, -HU: Hydroxy urea 無添加, UDS Index: (+HU)/(-Hu) × 100.

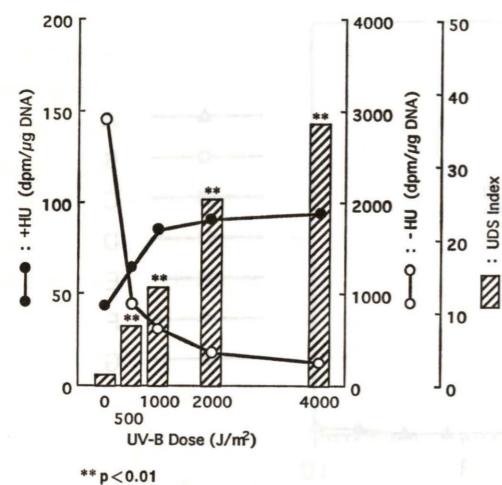


Fig. 5. UV-B の UDS 誘発性 (ヘアレスマウス表皮照射後 1 時間)。
略称は Fig. 4 参照。

ずれも 40% を越える染色体異常が誘発された。ところがサンプル G は 10 mM においても染色体異常は誘発されず変異原性がないことを示した。染色体異常を誘発したもののうち、5 品について小核試験が実施され、2 品が陰性、3 品が陽性と判定された。最終的に開発されたものはサンプル G であった。原料開発過程において変異原性の評価は重要な位置を占めることになる。評価する物質の化学構造組成によるとところが大きい。

が、陽性を示すものは Ames 試験よりも、染色体異常試験の方が多いことを経験している。

3) 紫外線の皮膚への影響: 不定期 DNA 合成 (UDS) 研究

紫外線から皮膚を防御することは近年オゾン層の破壊による紫外線の増加と相まって高い関心が寄せられている。地上に到達する紫外線のうち近紫外線の UV-B (280–320 nm) は皮膚では表皮まで到達し、遠紫外線である UV-A (320–400 nm) は真皮まで到達する。マウス表皮を標的臓器として紫外線 UV-A 及び UV-B の DNA 損傷性を UDS 試験を用いて検討している。UV-A を照射した場合 UDS を誘発しないことを見いだした。一方、UV-B は UDS を誘発することを確認した (未発表 Figs. 4–5)，近及び遠紫外線の皮膚に対する作用を、UDS を指標として検討しているが、紫外線の皮膚に対する影響の基礎的データとなると考えている。

7. まとめ

化粧品における変異原性試験の役割について日本、米国の実状を踏まえながら考察した。日本、米国とも変異原性試験は癌原性の予測の位置づけにあり、変異原性試験は発癌性に替わる安全性試験と考えられている。評価の進め方として

1. 2種の *in vitro* 遺伝毒性試験を実施する。
2. いずれかで陽性の場合は *in vivo* 小核試験を実施する。

小核試験を実施する場合は吸収、分布、代謝、排泄の結果を参考にし、骨髄細胞への到達性を考慮する。また、その他の遺伝毒性試験 (例えば、局所適用、皮膚をターゲットした UDS 等) が必要な場合がある。

3. いずれも陽性では小核試験及び他の遺伝毒性試験に加えて発癌性試験を考慮する。米国では哺乳類を含む 2種類の遺伝毒性試験で陽性の場合は発癌性試験の必要の可能性が示唆されている。

経口摂取して発癌性を示す物質の局所の安全性に対する取り扱い (CIR の考え方) では洗い流す製品等、適用回数が少ない、局所塗布して皮膚で

の発癌性がなく、また、経皮吸収量から安全率を考慮することによって使用の可能性があることが示唆される。

変異原性試験はスクリーニング試験の他に、化粧品原料中の変異原性のある不純物の検出を行い、変異原性、発癌性のない化粧品原料の選定に有用である。

参考文献

- Baden, H. P. and M. A. Pathak (1967) The metabolism and function of urocanic acid, *J. Invest Dermatol.*, **48**, 11–17.
 Bromine compounds, Ltd. (BCL) (January, 1992) Assesment of the safety of sodium bromate for use in hair care products, Unpublished report.
 BCL (July, 1992) Determination of Br and BrO_3^- (bromate) in ginea pig serum following *in vivo* exposure to commercial hair neutralizer. Unpublished report.
 Code of federal regulations (CFR) (1984). Title 21 Part 15. 20. Washinton D.C.
 CIR (1992) Cosmetic Ingredient Review 1992 Annual Report.
 CIR (1993) Cosmetic Ingredient Review 1993 Annual Report.
 CIR (March 18, 1993) Final report of the safety assesment for sodium bromate and potassium bromate prepared by the Expert Panel of the Cosmetic Ingredient Review, (CIR 47/84).
 Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate, Jr. (1982) High sensitivity in micronucleus induction on amouse strain (MS), *Mutat. Res.*, **105**, 253–256.
 Hayashi, Y., Y. Kurokawa, A. Maekawa and M. Takahashi (1986) Strategy of long-term animal testing for quantitative evaluation of chemicals carcinogenicity, *Dev. Toxicol. Environ. Sci.*, **12**, 383–391.
 Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, K. Yoshikawa, M. Hayashi, T. Nomi, M. Sawada and A. Matsuka (1984) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, *Food Chem. Toxicol.*, **22**, 623–636.
 Ito, N., S. Fukushima, A. Hagihara, M. Shibata and T. Ogiso (1983) Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F 344 rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 343–352.
 伊東信行, 広瀬雅雄, 増田あつ子, 長谷川良兵 (1989) 酸化防止剤の発癌性, 代謝, **26** (臨時増刊号「癌」, '89), 13–19.
 Rose Sheet 14 (22) p. 6 (1993).
 Rose Sheet 14 (48) p. 8 (1993).
 Reeve, V. E., G. E. Greenoak, P. J. Canfield, C. Boehm-Wilcox and C. H. Gallagher (1989) Topical urocanic acid enhances UV-induced tumour yield and malignancy in the hairless mouse, *Photochem Photobiol.*, **49**, 459–464.
 Kurokawa, Y., Y. Hayashi, A. Maekawa, M. Takahashi and T. Kokubo (1982) Induction of renal cell tumors in F 344 rats by oral administration of Potassium Bromate, a food additive, *Gann*, **73**, 335–338.
 Kurokawa, Y., Y. Hayashi, A. Maekawa, M. Takahashi, T. Kokubo and S. Odashima (1983) Carcinogenicity of Potassium Bromate administered orally to F 344 rats, *JNCI*, **71**, 965–972.
 Kurokawa, Y., A. Maekawa, M. Takahashi and Y. Hayashi (1984) Studies on the promoting and complete carcinogenic activities of some oxidizing chemicals in skin carcinogenesis, *Cancer Lett.*, **24**, 299–304.
 Kurokawa, Y., S. Aoki, Y. Matsushima, T. Imazawa and Y. Hayashi (1986) Dose-response studies on the carcinogenicity of potassium bromate in F-344 rats after longterm oral administration, *JNCI*, **77**, 977–982.
 Kurokawa, Y., H. Takamori, Y. Matsushima, T. Imazawa and Y. Hayashi (1990) Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate a new renal carcinogen, *Environ. health perspectives*, **87**, 309–335.
 小林 浩, 森 真輝, 杉山千代美 (1933) ヘアレスマウス表皮を用いた皮膚発癌物質の DNA 一本鎖切断作用の検討, 日本環境変異原学会第 22 回大会プログラム・要旨集, pp. 111.
 杉山千代美, 中嶋啓介 (1979) 化粧品原料の変異原性について, フレグランス ジャーナル, No. 37, 39–43.
 森 真輝, 小林 浩, 杉山千代美, 降旗千恵 (1933) 皮膚発癌物質のヘアレスマウス表皮における不定期 DNA 合成誘発の検討, 日本環境変異原学会第 22 回大会プログラム・要旨集, pp. 110.
 若田昭裕, 大内田昭信, 鈴木 洋 (1993) シンポジウム「変異原性で何がわかるか: 問題点と展望」マウス小核試験の問題点, 環境変異原研究, **15**, 97–101.
 工業会資料 (1987) 日本化粧品工業会技術資料, No. 82, pp. 60–68.
 工業会資料 (1991) 日本化粧品工業会技術資料, No. 92, pp. 5–12.
 食品添加物 (1992) 食品添加物公定書解説 第6版, 廣川書店, D-521–525.

第 22 回大会トピックス
 「変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点:
 メルボルン国際ワークショップの報告を中心に」

微生物突然変異試験 Bacterial mutation assays

能美健彦¹⁾, 太田敏博²⁾
 Nohmi, T.¹⁾ and T. Ohta²⁾

¹⁾国立衛生試験所, 変異遺伝部, 158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1, ²⁾(財)残留農薬研究所,
 毒性部 187 東京都小平市鈴木町 2-772

¹⁾Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan, ²⁾Toxicology Division, Institute of
 Environmental Toxicology, Suzuki-cho 2-772, Kodaira, Tokyo 187, Japan

(受付: 1994 年 2 月 3 日; 受理: 1994 年 2 月 3 日)

Summary

The differences among several regulatory guidelines for bacterial mutation assay in Europe, U.S.A. and Japan were discussed at the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures held in Melbourne on February, 1993. A consensus was obtained on many aspects of an acceptable minimum standard test protocol. However, the working group could not reach total agreement on the optimal tester strain battery, criteria for a positive results, and the need for repetitional assay on negative results.

Keywords: Bacterial mutation assay, Ames test, guideline, standardisation

1. はじめに

1993年 2 月にオーストラリアのメルボルンで開催された第 6 回国際環境変異原会議のサテライトワークショップとして、2 月 27, 28 日の両日にわたり、変異原性試験法の国際的標準化のための会議が行われた。微生物突然変異試験のグループでは、David Gatehouse (Glaxo/UK) が議長を務め、松島泰次郎 (日本バイオアッセイ研究センター), Celine Melcion (Rhone Poulen Rorer/ France), Elmar Gocke (Hoffmann La Roche/ Switzerland), Errol Zeiger (NIEHS/USA), Thomas Cebula (FDA/USA), Larry Kier (Monsanto/USA), Steve Haworth (Hazleton/USA), Stanley Venitt (ICR/UK), および筆者らの 11 名の指定討論者を中心にして論議が進められた。会

議は公開で行われ、一般討論者として日本からも 10名近くの研究者が参加した。比較検討したテストガイドラインは、日本(厚生省, 労働省, 農林水産省), 米国(EPA), イギリス(Dept. of Health), カナダ(Dept. of National Health and Welfare), 欧州経済共同体(EEC), および経済協力開発機構(OECD)で施行されているものを対象とした。これらのガイドライン間の異なる部分を抽出したうえで、試験成績が相互に受け入れられるためには最小限何をどのように行うべきかを議論し合意を得ることを目的とした。したがって、理論的な可能性の議論ではなく、実際の実験例のデータに基づいた主張のみを議論の対象とした。

2. プレート法がプレインキュベーション法か？

今回の会議では標準的な手法であるプレート法やプレインキュベーション法で検出され難い変異原物質（例えば、ガスや揮発性の高い物質）は特別なケースと考え、この様な物質の試験手法については議論の対象から外した。2つの手法で数多くの変異原物質について詳細に比較した論文は見あたらないため、参加者のスクリーニング経験を基に検討した。プレインキュベーション法でのみ変異原性が検出される例はニトロソアミン類、二価金属塩、アルデヒド類、アゾ化合物など、いくつかの論文があり、各参加者も同様な経験を持つことが報告された。逆に、プレート法でのみ検出される例も示されたが、いずれも溶媒対照値の2倍前後の増加を示す非常に弱い物質であり、プレート法を推奨する程の根拠とはならなかった。

一般的にプレインキュベーション法の方が検出感度が高い（特に代謝活性化の場合）というのが大多数の意見であった。一方で、定性的には片方の方法でしか検出されない変異原物質の例は極めて少ないと意見もあり（例えば、ニトロソアミン類はプレインキュベーション法でのみ検出されると言われているが、プレート法でもS9分画の量を増やせば変異原性は検出できる）、また、プレインキュベーション法では菌株に対する毒性が強く出るために変異原性を見落としやすい例（p-ニトロアニソール、塩化ニトロベンゼン類）も示された。

したがって、プレインキュベーション法に統一するにはデータベースが充分でないということで、現時点ではいずれの方法でも良いということに落ち着いた。なお、プレインキュベーションの条件は37°Cで20~60分が推奨された。

3. 菌株の組合せ

変異原性のスクリーニングにおいてどの菌株の組合せを用いるかの議論では、菌株に特異的な変異原物質がどのくらい存在するかを知ることが前提となる。一つの菌株にのみ変異原性を示す割合を文献と参加者の未発表データベースを基に調査した結果、現行のいずれのガイドラインでも指定されているサルモネラ菌のTA100, TA98, TA1535, TA1537株を用いることに異論は出なかっ

た。ただ、TA1537株の有用性についてはプラスミドpKM101を持つTA97株およびTA97a株との比較で検討された。TA1537株はhisC遺伝子に変異をもち、TA97株とTA97a株はhisD遺伝子に変異をもつがTA97a株の方がTA97株に比べuvrB遺伝子近傍の欠失が小さい。いずれの菌株も-1Gのフレームシフト変異の検出に適しているが、この種のフレームシフト変異を誘発する数多くの変異原物質について3株を系統だって比較した報告はない。したがって、現時点では3株は同等に扱いどれを用いても良いことで合意した。また、TA1538株に特異的な変異原物質も5例が示されたが、いずれも極めて弱い活性であることから標準菌株の最少単位に加える必要はないとの判断された。

討論の大半はサルモネラ菌TA102株の取扱いと、日本のガイドラインに特有の大腸菌WP2uvrA株を含めるべきかについてであった。イギリスのガイドラインではTA102株の代わりに大腸菌を用いる場合は、WP2uvrA/pKM101株とWP2/pKM101株のプラスミドを導入した2株を要求しているため、話はさらに複雑になった。労働省のデータベースをはじめとして、各参加者から大腸菌WP2uvrA株、あるいはWP2uvrA/pKM101株に特異的に変異原性を示す例が数多く示され、この中にはヒドラジン類などの重要な発癌物質が含まれていることからも大腸菌株の有用性が認識された。一方、TA102株は活性酸素を生成する変異原物質やDNAに架橋を形成する変異原物質（マイトイシンCなど）の検出に有効であるが、プラスミドpAQ1のコピー数の増減で自然復帰変異コロニー数がかなり変動するなどの欠点も指摘された。TA102株は除去修復機能が野生型であるが、TA102株もWP2uvrA株も共にオーカー変異部位(TAA)での復帰変異を指標とした菌株である。そこで、変異原に対する特異性の観点から大腸菌株とTA102株との同等性に論議が集中した。TA102株でのデータベースが大腸菌株ほど多くないこともあり、全員の合意を得る結論には至らなかったものの、A·T塩基対を突然変異の標的とした菌株を標準菌株に加えることの重要性は認識され、次の3通りの中からいづ

れかを選択することで大多数の同意が得られた。

- ① TA102株
- ② WP2/pKM101株とWP2uvrA/pKM101株の2菌株
- ③ WP2/pKM101株とWP2uvrA株の2菌株

少数意見としては、TA102株で検出されるアルデヒド類、過酸化物の中にはTA100株でも検出されるものがかなりあり、したがって、これらの菌株は最少単位に入れずにオプションとして残す方がよいとの主張があった。また、架橋形成型変異原は染色体異常試験で容易に検出されることから、微生物変異原性試験と染色体異常試験とがセットで実施されるのであれば、除去修復機能が野生型のWP2/pKM101株は将来省くことが出来るとの意見も出た。

4. 析出が生じる用量でも試験すべきか？

最高用量については、菌株に対する毒性以外にもトップアガード中の析出を考慮すべきとの意見が欧米から出され議論が白熱した。つまり、析出した用量での試験結果に意味があるか否かということであるが、彼らは試験物質が析出する用量以上では溶解している部分は飽和に達しているはずで試験することに意味がないと主張した。一方、日本側からは労働省のデータベースを基に、実際に変異原性が検出された248化合物のうち13%にあたる32化合物が析出の生じる用量でのみ陽性になることが示され、この中には用量依存性が認められる事例もあることから、析出の有無にかかわらず試験すべきとの主張がなされた。これに對しては、析出用量の一番低い用量まで試験すれば検出は可能で、それ以上の用量はなくても変異原性を見落とさないのではないか、また、微生物には哺乳動物培養細胞のように食作用で析出物を取り込むことがないので、析出用量での陽性結果の科学的意味がはっきりしない、さらには、その様な変異原物質の中に重要な発癌物質が含まれているかどうかが不明である（言い換えると、発癌性との相関で見た場合、False Positiveではないかとの意見）などの反論がなされた。しかし、代謝活性化の場合には代謝物の濃度は必ずしも飽和であるとは限らず、溶媒の種類や量を変えて析出

の生じない最高条件を見つけるための予備試験はあまり実際的とは思えない。また、析出を指標にすれば難溶性の物質は極めて低い用量で試験することになるが、不溶性の物質を懸濁状態で高用量まで実施する意義が不純物の評価にある（後述）というのであれば、難溶性物質の不純物についてはどうなのかという矛盾を感じる。

両者の意見の隔たりは大きく、結局、会議中に全員の納得のいく合意はなされなかった。この問題は他のin vitroの試験系とも併せて、その後Faxを通しての議論が続き以下の妥協案になった。

①菌株に対する毒性がなく、かつ、トップアガード中で析出もしない物質については5mg/プレート（液体の場合は5μl/プレート）を最高用量とする。

②菌株に対する毒性はないが、トップアガード中で析出するような物質については、析出の生じる最も低い用量を最高用量とする。

③菌株に対する毒性もなく、どの溶媒にも不溶な物質については試験の実施意義に疑問もあるが、不純物の変異原性評価を考え合わせ、懸濁状態で5mg/プレートを上限とする。

④菌株に対する毒性が認められる物質については析出の有無にかかわらず、毒性を指標として最高用量を決める。

以上のこととは本試験での最高用量に関するもので、用量設定のための予備試験では菌株に対する毒性を調べる必要があるため析出が生じても5mg/プレートまで行うことになる。したがって、予備試験を全菌株で行っていれば析出用量での変異原性も見落とす心配はない。なお、試験は少なくとも5用量で、公比は2~3.2(=√10)で行うことで合意した。

5. 各用量のプレート数は2枚か3枚か？

日本以外の参加者の意見は3枚のプレートを用いることを要求した。これは、一つには濃度設定試験のやり方の違いにも起因している。日本では全菌株を用いて各用量2枚のプレートで実施するが、欧米では通常1菌株、ないしは2菌株を用いて行い、本試験で各用量3枚のプレートで全菌株

について実施している。また、結果の判定に統計検定を採用するかどうかにも起因している。完全な合意は得られなかつたが、3枚のプレートを支持する参加者も、各用量2枚のプレートでも試験が2回行われていれば受け入れることになった。しかし、実際には後述のように試験は基本的に繰り返す必要があるので、各用量3枚のプレートで2回の試験は、2枚のプレートを用いる日本のやり方では4回の試験に相当する。合意とはいっても、欧米の要求を取り入れた結果になった。

6. 対照物質

陰性対照は溶媒対照のみでよいが、菌株に対する毒性が不明な特殊な溶媒を用いる場合には無処理対照を置くことを勧める。陽性対照は、化合物の種類や濃度まで指定する必要はないということで合意が得られた。

7. 陰性結果の確認試験は条件を変えるべきか？

試験結果の判定が明瞭に下せない場合には再試験をするのは当然であるが、その場合に、最初の試験と同一条件で実施するべきか、方法や条件を変えて実施すべきかで討議が行われた。結局、再試験のデザインは融通性を持たせるべきで、次のいずれかで行なえばよいことで決着した。

- ①用量の公比の取り方以外は全く同一条件で行なう。
- ②S9分画の量を変えて試験する。
- ③方法自体（プレート法とプレインキュベーション法）を変えて実施する。

最初の試験で陰性の結果が得られた場合の確認試験としては①ではほとんど意味がなく、②か③の条件で行なるべきとの意見が多かった。一方、陰性の場合には、再試験の必要性を感じないとの少數意見も出された。

最初の試験で陽性結果が得られた時の再試験は大方の意見が、必ずしも要求しないということであったが、陽性の判定基準が再現性を前提としているので、少なくとも陽性になつた菌株での再試験は行なるべきであろう。ただ、変異原性の検出を目的とした試験なので、陽性に出た菌株以外の菌株でも再試験が必要かどうかは議論の残るところ

であるが、そこまで議論は進まなかつた。

8. 結果の評価方法

時間切れで、充分な議論は出来なかつた。陽性の判定基準として統計検定はよく用いられる方法ではあるが、これを必須にはすべきでないとの意見が多かつた。また一方で、自然復帰変異コロニー数が大きく異なる種々の菌株に、一律に2倍法を適用することにも疑問が投げかけられた。特定の方法は提示されなかつたが、少なくとも、用量依存性があり、かつ、再現性のある増加を陽性と判定することに反対意見はなかつた。

9. おわりに

今回の会議では検討項目が多く、2日間では充分とはいえないかった（3日間行なえば合意が得られるといった性質のものでもない）。微生物突然変異試験ひとつを取つてみても、討議した全ての事項について、全員の合意が得られた訳ではないが、各国のガイドラインの相違がどの様な背景を基にして出て来たのかを、お互いに改めて認識することができた。例えば、プレートの枚数を3枚とする主張の裏には、雑菌のコンタミにより一枚のデータが得られなかつた場合の試験の有効性を考慮している部分が本音としてあること、試験の繰り返しの必要性には試験を担当する人に対する信頼度の差が、また、析出用量での陽性結果の意義については、*in vitro* 変異原性試験で陽性結果が得られた場合の追加試験の要求度合の違いがからんでいるように思われる。とは言え、今まで自分達の方法の妥当性を主張して平行線であったものが、かなりの部分でお互いに理解したうえで合意できた意義は大きい。今回の合意内容がすぐに国内の現行のプロトコールの変更を求めるものではないが、OECDのガイドライン改訂を含め、今後改訂されるであろう国内外のガイドラインにも反映されることは間違いない。メルボルンでの会議は試験法の標準化に向けての第一歩であり、今後蓄積されていくデータベースと変異原研究の進歩と共に試験法は常に見直されていくべきと考える。なお、今回のワークショップ全体の詳細な報告はMutation Research誌に掲載される予定である。

Environ. Mut. Res. Commun., 16: 141-150 (1994)

特別企画

第22回大会トピックス

「変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点：

メルボルン国際ワークショップの報告書を心に」

In vitro 染色体異常試験の国際的標準化の現状と問題点

Current status and problems of international standardisation
on the procedure of *in vitro* chromosomal
aberration test

森田 健¹, 近藤 耕治²

Morita, T.¹ and K. Kondo²

¹日本グラクソ(株)筑波研究所 〒300-42 茨城県つくば市和台 43 ²塩野義製薬(株)新薬研究所
〒561 大阪府豊中市二葉町 3-1-1

Tsukuba Research Laboratories, Nippon Glaxo Ltd., 43 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-42,
Japan, ²Developmental Research Laboratories, Shionogi & Co., 3-1-1
Futaba, Toyonaka-shi, Osaka 561, Japan

(受付：1994年1月30日；受理：1994年1月30日)

Summary

International standardisation of *in vitro* chromosomal aberration test procedures was discussed in the international workshop in Melbourne. The upper limit of testing should be 10 mM or 5 mg/ml, whichever is lower. Cytotoxicity at the top dose should be greater than 50% of concurrent negative control, if this can be achieved without exceeding a concentration limit of 10 mM or 5 mg/ml. It was not possible to reach a consensus on the issue of solubility limits. However, it was acceptable to include one top dose level with evident precipitate as a pragmatic way of demonstrating that the solubility limit in the cultures had been achieved. Treatment length both with and without S9 should be for 3 to 6 hours, followed by sampling at a time equivalent to about 1.5 normal cell cycle (NCC) lengths from the beginning of treatment. If this protocol gives negative results both with and without S9, an additional test without S9 should be done, with continuous treatment for 1.5 NCC lengths. Many items were discussed in addition to the above issues, and those were reached consensus.

Keywords: *in vitro* chromosomal aberration test; standardisation; international workshop; Melbourne

緒言

遺伝毒性試験法の国際的標準化を目指し、1993年2月27～28日にメルボルンで国際ワークショップが開催された。そこで取り上げられた5つの試験法の1つに*in vitro* 染色体異常試験がある。この試験についても、各国あるいは各地域で異なるガイドラインが作成・適用されており、試験方

法および結果の評価に関する考え方はそれぞれ違ったものになっている(Table 1)。そのため、同一化合物であっても異なる評価がもたらされる可能性があり、それを排除し、安全性評価の統一的な基盤を形成する必要があった。また、医薬品等の開発に際しては、ガイドラインが異なるため申請国毎による試験の繰り返しが行われるな

Table 1. International Requirements for *in vitro* tests for Chromosome Aberrations (by Galloway)

| AGENCY | CHEMICAL | DOSE SELECTION | TREATMENT LENGTH | SAMPLING TIMES | S9 CONDITIONS |
|----------------------|---|--|---|--|---|
| AGENCY | CATEGORY | MAX CONC | TOXICITY | -S9 | +S9 |
| JAPAN DRUGS | 10mM soluble 5 mg/ml insoluble | GROWTH INHIBITION: top dose >= 50% decrease May use MI/cell counts | through 1 cycle AND equal to S9 treatment length | 1 - 3 hr susp. 3 - 6 hr plate | 24 & 48 hr -S9: rat liver: ~5% |
| UK | 10mM soluble | top dose: 75% decrease MI | Continuous OR short: "a few hrs". | 3 - 6 hrs | "Usually rat liver, Arochlor". |
| | | mid dose: some MI decrease | Cell line: exponential growth. HL: 48 hr > PHA | 1.5 cell cycles from beginning of treatment | * IF NEGATIVE, repeat with extra harvest ~24 hrs later |
| | | low dose: borderline toxicity | | | |
| | | OR may use cell counts/CFE: 50 - 75% decrease but must also show MI decrease | | | |
| OECD (Proposed 1992) | 10 mM soluble. Insoluble may be necessary | ditto | ditto | ditto | induced rodent liver |
| EEC (Update 1992) | 5 mg/ml soluble | 50 % decrease in MI OR "other indication" | short exposure not acceptable unless sufficiently cytotoxic | >= 2 hrs | 1 to 1.5 cell cycles from beginning of treatment |
| USEPA CHEMICALS | Case by case soluble | evidence of toxicity or MI decrease | NS | NS | * "unless clear positive, repeat with harvest at same time + later time (24 hr)" |
| | | | | | Multiple, however "for screening I may be OK" with supporting data |
| | | | | | HL: multiple harvest OR multiple treatments & 1 harvest |

MI Mitotic Index NS Not Stated HL Human Lymphocytes CH Chinese hamster cell lines ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1985

Table 1 (cont.). International Requirements for *in vitro* tests for Chromosome Aberrations (by Galloway)

| AGENCY | CHEMICAL | CONTROLS | DUPLICATE ASSAY REQUIRED | CELLS SCORED | CRITERIA FOR POSITIVE | SCORING CRITERIA | OTHER |
|----------------------|----------------------------------|------------------|----------------------------------|---|---|--|-------------------------------------|
| AGENCY | CATEGORY | | if no dose relation or equivocal | 2 X 100 | NS | significant increase & evidence for dose relation. | include gaps record polyploids |
| JAPAN DRUGS | solvent | positive | | | | | |
| UK | Solvent | ALWAYS | 2 X 100 | >= 3 | 1 significant dose. | ISCN | NOTE A: |
| | | negative | | (Repeat with 2nd harvest time: score account when borderline only top dose) | Take gaps, exchanges into | HL > 44 | Positive control: moderate increase |
| | positive (see NOTE A) | | | | account when borderline only top dose) | CH >= 20 cycles | record polyploids if >= 2 cycles |
| OECD (Proposed 1992) | negative and/or solvent positive | ALWAYS | ditto | >= 3 | reproducible increase 1 point. "both biological and statistical significance considered" | ditto | record polyploids if >= 2 cycles |
| EEC (Update 1992) | solvent | Yes | ditto | NS | NS | HL 46 only | Now = UKEMS. |
| USEPA CHEMICALS | solvent and/or negative | when appropriate | NS | NS | Stat significant, dose related OR reproducible | HL 46 | Cell lines modal +/- 2 |
| | positive | | | | | | |

MI Mitotic index NS Not Stated HL Human Lymphocytes CH Chinese hamster cell lines ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1985

Table 2. Members of working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations

| | | |
|--------------|--|---|
| Chair-person | Galloway, S. M. | Merck (USA) |
| Rapporteur | Aardema, M. J. | Procter & Gamble (USA) |
| Panellists | Ishidate, M. Jr. Ivett, J. L. Kirkland, D. J. Morita, T. Mosesso, P. Sofuni, T. | Olympus (JAPAN) GD Searle & Co. (USA) Hazelton (UK) Nippon Glaxo (JAPAN) University of Tuscia (ITALY) NIHS (JAPAN) |

Table 3. Issues discussed on *in vitro* chromosomal aberration test in the Melbourne Workshop

- 1) Negative and positive controls
- 2) Solubility of test substance
- 3) Cytotoxicity measurement
- 4) Dose to be scored
- 5) Maximum exposure concentrations
- 6) Treatment length and culture harvest time
- 7) Metabolic activation
- 8) Cells to be observed
- 9) Nos. of plates and cells observed
- 10) Scoring of aberrations
- 11) Polyploidy (Numerical aberration)
- 12) Test repetition
- 13) Criterion for a positive response
- 14) Evaluation of results

ど、優れた医薬品の速やかな提供が行えず、標準化されたガイドラインの必要性が生じてきた。*In vitro* 染色体異常試験ワーキンググループは、Dr. Galloway を chair-person として 8 名から構成された (Table 2)。グループ会議には約 50 名が参加し、試験プロトコールについて活発な議論がすべてデータを基に行われた。会議の前提として、例えヒトリンパ球、CHO 細胞あるいは CHL 細胞の中で、どの細胞種を用いるのが良いかの議論は避けた。議論された項目を Table 3 に示す。これらの大半は合意に至ったが、若干の未解決事項を残した。

なお、議論の基となったデータには未発表のものや内部資料があるため、それらをここで全て提示するには問題がある。従って、ここでの報告は合意事項が中心となっており、個々のデータが少ないのは御容赦願いたい。

議論の内容

1) 隆性対照および陽性対照

陰性対照は溶媒対照のみで充分である。ただし、背景データのない溶媒については無処理対照も必要で、その溶媒が試験系や染色体異常頻度のバックグラウンドレベルに悪影響を与えないことを証明しなければならない。陽性対照は、物質および使用濃度とも規定せず、試験系が背景データからみて適切に反応していることが示されればよい。

2) 被験物質の溶解性

被験物質の析出の確認は DMSO あるいは水といった溶媒中で行うのではなく、血清あるいは S9 を含む実際に用いる培養液において、処理開始時と終了時に肉眼あるいは顕微鏡下で行う。

3) 細胞毒性

細胞毒性の指標としては、生存細胞数や細胞飽和度（モノセレーターなどによる）に基づく細胞増殖性が推奨された。分裂指数は細胞毒性あるいは細胞停止作用の間接的な測定で、処理後の時間に影響されるためヒトリンパ球などの血球培養系を除き適切な方法ではない。すなわち、回復時間を設けた場合など、リバウンド効果によりコントロール以上の分裂指数となる可能性があること、また分裂指数の 50~75% の抑制は、生存細胞数やコロニー形成法による測定と比べ過剰な毒性となる場合があるためである (Armstrong *et al.*, 1992; 森田, 矢嶋, 1993)。またコロニー形成法は、染色体異常試験における適切な毒性の上限がコロニーの減少ではとらえにくいため、積極的には推奨できない。しかし、染色体異常試験と同じ細胞

Results on 25 NTP chemicals tested with CHL cells

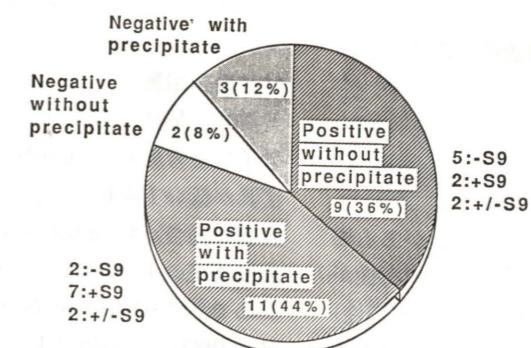


Fig. 1. Effects of precipitate based on the results on 25 NTP chemicals tested with CHL cells (Sofuni *et al.*, 1990).

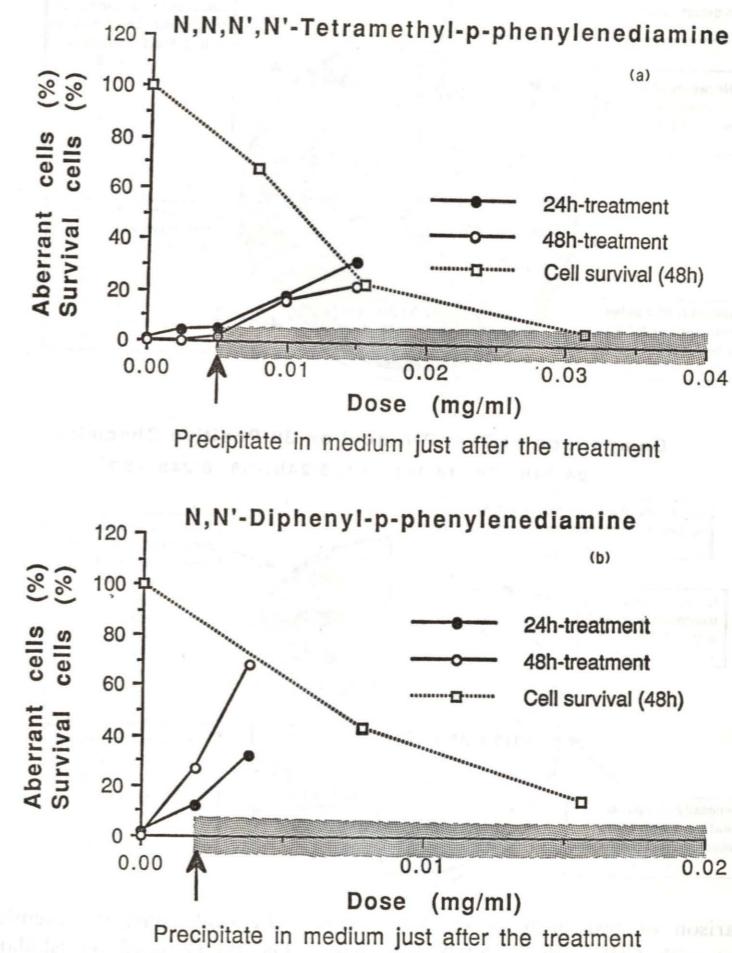


Fig. 2. Chromosomal aberration and cytotoxicity induced by *N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine* (a) and *N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine* (b) with CHL cells (Sofuni *et al.*, 1990).

密度で処理するプロトコールを用いればコロニー形成法も有用である。

細胞毒性は実験毎に変わるものがあるため、その測定は細胞毒性試験においてだけでなく、本試験においても行う。

4) 用量段階

少なくとも 3 用量を用いる。細胞毒性がある場合には、50% を超える毒性を示す用量（毒性が 50% に達しない場合には、達成できる最大毒性）からわずかな毒性または毒性を示さない用量をカ

バーする。従って、適切な毒性範囲を実現するためには、狭い濃度間隔を用いる場合が出てくる。

5) 最高用量

最高用量は、毒性のない物質については、その分子量を考慮して 10 mM あるいは 5 mg/ml のいずれか低い方を用いる。分子量が不明のものや混合物の場合、5 mg/ml とする。この上限は、培養液浸透圧の上昇による染色体異常の誘発を避けるためである (Ishidate *et al.*, 1984; Galloway *et al.*, 1987)。この用量上限が適切でない場合には、

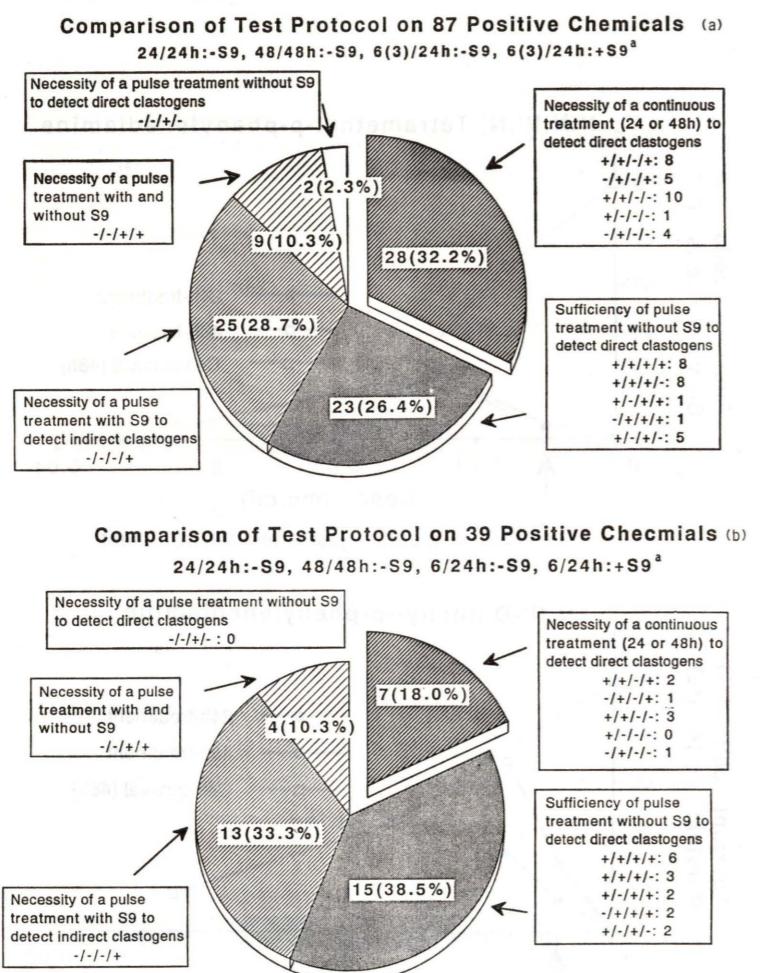


Fig. 3. Comparison of test protocol on 126 positive chemicals ((a); 87 chemicals, (b); 39 chemicals) with CHL cells in NIH data base. The (a) is based on Ishidate data book (1988). The (b) is new data generated after 1988.

a; Treatment time/Sampling time after the initiation of culture: in the presence or absence of S9.

設定した最高濃度の選択理由を述べる。また、極端な pH が染色体異常を誘発することが知られているので (Morita *et al.*, 1992), 培養液 pH を生理的範囲に保つことも必要である。

毒性のある物質では、陰性対照と比べ、50% を超える細胞増殖（生細胞数、飽和度などによる）抑制を示す濃度、血球培養系では分裂指数が 50% を超えて抑制される濃度とする。50% を超えるという制限は多くの機関の知見に基づくものであるが、細胞毒性測定の不正確性、日本では 50% を超える用量を使用していることおよび UKEMS ガイドラインは、分裂指数の 75% 減少を推奨していることを考慮した。

さらに、不溶性物質の最高用量をどのように規定するかが問題となった。溶解性にかかわらず細胞毒性を指標とする立場からは、沈殿域であっても細胞毒性が認められるならばいくつかの析出用量を用いるべきだとされた。これは、沈殿が認められる用量であっても、添加量に依存して細胞毒性や染色体異常の誘発が認められるケースがあることによる (Fig. 1 および Fig. 2, Sofuni *et al.*, 1990)。数種の細胞株におけるラテックスビーズの取り込みおよびクリソタイルの細胞毒性の検討から (Shiraishi, 未発表データ), 析出用量における毒性発現の機構の 1 つとして細胞の貪飢能が上げられた。一方、細胞毒性にかかわらず溶解性を指標とする立場からは、たとえ最高用量で細胞毒性が認められなくても溶解限度を越えるべきではないが、沈殿を生ずる用量を 1 つ加えることは溶解限度まで試験した証明となるので妥当とされた。両意見は合意には至らず、毒性がない場合には明かな析出を生ずる最低濃度を最高用量とする点では一応の合意が得られた。

6) 処理時間とサンプリングタイム

試験はまず直接法および代謝活性化法とも 3 時間から 6 時間のパルス処理を行い、処理の開始から約 1.5 正常細胞周期後に標本を作製する (Bean *et al.*, 1992)。これらの処理で陰性の結果が得られた場合には、直接法による約 1.5 正常細胞周期に渡る連続処理を行う。場合によっては、より長時間の連続処理が有効であることも指摘された。

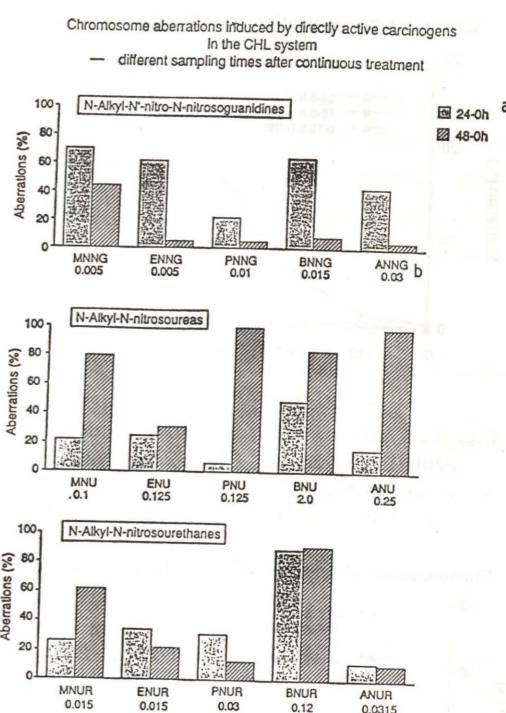


Fig. 4. Chromosome aberrations induced by directly active carcinogens in CHL cells —Different sampling times after continuous treatment— (Ishidate, 1988).

a; Treatment time-Recovery time, b; Concentration (mg/ml).

これらはいくつかのデータを基に議論されたが、ここでは国立衛生試験所データベース (Ishidate, 1988) の解析を例示する (Fig. 3)。Fig. 3 の (a) および (b) を合わせた 126 の陽性化合物のうち、107 化合物 (85%) は、直接法あるいは代謝活性化法の短時間パルス処理で陽性であった。このうち、代謝活性化法のみで陽性となったものは 38 化合物 (30%) であった。一方、24 時間あるいは 48 時間の連続処理で陽性となったものは 73 化合物 (58%) で、そのうち連続処理だけで陽性となったものは、19 化合物 (15%) であった。つまり、パルス処理だけでは 15% の陽性物質を見落とす可能性があるため、連続処理も必要とされた。ここでの問題は、48 時間処理においてのみ陽性となった 5 つの化合物をどう取り扱うか、すなわちより長時間の処理が必要か否かということであった。N-alkyl-N-nitrosourea 類 (Fig. 4, Ishidate, 1988), methotrexate (笠原, 未発表データ), 6-

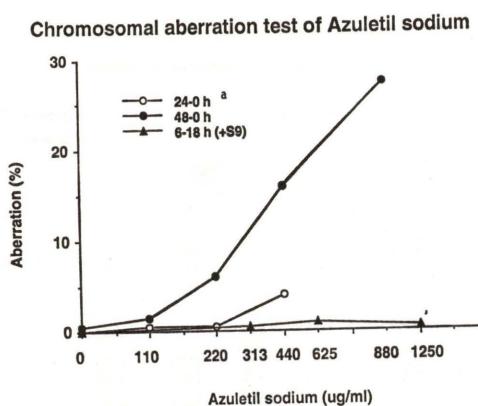


Fig. 5. Chromosomal aberration induced by azuletil sodium in CHL cells (Nakajima et al., 1990).

a; Treatment time-Recovery time.

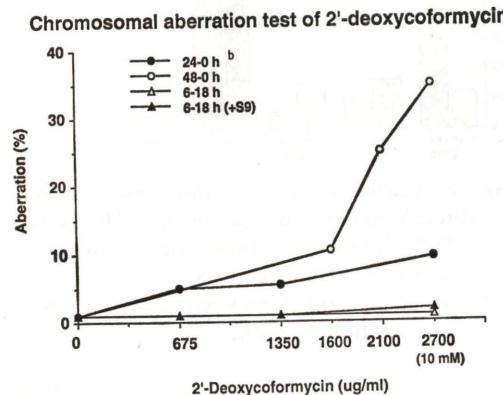


Fig. 6. Chromosomal aberration induced by 2'-deoxycoformycin in CHL cells (Ostuka et al., 1991).

a; Treatment time-Recovery time.

mercaptopurine (Sofuni, 1993) などは 24 時間処理より 48 時間処理の方が感度よく、あるいは 48 時間処理においてのみ異常を検出する。また azuletil sodium (Fig. 5, 中島ら, 1990) や 2'-deoxycoformycin (Fig. 6, 大塚ら, 1991) のように 48 時間処理のみで陽性となる化合物があることから長時間連続処理の必要性が提案された。しかしながら、dimethylnitrosamine による 3 時間処理後、17 時間より 41 時間ににおけるサンプリングがより高頻度に異常を誘発した (Bean and Galloway, 1993) ことから分かるように、短時間処理後の遅いサンプリングタイムのデータが少なく、本当に長時間処理が有効かどうかが不明なこと、重要な

染色体異常誘発物質の多くは 24 時間までの処理で検出できること、被験物質の培養液中での分解物の蓄積の可能性や、偽陽性が多くなるのではといった懸念から、必ずしも長時間処理は必要ではないとの反対意見が出された。この問題も合意には至らず、長時間処理は要求しないが、核酸アノログや nitrosamide などある種の化合物には長時間処理が有効であるとの見解にとどまった。

7) 代謝活性化

S9 の誘導剤は、通常 Aroclor 1254 あるいは phenobarbital/β-naphthoflavone を用いる。代謝活性化の処理時間は 3 時間から 6 時間とし、培養液中の最終 S9 量は 1% から 10% とする。補酵素類も特に規定せず、陽性対照における反応の妥当性で代謝活性化能を評価する。処理溶液中の血清の有無が問題とされたが、どちらがよいかは決定できなかった (Galloway, 未発表データ)。ただし、3 時間を越える処理では血清の添加が必要である。また、S9 の調製法および S9 中の蛋白含有量を記載する。

8) 観察対象細胞

観察対象細胞は、すべての細胞種（株細胞および初代細胞）について動原体数が染色体数モード士 2 の細胞として合意した。これは、1 本あるいは 2 本の染色体を失った細胞を観察しても、試験結果に影響を与えることはほとんどないとしたためである。

9) プレート数と観察細胞数

1 群あたりのプレート数は 1 枚で充分であり、必ずしも 2 枚用いる必要はない。これは、2 枚のプレートを詳細に比較した Merck のデータに基づいた (Soper and Galloway, in press)。陰性対照および処理群の観察細胞数は、用量あたり少なくとも 200 細胞とするが、例えば陽性対照のように異常数が極めて多い場合には、観察細胞数を減らしてもよい。

10) 異常の分類と記録

異常の分類と、それらの明確な定義を記載する

ことが必要であり、観察された異常のタイプをギャップを含めてデータとして示す。ギャップには多くの判定基準があるので、各試験機関は、ギャップの定義に基づきギャップをデータ解析の際にトータルの異常頻度に含めるか否かを決定する。染色分体の軸から離れていない、染色分体の幅と同程度かそれ以下のギャップはトータルの異常頻度には含めないことが合意された。

11) 倍数体（数的異常）

この試験プロトコールは構造異常の検出に特定したもので、倍数体（数的異常）の検出を意図したものではない。しかし、数的異常の評価は重要であり、倍数体を誘発する化合物の多くは異数性細胞も誘発することから、倍数体や核内倍加が認められた場合にはその頻度を記載する。

12) 試験の繰り返し

不明瞭な結果が得られた場合には、試験の繰り返しが必要である。この場合、用量やサンプリングタイムなどを考慮し、プロトコールを吟味して行う。明らかな陽性の場合には、繰り返しは必要ない。また、適切なプロトコールによる明かな陰性の場合にも繰り返しは必要ないとの意見が大多数を占めた。これらは、アメリカ製薬協によるアンケート調査ならびに Hazelton のデータに基づいた。

13) 陽性の定義

構造異常を有する細胞の異常頻度が 1 回の試験で明らかに用量依存的に増加するか、あるいは 1 用量での異常頻度の増加に再現性がある場合に陽性と判断する。

14) 結果の評価

構造異常を有する細胞のパーセンテージを、実験毎に評価する。通常、統計処理を行うが、有意水準は多重性を考慮に入れて設定する。また、生物学的妥当性も考慮する（例えば、背景データなど）。細胞あたりの異常頻度に関する情報は、不明瞭な結果を評価する際に有用である。

おわりに

ここに記した内容は、メルボルン国際ワークショッピングにおける *in vitro* 染色体異常ワーキンググループの報告 (Galloway et al., 1994) および付随資料から構成したものである。詳細は、同報告が Mutation Research 誌に掲載予定なので参照されたい。

謝 辞

本論文作成にあたり、データならびに図を快く提供して下さいました石館 基博士（オリンパス光学）ならびに祖父尼俊雄博士（国立衛生試験所）に感謝いたします。

参 考 文 献

- Armstrong, M. J., C. L. Bean and S. M. Galloway (1992) A quantitative assessment of the cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cell, Mutat. Res., 265, 45-60.
- Bean, C. L., M. J. Armstrong and S. M. Galloway (1992) Effect of sampling time on chromosome aberration yield for 7 chemicals in Chinese hamster ovary cells, Mutat. Res., 265, 31-44.
- Bean, C. L. and Galloway, S. M. (1993) Evaluation of the need for a late harvest time in the assay for chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells, Mutat. Res., 292, 3-16.
- Galloway, S. M., D. A. Deasy, C. L. Bean, A. R. Kraynak, M. J. Armstrong and M. O. Bradley (1987) Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and DNA strand breaks, and the relation to toxicity, Mutat. Res., 189, 15-25.
- Galloway, S. M., M. J. Aardema, M. Ishidate, Jr., J. L. Ivett, D. J. Kirkland, T. Morita, P. Mosesso, and T. Sofuni, (1994) International workshop on standardization of genotoxicity test procedures, Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberrations, Mutat. Res. (in press).
- Ishidate, M. Jr. (Ed.) (1988) Data book of chromosomal aberration test *in vitro*, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, K. Yoshikawa, M. Hayashi, T. Nohmi, M. Sawada and A. Matsukawa (1984) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, Fd. Chem. Toxic., 22, 623-636.
- Morita, T., T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura (1992) Clastogenicity of low pH to various

- cultured mammalian cells, *Mutat. Res.*, **268**, 297-305.
- 森田 健, 矢嶋信浩 (1993) 染色体異常試験の問題点, *環境変異原研究*, **15**, 89-96.
- 中島 圓, 天野彰子, 北沢倫世, 田中亮太, 井上博之, 松本 真, 島田 剛, 富田 格 (1990) アズレチルナトリウム (KTI-32) の変異原性試験 (第2報), *哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験, 薬理と治療*, **18**(7), 85-90.
- 大塚雅則, 小椋正造, 岡田真理, 稲井恒彦, 梶原美次, 安心院祥三, 久保清明, 菊野 秋, 白石博子, 柿本敬次郎, 志垣隆通, 桑田茂喜, 梅橋操子 (1991) YK-176 の変異原性試験, *基礎と臨床*, **25**(5), 47-56.

- Sofuni, T. (1993) Japanese guidelines for mutagenicity testing, *Environ. Mol. Mutagen.*, **21**, 2-7.
- Sofuni, T., A. Matsuoka, M. Sawada, M. Ishidate Jr., E. Zeiger and M. D. Shelby (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHL and CHO) systems in culture, *Mutat. Res.*, **241**, 175-254.
- Soper, K. A., and S. M. Galloway (1994) Replicate flasks are not necessary for *in vitro* chromosome aberration assays in CHO cells, *Mutat. Res.* (in press).

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 151-160 (1994)

第22回大会トピックス

「変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点:
メルボルン国際ワークショップの報告を中心に」

哺乳動物細胞を用いる遺伝子突然変異試験 —メルボルン国際ワークショップ合意—

Mammalian cell gene mutation assays: consensus at international workshops on standardization of genotoxicity test procedures

西 義 介
Yoshisuke Nishi

日本たばこ産業(株) 生命科学研究所 227 横浜市緑区梅ヶ丘 6-2

Life Science Research Laboratory, Japan Tobacco, Inc., 6-2 Umegaoka, Midori-ku,
Yokohama, Kanagawa 227, Japan

(受付: 1994年1月14日; 受理: 1994年1月14日)

Summary

A variety of protocol issues related to mammalian cell gene mutation assays was discussed by the working group at International Workshops on Standardization of Genotoxicity Test Procedures (Melbourne, 1993). Consensus (or agreement) reached on several issues is as follows:

- 1) The upper limit of concentration for non-toxic substances should be 10 mM or 5 mg/ml whichever is lower.
- 2) The acceptable upper limit of concentration for toxic substances should be that yielding 10-20% survival.
- 3) For evaluation of mutation in mammalian cells, any of several established assays (V79/HPRT, CHO/HPRT, L5178Y TK+/-, AS52/XPRT) can be used. The ouabain resistant mutation systems are not suitable for routine assays for evaluation of mutagenesis in mammalian cells.
- 4) When a mouse lymphoma system is used, criteria for small colonies is important and ability to recover small colonies must be convincingly demonstrated. Colony sizing is required for positives and if test compounds represent positive responses.
- 5) Testing both in the presence and absence of S9 activation is required.
- 6) There was a general agreement that treatment times longer than 2 cell cycles was often disadvantageous.
- 7) When the assay is adequately performed, it is not required to repeat clear positive and clear negative tests.
- 8) If treatment groups are not replicated, the numbers of doses should be increased.
- 9) Each laboratory should establish a historical database for the performance of a given assay.

Keywords: mammalian cell gene mutation, standardization, V79/HPRT, CHO/HPRT, L5178Y TK+/-, AS52/XPRT

1. はじめに

哺乳動物細胞を用いる遺伝子突然変異試験法 (以下 MCM 法と略記) は哺乳動物細胞の特定の

遺伝子座に誘発される遺伝子変異を定量的に評価する系であり、遺伝毒性試験法の一つとして位置づけられている。

Table 1. Status of mammalian cell mutation in guidelines from regulatory bodies

| Guidelines | Status of mammalian cell mutation assays | Comments |
|---|--|--|
| Canada Department of National Health and Welfare | Not explicitly mentioned | |
| Netherlands Cezondheidsraad 1981 | One of several options for tests in eukaryotic systems | Recommended protocol be "flexible" and that international guidelines settled on ASAP |
| UK Committee on Mutagenicity of Chemicals | Presented as an option in Phase I testing | L5178Y was mentioned explicitly |
| EC "Notes for guidance..." | Recommended: L5178Y vs CHO vs others | Flexibility urged |
| US-EPA Federal Register Pub. 1991 | One of several guidelines | Written fairly flexible |
| US-FDA | Not explicitly required | |
| Japan MHW/MAFF | Not explicitly required | |
| Nordic Countries Nordic Council on Medicines 1989 | Not explicitly discussed | |
| New Zealand | Not explicitly discussed | |

試験には通常、継代した培養細胞が用いられる。方法は培養細胞を被験物質に一定時間暴露させた後に、選択培地で一定期間培養し、生存していくコロニーを計数するというものである。今回のメルボルンワークショップでは MCM 法のプロトコルの共通化について日米欧 3 極の研究者間で討議がなされ、以下に記載する合意が得られた。

2. 各国ガイドラインにおける MCM 法の位置付け

プロトコルに関する合意事項を述べる前に、各国のガイドラインに見られる MCM 法の位置付けを示す (Table 1)。MCM 法を何らかの形でガイドラインに組み入れている国および機関は英国、米国（但し EPA）、それに EC である。一方、その他の国、中でも日本の厚生省、農水省のガイドラインでは MCM 法を特に要求してはいない。即ち、3 極の中で日本を除く 2 極は MCM 法に一定の評価を与え、ガイドラインに取り入れている。

3. 何故 MCM 法か？

MCM 法が欧米のガイドラインの中に取り入れられている理由としては MCM 法の開発、実施研究者層が 2 極、特に英米では厚く、従って MCM 法に一定の評価を与える土壌があると言う事情であろう。その他の理由としては以下の点が挙げられよう (Table 2)。1) 動物細胞とバクテリアではゲノム構造が種々の点で異なり、それが突然変異率に影響する可能性があり、Ames 系では代替出来ないとする意見。2) バクテリアに対して過剰な毒性を示す抗生物質のようなものは毒性が強く出て、見かけ上突然変異率の上昇を招く可能性がある。また余りに強すぎる場合には、有効な用量範囲が狭く、逆に変異が検出されない場合も考えられる。3) さらに、動物細胞に特異的な複製阻害剤（トポイソメラース阻害剤やスクレオチドアナログなど）のような物質は Ames 系では検出されず、動物細胞を使う必要があるとする意見。4) どのガイドラインにおいても公認されている染色体異常試験が染色体異常に起因する細

胞の致死的な作用を観察しているのに対して、MCM 法のエンドポイントは生存細胞の変異であり、遺伝毒性、発癌性などより重要な変異に関連する異常を観察している。特に L5178Y 細胞系では変異を起こした細胞の中に染色体異常を伴っているものがあり（後述）、染色体異常の変異をも検出することが出来る点。

4. 用量設定

用量設定に関する合意事項を Table 3 に示した。1) 細胞毒性が認められない被験物質に対しては 10 mM あるいは 5 mg/ml の内、低用量の方。2) 細胞毒性が認められる被験物質に対しては、最高用量は試験法に関わらず、初期相対生存率が 10~20% となる用量とする。その他のコメントとして、a) 初期生存率が 20% を越える細胞

毒性を示す場合、遺伝子変異率は相対的に上昇する可能性があるので注意を要する。b) 初期毒性の測定は relative total growth またはコロニー形成能が良い。c) LDH の放出や種々の染色法は細胞毒性の測定の指標には好ましくない。d) 用量の設定数は 1 用量当たりの試験の試行回数と 1 試行当たりの生存細胞数に依存して変わる。e) 用量は毒性領域に重点を置いて、設定する必要があるが、毒性を示す範囲から無毒性の範囲までを広くカバーすべきである。

5. 試験系

試験系に関する合意事項を Table 4 に示した。1) 用いる試験系としてはどのような樹立化された哺乳動物細胞を用いることも可能である。汎用的に用いられている MCM 法としては a) V79/

Table 2. MCM assay systems: why included in some guidelines

- 1) Different organizations of the genome between bacteria and mammalian cells
- 2) MCM applies to compounds:
 - a) excessively toxic to bacteria (antibiotics)
 - b) nucleotide analogues
 - c) thought to be interfere with the mammalian cell replication system (topoisomerase inhibitor)
 - d) biological materials
- 3) Viable endpoints as compared with clastogenicity
Small colonies (L5178Y) represent viable cells after chromosomal changes

Table 3. 1. Dose Setting

- | | |
|--|---|
| 1) For non-toxic substances: | the upper limit of concentration 10 mM or 5 mg/ml whichever is lower |
| 2) For toxic substances: | the acceptable upper limit of concentration 10-20% survival |
| # For excessive toxicity above doses giving 20% survival, cases may arise in MCM assay systems with high relative increase in mutation frequency | |
| # The acceptable metric will normally be either relative total growth or colony forming ability | |
| # Other methods such as LDH release or various staining methods are not felt to be adequately characterized | |
| # The number of concentrations was dependent on the number of replicates per concentration and the number of viable cells per replicate | |
| # The doses should span a wide range from toxic to non-toxic while emphasizing the higher toxicity level | |

Consensus on Melbourne Workshop (IWSGTP)

Table 4. 2. Test Systems

| 1) Any of several established mammalian cell mutation assays: | | | | |
|---|--|--|--|--|
| a) V79/HPRT | | | | |
| b) CHO/HPRT | | | | |
| c) L5178Y TK+/- | | | | |
| d) AS52/XPRT | | | | |
| 2) Inensitive or incompletely validated | | | | |
| "Ouabain" locus and those using primary culture | | | | |
| # Each of the assays clearly has advantages and disadvantages and no particular assay is judged superior for testing purposes | | | | |
| # The location of the HPRT gene on the X-chromosome is noted to result in insensitivity to compounds which produce their effect through a clastogenic mechanism | | | | |
| # Ability to recover small colonies must be convincingly demonstrated when using the L5178Y TK+/- assay | | | | |
| # Low background mf vs high relative increases in mf (V79, CHO), the number of cells at risk is critical | | | | |
| # high background mf vs lower relative increases in mf (L5178Y), optimal exposure concentrations are important | | | | |
| Consensus on Melbourne Workshop (IWSGTP) | | | | |

Table 5. Mammalian cell mutation assay systems

| Cell | V79/HPRT | CHO/HPRT | AS52/XPRT | L5178Y/TK +/ - |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Source | Chinese hamster lung cell | Chinese hamster ovary cell | CHO-derived transfectant | mouse (DBA/2) lymphoma cell |
| Locus | hppt (Xp) | hppt (Xp) | E. coli gpt | tk-1 (#11) |
| Genotype | hemizygous | hemizygous | hppt/gpt+ | heterozygous |
| Mutation | hppt+ → hppt- | hppt+ → hppt- | gpt+ → gpt- | tk-1+/tk-1- → tk-1-/tk-1- |
| Selection | 6TG | 6TG | 6TG | TFT |
| Culture | solid substrate | solid substrate | solid substrate | semi-solid substrate |
| Expression time | 6-7 days | 6-7 days | 7 days | 48-72 hours |
| Spontaneous mutation fr. | 20 × 10 ⁻⁶ | 20 × 10 ⁻⁶ | 30 × 10 ⁻⁶ | 100 × 10 ⁻⁶ |
| Remarks | less sensitive | less sensitive | slightly sensitive | small & large colonies |

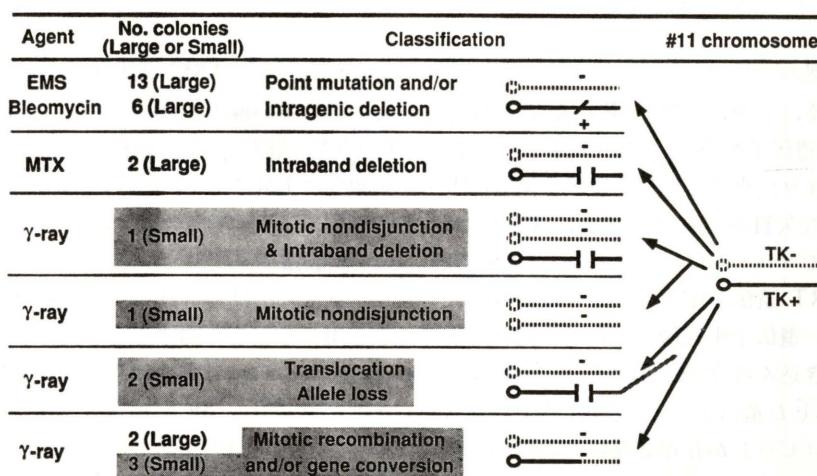
HPRT 系, b) CHO/HPRT 系, c) L5178Y TK +/ - 系, d) AS52/XPRT 系などが挙げられる。2) ウーバイン耐性変異系や初代培養細胞を用いる系は感受性が低かったり、系として不完全であったりして、推薦出来ない。その他のコメントとして、a) どのような系を用いるにしろ、弱点と長所を持っており、いずれの系も他よりも優れた系という捕え方は出来ない。b) HPRT 遺伝子座が X 染色体上に存在することから、染色体異常を経由して細胞に障害をもたらす化合物に対しては感受性

が低下することが考えられる(後述)。c) L5178Y TK +/ - 系を用いる場合、いわゆる小型コロニーの出現能を明確に示さなければならない(後述)。d) V79/HPRT 系や CHO/HPRT 系の場合、バックグラウンドの変異率が低く、相対的に誘発変異が高い。この場合、変異を観察する細胞集団の細胞数が問題となる。e) L5178Y TK +/ - 系の場合、バックグラウンドの変異率が高く、相対的に誘発変異が低い。この場合、曝露量の最適化が重要となる。

Table 5 に汎用される MCM 法 (Chu and Malling, 1968; Fox, 1975; Hsie et al., 1975; Stankowski, Jr. and Tindall, 1987; Clive and Spector, 1975) の特性についてまとめたものを示した。V79, CHO 細胞はチャイニーズハムスターに由来する纖維芽細胞、L5178Y 細胞はマウスのリンパ腫に由来し、AS52 細胞は CHO 細胞に大腸菌由来の gpt 遺伝子を導入したものである。従って、V79, CHO, AS52 細胞は固形基質依存性(壁着性)、L5178Y は固形基質非依存性(浮遊性)の増殖を示す。V79/HPRT, CHO/HPRT 系は hppt⁺ から hppt⁻への変異、AS52/XPRT 系は gpt⁺ から gpt⁻への変異、L5178Y TK +/ - 系は tk-1^{+/tk-1-} から tk-1^{-/tk-1-}への変異を検出する。V79, CHO, AS52 系はすべて 6-チオグアニン耐性を指標とする。一方、L5178Y 系はトリフルオロチミジン耐性を指標とする。遺伝子変異発現時間は V79, CHO, AS52 細胞が 6~7 日、L5178Y 細胞が 48~72 時間が最適とされる。バックグラウンド変異率は概ね 10⁻⁵ から 10⁻⁴ の範囲にある(後述)。

最後にこれらの系の感受性を記載する。一般的に AS52/XPRT 系、L5178Y TK +/ - 系の感受性は、V79/HPRT 系や CHO/HPRT 系に比べ、高いと言われる(Table 5, Remarks; もっとも、バックグラウンドに対する誘発頻度を相対値で比較

すると、前述したように必ずしも V79/HPRT 系や CHO/HPRT 系の方が低いとは言えない)。特に L5178Y TK +/ - 系では小型コロニーを含めると誘発頻度は上昇する。この小型コロニーの起源について Applegate らは種々の変異原処理により得られた TK⁻ 変異細胞を遺伝子レベルで調べた(Applegate et al., 1990)。Fig. 1 に得られた結果を要約して示した。変異原処理で出現した大型コロニーは点突然変異や遺伝子内部、あるいは TK 遺伝子を含む染色体の 1 バンド内部の小さな欠質を伴っていた。一方、同様に変異原の処理により出現した小型コロニーは染色体不分離や、ranslocation, アリルロス、マイティックリコンピネーション、遺伝子変換など大きな染色体領域の欠質を伴っていた。この結果を変異頻度との関係で考察すると、Fig. 2 のような説明が可能となる。即ち、L5178Y TK +/ - 系では点突然変異あるいは遺伝子座に限定される微小欠質を伴う場合、遺伝子変異は TK 遺伝子に限局され、大型コロニーが回収される。一方、染色体上の遺伝子座を含む大きな領域に欠質変異が生じた場合、遺伝子座近傍に存在する他の遺伝子を共通に巻き込んで欠質を引き起こす(図中丸印で示した遺伝子)。このような変異が起こると、正常な遺伝子は 1 コピーしか存在しなくなるために、もし、この遺伝子が細胞の生存に必須で、dosage 効果を持つ



Modified from Applegate et al., PNAS, 87: 51-55, 1990

Fig. 1. Classification of TK+/- mutants by mechanism of origin.

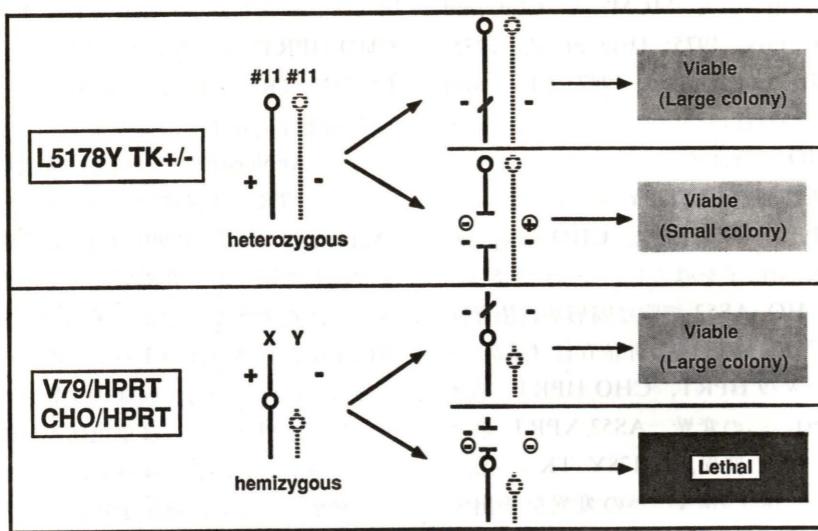


Fig. 2. Different Sensitivity in Recessive Mutations (X-linked vs. Autosomal).

Table 6. 3. Study Design

- 1) Testing both in the presence and absence of S9 metabolic activation:**
- # An induced rat liver S9 system in the range of 2-10%, although other concentrations with adequate justification
 - # Treatment time is different dependent on test system, or due to the toxicity of S9
 - # The dose rangefinding data should be based on a similar treatment regimen to that used in the experiment
 - # Extended treatment (> 2 cell cycles) are generally inappropriate in MCM

Consensus on Melbourne Workshop (IWSGTP)

いた場合、小型のコロニーとして回収される可能性が考えられる。一方、V79/HPRT 系や CHO/HPRT 系では遺伝子が X 染色体上に存在するために事情が異なり、点突然変異や遺伝子領域に限局される微小な欠質が存在する場合、TK⁺⁻系と同様な機構でコロニーは回収される。しかし染色体上の HPRT 遺伝子座を含む大きな領域に欠質変異が生じ、遺伝子座近傍に存在する他の遺伝子を共通に巻き込んで欠質を引き起こした場合(図中丸印で示した遺伝子)，この遺伝子は元来 X 染色体上に 1 コピーしか存在しないために、もし、この遺伝子が細胞の生存に必須であれば、細胞には致死効果として作用し、変異コロニーとしては回収されない。この分、遺伝子変異率は減少する

と考えられる。AS52 細胞の場合は常染色体中に gpt 遺伝子が導入されているので、基本的には L5178Y 細胞の場合と同様の状況が考えられ、変異頻度は上昇する。

6. 試験法

試験法における合意事項は主に S9 代謝活性化系を用いることに関するものである (Table 6)。以下の点がさらに考慮されるべきである。a) 誘導をかけたラットの S9 を用いる。b) 濃度は 2~10% 程度の範囲が適当であるが、最適条件を求める必要がある。c) 処理時間は S9 の毒性に依存して、定決する。d) 試験には用量決定に用いたレジメと同一のレジメを用いることが望ましい。e) 2 細胞

周期以上の処理時間は細胞に対して強い毒性を示し、適当ではない。

7. 反復回数

反復回数に関する合意事項を Table 7 に示した。1) 完全陽性対照、あるいは完全陰性対照については反復試験は不要である。2) 被験物質処理群についても、反復試験を支持するものではない。3) 1 試験内での同一の用量水準の重複処理群の設定はこれを行なわないであれば、設定用量水準数を増やすか、充分量の細胞数を用いるかする必要がある。4) 充分量の細胞数とは被験物

質処理後の生存細胞数にして、V79, CHO 細胞で 10^6 個、L5178Y 細胞で 3×10^5 個、AS52 細胞で 2×10^5 個以上の細胞に相当し、この細胞数以上の細胞数を（充分な増殖条件下において）遺伝子変異発現期間中および変異体の選抜時に維持する。コメントとして、a) 充分量の用量水準としては、3 水準以上必要であり、最高用量は 10~20% の生存率を示す用量までとする。b) 高用量水準で得られた陰性結果が細胞毒性に起因しているのではないかということを確認するためには充分量の細胞数が用いられた条件が保障されれば、同一用量水準の重複群の設定は不要である。

Table 7. 4. Replication of Tests

- 1) Not necessary to repeat clear positive or clear negative tests**
- 2) The need for repeating the assays is not supported**
- 3) Increased number of doses or sufficient viable cells, if treatments not replicated**
- 4) The minimum number of viable cells at the point in the assay:**
- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| V79 and CHO/HPRT | : 10^6 cells / treatment group |
| L5178Y TK ⁺⁻ | : 3×10^5 cells / culture |
| AS52/XPRT | : 2×10^5 cells / treatment |
- # Adequate performance of the assays implies that sufficient doses, i.e., three or more, and sufficiently rigorous doses, i.e., a high dose giving between 10 and 20% survival, are used
- # It is not required to test replicate cultures provided sufficient viable cells are passed and plated at the high dose to ensure that negative cultures in the high dose selection plates are not due to toxicity

Consensus on Melbourne Workshop (IWSGTP)

Table 8. 5. Criteria for Evaluation of Final Results

- 1) Establish a historical database for the performance of a given assay**
- 2) A positive response established based on analysis of variation of laboratory's negative control**
- 3) A cutoff frequency for concluding a positive response:**
- | | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| V79 and CHO/HPRT | : > 20 mutants ($\times 10^{-6}$) |
| L5178Y TK ⁺⁻ | : > 100 mutants ($\times 10^{-6}$) |
| AS52/XPRT | : > 30 mutants ($\times 10^{-6}$) |
- # The cutoff frequency using a particular test system should be established in each laboratory
- # Positive results should be corroborated by statistical analysis, concentration-response relationship and/or repeat of experiments
- # No specific statistical tests are uniformly endorsed

Consensus on Melbourne Workshop (IWSGTP)

8. 最終判定

最終判定に関する合意事項を Table 8 に示した。1) 各研究室は累積データを持つ必要がある。試験の妥当性は累積データとの比較で判定すべきであろう。2) 研究室での陰性対照のばらつきをベースにして陽性判定を行なうことが望ましい。3) 陽性反応の基準（カットオフ）とする突然変異率は V79 や CHO 細胞の HPRT 系では 20×10^{-6} , L5178Y TK+/- 系では 100×10^{-6} , AS52/XPRT 系では 30×10^{-6} 程度であり、これ以上の突然変異率が認められる場合に陽性判定の検討を行なうと良い、以下はその他のコメントである。a) 基準となるカットオフ頻度は各々の研究室で決定すべきである。b) 陽性の判定、用量依存性、反復試験間の結果の評価は統計的に確認すべきである。c) MCM 法の評価系として、単独かつ唯一の統計法が存在するわけではない。

9. 統計評価について

最後に統計評価について触れてみたい。この事項については今回のワークショップのテーマとは直接関係していないので、簡単にコメントするに留める。以下の記載は MCM 法に統計評価を行なった例である。Hsie らは CHO/HPRT 系の評価に重み付けをした最少 2 乗回帰法を導入した

Table 9. Statistical Evaluation of Test Data from MCM Assay System

| Method of analysis | MCM system | Distribution (Variance) | References |
|---|--------------------------|---|--|
| Weighted least squares regression | CHO/HPRT | Poisson (change between doses) | Hsie <i>et al.</i> , Somat. Cell Genet. 3: 247-261, 1975 |
| Poisson-weighted analysis of variance | L5178Y TK+/- | Poisson (change between doses) | UKEMS sub-committee guideline |
| Analysis of variance after Box-Cox procedure | CHO/HPRT L5178Y TK+/- | Normal after Box-Cox (homogeneous; ex. error) | Snee & Irr, Mutation Res. 85: 77-93, 1981 Irr & Snee, Mutation Res. 97: 371-392, 1982 |
| Two sample t - tests | V79/HPRT | Normal | Newbold <i>et al.</i> , Mutation Res. 67: 55-63, 1979 |
| Two sample t - tests after log transformation | L5178Y TK+/- | Normal | Amacher <i>et al.</i> , Mutation Res. 72: 447-474, 1980 |
| Non-parametric test | L5178Y TK+/- | No form | Boyd, Mutation Res. 97: 147-153, 1982 |

International Workshop on Standardization of Genotoxicity Test Procedures: Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report

Members of the Working Group:

C.S. Aaron¹ (Chair), G. Bolesfoldi², H.-R. Glatt³, M. Moore⁴, Y. Nishi⁵, L. Stankowski⁶, J. Theiss⁷ (Rapporteur) and E. Thompson⁸ (Rapporteur).

¹The Upjohn Company, Investigative Toxicology (7228-300-5), Kalamazoo, MI 49001;
²AB Astra, Safety Assessment, S-151 85, Södertälje, Sweden;
³University of Mainz, Mainz, Germany;
⁴USEPA (MD-68A), Research Triangle Park, NC 27711;
⁵Japan Tobacco Inc., 6-2 Umegaoka, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 227 Japan;
⁶Pharmakon Research International, P.O. Box 609, Waverly, PA 18471;
⁷Parke-Davis Pharmaceutical Research, 2800 Plymouth Road, Ann Arbor, MI 48105;
⁸The Procter and Gamble Company, Miami Valley Laboratory, P.O. Box 398707, Cincinnati, OH 45239-8707.

Fig. 3. Title page of MCGMA working group report.

リック法を用いているものなどがある (Boyd, 1982)。

10. おわりに

今回、メルボルンワークショップに参加する機会を得た。この場を借りて感想を述べさせて頂く。こういった会議（国際的なハーモナイゼーション）は私にとって初めての経験であった。単に大量のデータを開示し、サイエンティフィックな議論に終始するだけではすまされない、ある種の外交的センスが要求される落とし所の難しい会議であったと思う。3 極の中では、欧米の事情に比べ、日本の特殊事情が目立つケースが多かったように感じた。いずれにしろ、色々な意味で興味深い体験であった。ワークショップの期間中、全く本題に関連のない憐愍の思いが去來した。明治以来、日本の外交官は常にこのような状況に置かれて苦悶したに違いないと。最後に、今回のこれらの結果はワーキングレポート (Fig. 3) と言う形で Mutation Research 誌に投稿された。

謝 辞

この論文をまとめるに当たり、統計の解釈についてご助言を賜った吉村先生（東京理科大、経営学部、経営工学科）に深甚の謝意を表します。

参考文献

- Amacher, D. E., S. C. Paillet, G. N. Turner, V. A. Ray and D. S. Salsburg (1980) Point mutations at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells. 2. Test validation and interpretation, Mutat. Res., 72: 447-474.
- Applegate, M. L., M. M. Moore, C. B. Broder, A. Burrell, G. Juhn, K. L. Kasweck, P.-F. Lin, A. Wadhams and J. C. Hozier (1990) Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 51-55.
- Arlett, C. F., M. H. L. Smith, G. M. Clarke, M. H. L. Green, J. Cole, D. B. McGregor and J. C. Asquith (1989) Mammalian cell gene mutation assays based upon colony formation, In: D. J. Kirkland, G. A. T. Mahon, C. F. Arlett, W. D. Robinson, C. Richardson, D. A. Williams, D. Cooke, D. P. Lovell, D. O. Chanter, R. D. Combes, M. R. Thomas (Eds.), Statistical evaluation of mutagenicity test data. UKEMS sub-committee on guidelines for mutagenicity testing. Report. Part III, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 66-101.
- Boyd, M. N. (1982) Example of testing against ordered alternatives in the analysis of mutagenicity data, Mutat. Res., 97: 147-153.
- Chu, E. H. Y. and H. V. Malling (1968) Mammalian cell genetics. II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells *in vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., 61: 1306-1312.
- Clive, D. and J. F. S. Spector (1975) Laboratory

- procedure for assessing specific locus mutations at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells, *Mutat. Res.*, **44**: 269-278.
- Fox, M. (1975) Factors affecting the quantitation of dose-response curves for mutation induction in V79 Chinese hamster cells after exposure to chemical and physical mutagens, *Mutat. Res.*, **29**: 449-466.
- Hsie, A. W., P. A. Brimer, T. J. Mitchell and D. G. Gosslee (1975) The dose-response relationship for ethyl methanesulfonate-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells, *Somatic Cell Genet.*, **1**: 247-261.
- Irr, J. D. and R. D. Snee (1982) A statistical method for analysis of mouse lymphoma L5178Y cell TK locus forward mutation assay, *Mutat. Res.*, **97**: 371-392.
- Newbold, R. F., J. Amos and J. R. Connell (1979) The cytotoxic, mutagenic and clastogenic effects of chromium-containing compounds on mammalian cells in culture, *Mutat. Res.*, **67**: 55-63.
- Snee, R. D. and J. D. Irr (1981) Design of a statistical method for the analysis of mutagenesis at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus of cultured Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.*, **85**: 77-93.
- Stankowski, Jr., L. F. and K. R. Tindall (1987) Characterization of the AS52 cell line for use in mammalian cell mutagenesis studies, In: M. M. Moore, D. M. Demarini, F. J. de Serres, K. R. Tindall (Eds.), *Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, pp. 71-79.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 161-164 (1994)

第22回大会トピックス

「変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点:
メルボルン国際ワークショップの報告を中心に」

不定期DNA合成(UDS)試験

Recommendations for the performance of UDS tests *in vitro* and *in vivo*

降旗千恵¹, 森秀樹²
Furihata, C.¹ and H. Mori²

¹東京大学医学研究所, ²岐阜大学医学部

¹Department of Molecular Oncology, Institute of Medical Science, University of Tokyo,
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan, ²Department of Pathology, School
of Medicine, Gifu University, 40 Tsukasa-cho, Gifu 500, Japan

(受付: 1994年1月27日; 受理: 1994年1月27日)

Summary

“*In vitro* hepatocyte UDS tests” and “*in vivo* liver UDS tests” using autoradiography were recommended at the “International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures”.

“Recommendations for *in vitro* UDS tests”

Test substance: Solutions in growth medium.

Cells and culture conditions: Primary hepatocytes. Viability above 70%.

Animals (species, strain, sex): Male rat.

Number of cultures: 3.

Controls: Concurrent positive and negative (vehicle) controls.

Exposure concentrations: The maximum concentration of 10 mM or 5 mg/ml for non-toxic compounds and a marked reduction in viability for toxic compounds. At least 4 concentrations.

Treatment with the test substance: Test compound and [³H]thymidine for 16-20 h.

Autoradiography analysis: Nuclear and cytoplasmic grains.

Number of cells analysed: 50 cells per culture.

Evaluation of results: Dose-dependent increase of net nuclear grain values (NNGs) at least 2 consecutive concentrations.

“Recommendation for *in vivo* UDS tests”

Animals (species, strain, sex): Male rat.

Number of animals: 3 animals per group.

Controls: Concurrent negative and positive controls on each sampling day.

Dosing of animals: The oral route. A single dose of 2000 mg/kg for non-toxic compounds.

For toxic compounds, the maximum tolerated dose and at least 1 other lower dose.

Sampling times: 12-16 h. If negative, and then 2-4 h.

Preparation of cultures: Primary hepatocytes. Viability above 50%.

Autoradiographic determinations: 100 cells per animal.

Evaluation of results: Increase in NNG at least 1 treatment group.

Keywords: UDS tests; *in vitro*; *in vivo*; hepatocytes; liver

はじめに

"International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures" が D. Kirkland (Hazleton/U.K.) を議長としてオーストラリアのメルボルンで 1993 年 2 月 27, 28 日に開かれた。分科会の一つとして本法が取り上げられた。この方法は必ずしも広く使われている方法ではないが、最近 "in vivo 肝 UDS" が U.K. を中心にヨーロッパで使われたので取り上げられたと考えられる。分科会の議長は S. Madle (Federal Health Office, Germany), 書記は英語を母国語とする人として S. W. Dean (Hazleton, U.K.), 指定討論者は U. Andrae (GSF-Forschungszentrum fur Umwelt und Gesundheit, Germany), G. Brambilla (Universita di Genova, Italy), B. Burlinson (Glaxo, U.K.), D. J. Dolittle (R. J. Reynolds Tobacco Company, U.S.A.), T. Hertner (Ciba-Geigy, Switzerland) と日本から森 秀樹と降旗千恵が参加した。この方法は元々 U.S.A. で開発された方法であるが、参加者 9 人のうち 6 人がヨーロッパというは、各国の "liver UDS" に対する現在の姿勢が表わされている。一般参加者として、B. Elliott (Zeneca, U.K.), I. Stammberger (Hoechst, Germany), 日本から大内田昭信 (大鵬薬品) と沢田繁樹 (エーワイ) が参加した。他に統計学の D. Lovell (Bebra, U.K.) と吉村 功 (東京理科大) が時々参加した。小人数で話しやすく合意を得やすかった。推奨法は現在行われている方法と実験結果に基いて作られた。

UDS 法の原理

UDS とは DNA 損傷の除去修復による修復 DNA 合成を ³H チミジンの DNA への取込みによって検出する方法である。³H チミジンの検出には現在オートラジオグラフィー法が一般的に使われている。液体シンチレーション法 (降旗) と BrdU 密度移動法 (Andrae) について研究成果の紹介と討論が行われたが、まだ一般的でないと言うことで、オートラジオグラフィー法による "In vitro 肝細胞 UDS" と "in vivo 肝 UDS" について、標準法を推奨することとした。 "In vitro 肝細

胞 UDS" は初代培養肝細胞を調製して *in vitro* で化学物質に暴露して UDS を調べる。 "In vivo 肝 UDS" は動物に化学物質を投与して *in vivo* で作用させた後、初代培養肝細胞を調製して *in vitro* で UDS を調べる。

In vitro 肝細胞 UDS 試験

1. 被験物質

培養液に溶解する。有機溶媒 (dimethyl sulfoxide など) は最終濃度 1% 以下とする。

2. 細胞

肝臓を灌流して初代培養肝細胞を調製し、生存率は 70% 以上とする。灌流法は特に指定しない。

3. 培養条件

培養液は指定しない。

4. 実験動物

種はラットを、系統は特に指定せず、雌雄は一般的には雄を使う。

5. 培養数

各点少なくとも 3 とする。

6. 対照群

実験毎に陰性 (溶媒) 及び陽性対照群を設ける。陽性対照は代謝活性化が必要な物質を中程度の活性で使う。

7. 暴露濃度

最高濃度は、無毒物質では 10 mM か 5 mg/ml あるいは析出しない最高濃度とする。有毒物質では生存率が顕著に下がる濃度とする。少なくとも 4 濃度を、例えば 1/2 対数希釈で調べる。

8. 処理時間

被験物質と ³H チミジンを 16~20 時間暴露する。

9. オートラジオグラフィーの計測

核の grain と細胞質の grain とを計測して記載

する。細胞質の grain の計測法は、報告されているいずれの方法でもよい。Grain の計測は、手作業による計測でも自動的計測でも、grain の面積の計測でもよい。

10. 計測細胞数

各 50 細胞を 3 培養について計測する。

11. 再試験

疑陽性の結果がでた場合は再試験する。再試験は一般的に初めと異なる条件で行う。明らかに陰性の結果がでた場合については意見の一一致は得られなかったが、再確認に賛成の意見が多くいた。明らかに陽性の結果は再確認の必要はない。

12. 結果の判定

Net nuclear grain の上昇で判定する。(Net nuclear grain)=(nuclear grain)-(cytoplasmic grain)。連続する 2 つ以上の濃度で用量依存性を示して上昇したら陽性とするか、あるいは再現性、用量相関、細胞毒性を総合して判断する。

著者注釈。今まで net nuclear grain のみを論文に記載したが、nuclear grain と cytoplasmic grain も記載する点が新しくなった。これは、cytoplasmic grain の減少で、見かけ上 net nuclear grain が増加することもあり得るので、生の結果を出すことになったためである。

In vivo 肝 UDS 試験

1. 実験動物

種はラットを、系統は特に指定せず UDS 法で一般に使われている系統を、雌雄は一般に雄を使う。

著者注釈。これまでに 131 の化学物質について in vivo 肝 UDS 試験の結果が発表されている。ラットで 126, マウスで 20 の化学物質が調べられているが、ラットで陽性の化学物質はマウスでも陽性で、マウスのみで陽性の例が 1 例もないので、ラットで試験すればよいと言う結論を出した。良く使われている系統は、Fischer 系 F344, Wistar 系 Alp/AP, Sprague Dawley である。雄ラットで 126, 雄ラットで 3, 雄マウスで 20, 雄

マウスで 12 の化学物質が調べられているが、雌でのみ陽性の物質が今のところ無い。

2. 動物数

実験群は各点少なくとも 1 群 3 匹必要である。対照群は累積対照群がある場合には 1 か 2 匹に減らせるが、統計解析をする場合には多くする必要がある。

著者注釈。1 群 4 匹で 20 回の対照群と dimethylnitrosmine, methyl methanesulfonate, 4-aminobiphenyl 合計 15 回の実験群の値と、1 群 5 匹で 52 回の対照群の値が紹介された。各々最初の 3 匹の値を取っても最終結果が変わらないことが示された。既報論文も 1 群 3 匹が多い。統計解析を用いる人が少なく、統計解析に関する議論は不充分であった。この点は今後改善が必要であろう。

3. 対照群

実験日毎に陰性 (溶媒) 及び陽性対照群が必要である。陽性対照は代謝活性化の必要な物質を中程度の活性で使う。

4. 投与

投与経路は一般に経口投与を推奨する。腹腔内投与は肝臓に直接暴露する可能性があるので推奨しない。

用量は、無毒物質では 2000 mg/kg の 1 点だけでよい。有毒物質では最大耐用量と少なくとももう 1 点低い用量を設ける。

5. 処置時間

動物に化学物質を投与後、12~16 時間処置する。もし陰性ならば、次ぎに 2~4 時間処置する。

著者注釈。初めに 12~16 時間としたのは、今までに報告されている陽性物質 37 のうち 27 が 12~16 時間で陽性になっているためである。

6. 初代培養肝細胞の調製

肝臓の灌流法は報告されているいずれの方法でもよい。肝細胞の生存率は陰性対照群で最低 50% とする。

著者注釈。実験群では化学物質の毒性によって生存率はさらに低いことがある。その場合低くても実験結果には支障はないようである。

7. オートラジオグラフィーの計測

"*In vitro* 肝細胞 UDS" と同様にする ("*In vitro* 肝細胞 UDS" を参照)。核の grain と細胞質の grain とを計測して記載する。1 匹につき、スライド 1 枚あたり 50 細胞で 2 枚計測する。

8. 結果の判定

Net nuclear grain の上昇で判定する。(Net nuclear grain)=(nuclear grain)-(cytoplasmic

grain)。陽性の判定の絶対値は設けない。各研究室で陰性対照群の累積対照値と比べて、あるいは統計学的に判定する。用量と処置時間について 1 群でも上昇したら陽性とする。

おわりに

以上の Recommendations は Mutation Research の特別号として今年中に出版される予定である。また既報の 131 物質の "*in vivo* 肝 UDS" について、動物の種、系統、雌雄、投与経路、用量、処置時間、1 群の動物数、試験結果、文献が付表として一緒に出版されるので活用して欲しい。

Environ. Mut. Res. Commun., 16: 165-171 (1994)

特別企画

第 22 回大会トピックス

「変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点:
メルボルン国際ワークショップの報告を中心に」

げっ歯類の赤血球を用いる *in vivo* 小核試験

In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay

須藤 鎮世¹, 林 真², 島田 弘康³

Sutou, S.¹, M. Hayashi² and H. Shimada³

¹伊藤ハム株式会社中央研究所, 320-01 茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘 1-2, ²国立衛生試験所,
158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1, ³第 1 製薬株式会社開発研究所,
134 東京都江戸川区北葛西 1-16-3

¹Central Research Institute, Itoham Food Inc., 1-2 Kubogaoka, Moriya-machi, Kitasoma-gun,
Ibaraki 302-01, Japan, ²Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic
Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan, ³Drug Safety Research
Center, Developmental Research Laboratories, Daiichi Pharmaceutical
Co., Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan

(受付: 1994 年 1 月 17 日; 受理: 1994 年 1 月 17 日)

Summary

After comparison of micronucleus assay guidelines, the In Vivo Micronucleus Assay Working Group tried to construct a practical, scientifically based, and internationally harmonized protocol. The main points of agreement are the following. Micronuclei may be scored in immature erythrocytes in either bone marrow or peripheral blood in the mouse, or in any other species in which the spleen does not remove micronucleated erythrocytes. In general, available data suggest that the use of one gender is adequate for screening. However, if there are significant differences in the toxicity, pharmacokinetics or metabolism of the compound between males and females, then both sexes should be used. The size of the experiment, i.e., number of animals per group and the number of cells per animal, should be based on statistical considerations. No unique treatment schedule can be recommended. Samples from extended dose regimens are acceptable if the result is positive, or, for a negative study, if toxicity has been demonstrated, or the limit dose (maximum testable) has been used and dosing continued until the time of sampling. The highest dose tested should be based on mortality, bone marrow cell toxicity, or clinical symptoms of toxicity.

Keywords: rodent erythrocyte; micronucleus; international harmonization

1. はじめに

1993 年 2 月 27~28 日にメルボルンで行われた変異原性試験法の国際的標準化のためのワークショップのうち, *in vivo* 小核試験について述べる。骨髄細胞を用いる染色体異常試験も討論の範囲内にあったが、多くの時間が小核試験に割かれ

たこと、小核試験が主流であることから、ここでは触れない。招待討論者の氏名、所属を Table 1 に示す。このほか関係者数十名が陪席し、討論に参加した。本会議に先立ち、1992 年 12 月 7~8 日、東京においてその準備会議 (Sofuni, 1993) が開催され、前提条件の相互理解や問題点の整理が

Table 1. Invited discussants

| |
|---|
| Makoto Hayashi (chair person) |
| Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Hygienic Sciences, Japan |
| Ray Tice (vice-chair person) |
| Genetic Toxicology Program, Integrated Laboratory System, U.S.A. |
| James T. MacGregor (rapporteur) |
| Toxicology Laboratory, SRI International, U.S.A. |
| Diana Anderson |
| BIBRA Toxicology International, Canada |
| David H. Blakey |
| The Department of National Health and Welfare, Canada |
| M. Kirsh-Volders |
| Laboratory for Anthropogenetics, Free University of Brussels, Belgium |
| Frederick B. Oleson Jr. |
| BIOGEN, U.S.A. |
| Francesca Pacchierotti |
| Division of Toxicology, ENEA CRE Casaccia, Italy |
| Felix Romagna |
| Sandoz Pharma Ltd., Switzerland |
| Hiroyasu Shimada |
| Daiichi Pharmaceutical Research Center, Japan |
| Shizuyo Sutou |
| Itoham Central Research Institute, Japan |
| Bernard Vannier |
| Roussel Uclaf, Division Scientifique, Département de Toxicologie, France |

なされた。前もって討論者には資料が配布されており、合意は容易に達せられるものと予想された。しかし、実際に会議を開いてみると、あらゆる項目についてまるで振出しに戻った感があり、2日間の会期では到底議論は尽くせなかった。したがって、最終報告書(Hayashi, et al., 1994)の作成にあたっては、ファックスによる交信が数ヶ月にわたって行われた。また、統計に関する議論は別途、国際会議がもたれ、報告書(Adler et al., 1994)が作成された。この統計に関する議論も含め、他の代表的ガイドラインと比較検討しつつ、ここに報告する。以下、メルボルンのガイドラインは Mel ガイドと略す。

2. 比較するガイドラインとその特徴

日本の変異原性試験ガイドラインで小核試験が関与するのは、厚生省、農水省、通産省のそれで、労働省は対象外となる。代表として厚生省の医薬品を対照としたガイドライン(MHW, 1989)をとりあげる。いわゆる3点セットの1つである。ガ

イドラインには本文の他、注記があり、さらに解説がある。解説を含めてひとつとみなす。以下、日本ガイドと略す。

OECD のガイドライン(OECD, 1983)は一般化学物質が対象で、日本で言えば、通産省(厚生省、環境庁も含む)の化審法に相当する。1992年11月から12月にかけて大幅に修正された(OECD, 1992)。以下、OECD ガイドと略す。

イギリスのガイドライン(UKEMS, 1990)は政府の委託により、イギリスの変異原学会がまとめた。あらゆる化合物に適用出来るよう工夫されている。段階的に行う方式で、小核試験は第2段階で行うことになる。要すれば、解説文(須藤, 1992)を参照されたい。以下、UK ガイドと略す。

アメリカでは医薬品に対するガイドラインはなく、個別対応となっている。その他諸々の物質は概して環境庁の管轄となる。考え方については報告(Dearfield et al., 1991)があり、小核試験の実際については官報(1991)に記載されている。

3. 表題について

In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay という最終報告書(Hayashi et al., 1994)の表題は、Mel ガイドの特色をよく表しているので多少の解説を加える。*In vivo* は動物個体を用いるという意味で、培養細胞などを利用した *in vitro* 試験ではないことを示す。rodent は背景データがあればどのげっ歯類でもよく、マウスやラットを推奨するものではない。ただし、結果として、蓄積データが多く、日頃頻用されているこれら2種が選択されることになろう。Erythrocyte は血球を利用することを示し、肝細胞、胎仔、腸管上皮などを利用した他の小核試験とは異なることを意味する。血球のうち実際に利用されるのは、骨髓小核試験にあっては多染性赤血球(PCE)、短期末梢血小核試験にあっては網状赤血球(RET)、長期末梢血小核試験にあっては成熟赤血球(NCE)が観察対象となりうる。

4. Mel ガイドの比較検討(Table 2)

1) 動物種

Rodent の意味については上述した。他のガイ

Table 2. Comparison of guidelines

| Items | Melbourne | Japan | OECD | UK | USA |
|---------------------------|---|------------------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|
| Species | common rodents (mice & rats) | mice (rats OK) | mice (rodents) | mice or rats | mice (rodents) |
| Strain | no preference | 0 ^a | b | 0 (on MS/Ae) | - |
| Sex | 1 (2 if differ between M & F) | 0 | ≥3 M, ≥3 F | 0 | ≥5 M, ≥5 F |
| Age (weeks) | H.S.M.Y. ^c , adults | - | H.Y. adults | 6-12 mice, 8-12 rats | Y. adults |
| Housing | G.A.H.P. ^d ; diet and water, free | - | 0 | 0 | - |
| Animal/group | 5 (min. 4) | ≥5 | ≥6 | 7-10 | ≥10 |
| Dose Groups | 3 (1, the limit dose if non-toxic) | 0 (-) | 3 | depend on purpose | depend |
| Preparation | just before use (if no data) | - | - | 0 | 0 |
| Vehicle | water or isotonic saline, or isotropic vehicle (e.g., veg. oil) | 0 | 0 | isotonic saline | 0 |
| Route | po or ip (others if justified) | 0 | 0 | po > ip | 0 (O) |
| Dosing times | 1 (2 BM ^e , 24, 48; 2 PB ^f , 48, 72) 2 (BM, 18-24; 1 PB, 36-48) and 14 ^g sampling >14 | 1, 1, 18-30; or g 0 (-) | 1-2, 2, 12-48 ≥3, 1, 24 multi. (if need), 1, 24 | 1, 2, 24-30 & 48 ≥2, 1, 24 | 1, 3, 12-72 ≥2, 1, opt. or 24 |
| Top dose: toxic non-toxic | MTD 2.0/kg (14 ^g), 1.0/kg (>14) | 0 2.0/kg | 0 0 | 0 2.0/kg | 0 5.0/kg |
| Cells to analyze | mice: 4 w ^h , immature erythro. >4 w, mature erythro. rats: immature erythro. in BM | BM | BM | BM | BM |
| Dosing volume | - | - | 10 ml/kg (max 20) | 10 (ip, iv), 20 (po) | - |
| Staining | Giems or fluorescence | 0 | - | 0 | - |
| Counting | 2000 (PCE, 200 BM, 1000 PB) | ≥1000 (200 BM) | ≥2000 (1000 BM) | ≥1000, more if needed | ≥1000 (200 BM) |
| Negat. control | concurrent vehicle cont. 0 time sample for short PB test | 0 | 0 (2 for 2; non-treat.) ^h | OECD type | 0 |
| Detection | (0.05%, 80%, x2) | - | - | (reference table) | - |
| Statistics | think also biological meaning | needed | 0 | (reference book) | 0 |
| Treatment of results | historical data, trend, pair wise | historical, needed useful | historical, needed | OECD | approp. method |
| Repeat test | if equivocal | - | not always | if needed | (reproducibility) |

^a, Same or almost same as 'Melbourne'. ^b, No description. ^c, Healthy sexually-matured young. ^d, Good animal husbandry procedure. ^e, BM: bone marrow; ^f, PB: peripheral blood.

^g, One sample between 18 and 30 h or several samples between 24 and 72 h. ^h, Two negative controls for a two sampling regimen. Non-treatment control for a special vehicle.

ドライインでは原則としてマウス、マウスあるいはラット、マウスあるいは他のげっ歯類という表現をとり、優先順位がみられる。

2) 系統

UK ガイドでは高感度マウス（例、MS/Ae）について言及している。すなわち、遺伝毒性の同定（hazard identification）にはよいが、機構が不明なので安全性評（risk assessment）には不適としている。Mel ガイドその他では系統を選ばない。

3) 性

これについては多くの討論がなされた。完全に合意が得られたわけではないが、最終的に、定性的に雌雄差がないというデータに基づき、原則として一方の性を用いればよいとされた（毒性その他で明らかに性差が認められれば、両性を用いる）。

一方の性のみでよいとする論拠は、片方の性のみで陽性となる物質はほとんどないというデータと、使用動物数がほぼ半減するということである。両性の使用を主張する論拠は、雌雄間で反応に差を示す物質が多少あれ存在すること、小核試験は簡単で信頼のおける方法だから、多くのデータを取っておくべきであるとするものである。これは安全性評価に一步踏み出した考え方といえよう。

日本ガイドは原則として雄、UK ガイドは一方の性、OECD ガイドと USA ガイドとは両性である。性に関する論議で、両者相談らずの状況が OECD ガイドの改訂のいきさつに述べてあるが、類似の状況がメルボルンでもみられた。

4) 動物の齢

日本ガイドでは特に記載は無いが、若い成獣（USA ガイド）、健康で若い成獣（OECD ガイド）、健康で性的に成熟した若い成獣（Mel ガイド）と表現に差がある。具体的にはマウスで 6~12 週齢、ラットで 8~12 週齢（UK ガイド）といふところか。ただし、JEMS・MMS の共同研究の結果によれば、マウスの自然発生小核頻度は生涯をおして、著変は認められないで、実際には特に

若くとも、健康な成獣であれば実際には差し支えないようだ。

5) 動物の維持管理

ガイドラインにより記載の有無がある。Mel ガイドでは標準飼育法に従えばよく、試験前の絶食は生理的に変調をきたすので、不要とされた。

6) 群あたりの匹数および観察細胞数

議論が多かった。これは単独に論すべき問題ではない。個体あたりの観察細胞数とともに、自然発生頻度に比べ何倍の小核を誘発する物質を、何%の有意水準で、何%検出するかを定める必要がある。Mel ガイドでは小核を 2 倍増加させる物質を、5% の有意水準で、80% 検出しようという設定で、1 群 5 匹（最低有効匹数 4）と決められた。1 匹あたりの観察細胞数は 2000 である。2000 という数値には小核頻度 0 という、検定上好ましくない事態を避ける意味がある（Adler *et al.*, 1994）。

日本ガイドでは 1 匹 1000 個以上で 1 群 5 以上（雄）、UK ガイドでは 1 匹 1000 個以上で 1 群 7~10 匹（片性）、USA ガイドでは 1 匹 1000 個以上で 1 群 5 匹以上（雌雄）、OECD ガイドでは 1 匹 2000 個以上で 1 群 3 匹以上（雌雄、雌雄間に有意差がなければデータを合わせてよい）である。

7) 投与群数と最高用量

日本ガイド、OECD ガイド、Mel ガイドともに 3 群としているが、これは用量相関がみられるよう配慮したためである。ただし、Mel ガイドでは全く毒性が無い場合、限界用量 1 群でよいとしている。ここで、限界用量とは、2 週以下の投与にあっては 2 g/kg、2 週を超える場合には 1 g/kg である。UK ガイドや USA ガイドでは群数は特定されず、試験の状況に応じて変えることになる。また、USA ガイドでは限界用量は 5 g/kg である。

毒性がある場合の最高用量は最大耐量（MTD、maximum tolerated dose）で、これは予備試験により決める。他のガイドラインも同様である。

8) 媒体と検体調製

水や生理食塩液に溶ければ溶かすが、不溶であれば、植物油その他、適当な媒体を用いる。他のガイドラインも同様である。安定であるという証拠がない限り、用時調製とする。

9) 投与経路

経口または腹腔内とし、正当な理由があれば他の経路でもよい。UK ガイドのみが、腹腔内よりは経口を優先させているのが注目される。

10) 投与液量

OECD ガイドでは 10 ml/1 g、最高で 20 ml/kg とされ、UK ガイドでは腹腔内と静注では 10 ml/kg、経口投与では 20 ml/kg とされるが、他のガイドラインには記載がない。

11) 投与回数と対象細胞のサンプリング

これは Mel ガイドの大きな特色をなす。他のガイドラインが 1~2 回、多くても数回の投与を想定し、骨髄細胞の観察を前提にしているのに比べ、末梢血も対象にされているからである。ただし、末梢血が利用できるのは脾臓による幼弱赤血球の捕獲がない場合に限られるので、マウスは対象となるが、ラットは対象たりえない。

1 回投与では骨髄では 24 と 48 時間目、末梢血では 48 と 72 時間目に 2 回標本をとる。2 回以上 14 回までの投与では骨髄では 18~24 時間に、末梢血では 36~48 時間に 1 回標本をとる。14 回以上の投与では骨髄では 18~24 時間に、末梢血では 24~48 時間に 1 回標本をとる。投

与が 4 週間以下の場合は PCE あるいは RET を観察対象とするが、これを超えた長期投与にあっては、PCE と NCE とが平衡に達するので、NCE を観察してもよい。

12) 染色法

ギムザ染色あるいは蛍光染色である。実際にには、ラット骨髄のマスト細胞由来の顆粒はギムザ染色で小核と識別し難く、また、マウス末梢血での観察の容易さから、蛍光染色が推奨される。

13) 隆性対照

媒体を隆性対照とする。OECD ガイドや UK ガイドでは、特殊な媒体を利用する場合、無処理対照もとるよう指導している。これらのガイドラインでは、サンプリングが 2 回にわたる場合、その都度、隆性対照が必要となる。

Mel ガイドで特徴的なのは、短期投与試験の末梢血法においては隆性対照をとる必要がなく、投与前のサンプルをもって隆性対照に代えることができる点である。

14) 統計処理

ガイドラインの多くは、結果につき適切な統計処理を施す、と述べるにとどまる。Mel ガイドでは試験計画が統計的考察により規定されている（6 項参照）。ただし、統計は万能ではなく、生物学的考察を加えよとしているのは、OECD ガイドや USA ガイドと同じである。

さて、具体的手法については Fig. 1 に示した。まず、現隆性対照が背景データの平均 ±3×標準

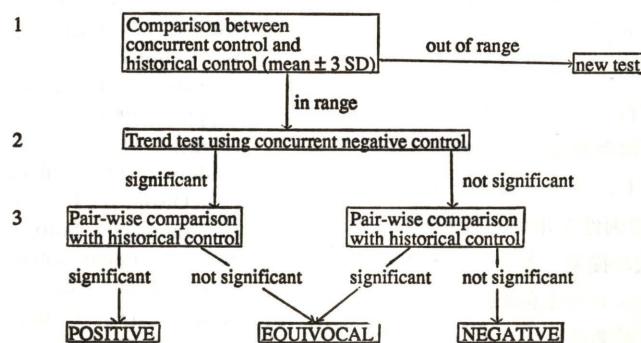


Fig. 1. Strategy of statistical evaluation of the test data.

偏差に収まるか否かを検証し、試験が成立するか否かを確かめる。不成立なら再試験である。成立すれば、トレンド検定を行い、さらに各対別の有意差検定を行う。トレンドで有意差がみられ、対別でも有意であれば、結果は陽性を判定する。ともに陰性であれば、結果も陰性と判定される。しかし、トレンドと個別検定が相反する場合、結果は不確定と判定され、再試験を余儀なくされる(Adler *et al.*, 1994)。

5. 問題点

1) 雌雄の問題

小核試験に限らず全試験項目をとおして、主たる目的は遺伝毒性の同定(hazard identification)であり、安全性評(risk assessment)は副次的である。ただし、安全性評価は遺伝毒性の同定があつて初めて成り立つ。さて、遺伝毒性の同定を目的とし、蓄積データに基づき判断するならば、一方の性を用いればよいという結論になる。両性を用いることには、毒性試験その他従来の因襲が念頭にあること、仮定された例外事例をも捕らえようとしてすること、および安全性評価への一助にしようという側面がある。

2) 2種問題

生物が異なるれば反応が異なることは当然予期されることである。実際、文献からデータを集めると、マウスで陽性、ラットで陰性、またその逆の事例がみられる。まず、その事実が確認される必要がある。これは用いた被験物質の製造元やロットにより、陰性陽性が逆転することがあるからである。さらに、技術レベル、染色技術、顕微鏡の性能その他の要因により、誤った結果を招来する可能性があるからである。

しかし、確認試験を行っても、種差はみられるであろう。文献データは雌雄差よりは種差が大きいことを示した(ただし、データはまだ不十分である)。そこで、1種で両性を用いる代わりに、2種で1性を用いる方式が提案された。この背景には、マウスで発癌、ラットで非発癌、またその逆の事例が見られることがある。

この議論を押し進めると、経口と腹腔内投与と

で差のある物質があるので、1種を用い雄では経口、雌では腹腔内投与という案のほうが、2種1性より有効と思われる。このようにして例えば2種、雌雄、2経路で試験をしたとき、1種、1性、1経路で試験をしたときに比べ、遺伝毒性の同定においてどれほど有意な情報が得られるのであろうか。コストパフォーマンスの観点から、また、簡便で信頼性が高いという小核が泣く。

ある程度の種差、性差、経路差は存在することをまず認識しておく。そのうえであるプロトコールに従い小核試験をまず実施する。何らかの疑義があれば、実験条件を変えて再試験を行うということだろう。UKガイドは種差があるからといって2種を用いるのは当たらないとしている。

3) 長期投与と短期投与とは等価か

MEIガイドの大きな特徴は長期投与による小核試験が認められたことである。MTDで1~2回投与すると、より低い用量で長期間投与することでは本質的な差が出てくる可能性がある。投与経路として同じ経口でも、強制経口と混餌法とでは自ずから異なる。蓄積性や薬理作用の効果も大きいだろう。飲料水とともに与える場合、水溶性でかつ安定でなければならない。さらに一般化するためには、より多くの研究者が本法を試み、理解を深める必要があるだろう。そして、長期投与と短期投与とは等価か、傷害の同定よりは安全性評価に適した試験ではないかといった疑問に、より多くのデータをもって答える必要があるだろう。

参考文献

- 1) Sofuni, T. (organizer) (1993) International Work shop on Standardization of Procedures in Genetic Toxicology, MMS Commun., Suppl. 2, 1993.
- 2) Hayashi, M., R. Tice, J. T. MacGregor, D. Anderson, D. H. Blakey, M. Kirsh-Volders, F. B. Olson, Jr., F. Facchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou, and B. Vannier (1994) *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutat. Res. (in press).
- 3) Adler, I.-D., J. Bootman, J. Favor, M. Hayashi, G. Hook, G. Schriever-Schwemer, G. Welzl, E. Whorton, and I. Yoshi-mura (1994) Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests, Mutat. Res. (in press).
- 4) Notification No. 24 of the Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, Japan, Sept. 11, 1989.
- 5) OECD guidelines for testing of chemicals: Genetic toxicology: Micronucleus test. No. 474 (Adopted 5/26, 1983).
- 6) OECD consultation meeting of experts on genetic toxicology test methods. Chairman's report, London, 11/30-12/2, 1992.
- 7) UKEMS Sub-committee on guidelines for mutagenicity testing (1990) Report, Part I revised: Basic mutagenicity tests: UKEMS recommended procedures, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 8) 須藤鎮世(1992) 英国における遺伝毒性試験法の基本的考え方、変異原性試験、1, 53-59.
- 9) Dearfield, K. L., A. E. Auletta, M. C. Cimino, and M. M. Moore (1991) Environmental Protection Agency's test approach for mutagenicity, Mutat. Res., 258, 259-283.
- 10) Federal Register, Section 798.5398, 1/1, 1991.

第 22 回大会トピックス

「変異原性試験法の国際的標準化の現状と問題点:

メルボルン国際ワークショップの報告を中心に」

ICH (薬事規制の調和のための国際会議) について

International conference on harmonisation of technical requirements
for registration of pharmaceuticals for human use

菊池 康基

Yasumoto Kikuchi

武田薬品工業・医薬開発本部 532 大阪市淀川区十三本町 2-17-85

Report from Genotoxicity Symposium on ICH 2

Yasumoto Kikuchi, Pharmaceutical Development Division, Takeda Chemical Industries
Ltd., 2-17-85 Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

(受付: 1994 年 1 月 21 日; 受理: 1994 年 1 月 21 日)

Summary

Genotoxicity Expert Working group in ICH was discussed 11 issues related strategy and test performance of genotoxicity test guidelines for international harmonisation. Most of them were harmonised. However, some issues such as *in vitro* mammalian gene mutation assays and core test battery have still been under discussed.

Keywords: genotoxicity, harmonisation**1. ICH とは**

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) は、医薬品の製造承認申請に必要な品質、安全性、有効性の 3 分野について、日米欧 3 極の行政 (MHW, FDA, EC) と業界 (JPMA, PMA, EFPIA) が協力して、規制の調和を図るために 1991 年より 2 年毎に開催されている。この第 2 回会議 (ICH2) が、1993 年 10 月 27~29 日にフロリダ州 Orlando で、1600 名の参加者のもとに開催された。

安全性に関しては、癌原性試験、遺伝毒性試験及びトキシコキネティクスの 3 テーマについてシ

ンポジウムが行われた。遺伝毒性試験については、1992 年より Expert Working Group (EWG)において検討されてきたので、その内容を中心に報告する。

2. Expert Working Group

ICH2 の本会議に先立ち、10 月 25, 26 日の両日、EWG の premeeting を開催した。それまでの会議で 11 の検討項目のうち 6 項目について合意が得られていたが、この会合で更に 2 項目の合意に達し、残るは下記 I.A, I.C, 及び I.F の 3 つとなった。以下、各項目について、これまでの EWG 会合における議論を概説する。

現住所: 株式会社ラビトン研究所 大阪医薬品臨床開発研究所 565 豊中市新千里東町 1-4-2

Present address: Osaka Clinical Research Organization for Medicaments, Rabiton Institute Inc., 1-4-2 Shinsenri-higashimachi, Toyonaka-shi, Osaka 565, Japan

I STRATEGIC ISSUES

I.A *In vitro* mammalian cell gene mutation (MCGM) 試験の有用性

MCGM 試験の有用性は EWG の会議を通じ最も時間をかけて議論された。遺伝子突然変異について、哺乳動物の細胞を用いて評価することが重要であり、試験系として多少問題があつても、感受性の高い mouse lymphoma assay を使用すべきである、というのが欧米の行政の意向であった。これに対し日米欧の業界と厚生省は、mouse lymphoma assay は sensitivity は高いけれども specificity が低いこと、ルーティン試験として実施するには、未だ手法に問題があることなどを指摘し、結論には至らなかつた。これに関しては、I.F の項でもう一度ふれる。

I.B 大腸菌の試験

合意内容は、細菌を用いる復帰変異試験では、指示菌株として、*S. typhimurium* の ① TA98; ② TA100; ③ TA1535; ④ TA1537 or TA97 or TA97a; ⑤ TA102 or *E. coli* WP2uvrA or WP2uvrA (pK101) の 5 菌株とする、ことであつた。

I.C 試験実施のタイミング

欧米と日本とでは臨床試験 Phase I のやり方に相違があり、また他の毒性試験との兼ね合いもあり、本 EWG のみで結論を得るのは難しい、ということで意見が一致した。この問題は毒性試験全体の問題として ICH3 のテーマとすべきであり、本 EWG としてはこの項目を削除することになろう。

I.D *In vivo* 染色体試験と小核試験の同等性

小核試験が果たして染色体異常試験の代替といえるのかという指摘が FDA から出されたが、同等性については全く問題がない、ということで同意に達した。

I.E *In vitro* 陽性時の評価法

In vitro 試験で陽性結果となった場合に、どのような試験を追加実施するかは、その医薬品の特性を考慮して、ケースバイケースで対応する、ことで合意した。

I.F 最小の試験の組み合わせ

6 月の EWG 会議では、core test battery として、① 細菌による復帰変異試験または培養細胞による遺伝子突然変異 (MCGM) 試験、② *in vitro* 染色体試験、③ *in vivo* 細胞遺伝学的試験、の 3 試験の組み合わせと、MCGM 試験を独立させた 4 試験の組み合わせとが提案された。直前の EWG 会議では core test battery として、厚生省と日米欧の業界は 3 試験方式を主張したのに対し、EC と FDA は MCGM 試験を加えた 4 試験方式を提唱し、結論には至らなかつた。

II TEST PERFORMANCE

II.A Toxicokinetics (TK)

マウスにおける小核試験と骨髓染色体試験を対象に議論した。一般論として、変異原性試験のように、ある限られた情報のみを得るような試験においては、反復投与毒性試験並の TK の手当は不要ということで意見は一致した。PMA と JPMA で行ったラット及びマウスの骨髓中濃度と血漿中濃度の調査結果を基に、直前の EWG 会議では、*in vitro* 試験で陽性結果が得られ、かつ *in vivo* 試験で陰性の場合には、① 血液（血漿）または骨髓中濃度、② Autoradiography, ③ PCE/NCE ratio の変動など毒性兆候、のいずれかのデータがあればよい、ということでおいた。

II.B *In vitro* 試験の反復実施

いずれの試験においても、clear negative または clear positive の場合には、① 用量設定試験の最高用量で genetic endpoint が評価されている、② 構造的に問題がない、③ 試験条件に質的な問題がない、④ 用量範囲が陽性結果を見逃すことのないように設定されれば、再試験の必要はない、との合意に達した。

II.C 沈澱物の試験

用量設定試験において高用量としては、まず、細菌試験では 5 mg/plate、培養細胞では 5 mg/ml または 10 mM とする。もし、これらの用量で毒性が無ければ、沈澱が析出する最低用量を用いる。また、不溶濃度範囲で用量依存的に毒性が現れたならば、最高用量は溶解性とは関係なく、毒性をベースに決定する。析出の

程度は試験結果に悪影響を及ぼしてはならない、との内容で合意した。

II.D 培養細胞を用いる試験の最高用量の設定

染色体試験の毒性の上限は細胞増殖の 50% 以上の抑制、またリンパ培養では mitotic index の 50% 以上抑制とする、MCGM 試験の毒性の上限は陰性対照に比べ生存率が 20% 以下の減少とする、ことで合意した。

II.E 小核試験における両性使用

欧米では両性を用いるよう求めており、雄のみでよいとする日本のガイドラインとの差をいかにクリアーするかが大きな問題であった。毒性試験であるならば雌雄の使用は当然であるという考えが欧米の EWG member では支配的であったが、最終的には日本で行われた共同研究の成果が、正当に評価され、次の内容で合意を見た。即ち、雌雄のげっ歯類の間に毒性の明白な差異がある場合を除き、雄のみの使用で十分である。一方の性のみに使用する医薬品については、その性について試験する。

3. Symposium

10 月 28 日に行われた Symposium では、Rapporteur の Dr. 祖父尼（国立衛試）がこれまでの EWG における討議の経緯を説明の後、3 人の演者の発表があった。Dr. Muller (EC) は MCGM 試験の有用性が高いことから、この試験を core battery に組み入れるべきであるとの EC の主張を展開した。Dr. Tweats (EFPIA) は *in vitro* 試験で陽性結果が得られた場合の追加試験の選択基準の基本的考え方について、Dr. Probst (PMA) は試験の手法に関する 6 項目の主要な論点について紹介した。

引き続いて行われた Panel Discussion では、Dr. 祖父尼の司会のもと、焦点を小核試験と、試験の組み合わせの 2 つに絞って、以下の討論が行われた。

即ち、Dr. 林（国立衛試）はマウス小核試験では、雄のみの使用で十分であること、及び小核試

験の clastogens の検出力は骨髓染色体試験と同等であることを論じた。また小核試験の toxicokinetics に関し、Dr. Probst と菊池はラットでの薬物の骨髓中濃度は低い場合でも血漿中濃度の約 20% であり、調べた薬物では全て骨髓に分布していること、更に菊池はマウス（2 例ではあるが貴重な資料である。PMA ではみつけられなかった）でも薬物の骨髓中濃度とその経時的推移はラットと極めて類似していることを示し、小核試験では骨髓中濃度を測らなくても、血漿中濃度の測定で十分であると論じた。

次に、core test battery について Dr. Schechtman (FDA) は MCGM 試験を含む 4 試験が必要であるとの FDA の見解を披瀝した。これに対し菊池は MCGM 試験の問題点を指摘して、core battery には厚生省ガイドラインの 3 試験で十分であり、MCGM 試験は二次選択の試験にすべきとの JPMA の考え方を述べた。

4. 今後の見通し

以上のように、test performance の 5 項目は一応の合意に達したが、strategy に関する 6 項目中の 3 つについてはなお合意は得られなかった。このうちの 1 つは試験実施のタイミングについてであり、この項目は安全性全体の問題として、ICH3 のテーマに取り上げて、その上で幅広く議論するのが適切と考えられる。残りの 2 つは core battery に関する事で、MCGM 試験を core battery に入れるか入れないかで意見が分かれている。更に議論を重ねることにより、何とか合意点（例えば、6 月の会議で提案された 3 試験方式、または core battery の項目をはずして合意された項目だけまとめるなど）に到達して、1994 年 3 月の東京での準備会議までに Guideline 化を達成することになるものと考えられる。いずれにしても、ICH の Guideline として承認された場合には、行政はこれに従って国内の Guideline の改正を行うことになるので、今後共関係者の協力をお願いすることになろう。

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。
- 第8条 評議員会は会員を代表し、事業計画、経費の収支、予算決算およびその他の重要事項について審議する。
- 第9条 本会は年1回総会を開く。
総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。
- 第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。
会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。
- 第11条 本会の事務は暦年による。
- 第12条 本会に名誉会員をおく。
- 附記
1. 本会則は平成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 |

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」などを掲載する。なお、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を使う場合は、下記の原稿送付先まで請求する。
4. 報文の送り先
論文原稿は正 1 部コピー 2 部の計 3 部を、日本環

境変異原学会学長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：

〒158 東京都世田谷区用賀 1-18-1
国立衛生試験所 変異遺伝部
祖父尼 俊雄
TEL 03-3700-1141
FAX 03-3700-2348

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の許可があった場合には、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、著作者が自分の記事、論文などの一部を複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著作者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて申し出を行い、許諾を求めなければならない。
6. 校正
著者校正は原則として原稿に対する誤植の訂正に限る。原稿にない加筆・変更をしないこと。
7. 著者負担金
1) 投稿論文は、組版代の一部負担金として刷り上がり 1 頁につき 2,000 円を著者が負担す

- る。また規定の頁数を越えた分については、超過頁分についての実費は著者負担とする。
2) カラー印刷等特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。
3) 別刷りは著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申し込み書に 50 部単位で申し込むこと。

環境変異原研究執筆規定

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

日本文の場合：原稿は A4 版用紙に 1 行 22 字、1 頁 20 行で印字する（刷り上がりの 1/4 頁に相当する）。また、別に英文の題名、著者名、所属機関名所在地ならびに要約（300 語以内）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。一行打字数は約 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. 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。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。

6. 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。
7. 句読点はカンマ（,）およびピリオド（.）とする。
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) 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ってする。
12. 引用文献は筆頭著者名のアルファベット順に配列し、雑誌の省略名は Chemical Abstracts の記載方法に従う。記載順序は著者氏名、年号、題名、雑誌名、巻、頁（単行本の場合は著者氏名、年号、題名、編者名、書名、発行所、発行地、頁）の順とする。文献の記載方法は下記の例に従う。

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

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

藤川和男、梁 治子、近藤宗平 (1984) ハエの翅毛スポットテスト—近ごろ注目される短期試験法、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 | <input checked="" type="checkbox"/> | | |
| 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) | | |
| | (英) | | |
| 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 | |
| 大学院 | 課程 | 学校名 | 会学取修了年次 | |
| 学位 | | | | 取得年 |
| 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) <input checked="" type="checkbox"/> | | | | |
| 入会申込者との関係 (数行ご記入ください) | | | | |

住所・所属等変更届

平成 年 月 日

日本環境変異原学会
事務局 御中

下記変更がありましたのでお届け致します。

| | |
|------|-------|
| フリガナ | |
| 氏名 | 田中 博之 |
| 旧所属 | |

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

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

賛助会員名簿（五十音順）

下記の皆様に日本環境変異原学会の賛助会員となって頂き、
学会活動にご協力頂いております。

家田貿易株式会社
 エスピー食品株式会社 中央研究所
 大塚製薬株式会社 PMS部
 株式会社化合物安全性研究所
 株式会社新日化環境エンジニアリング
 株式会社ツムラ ツムラ中央研究所
 株式会社東京エム・アイ商会
 株式会社ナード研究所
 株式会社ノエビア 滋賀中央研究所
 キヤノン株式会社 化学安全部
 三光純薬株式会社
 サンド薬品株式会社テクノパーク大穂 筑波総合研究所
 シオノギ製薬株式会社
 システムサイエンス株式会社
 正晃株式会社
 大正製薬株式会社 総合研究所安全性研究部
 大鵬薬品工業株式会社 製薬センター安全性研究所
 田辺製薬株式会社 研究開発企画センター
 帝国臓器製薬株式会社 研究企画部
 帝人株式会社 生物医学総合研究所
 東洋測器株式会社
 内藤環境管理株式会社
 日新製粉株式会社 ヘルスケア新事業室
 日本化学物質安全・情報センター
 日本コカ・コーラ株式会社 学術調査部
 日本たばこ産業株式会社 安全性研究所
 日本たばこ産業株式会社 生命科学研究所
 日本チバガイギー株式会社 研究開発統括
 日本バイオアッセイ研究センター
 ハウス食品株式会社 ソマテックセンター
 藤沢薬品工業株式会社 安全性研究所
 フナコシ株式会社 研究開発部
 三菱化成安全科学研究所 鹿島研究所
 明治製菓株式会社 薬品総合研究所



このS-9は、キッコーマン研究本部で調製されたものです。

変異原性試験用凍結S-9

S-9調製法

家田貿易のS-9は7週令のSDラットの雄に誘導剤としてフェノバルビタール及び5,6-ベンゾフランを腹腔内投与した肝臓から調整したものを標準としていますが、その他の動物種及び誘導剤についても御相談に応じております。

保存

S-9は活性の高い酵素系よりなっており、-80°Cで保存して下さい。まれに解凍後分離がありますが活性には異常ありませんので、よく攪拌して御使用下さい。

●包装単位：1.5ml×12本詰 ●特注品、S-9に関して詰容量は4.5mlまでお受けいたします。

活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

| 分画 | 測定データ |
|-------------------------|--|
| S-9 (9,000×g分画) | タンパク質含量 チトクロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性 |
| ミクロソーム (105,000×g分画) | タンパク質含量 チトクロームP-450含量 |

| 薬物 | 菌株* |
|-----------------|----------------------|
| ベンゾ(a)ピレン | TA-100、TA-98、TA-1537 |
| 2-アミノアントラセン | TA-100、TA-98、TA-1537 |
| 9,10-ジメチルアントラセン | TA-100、TA-98、TA-1537 |
| 自然発生突然変異株数 | TA-100、TA-98、TA-1537 |

* Salmonella typhimurium

エームス試験用凍結S-9MIX

特長

- ①エームス試験がより手軽になりました。
- ②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。
- ③解凍後、直ちにエームス試験にご使用いただけます。
- ④S-9が1mlとコファクターミックスが9ml入っており、20プレート分の試験が可能です。

●包装単位：10ml×8本、5ml×4本

染色体異常試験用凍結S-9MIX

特長

- ①染色体異常試験がより簡単になりました。
- ②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。
- ③解凍後、直ちに染色体異常試験にご使用いただけます。
- ④S-9が1.05mlとコファクターミックスが2.45ml入っており、7プレート分の試験が可能です。

●包装単位：3.5ml×3本

| カタログNo. | 品名 | 包装 | 価格 |
|-----------|-------------------|-----------|---------|
| S-9 | 変異原性試験用凍結S-9 | 1.5ml×12本 | ¥32,400 |
| S-9 MIX | エームス試験用凍結S-9 MIX | 10ml×8本 | ¥43,200 |
| S-9 MIX-5 | エームス試験用凍結S-9 MIX | 5ml×4本 | ¥14,000 |
| S-9 MIXTS | 染色体異常試験用凍結S-9 MIX | 3.5ml×3本 | ¥12,000 |



家田貿易株式会社

東京：〒113 東京都文京区本郷3-14-16 EKビル
TEL.03(3816)2861 FAX.03(3814)5347
大阪：〒564 大阪府吹田市南金田1-14-5
TEL.06(338)1518 FAX.06(338)5626

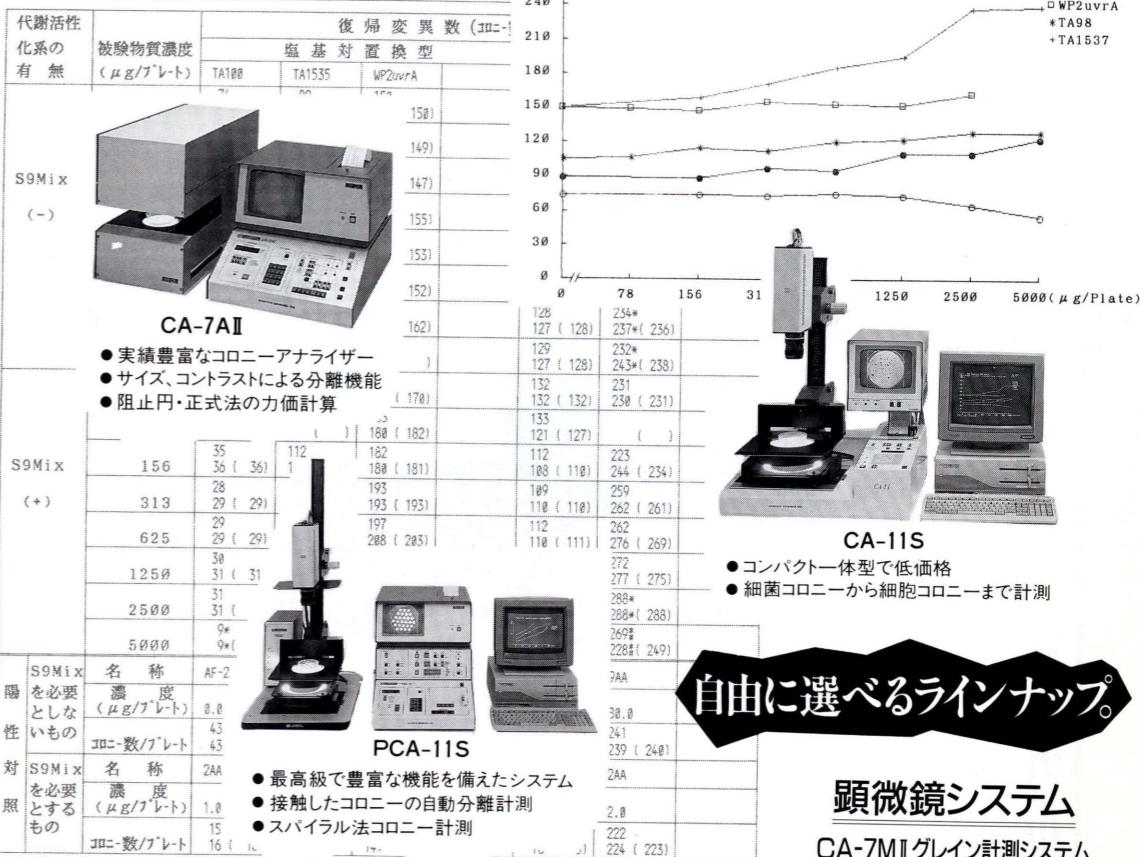
エームステストシステム CA-11・CA-7II・PCA-11

（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。

Fig. 1 Test Substance: TEST
(Colonies/Plate) Dose-response curve (S-9-)

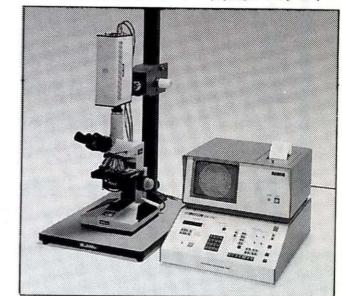
被験物質の名称：TEST



自由に選べるラインナップ。

顕微鏡システム

CA-7M II グレイン計測システム



CA-7M II

(備考) 数値の右の*印は、菌の生育阻害が認められたものです。

数値の右の#印は、菌の沈殿が認められたものです。

■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

■豊富なソフトウエア

■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おります。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)

生命と対話する、

メディカル・メディア。

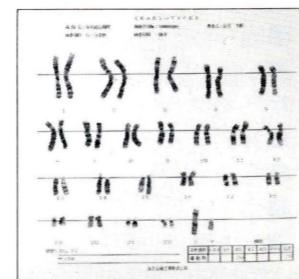
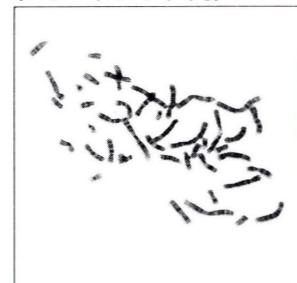


メタフェーズファインディング、オート
カリオタイピング、データ管理のフルシ
ステム。高速・高度・高画質の一歩進んだ
染色体画像解析を簡単操作で行なえます。

■特長

- 一度に6枚までのプレパラートを処理する
高速メタフェーズファインディング。
- 良好なメタフェーズを容易に的確に選べる
25分割評価画面。
- 日本語対話方式とマウス操作で簡単迅速な
カリオタイピング。
- データ登録・検索ができる高度データ管理。
画像データは、光ディスクに保存。
- 100万画素対応カメラと高精度プリンタに
による高画質鮮明画像。

〈プリントアウト例〉



染色体画像解析システム

KARYOVISION
カリオビジョン

住友金属工業株式会社

バイオ・メディカル事業部メディカル部
〒100 東京都千代田区大手町1丁目1番3号 大手センタービル
電話(03)3282-6050(直通) フax(03)3282-6764

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、麻醉前投薬、
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】

1.一般的注意

治療にあたっては経過を十分に観察し、症状に応じ
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、瘙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
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。

③消化器=ときに便秘、下痢、恶心、腹部膨満感等
があらわれることがある。④肝臓=ときにGOT、
GPTの上昇等の肝機能異常があらわれることがあ
る。⑤精神神経系=ときに眠気、まれに不眠、頭痛
等があらわれることがある。なお、他のH₂-受容体拮
抗剤で痙攣があらわれたとの報告がある。⑥その他
=まれに倦怠感、血圧上昇があらわれることがある。

4.高齢者への投与

一般に高齢者は生理機能が低下しているので慎重
に投与すること。

5.妊娠、授乳婦への投与

妊娠中の投与に関する安全性は確立していないので、
妊娠又は妊娠している可能性のある婦人は治療上
の有益性が危険性を上まわると判断される場合にのみ
投与すること。動物実験で乳汁中への移行がみられ
るので、授乳中は授乳させないよう注意すること。

6.小児への投与

小児に対する安全性は確立していない。

7.その他

本剤の投与が胃癌による症状を隠蔽する事がある
ので、悪性でないことを確認のうえ投与すること。

●用法・用量については添付文書をご参照ください。

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

指
アリエタット[®]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

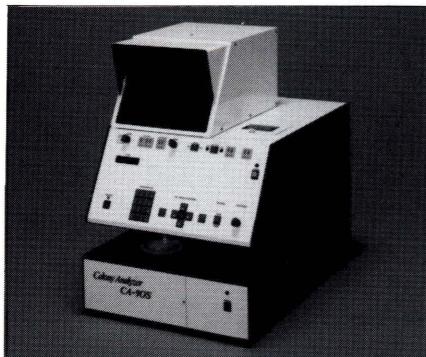
バイオラボラトリーの自動化を目指す東洋測器

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。



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

コロニー計数表示……0～999999
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)
ミニター：268(W)×350(D)×200(H)

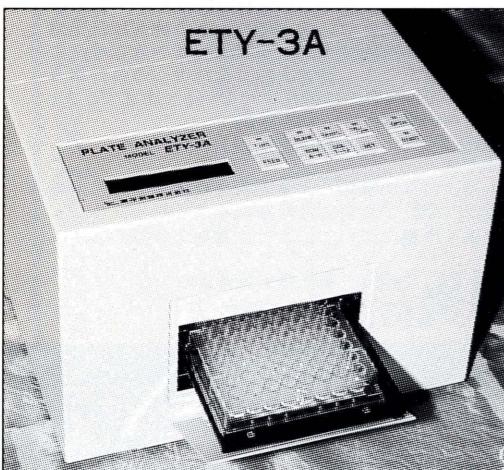
ETY-3A

プレートアナライザ

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

DNA受託合成

研究用

20merカラム精製品 → 16,000円

(納期：約5日間)

[計算例] 20merの合成DNAをカラム精製品として注文した場合

3,000円+(20mer×500円)+3,000円=16,000円

(基本料金) (合成料金) (精製料金)

HPLC精製料金(脱塩済) 10,000円／本

~特注品~

Sオリゴ(アンチセンス) 1mg 10mg
ビオチン.イノシン.デオキシウラシル. DIG. 單光プライマー

コモンプライマー

研究用

(DNA 12mer set)

遺伝子の研究用としてコモンプライマーは、動植物及び微生物に存在する遺伝子(アミノ酸)配列に基づいてデザイン(アルファー法)しています。

プライマーの長さは、酵素反応用として再現性を高めるために、12merと致しました。

コモンプライマーは、ジェノミックタイピング法にもご利用できます。

コモンプライマーセット(0.5OD, 10種類) 価格17,000円

シーケンス例

CMN-A00

A00 ATC AgC gCA CCA
A01 AgC AgC gCC TCA
A02 gCC AgC TgT ACg
A03 TgC CTC gCA CCA

CMN-A20

A20 TTg CCg ggA CCA
A21 gTg ACC gAT CCA
A22 TCC AAg CTA CCA
A23 AAg Tgg Tgg TAT

CMN-A40

A40 gCg gAg gAA CCA
A41 Tgg TAC ggT ATA
A42 gAg CAg gAA TAT
A43 ACT CTT CTA CAA

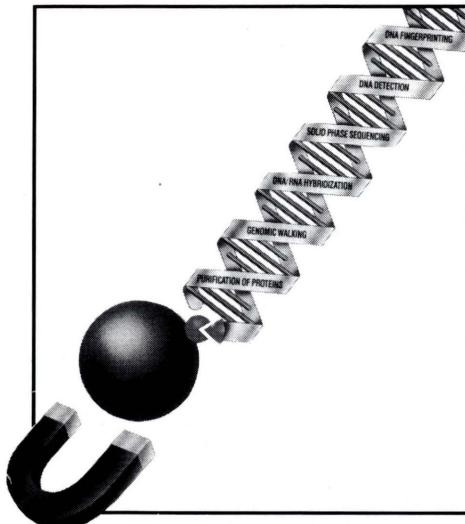
※詳しい資料をご希望の方はお問い合わせ下さい。

BEX 株式会社 ベックス

〒173 東京都板橋区板橋 2-61-14-301
TEL 03-5375-1071(代表) FAX 03-5375-5636

Dynabeads® for Molecular Biology

(ダイナビーズ)



机で使えるダイナビーズ!!
迅速・簡便・綺麗な結果

- DYNABEADS M-280 Streptavidin
- DYNABEADS テンプレート作製キット
- DYNABEADS テンプレート作製スターターキット
- DYNABEADS Oligo(dT)₂₅
- DYNABEADS mRNA精製キット
- DYNABEADS lac Z Vector精製キット
- DIANA

Direct Solid phase Sequencing

増幅したプラスミドあるいはゲノムDNAをDynabeadsに固定したまま、遠心操作なしで簡便に Sequencingを行います。テンプレートの純度が高く、バックグラウンドの低い読みやすいData が得られます。

DNA結合蛋白質の精製

Dynabeadsにビオチン化DNA fragmentを結合したところにDNA結合蛋白質を結合させ磁石で回収します。遠心操作、カラムを利用せず、簡便に高純度の蛋白質を回収できます。回収溶媒量の調製が容易です。

mRNAの精製-固定化cDNAの合成

poly(A)⁺ RNAをTotal RNAあるいは細胞や組織から、直接、短時間で調製できます。さらにビーズにmRNAが結合した状態でビーズ上でcDNAを合成します。合成された固定化cDNAは保存、再使用可能です。

■参考資料をさしあげます。

- Molecular Biology Handbook
 - Dynabeads LETTERS
- MB-1 DNA affinity precipitation Assay
(DNA-Tax 蛋白複合体精製法)
- MB-2 P53のDirect Sequencing
- その他

日本総代理店：

TEL.(03)3435-1558(代表)/FAX.(03)3435-1526

輸入元：日本ダイナル株式会社

製造元：DYNAL A.S.
OSLO, NORWAY

複写される方に

本誌に掲載された著作物を複写したい方は、著作権者から複写権の依託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。

学協会著作権協議会内
日本複写権センター支部
〒107 東京都港区赤坂 9-6-42-704
Phone: 03-3475-4621・5618
Fax : 03-3403-1738

編集委員

| | |
|-----|-------|
| 委員長 | 菊川 清見 |
| 委員 | 石館 基 |
| | 後藤 純雄 |
| | 瀧谷 徹 |
| | 島田 弘康 |
| | 鈴木 潤三 |
| | 林 真 |

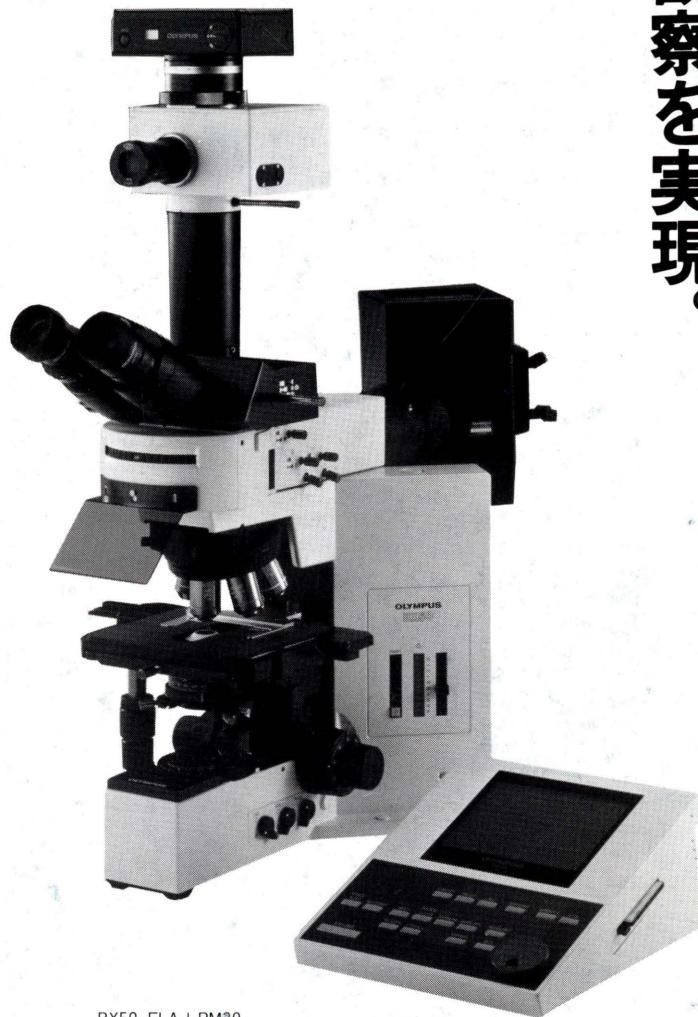
環境変異原研究 第16巻 第1号 1994年

平成6年6月7日 印刷
平成6年6月10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

OLYMPUS

高い解像度、コントラストがより鮮明な
蛍光観察を実現。



BX50-FLA + PM30

落射蛍光顕微鏡
BX
BX50

UV透過率を飛躍的に向上させ、高い解像度と鮮明なコントラストの蛍光観察を実現。独自のUIS光学系により、フラットネスのよい蛍光像を提供。さらに通常の自動露出モードに加え、蛍光専用のオートモードを搭載した写真撮影装置PM30/20との連動を図り、新開発の露出計算アルゴリズムにより、蛍光写真が自動露出で撮影可能になり、すぐれた蛍光観察システムを構築しました。

KSオリエンパス株式会社

〒101 東京都千代田区鍛冶町1-8-3 神田91ビル3F TEL.03-3252-2301㈹ FAX.03-3256-8959