



# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

Vol.16 No.2 1994



# バイオラボラトリーの自動化を目指す東洋測器

## バイオ・マルチスキャナー BMS-400

コロニーカウント { サイズ別ヒストグラム表示  
スパイラルコロニー  
エームテスト、グレインカウント

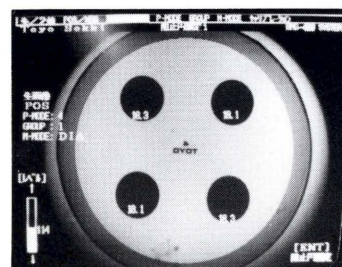
MIC測定 (寒天希釈法による、27菌株の同時測定)

阻止円測定 (4個の阻止円を同時測定)

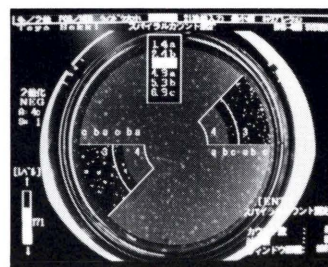
東洋測器のこの1台が すべてを瞬時測定



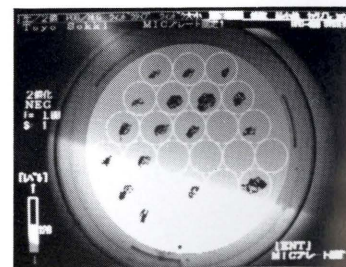
コロニーサイズ別ヒストグラム表示



阻止円直径測定



スパイラルコロニーカウント



MIC測定

**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

環境変異原研究

Environmental Mutagen Research Communications

Volume 16, Number 2 1994

## 目次

### 一般論文

非喫煙者の尿中変異原性の経時変動

遠藤 治, 大久保忠利, 西村義隆, 田辺 潔, 後藤純雄,

石井忠浩, 溝口次夫..... 177

ヒドロキシラジカル捕捉作用を有するビフェニル化合物による紫外線

突然変異抑制効果

藤田しのぶ, 平良淳誠..... 189

エイムス試験に有用な新しいラット肝チトクロム P450 誘導剤

森 幸雄, 飯村和徳, 小西陽一..... 195

Effects of Low-dose  $\gamma$ -Irradiation on the Root Apical Meristem of Barley

Y. Taguchi, N. Tsutsumi, A. Tatara, H. Eguchi and S. Tano..... 205

Ethyl Acrylate is Negative in the Bone Marrow Micronucleus Test Using

BDF<sub>1</sub> Male Mice

T. Hara, M. Katoh, N. Horiya and T. Shibuya..... 211

### 短 報

2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH) から生成する

炭素ラジカルの変異原性

加藤哲太, 福原亜紀, 菊川清見..... 217

Detection of Nongenotoxic Hepatocarcinogens by Immunohistochemical

Staining with Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Monoclonal Antibody

K. Sugimoto, A. Nagahara and M. Kikuchi..... 223

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine による変異の解析

幾田由里子..... 229

### 資 料

エイムス試験で認められるラフ化コロニーの生因について 清水 登, 高坂芳男..... 233

日本学会会議だより (No. 34) ..... 239

### 付記

日本環境変異原学会 会則..... 241

" 平成 6~7 年 役員名簿..... 242

" " 評議員名簿..... 243

環境変異原研究 投稿規定..... 244

" 執筆規定..... 245

日本環境変異原学会入会申込書..... 246

住所・所属等変更届..... 248

賛助会員..... 249

広告..... 250



## 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)  
グンゼ産業株式会社  
コスモ・バイオ株式会社  
システムサイエンス株式会社  
帝国臓器製薬株式会社  
東亜合成株式会社  
東洋測器株式会社 (表2)  
フナコシ株式会社  
株式会社ベックス

## 非喫煙者の尿中変異原性の経時変動

### A time-course study on the urinary mutagenicity of non-smokers

遠藤 治<sup>1</sup>, 大久保忠利<sup>1</sup>, 西村 義隆<sup>2</sup>, 田辺 潔<sup>3</sup>,  
後藤 純雄<sup>1</sup>, 石井 忠浩<sup>2</sup>, 溝口 次夫<sup>1</sup>

Endo, O.<sup>1</sup>, T. Ohkubo<sup>1</sup>, Y. Nishimura<sup>2</sup>, K. Tanabe<sup>3</sup>, S. Goto<sup>1</sup>,  
T. Ishii<sup>2</sup> and T. Mizoguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立公衆衛生院 108 東京都港区白金台 4-6-1, <sup>2</sup>東京理科大学 162  
東京都新宿区神楽坂 1-3, <sup>3</sup>国立環境研究所 305 茨城県つくば市  
小野川 16-2

<sup>1</sup>National Institute of Public Health, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108, Japan,

<sup>2</sup>Science University of Tokyo, 1-3, Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan,

<sup>3</sup>National Institute for Environmental Studies, 16-2, Onogawa,  
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

(受付: 1994 年 3 月 17 日; 受理: 1994 年 5 月 12 日)

#### Summary

A time-course study on the mutagenicity of urine sample from non-smoking volunteers (3 males and 2 females) has been carried out under the conditions of daily life and/or of some diet control. Blue rayon extracts of urine sample were assayed with pre-incubation method using *Salmonella* strain YG1024 in the presence and absence of a metabolic activation system (S9 mix).

In the absence of S9 mix, the mutagenic activity increased after taking some fish meals such like tuna (both raw and roasted) for male volunteers in diet control. Also many urine samples from a female volunteer showed very potent mutagenic activity in daily life. In the presence of S9 mix, mutagenic activity increased after taking some cooked meals like fried ground beef, roast pork, roast tuna. It was suggested that there were many kind of mutagens, not only promutagens but also direct-acting mutagens in human urine.

**Keywords:** non-smoker's urine; mutagenicity; time-course study; daily life; diet control

#### 緒言

尿中への変異原性代謝物などの排出を指標として、発がん関連物質への曝露を評価する手法は、曝露経路などを定量的かつ詳細に把握することはできないが、未知物質を含めた発がん関連物質への総合的な曝露を評価できるため、ハイリスクグループの検出に適している可能性が高く、また、データの蓄積に伴ってリスク要因等の解析も可能であると考えられる。

従来、石油プラントなどでの職業性曝露 (Sadu-

rska *et al.*, 1989), 制がん剤投与 (Rossner *et al.*, 1988), 喫煙 (Yamasaki *et al.*, 1977; Aeschbacher and Chappuis, 1981; Conner *et al.*, 1983; Kobayashi and Hayatsu, 1984; Einisto *et al.*, 1990) などによる尿の変異原性の上昇が調べられている。しかし、試験法の感度などの問題もあって、食事などのより日常的な因子については、関係を示唆する報告はあるものの、詳細には調べられていなかった。

我々は、尿中への変異原性物質などの排出を指



標として、生活環境における種々の発がん関連物質への曝露実態を解析し、がん対策の基礎的資料とすることを目的として種々検討を行っている。現在までに、尿試料の変異原性試験方法の高感度化及び最適化の検討を行い、ブルーレーヨン抽出→S9 mixによる代謝活性化→YG 1024菌株によるAmes試験の方法により、喫煙者ばかりでなく非喫煙者についても、簡便かつ高感度、定量的に尿の経時変動をモニターできることを明らかにしてきた。今回は、上記方法を用いて日常生活下および食事制限下における非喫煙者の尿の変異原性の経時変動とその曝露因子について検討したので報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 試薬

ブルーレーヨン：フナコシ製のものを用いた。  
抽出溶媒：残留農薬試験用メタノール、精密分析用25%アンモニア水は、和光純薬工業製のものを用いた。

変異原性試験用溶媒：蛍光分析用ジメチルスルホキシド(DMSO)は、同仁化学研究所製のもの(ルミナゾール)を用いた。

変異原性試験用試薬類：寒天は北辰化学から購入した。S9 mix 調製用 Cofactor-I はオリエンタル酵母工業製のものを用いた。S9 は、常法(Ames *et al.*, 1975)にしたがって、PCB (KC 500) で酵素誘導した Sprague-Dawley 系雄ラット肝から自製した。

### 2. 尿の採取

健康な非喫煙者5名(男性3名、女性2名)を被験者として、以下に述べる3つの条件下でそれぞれ尿を採取した。

#### 実験I:

日常生活下での尿の変異原性を調べるため、非喫煙者4名(男女2名ずつ)に約48時間にわたって食事等に一切制限を設けず過ごしてもらい尿を採取した。

#### 実験II:

食事の影響を調べるため、男性2名(実験Iと同一人物)に試料採取開始24時間前から食事制限を行った上で、3日間昼食時間に指定した定食

を摂取してもらい尿を採取した。以下に食事制限および指定した定食の内容を記す。

食事制限：期間中摂取した食品は下記の通りである。

生野菜、果実類(リンゴ、ブドウ、モモ、バナナ、トマト、グレープフルーツ)、豆腐、プロセスチーズ、食パン(トーストしない)、白飯、味噌汁、ヨーグルト(プレーンのみ)、牛乳、紅茶、緑茶、ウーロン茶、オレンジジュース。

指定食(国立公衆衛生院内の食堂で調理)：

1日目 野菜炒め定食：野菜(キャベツ、玉葱、人参、ニラ、モヤシ、椎茸、エノキ)を食塩とコショウで炒める。出来上がり重量210g。白飯230g。味噌汁(具：大根、葱、ワカメ)100c.c.。

2日目 焼魚(さんま)定食：さんま150g(可食部100g)に食塩をふり、上下15分焼く。白飯200g。味噌汁(具：卵、カイワレ、ニラ、モヤシ)100c.c.。

3日目 焼肉定食：豚上ロース150g(焼上がり80g)、玉葱10g、ニンニク5gをタレ(食塩、コショウ、醤油、砂糖)で上下7分網焼。白飯260g。スープ(具：卵、ニラ、モヤシ)100c.c.。

#### 実験III

実験IIと異なる食事制限の影響を調べるため、男性2名(うち1名は実験I、IIに続いて3回目)に試料採取開始24時間前から食事制限を行った上で、3日間昼食時間に指定した単一食品を摂取してもらい尿を採取した。以下に食事制限および指定した単一食品の内容を記す。

食事制限：

白飯、味噌汁を除いて実験IIと同じ。

指定食(研究室内で調理)

1日目 まぐろ(築地市場で購入)刺身320gを解凍後、食塩のみで食す。

2日目 まぐろ(同上)塩焼320g(焼上がり260g)。食塩をふりフライパンで上下15分。

3日目 ハンバーグ320g(焼上がり280g)。国産牛上挽き肉1000gに対して食塩5gを加えてハンバーグ様にしたものをフライパンで上下12分焼いた(ウェルダン)。

尿は1回毎にポリエチレン容器(500~1000ml容)に全量採取し、実験に供するまでできるだけ

低温(4°C~-20°C)で遮光して保存した。なお、すべての試料について、採取開始前日からの食事、その他の生活行動をできるかぎり記録した。

### 3. 尿試料の調製

試料は、室温に戻したのち、ブルーレーヨン抽出(Hayatsu, 1990)を行った。尿量にかかわらず、ブルーレーヨンは0.4g×2回とした。抽出溶媒にはメタノール-アンモニア水(100:1, v/v)を用いた。抽出物は、窒素ガスを吹き付けて溶媒を留去した後密栓し、変異原性試験に供するまで-80°Cのフリーザー内に保存した。

### 4. 変異原性試験

菌株は *Salmonella typhimurium* YG 1024(Watanabe *et al.*, 1989)を用い、S9 mix (50  $\mu$ l S9/プレート)添加・無添加の両条件下でプレインキュベーション法(Yahagi *et al.*, 1977)により変異原性試験を行った。

試験当日、試料をフリーザーから取り出し、余分な水分がつかないようにシリカゲルデシケーター内に放置して室温に戻した後、所定量のDMSOに溶解した。公比2で3段階の希釈列を作成し、各濃度段階について2枚のプレートを用いて変異原性試験を行った。

## 結果

Fig. 1に尿の変異原性試験によって得られた用量-反応関係の例を示す。Fig. 1に示してある濃度範囲ではプレートのバックグラウンドコロニーを見る限り菌の生育阻害は殆ど認められなかった。用量-反応関係が認められ、2枚のプレートの復帰コロニー数の平均値が溶媒対照の2倍以上のものを変異原性陽性、1.5倍以上2倍未満のものを疑陽性、1.5倍未満のものを陰性と判定した。試験に供した126試料のうち、陽性および疑陽性を示す試験結果について、用量-反応関係が直線的な部分から、最小自乗法により直線回帰式を求め、その傾きから変異原活性を算出した。

Table 1にその結果を示す。変異原活性は1回の排出尿中の変異原性(Revertants/sample)ならびにこれを排尿間隔時間(分)で割った値(Revertants/min)で表した。なお、陰性例はすべてzero revertantとした。

実験Iでは、日常生活下における非喫煙者の尿中変異原性の曝露実態を把握するために、非喫煙者4名(男女2名ずつ)の尿の変異原性を約48時間にわたって調べた。その結果Table 1(Experiment I)に示したように、食事等生活行動に特に制限を設けない日常生活下でも、各被験者とも尿の変異原性には経時変動が認められた。また、非喫煙者間でも被験者により変異原性出現のパターン及びレベルに差が認められ、日常生活に

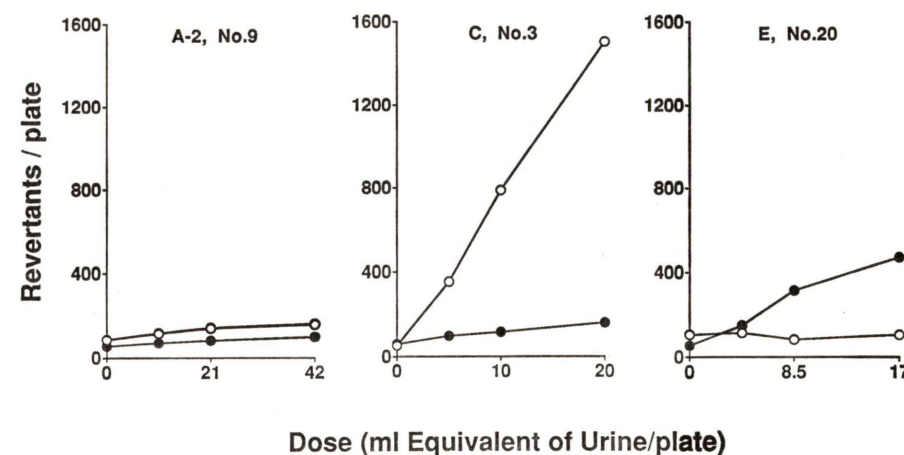


Fig. 1. Dose-responses of some urine samples.  
○: without S9 mix, ●: with S9 mix.



Table 1. Mutagenicity of urine samples from non-smokers using *Salmonella typhimurium* YG 1024 (Experiment I)

Subject	Sampling No.	Day	Time	Interval (min)	Urine volume (ml)	Revertants/sample		Revertants/min <sup>a</sup>		Main diet (Ingestion time)
						-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	
A-1 male age 24	1	1st	14:55	260	300	0	0	0.0	0.0	Japanese hotchpotch (21:45)
	2		17:50	175	190	0	0	0.0	0.0	
	3		19:55	125	290	0	0	0.0	0.0	
	4		21:40	105	140	0	0	0.0	0.0	
	5	2nd	0:25	165	190	0	0	0.0	0.0	
	6		6:40	375	400	0	306	0.0	0.8	toast, corned beef (10:45) Chinese noodle (12:45) roast beef (18:30)
	7		11:05	265	450	0	0	0.0	0.0	
	8		17:20	375	380	0	0	0.0	0.0	
	9		22:15	295	300	0	548	0.0	1.9	
	10	3rd	1:00	165	230	0	312	0.0	1.9	
	11		10:00	540	490	0	346	0.0	0.6	
B-1 male age 33	1	1st	12:40	120	250	0	353	0.0	2.9	shao-mai (12:40)
	2		16:15	215	290	0	508	0.0	2.4	gratin (20:30)
	3		19:00	165	160	0	129	0.0	0.8	
	4		22:00	180	290	193	681	1.1	3.8	roast salmon (8:30) fried ground beef (13:00)
	5	2nd	7:00	540	460	0	421	0.0	0.8	
	6		11:20	260	200	255	0	1.0	0.0	
	7		15:00	220	310	0	352	0.0	1.6	roast beef (18:30)
	8		18:10	190	250	0	876	0.0	4.6	
	9		22:10	240	320	0	572	0.0	2.4	
	10	3rd	0:10	120	150	0	600	0.0	5.0	
	11		5:55	345	440	0	511	0.0	1.5	
	12		9:00	185	380	0	310	0.0	1.7	roast beef (18:30)
	13		10:40	100	75	117	0	1.2	0.0	
C female age 27	1	1st	6:50	600	260	26800	1350	44.7	2.3	toast (7:30)/rice (12:15)
	2		13:30	400	110	17800	1070	44.4	2.7	gratin (18:20)
	3		21:55	505	200	14600	1010	29.0	2.0	roast pork (7:10) chicken nugget (12:45) Chinese noodle (18:15)
	4	2nd	6:15	500	310	19600	546	39.2	1.1	
	5		12:25	370	90	16400	1100	44.4	3.0	
	6		16:52	267	195	16400	695	61.3	2.6	(lost sample)
	7	3rd	1:00	488	—	(lost sample)				
	8		8:35	455	155	4600	388	10.1	0.9	
D female age 23	1	1st	9:20	535	330	3750	452	7.0	0.8	fried fish (13:30) vegetables (21:00)
	2		13:25	245	180	0	0	0.0	0.0	
	3		15:57	152	140	0	455	0.0	3.0	
	4	2nd	0:55	538	275	581	421	1.1	0.8	vegetables (7:00)
	5		6:45	350	295	0	419	0.0	1.2	
	6		9:12	147	210	2120	0	14.4	0.0	
	7		11:55	163	315	0	275	0.0	1.7	vegetables (13:00)
	8		18:17	382	540	0	305	0.0	0.8	fried chicken (21:30)
	9	3rd	1:37	440	130	0	349	0.0	0.8	

$$^a \text{ Revertants/min} = \frac{\text{Revertants/sample}}{\text{Interval (min)}}$$

Table 1. continued (Experiment II<sup>b</sup>)

Subject	Sampling No.	Day	Time	Interval (min)	Urine volume (ml)	Revertants/sample		Revertants/min <sup>a</sup>		Main diet (Ingestion time)
						-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	
A-2	1	1st	6:20	380	420	1070	1140	2.8	3.0	fried vegetable <sup>d</sup> (13:30)
	2		9:20	180	470	0	457	0.0	2.5	
	3		12:30	190	150	0	638	0.0	3.4	
	4		16:30	240	150	0	488	0.0	2.0	
	5		19:40	190	230	0	495	0.0	2.6	
	6		22:30	170	140	0	851	0.0	5.0	grilled saury <sup>d</sup> (13:40)
	7	2nd	8:20	590	460	0	342	0.0	0.6	
	8		13:30	310	450	0	804	0.0	2.6	
	9		16:30	180	120	737	440	4.1	2.4	
	10		19:40	190	320	0	452	0.0	2.4	
	11		22:00	140	130	0	463	0.0	3.3	roast pork <sup>d</sup> (11:30)
	12	3rd	1:20	200	380	0	781	0.0	3.9	
	13		8:00	400	480	0	507	0.0	1.3	
	14		11:20	200	210	0	325	0.0	1.6	
	15		13:10	110	280	0	492	0.0	4.5	
	16		17:30	260	220	0	1100	0.0	4.2	
	17	4th	8:20	890	470	0	821	0.0	0.9	roast pork <sup>d</sup> (11:30)
	18		12:55	275	290	0	0	0.0	0.0	
B-2	1	1st	7:17	317	370	0	733	0.0	2.3	fried vegetable <sup>d</sup> (13:30)
	2		10:42	205	350	0	338	0.0	1.6	
	3		13:20	158	400	0	0	0.0	0.0	
	4		16:30	190	380	0	417	0.0	2.2	
	5		19:55	205	180	0	0	0.0	0.0	
	6	2nd	3:00	425	320	0	0	0.0	0.0	grilled saury <sup>d</sup> (13:40)
	7		7:30	270	680	0	0	0.0	0.0	
	8		10:35	185	330	0	241	0.0	1.3	
	9		13:30	175	330	0	0	0.0	0.0	
	10		16:30	180	360	0	530	0.0	2.9	
	11		20:20	230	200	0	1180	0.0	5.1	roast pork <sup>d</sup> (11:30)
	12	3rd	5:45	565	540	0	850	0.0	1.5	
	13		11:20	335	610	0	482	0.0	1.4	
	14		14:25	185	270	0	869	0.0	4.7	
	15		17:20	175	190	0	799	0.0	4.6	
	16		20:45	205	160	0	490	0.0	2.4	roast pork <sup>d</sup> (11:30)
	17	4th	0:25	220	150	0	439	0.0	2.0	
	18		6:10	345	520	0	234	0.0	0.7	
	19		11:15	305	280	0	399	0.0	1.3	
	20		13:00	105	120	0	398	0.0	3.8	

<sup>b</sup> Control diet for Exp. II: fresh vegetables, fresh fruits (apple, grape, peach, banana, tomato, grapefruit), tofu (bean curd), process cheese, bread, boiled rice, miso soup, yogurt (plane), milk, tea, green tea, oolong tea, orange juice

<sup>c</sup> Control diet for Exp. III: same as above except for boiled rice and miso soup

<sup>d</sup> These main diets were taken with boiled rice and soup



Table 1. continued (Experiment III<sup>e</sup>)

Subject	Sampling No.	Day	Time	Interval (min)	Urine volume (ml)	Revertants/sample		Revertants/min <sup>a</sup>		Main diet (Ingestion time)
						-S9 mix	+S9 mix	-S9 mix	+S9 mix	
A-3	1	1st	8:50	460	420	0	450	0.0	1.0	sliced raw tuna (13:00)
	2		12:30	220	180	0	0	0.0	0.0	
	3		15:45	195	470	0	0	0.0	0.0	
	4		19:00	195	430	0	0	0.0	0.0	
	5		21:45	165	220	3090	0	18.7	0.0	
	6		23:15	90	370	1160	315	12.9	3.5	
	7	2nd	0:35	80	330	972	0	12.2	0.0	roast tuna (13:30)
	8		9:35	540	510	997	0	1.8	0.0	
	9		13:25	230	400	782	0	3.4	0.0	
	10		16:50	205	250	711	778	3.5	3.8	
	11		19:45	175	280	2630	924	15.0	5.3	
	12		22:45	180	500	3690	542	20.5	3.0	
	13	3rd	0:15	90	490	940	369	10.4	4.1	fried ground beef (13:00)
	14		2:05	110	220	2580	0	23.5	0.0	
	15		9:15	430	390	0	342	0.0	0.8	
	16		13:00	225	230	790	0	3.5	0.0	
	17		16:15	195	200	0	6910	0.0	35.4	
	18		19:20	185	420	0	12400	0.0	67.1	
	19		22:15	175	310	0	2880	0.0	16.4	sliced raw tuna (13:00)
	20	4th	0:15	120	420	1120	949	9.3	7.9	
	21		9:00	525	500	0	736	0.0	1.4	
	22		13:00	240	170	955	650	4.0	2.7	
E male age 22	1	1st	4:30	450	350	4320	512	9.6	1.1	sliced raw tuna (13:00)
	2		6:30	120	110	634	0	5.3	0.0	
	3		10:45	255	120	0	0	0.0	0.0	
	4		12:40	115	80	0	0	0.0	0.0	
	5		15:15	155	190	0	0	0.0	0.0	
	6		17:45	150	160	0	0	0.0	0.0	roast tuna (13:30)
	7		21:45	240	280	2310	994	9.6	4.1	
	8	2nd	2:40	295	490	0	314	0.0	1.1	
	9		6:00	200	220	1750	510	8.7	2.6	
	10		9:00	180	100	4940	787	27.4	4.4	
	11		12:45	225	180	2960	1040	13.2	4.6	
	12		16:00	195	180	0	355	0.0	1.8	fried ground beef (13:00)
	13		18:15	135	190	3410	854	25.3	6.3	
	14		20:05	110	150	0	573	0.0	5.2	
	15		23:30	205	350	630	0	3.1	0.0	
	16	3rd	5:00	330	110	1910	0	5.8	0.0	
	17		8:05	185	120	3920	0	21.2	0.0	
	18		12:45	280	210	0	0	0.0	0.0	sliced raw tuna (13:00)
	19		16:00	195	200	0	3280	0.0	16.8	
	20		18:05	125	170	0	4280	0.0	34.2	
	21		21:15	190	250	0	5600	0.0	29.5	
	22		23:00	105	110	1380	1320	13.1	12.5	
	23	4th	2:30	210	340	0	1110	0.0	5.3	fried ground beef (13:00)
	24		5:00	150	190	1300	542	8.7	3.6	
	25		8:30	210	180	1110	390	5.3	1.9	
	26		11:00	150	100	0	0	0.0	0.0	

おける喫煙以外の曝露因子の検討にも有効であることが確認された。

男性と女性を比較すると、女性被験者に S9 mix 無添加条件下でかなり高い変異原性が認められた。C は実験期間中コンスタントに高い変異原性が認められたが、食事内容等に特定の曝露因子と思われるようなものはなく、当該尿試料中には S9 mix 添加で変異原性が低下するような物質が含まれていることが判った。D は、受動喫煙が記録されていたが、受動喫煙本数と変異原性との間に明瞭な関係は認められず、食事内容にも特定の曝露因子と思われるようなものは見当たらなかった。両者とも月経期間中ではなかったが、これらの結果には複雑な生理的要因などが関与していることが考えられる。

一方、S9 mix 添加条件下では食事（内容）との関係が強く示唆された。食事内容と変異原性の関係をみると、焼いた肉、ハンバーグなど加熱調理した高蛋白、高脂肪食品の食後に変異原性の上昇が認められたが、野菜類を多く食べた後にはあまり強い変異原性は認められなかった。焼いた豚肉やベーコン (Baker *et al.*, 1982)、焼いた牛挽肉 (Hayatsu *et al.*, 1985) をそれぞれ摂取した直後に尿中の変異原性が増加することが報告されている。これらの事実を考え合せると、食事内容によって尿の変異原性は変化すること、特に加熱調理した高蛋白、高脂肪食品の影響は S9 mix 添加条

件下での変異原性によく反映されることが示唆された。

Table 2 は日常生活における尿中変異原曝露量を 24 時間 (1440 分) あたりの復帰変異コロニー数として算出したものである。Table 2 から、S9 mix 添加条件下では比較的個人差が少なく、被験者 4 人 (8 日分) の平均値は 1910 コロニー/日であった。これに対して、S9 mix 無添加条件下では Table 1 から明らかなように個人差が大きく、特に女性では被験者によって差はあるものの、両被験者とも連日 S9 mix 無添加条件下の方が添加条件下よりも高い値を示し、食事以外に無視できない曝露因子が存在することが強く示唆された。

## 考 察

近年わが国では胃がん、子宮がんによる死亡率が増加してきている。この原因として、日本人の食生活の変化、日常のライフスタイルの多様化などがあげられている。がんの一次予防の観点から、いくつかのヒトがんの危険因子について、それらの寄与率の推計が試みられており、食物 (35%) と喫煙 (30%) の寄与率が大いことなどが報告されている (Doll and Peto, 1982)。

結果のところで述べたように、日常の食生活の中でも加熱調理した高蛋白・高脂肪食品などの食後に尿の変異原性が増加することが認められたが、実験 I では食事内容も含めて生活行動に特に制限を設けなかったため、特定の食事が尿の変異原性に及ぼす影響を明らかにすることは困難であることが判った。

そこで、男性 2 名 (実験 I と同一人物) に試料採取開始 24 時間前から食事制限を行った上で、3 日間昼食時間に指定した定食を摂取してもらい、その影響を調べた (実験 II)。定食は、加熱調理したものを主菜とし、代表的なものとして、野菜炒め (肉なし)、焼魚 (さんま)、焼肉 (豚ロース) を選び、これに若干の付けあわせと白飯、汁物を組合わせた。なお、被験者間での差の有無を確認するため、実験は 2 名同時に行った。

Table 1 (Experiment II) から、制限後若干の

Table 2. Daily personal exposure to mutagens in non-smoker's urine

Sample Subject	Day (No.)	Interval (min)	Revertants/24 Hrs.	
			−S9 mix	+S9 mix
Exp. I				
A-1	1 ( 1- 7)	1470	0	300
	2 ( 8-11)	1375	0	1260
B-1	1 ( 1- 6)	1480	440	2040
	2 ( 7-13)	1400	120	3300
C	1 ( 1- 3)	1505	56700	3290
	2 ( 4- 8)	1592	51500	2470
D	1 ( 1- 4)	1470	4240	1300
	2 ( 5- 9)	1482	2060	1310
mean			14400	1910
s.d.			24600	1060



変異原性が認められる場合 (A-2) もあるが、全体として食事制限を行うことによって尿中変異原性のレベルを低く抑えられることが判った。食後の変異原性出現のパターンやレベルは、2人の被験者でよく似た傾向を示した。すなわち、野菜炒め定食の食後にはあまり大きな変化は認められなかったが、焼魚定食や焼肉定食の食後には、食前に較べて変異原性が上昇することが判った。焼魚定食や焼肉定食の場合、両定食とも食後3時間ほど経過した直後の尿で既に変異原性の上昇が認められ、約6時間後にピークが現れた。レベル的には両被験者とも日常 (食) 生活下でインパクトが強いと思われる食事 (焼肉など) を摂取したときと同じか若干高めの変異原性を示した。以後次第に減少していき、16~20時間後にはほぼ指定した定食を摂取する直前のレベルに戻った。

村岡らは百種類以上の食品の変異原性を調べ、陽性を示した食品の多くが主に動物性蛋白質を主材料としたもので、高温調理の行われたものであること、1つの料理のもつ変異原活性は同時に食べ合わせる添えの料理、調理時の材料の組み合わせによって抑制されることなどを報告している (村岡ら, 1986)。これらを考え合えると、加熱調理した食品であっても、その素材、調理方法によって尿の変異原性に及ぼす影響は異なるものと考えられた。特に定食の場合、複数の食品が組み合わされているので、食品別の影響の大きさを明らかにすることは困難であると考えられた。

そこで、この影響の大きさを調べるためのモデル実験として、さらに男性2名 (うち1名は実験I, IIに続いて3回目) に試料採取開始24時間前から食事制限を行った上で、3日間昼食時間に指定した単一食品を摂取してもらい、その影響を調べた (実験III)。

摂取する食品は、日本人の食生活の中で重要な動物性蛋白源と考えられるもので加熱調理の影響も比較検討するために、まぐろの刺身、同塩焼、ハンバーグを選んだ。食事制限の内容も実験IIよりさらに厳しく、白飯や味噌汁を制限した。実験はやはり2名同時に行った。

Table 1 (Experiment III) から、両被験者とも食事制限を厳しくした効果があったためか、最初

の指定食を摂取する直前の尿の変異原性はS9 mix 添加の有無にかかわらず陰性となった。これに対して、食後の変異原性はこれまでの実験 (I 及び II) と比較してかなり高い値を示した。Fig. 2 は実験IIIの結果を、横軸に時間 (hour)、縦軸に変異原性 (revertants/min.) をとって図示したものである。Fig. 2 から明らかなように、被験者間で若干の差はあるものの、変異原性出現のパターンやそのレベルはよく似た傾向を示した。

まぐろ刺身の場合、S9 mix 添加条件下ではあまり強い変異原性は認められなかったが、無添加条件下では摂取後約9時間目の尿に高いピークが現れた。被験者 A-3 では徐々に変異原性が減少していったが、被験者 E では一旦変異原性が消失してから再び20時間目の尿に最大のピークが現れた。

同じまぐろでも塩焼にした場合、S9 mix 添加条件下では、食後3~6時間目の尿に変異原性 (ピーク) が認められた。そのレベルは実験IIで焼魚定食を摂取した直後のそれと同程度かやや高めであった。ピーク以後、変異原性は次第に減少していった。一方、S9 mix 無添加条件下では約6時間後の尿に高いピークが現れ、両被験者ともに、Eの刺身の場合と同じように一旦消失してから、再び変異原性ピークが現れるという2峰性のパターンを示した。これは、食後の吸収速度や生体内での代謝速度が異なる直接作用型の変異原性物質が複数存在することを示唆している。

ハンバーグを摂取した場合には、まぐろの場合と対照的に、S9 mix 無添加条件下よりも添加条件下で強い変異原性が認められ、摂取直後3~6時間目にピークが現れ、以後次第に減少しながらも変異原性が認められるパターンを示した。

このように、尿中に排出される食事由来の変異原性物質は、従来考えられていた以上に多岐にわたっており、S9 mix 無添加条件下でも変異原性を示すものが複数存在すること、これらのうち、比較的早いものは食後3時間以内に尿中に排泄されはじめ、その大部分は24時間以内にクリアランスされることが示唆された。

Table 3 は食事制限下 (実験II・III) における尿中変異原の曝露量を24時間 (1440分) あたり

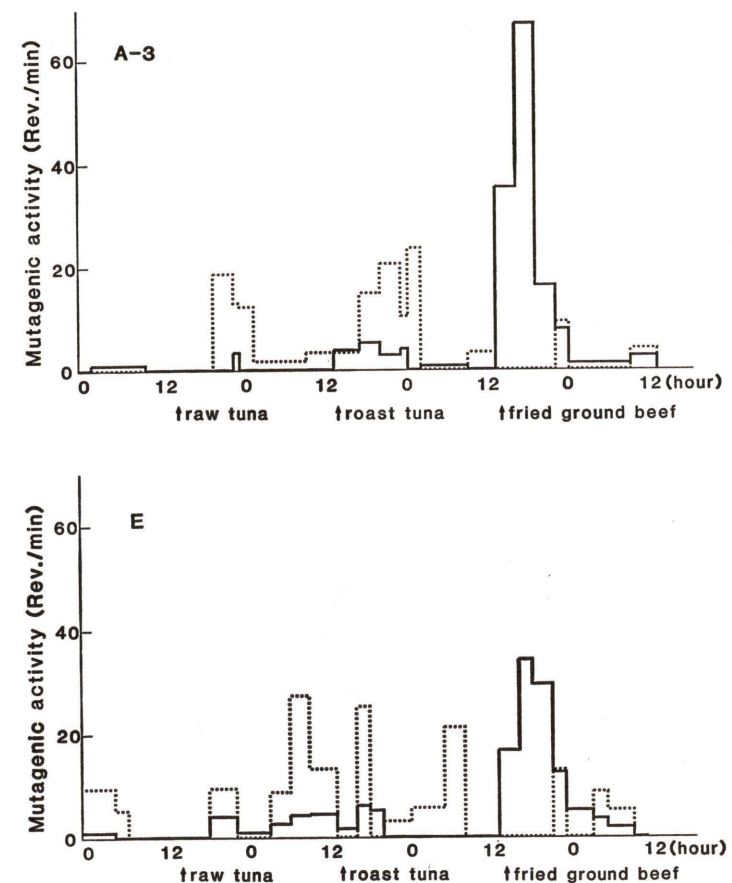


Fig. 2. Time-course variation of mutagenic activity of urine samples in experiment III.  
—: with S9 mix, ----: without S9 mix.

の復帰変異コロニー数として算出したものである。Table 3 から、定食による変異原性は、1例 (A-2, 焼魚定食) を除いて S9 mix 添加条件下でのみ認められたが、その食品別の平均値は、野菜炒め定食 1760, 焼魚定食 3300, 焼肉定食 2830 コロニー/日であった。これらの値は被験者間での差も比較的少なく、日常 (食) 生活下での1日当りの変異原性曝露量 (Table 2) と比較してもそれほど大きな差はなかった。

一方、単品による変異原性は、定食のそれに較べてかなり高い値を示し、魚と肉でそのパターンが異なっていた。魚 (まぐろ) は加熱の有無にかかわらず S9 mix 無添加条件下で高い値 (刺身 9330, 塩焼 10700 コロニー/日) を示したが、添加条件下ではその 1/5 程度 (刺身 1970, 塩焼

2390 コロニー/日) で、定食のそれと大差ないのであった。これに対して、肉 (ハンバーグ) は S9 mix 添加条件下で高い値 (平均 21200 コロニー/日) を示した。無添加条件下ではその 1/7 程度 (3080 コロニー/日) であったが、それでも定食を食べた場合よりもかなり高い値であった。

指定した食事を摂取する直前の尿の変異原性は殆ど陰性を示しており、これらの値はおおよそ指定した食品に由来するものと考えられた。そこで、Table 3 に示した食品別の平均値を摂取した食品重量で除することによって、尿の変異原性に及ぼす食品別の影響の大きさを推定した。Table 4 はその影響の大きさを、食品 (可食部) 100g あたりの変異コロニー数として表したものである。なお、( ) 内の数値は定食全体の重量 (実験



Table 3. Effect of diet on the daily personal exposure to mutagens in non-smoker's urine

Sample Subject	Day (No.)	Interval (min)	Revertants/24 Hrs.	
			-S9 mix	+S9 mix
Exp. II				
A-2	1 ( 3- 8)	1500	0	2860
	2 ( 9-14)	1310	810	3260
	3 (15-18)	1535	0	2260
B-2	1 ( 4- 9)	1450	0	650
	2 (10-13)	1310	0	3340
	3 (14-19)	1540	0	3390
mean	1 (fried vegetable lunch)		0	1760
	2 (grilled saury lunch)		405	3300
	3 (roast pork lunch)		0	2830
Exp. III				
A-3	1 ( 3- 9)	1495	6750	300
	2 (10-16)	1415	11500	3010
	3 (17-22)	1440	2070	24500
E	1 ( 5-11)	1445	11900	3630
	2 (12-18)	1440	9870	1780
	3 (19-26)	1335	4080	17800
mean	1 (raw tuna)		9330	1970
	2 (roast tuna)		10700	2390
	3 (fried ground beef)		3080	21200

Table 4. Effect of diet for the mutagenicity of urine

Diet	Revertants/100 g of diet	
	-S9 mix	+S9 mix
[Exp. II]		
fried vegetable (lunch)	0 ( 0)	838 ( 326)
grilled saury (lunch)	405 ( 101)	3300 ( 825)
roast pork (lunch)	0 ( 0)	2980 ( 622)
[Exp. III]		
raw tuna	2920	616
roast tuna (raw weight)	4120 (3340)	919 ( 747)
fried ground beef (raw weight)	1100 ( 963)	7570 (6630)

Number in parenthesis indicates the value divided with 100 g of total lunch (Exp. II) or of raw diet (Exp. III)

II) または調理前の生重量 (実験III) で、それぞれ除した値である。

Table 4 から、定食の影響の大きさ (S9 mix 添加条件下) は焼肉定食>焼魚定食>野菜炒め定食の順に、単品の影響の大きさは、S9 mix 無添加条件下ではまぐろ塩焼>同刺身>ハンバーグの順に、添加条件下ではハンバーグ>まぐろ塩焼>

同刺身の順に高いことが判った。これらの順番は定食全体の重量 (実験II) または調理前の生重量 (実験III) で、それぞれ除した値でも同じであった。このように、素材や調理方法などによって尿の変異原性に及ぼす食品の影響は大きく異なることが明らかとなった。また、同じ食品でも S9 mix の添加・無添加によって異なることから、食品中

には代謝活性化等を必要とする間接変異原を与えやすい物質ばかりでなく、これらを必要としない直接変異原を与える物質も存在するなど、多種多様な物質が共存していることが明らかとなった。

加熱調理した高蛋白・高脂肪食品、特に肉類の影響は主に S9 mix 添加条件下で認められたが、これら食品中には、S9 mix 添加条件下で強い変異原性を示すヘテロサイクリックアミン類が存在することが報告されている (Takahashi *et al.*, 1985)。ヘテロサイクリックアミン類は、ブルーレーヨンに吸着されやすいこと (Hayatsu, 1990) や、ヒトの尿 (24 時間尿) 中から検出されたこと (Ushiyama *et al.*, 1991) が報告されており、S9 mix 添加条件下における主要な変異原のひとつと考えられるが、今回、尿の一部を用いてその経時変動を調べることは分析感度等の問題からあきらめざるを得なかった。一方、S9 mix 無添加条件下での変異原性はヘテロサイクリックアミン以外の物質が関与していると考えられる。今後、このような指標となる物質を検索するとともに、それらの分析法が改良されるにしたがって、寄与率などより詳細な解析ができるようになると思われる。

今回の実験結果から、①肉 (ハンバーグ、焼肉) や魚 (まぐろ、さんま) の食後に変異原性の上昇が認められること、②S9 mix 添加条件下で変異原性を与えやすい食事と無添加条件下で変異原性を与えやすい食事が存在することなどが明らかとなった。また、③喫煙者の尿でも S9 mix 添加・無添加両条件下で変異原性の上昇が認められること (遠藤ら, 1992) も明らかとなっており、尿の変異原性曝露因子については、未知のものも含めて複数の因子が関与しているものと考えられる。尿は膀胱内に数時間程度貯留されるので、発がん (特に膀胱がん) イニシエーターとしては、S9 mix 添加条件下よりも、むしろ無添加条件下での曝露因子の方が危険性が高いと考えられる。今後、女性の性周期や食事内容等との関連を中心に、曝露因子やその実態の解明を急ぐ必要があると思われる。

## 謝 辞

本研究の一部は対がん10ヵ年総合戦略プロジェクト研究費によって行われたもので、関係各位に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- Aeschbacher, H. U. and C. Chappuis (1981) Non-mutagenicity of urine from coffee drinkers compared with that from cigarette smokers, *Mutat. Res.*, **89**, 161-177.
- 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.
- Baker, R., A. Arlauskas, A. Bonin and D. Angus (1982) Detection of mutagenic activity in human urine following fried pork or bacon meals, *Cancer Lett.*, **16**, 81-89.
- Connor, T. H., V. M. S. Ramanujam, J. B. Ward Jr. and M. S. Legator (1983) The identification and characterization of a urinary mutagen resulting from cigarette smoke, *Mutat. Res.*, **113**, 161-172.
- Doll, R. and R. Peto (1982) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *JNCI*, **66**, 1191-1308.
- Einisto, P., T. Nohmi, M. Watanabe and M. Ishidate Jr. (1990) Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG 1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking, *Mutat. Res.*, **245**, 87-92.
- 遠藤 治, 田辺 潔, 後藤純雄, 溝口次夫, 松下秀鶴 (1992) 尿中変異原性を指標とした日常生活における発がん関連物質への曝露評価の検討, *衛生化学*, **39**, 554-559.
- Hayatsu, H., T. Hayatsu and Y. Ohara (1985) Mutagenicity of human urine caused by ingestion of fried ground beef, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 445-448.
- Hayatsu, H. (1990) Blue cotton—Broad possibility in assessing mutagens/carcinogens in the environment, In: G. Obe (Eds), *Advances in Mutagenesis Research*, Springer, Berlin, Vol. 1, pp. 1-26.
- Kobayashi, H. and H. Hayatsu (1984) A time-course study on the mutagenicity of smoker's urine, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **75**, 489-493.
- 村岡知子, 明石牧子, 高田真理子, 安田公子, 大下市子 (1986) 調理食品の変異原活性の検索 II—女子大学生の昼食について その1—, *山陽学園短期大学研究論集*, **17**, 17-26.
- Rossner, P., M. Cerna, D. Porkorna, V. Hajek and J. Petr (1988) Effect of ascorbic acid



prophylaxis on the frequency of chromosome aberrations, urine mutagenicity and nucleolus test in workers occupationally exposed to cytostatic drugs, *Mutat. Res.*, **208**, 149-153.

Sadurska, B., W. Zielinski, E. Skalska-Hilgier, B. Tudek, M. Szczypka and T. Szymczyk (1989) Urine mutagenicity of petroleum plant workers, *Mutat. Res.*, **224**, 147-150.

Takahashi, M., K. Wakabayashi, M. Nagao, I. Tomita and T. Sugimura (1985) Quantification of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in cooked foods, *Mutat. Res.*, **147**, 275.

Ushiyama, H., K. Wakabayashi, M. Hirose, H. Itoh, T. Sugimura and M. Nagao (1991) Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but not of alimentation, *Carcinogenesis*,

**12**, 1417-1422.

Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1990) Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains processing 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.

Yamasaki, E. and B.N. Ames (1987) Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 3555-3559.

*Environ. Mut. Res. Commun.*, **16**: 189-194 (1994)

一般論文

## ヒドロキシラジカル捕捉作用を有するビフェニル化合物 による紫外線突然変異抑制効果

### Biphenyl compounds are hydroxyl radical scavengers: Their effective inhibition for UV-induced mutation in *Salmonella typhimurium* TA 102

藤田しのぶ, 平良淳誠

Fujita, S. and J. Taira

鐘紡株式会社 化粧品研究所  
250 神奈川県小田原市寿町 5-3-28

Cosmetics Laboratory, Kanebo Ltd., 5-3-28 Kotobuki-cho, Odawara Kanagawa 250, Japan

(受付: 1994 年 3 月 17 日; 受理: 1994 年 5 月 9 日)

#### Summary

In our previous study, we found several hydroxylated biphenyl compounds have a great scavenging effect for hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ). In this study, to elucidate the relationship between generation of the  $\cdot\text{OH}$  and photo-mutagenesis, six biphenyl compounds such as dehydrodieugenol, dehydrodivanillyl alcohol, dehydrodihydroeugenol, dehydrodicreosol, magnolol, and honokiol, respectively were examined for their ability to inhibit UV-induced mutation in *Salmonella typhimurium* TA 102.

The relative mutagenic activities (RMA, %) indicated the mutation frequency of treated cells divided by the mutation frequency of control cells times 100%. The RMA (%) are as follows:  $28 \pm 1$ ,  $31 \pm 1$ ,  $33 \pm 1$ ,  $41 \pm 2$ ,  $62 \pm 1$ , and  $62 \pm 4$  at concentrations of  $5 \mu\text{g}$  per plate for dehydrodieugenol, dehydrodivanillyl alcohol, dehydrodihydroeugenol, dehydrodicreosol, magnolol, and honokiol, respectively. These values indicate that low concentrations of these biphenyl compounds effectively suppress UV-induced mutagenesis. Also, these compounds acted as effective antimutagens in a dose-dependent manner ( $0.00005$ – $5 \mu\text{g}$  per plate).

These compounds are effective  $\cdot\text{OH}$  scavengers. Consequently, the results obtained above suggest that these compounds could inhibit against UV-induced mutation by scavenging of  $\cdot\text{OH}$  generated by UV irradiation. The results also suggest that  $\cdot\text{OH}$  are associated with UV-induced mutation in *Salmonella typhimurium* TA 102.

**Keywords:** hydroxyl radical; UV-mutation; hydroxyl radical scavenger; biphenyl compound, *Salmonella typhimurium* TA 102

#### 緒言

スーパーオキシドラジカル, ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ), 一重項酸素の活性酸素種が生体内で生じ, 様々な障害を引き起こすことを示唆する研究が報告されている (Frong *et al.*, 1973; Kellogg *et al.*, 1975; Lai *et al.*, 1977; Tien *et al.*, 1981).

これら活性酸素による障害はタンパク質, 脂質, DNA などの生体成分におよび, 特に DNA への損傷は突然変異 (Bruyninckx *et al.*, 1978; Fenn *et al.*, 1957; Gifford, 1968) や細胞の死 (Wells *et al.*, 1984) に至ることが示唆されている. この DNA 損傷の一つの要因は, DNA 塩基の酸化的損傷が



示唆されており、またその酸化物のチミングリコール、5-ヒドロキシメチルウラシル、5-ホルミルウラシル、8-ヒドロキシグアノシンも検出されている (Adelman *et al.*, 1988; Ames *et al.*, 1991; Cathcart *et al.*, 1984; Floyd *et al.*, 1986). すなわち、活性酸素種の中でも特に  $\cdot\text{OH}$  の DNA への付加が、大きな要因と考えられている。

一方、活性酸素種と紫外線の関係においては、紫外線を最も多く受ける皮膚で、紫外線照射時にフリーラジカル反応の生じることが報告されている (Pathak *et al.*, 1968). 著者らは、表皮細胞を用いて紫外線照射による  $\cdot\text{OH}$  の生成を確認した (Taira *et al.*, 1992). Nishi らは、紫外線照射による表皮細胞の脂質の過酸化に、この  $\cdot\text{OH}$  の関与を示唆している (Nishi *et al.*, 1991). また紫外線による皮膚癌の原因の一つと考えられる紫外線突然変異も紫外線照射により生じた活性酸素の DNA 損傷によるものと考えられている (Smith, 1976). しかしながら、その原因の活性酸素種やそのメカニズムは明らかではない。

一方では、この毒性の強い  $\cdot\text{OH}$  の捕捉剤の研究も盛んに行われており、これまでも多くの捕捉剤が見出されている。我々も  $\cdot\text{OH}$  に特異な捕捉剤として、数種のフェノール性化合物に  $\cdot\text{OH}$  の捕捉作用を有することを見出している (Taira *et al.*, 1992, 1993).

本研究の目的は、紫外線突然変異に  $\cdot\text{OH}$  が関与しているのかを明らかにする目的で、酸化的ストレスに最も感受性の高い *Salmonella typhimurium* TA 102 (Levin *et al.*, 1982) に紫外線を照射した系に、 $\cdot\text{OH}$  捕捉剤のビフェニル化合物を添加し、その紫外線突然変異の抑制効果を検討した。

#### 実験材料および方法

実験に用いた 6 種のビフェニル化合物を図 1 に示した。Magnolol および honokiol は和光純薬工業 (株) より入手し、他のビフェニル化合物は、実験室で合成した (Taira *et al.*, 1993). また 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) はラボテック (株) から入手した。化合物はすべて dimethylsulfoxide (DMSO, 同仁化学研究所, 吸収スペク

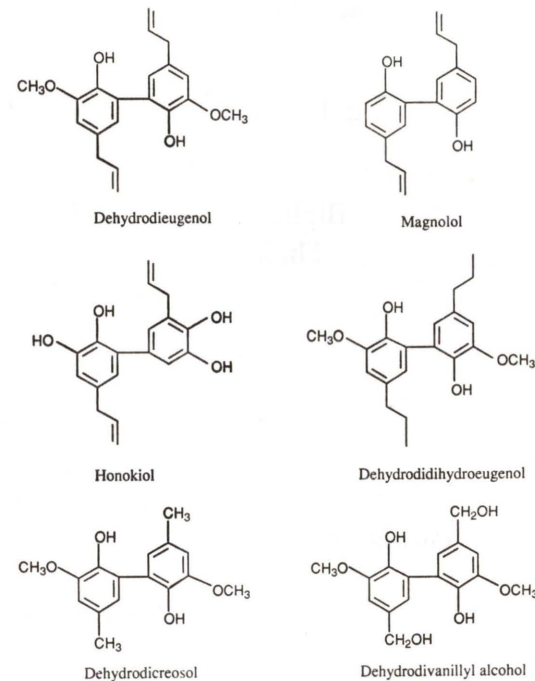


Fig. 1. Structures of biphenyl compounds tested in the present study.

トル用) に溶解させて用いた。その他の試薬は全て和光純薬工業 (株) より入手した。実験に用いた菌株、*Salmonella typhimurium* TA 102 は国立衛生試験所より供与を受けた。培地は最小グルコース平板培地を用い、トップアガーは寒天 0.7%/NaCl 0.5% の滅菌溶液に 0.5 mM L-ヒスチジン-HCl/0.5 mM ピオチン滅菌溶液を 1/10 容量加えて調製した。*Salmonella typhimurium* TA 102 は、20 ml/oxid nutrient broth No. 2 (ampicillin 500  $\mu\text{g}$ , tetracycline 40  $\mu\text{g}$  を添加) 中で 37°C, 16 時間培養し、磷酸緩衝液 (100 mM, pH 7.4) で 2 回洗浄後、同緩衝液に懸濁して  $1 \times 10^8$  cells/ml に調製し用いた。この懸濁液の 0.4 ml を直径 35 mm のシャーレにとり、これに磷酸緩衝液 2 ml と混合した後、254 nm の紫外線 (germicidal lamp, 15 W SANKYO DENKI) を 21.7 J/m<sup>2</sup> 照射した (紫外線照射量は、UVX-254 radio meter UV, P, INC., USA で測定)。紫外線照射後、直ちにビフェニル化合物溶液または DMPO 溶液を 0.4 ml 加えた。この混合液から 0.7 ml を分取し、2

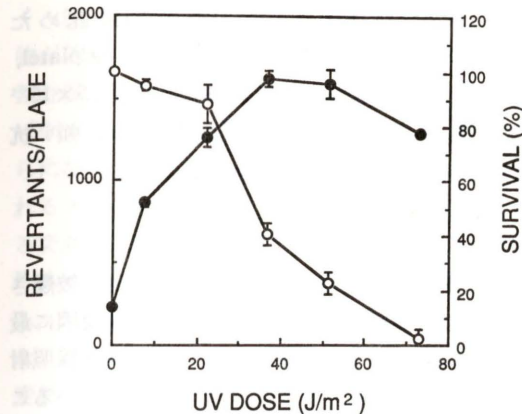


Fig. 2. Mutation on *Salmonella typhimurium* TA 102 accompany with UV irradiation. (●) revertants/plate, (○) % survival. Each assay consisted of triplicate plates for each amount of radiation, and the results were the average (mean  $\pm$  SD) of three tests.

ml のトップアガーを混和して、最小グルコース寒天培地に重層した。37°C で 48 時間転倒培養後に復帰コロニー数 (revertants) をカウントした。一方で菌の生存率を確認するため、菌懸濁液を 10<sup>5</sup> 倍に希釈して同様の操作を行い、培養後の生菌数 (viable cells) をカウントして生存率 (survival(%)) を求めた。突然変異率 (mutation frequency) は、生菌数当たりの復帰コロニー数で求めた。実験は、全て各濃度に 3 枚のプレートを用い、結果は 3 回の実験の平均値から相対変異率 (relative mutagenic activity(%)) として次式より算出して求めた。

$$\text{RMA (\%)} = \frac{\text{mutation frequency of test compounds}}{\text{mutation frequency of DMSO}} \times 100$$

#### 結果

図 2 に紫外線照射量と復帰コロニー数との関連を示す。紫外線による菌の復帰コロニー数、即ち突然変異は、7.3 から 36.3 J/m<sup>2</sup> までの紫外線照射量に伴い変異を起こし、それ以上の照射量では大きな変化を認めなかった。各種ビフェニル化合物による紫外線突然変異抑制効果の評価に当り、紫外線照射量は菌の生存率が 88% の時の紫外線

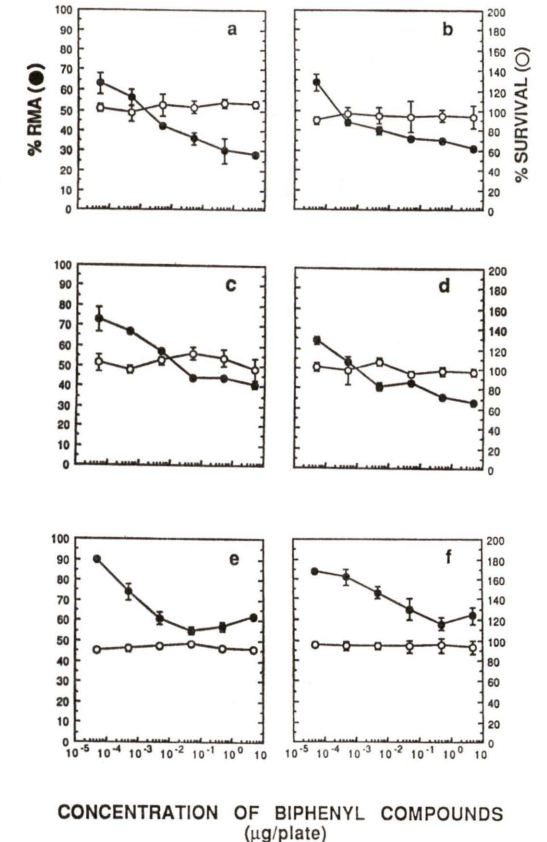


Fig. 3. Inhibition of biphenyl compounds against UV-mutation on *Salmonella typhimurium* TA 102. The assay was subjected to triplicate plates, and the results were indicated the average (mean  $\pm$  SD) of three times tests. Relative mutagenic activity (RMA, %) was calculated as shown in the text. (a) dehydrodieugenol, (b) dehydrodivanillyl alcohol, (c) dehydrodicreosol, (d) dehydrodihydroeugenol, (e) magnolol, and (f) honokiol.

量 21.7 J/m<sup>2</sup> に決めた。図 3 にビフェニル化合物 6 種の紫外線突然変異の抑制効果を示す。データは示さないが、magnolol と honokiol は 50  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で、菌に対する生育阻害を起こし、また dehydrodihydroeugenol は 50  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で析出を生じたため、今回の評価濃度は、最高 5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  で評価した。それぞれ 5  $\mu\text{g}/\text{plate}$  における RMA (%) は dehydrodieugenol: 28  $\pm$  1, dehydrodivanillyl alcohol: 31  $\pm$  1, dehydrodihydroeugenol: 33  $\pm$  1, dehydrodicreosol: 41  $\pm$  2, mag-



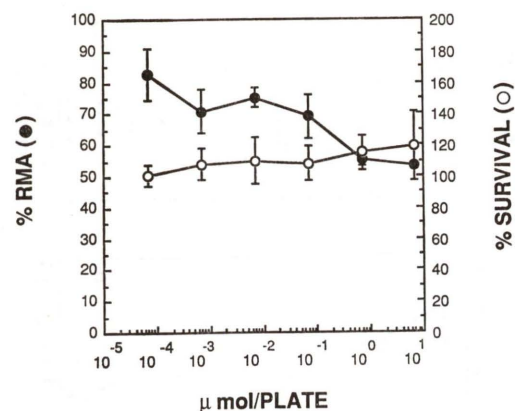


Fig. 4. Inhibition of DMPO against UV-mutation on *Salmonella typhimurium* TA 102. The assay was subjected to triplicate plates, and the results were indicated the average (mean $\pm$ SD) of three times tests. Relative mutagenic activity (RMA, %) was calculated as shown in the text.

nolol:  $62\pm 1$ , honokiol:  $62\pm 4$  で、これまでの化合物にない高い紫外線突然変異抑制効果を認めた。また図にも示されるように、同化合物はそれぞれの RMA(%) 値が  $5\times 10^{-5}$   $\mu\text{g}/\text{plate}$  の低濃度から  $5\mu\text{g}/\text{plate}$  の広範囲な濃度域で、濃度依存的に低下を示すことも特徴であった。

一方、生物試料から生じる  $\cdot\text{OH}$  の検出のための研究にしばしば用いられるスピントラップ剤に DMPO がある。本トラップ剤は、 $\cdot\text{OH}$  とスピニアダクト (DMPO- $\text{OH}$ ) を形成し、電子スピン共鳴装置で検出することを目的に使われる。 $\cdot\text{OH}$  が紫外線突然変異に関与していることを確かめるため、ビフェニル化合物と同様に DMPO を同系に添加し、紫外線誘発による突然変異の抑制効果を調べた。図 4 に DMPO の紫外線突然変異に対する効果を示す。図からも明らかのように、RMA(%) 値は、DMPO の濃度増加に伴い低下した。例えば、DMPO  $7\mu\text{mol}/\text{plate}$  即ち、 $7.9\times 10^2\mu\text{g}/\text{plate}$  に相当する RMA(%) 値は 53.5 であった。これらの結果から、紫外線突然変異の抑制は、明らかに DMPO の  $\cdot\text{OH}$  捕捉作用による効果と考えることが妥当であろう。また、ビフェニル化合物の DMPO との紫外線突然変異抑制効果を比較した場合、上記の DMPO の RMA 値に対し、

ビフェニル化合物は最も高い抑制効果を認めた dehydrodivanillyl alcohol で約  $5\times 10^{-4}\mu\text{g}/\text{plate}$ 、また抑制効果の最も低い honokiol で、約  $5\times 10^{-1}\mu\text{g}/\text{plate}$  の濃度で同等の抑制効果を示し、強い抗変異原物質であることを示した。

## 考 察

紫外線による障害は、主に紫外線に常に被爆されている皮膚組織で生じる。この大きな要因に最近活性酸素の関与が指摘されている。紫外線照射した皮膚で、フリーラジカル反応が生じていることは、最初に Pathak らにより報告されている (Pathak *et al.*, 1968)。最近の研究で、紫外線を照射した表皮細胞から、 $\cdot\text{OH}$  が生成し、またこの  $\cdot\text{OH}$  が脂質の過酸化に関与していることも示唆されている (Taira *et al.*, 1992; Nishi *et al.*, 1991)。一方で、紫外線による皮膚癌の原因の一つに、紫外線突然変異や紫外線照射により生じた活性酸素の DNA 損傷によることが示唆され、特に  $\cdot\text{OH}$  の DNA 塩基付加物も検出、同定されている (Smith, 1976)。一方では、この毒性の強い  $\cdot\text{OH}$  の捕捉剤の研究も盛んに行われており、我々も  $\cdot\text{OH}$  に特異な捕捉剤として、数種のフェノール性化合物に  $\cdot\text{OH}$  の捕捉作用を有することを見出している (Taira *et al.*, 1992, 1993)。今回は、紫外線突然変異と活性酸素との関連を明らかにするため、 $\cdot\text{OH}$  捕捉剤のビフェニル化合物を紫外線照射した *Salmonella typhimurium* TA 102 系で検討した (図 3)。ビフェニル化合物による紫外線突然変異の抑制は、RMA(%) 値が  $5\times 10^{-5}\mu\text{g}/\text{plate}$  の低濃度から  $5\mu\text{g}/\text{plate}$  の広範囲な濃度域で、濃度依存的な低下を示した。この RMA(%) 値は、Shimoi らが報告している特定のタンニン酸、カテキンなどの化合物に比べても、非常に低く、且つ作用濃度範囲の広いのが特徴である (Shimoi *et al.*, 1986)。この結果から、今回評価したビフェニル化合物は、強い抗変異原物質であると言える。また Shimoi らは同化合物による紫外線突然変異の抑制機構は、DNA の除去修復の増進によるものと推察しているが、著者らは、ビフェニル化合物の紫外線突然変異に対する作用濃度が、タンニン酸などの抗変異原物質に比べ、かなり低

く、作用濃度範囲の広いこと及びビフェニル化合物が強い  $\cdot\text{OH}$  の捕捉剤であることから、今回の紫外線突然変異抑制機構は、紫外線により生じた  $\cdot\text{OH}$  の捕捉によるものと推察した。このことをさらに証明するため、 $\cdot\text{OH}$  の検出のために用いられるスピントラップ剤 DMPO を紫外線誘発による突然変異の抑制効果を同系で検討した (図 4)。RMA(%) 値は、DMPO の濃度増加に伴い低下し、紫外線突然変異に対する効果を示した。また、ビフェニル化合物は、DMPO の紫外線突然変異抑制効果の約  $1/10^8\sim 1/10^3$  の低濃度域で、抑制効果を示した (図 4, 5)。この結果はビフェニル化合物と  $\cdot\text{OH}$  の反応速度定数が DMPO のそれに比べても、明らかに高い速度定数を有していることともよく一致している (Taira *et al.*, 1993)。また、ビフェニル化合物は脂溶性の高い化合物であるため、膜近傍への移行が速やかに行われ、効果の発現に寄与しているものと思われる。これらの結果から、ビフェニル化合物及び DMPO による紫外線突然変異の抑制は、明らかに紫外線照射により菌体で生じた  $\cdot\text{OH}$  捕捉作用による効果と考えることが妥当であろう。また、この結果は *Salmonella typhimurium* TA 102 における紫外線突然変異が、紫外線により生じた  $\cdot\text{OH}$  の生成と何らかの因果関係のあることを同時に示唆するものである。

しかしながら、 $\cdot\text{OH}$  が紫外線突然変異を引き起こすメカニズムおよびビフェニル化合物の  $\cdot\text{OH}$  捕捉機構については不明であり、今後の大きな研究課題である。

## 参 考 文 献

- Adelman, R., R. L. Saul and B. N. Ames (1988) Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (U.S.A.), **85**, 2706-2708.
- Ames, B. N. and L. S. Gold (1991) Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.*, **250**, 3-16.
- Bruyninckx, W. J., S. H. Maon and S. A. Morse (1978) Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature*, **274**, 606-607.
- Cathcart, R. E., Schwiers, R. L. Saul and B. N. Ames (1984) Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: A possible

- assay for oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (U.S.A.), **81**, 5633-5637.
- Fenn, W. O., R. Gerschman and D. L. Gilbert (1957) Mutagenic effects of high oxygen tensions on *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.A.), **43**, 1027-1032.
- Floyd, R. A., J. J. Watson, P. K. Wong, D. H. Altmiller and R. C. Rickard (1986) Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: Sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Rad. Res. Commun.*, **1**, 3, 163-172.
- Fong, K. L., P. B. McCay, J. L. Poyer, B. B. Keele and H. Misra (1973) Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792-7797.
- Gifford, G. D. (1968) Mutation of an auxotrophic strain of *Escherichia Coli* by high pressure oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 294-298.
- Kellogg, E. W. and I. Fridovich (1975) Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, **250**, 8812-8817.
- Lai, C.-S. and L. G. Piette (1977) Hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 51-59.
- Levin, D. E., M. F. Christman, E. A. Schwiers and B. N. Ames (1982) A new *Salmonella* tester strain (TA 102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U.S.A.), **79**, 7445-7449.
- Nishi, J., R. Ogura, M. Sugiyama, T. Hidaka and M. Kohno (1991) Involvement of active oxygen in lipid peroxide radical reaction of epidermal homogenate following ultraviolet light exposure. *J. Invest. Dermatol.*, **97**, 115-119.
- Pathak, M. A. and K. Stratton (1968) Free radical in human skin before and after exposure to light. *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 468-476.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara and T. Kada (1986) The pyrogallol related compounds reduce UV-induced mutations in *Escherichia coli* B/r WP 2. *Mutat. Res.*, **173**, 239-244.
- Smith, K. C. (1976) Carcinogenesis and radiation biology. In: Smith, K. C. (Eds.) *Aging*, New York, Plenum. press, pp. 67-81.
- Taira, J., K. Mimura, T. Yoneya, A. Hagi, A. Murakami and K. Makino (1992) Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells. *J. Biochem.*, **111**, 693-699.
- Taira, J., T. Ikemoto, T. Yoneya, A. Hagi, A.



Murakami and K. Makino (1992) Essential Oil Phenyl Propanoids. Useful as  $\cdot\text{OH}$  scavengers?, Free Rad. Res. Commun., **16**, 197-204.

Taira, J., T. Ikemoto, K. Mimura, A. Hagi, A. Murakami and K. Makino (1993) Effective inhibition of hydroxyl radicals by hydroxylated biphenyl compounds, Free Rad. Res. Commun., **19**, Supplement, 71-77.

Tien, M., B. A. Svingen and S. D. Aust (1981) Superoxide dependent lipid peroxidation, Fed. proceed., **40**, 179-182.

Wells, R. L. and A. Han (1984) Action spectra for killing and mutation of chinese hamster cells exposed to mid-and near ultraviolet monochromatic light, Mutat. Res., **129**, 251-258.

Environ. Mut. Res. Commun., **16**: 195-204 (1994)

一般論文

## エイムス試験に有用な新しいラット肝チトクロム P450 誘導剤\*

### A new cytochrome P450 inducer for Ames test\*

森 幸雄<sup>1</sup>, 飯村和徳<sup>1</sup>, 小西陽一<sup>2</sup>

Mori, Y.<sup>1</sup>, K. Iimura<sup>1</sup> and Y. Konishi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大学放射化学研究室 502 岐阜市三田洞東 5-6-1,

<sup>2</sup>奈良医科大学がんセンター腫瘍病理 634 橿原市四条町 840

<sup>1</sup>Radioisotope Laboratory, Gifu Pharmaceutical University, 6-1, Mitahora-higashi 5-chome, Gifu 502, Japan

<sup>2</sup>Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University, 840 Kashihara, Nara 634, Japan

(受付: 1994 年 3 月 17 日; 受理: 1994 年 4 月 15 日)

#### Summary

The effects of *N*-benzylimidazole (BI) on mutagenic activation of six groups of carcinogens were studied with Ames liquid incubation assay. Intragastric treatment of male Sprague-Dawley, ACI/N and Wistar rats for 3 days with BI produced 2.6~3.4-fold induction of hepatic microsomal cytochrome P450 (CYP). In the presence of liver S9 from BI-treated SD rats, the mutagenicity of five *N*-nitrosamines on *S. typhimurium* TA100 and two arylamines, aflatoxin B<sub>1</sub>, two polycyclic hydrocarbons, two aminoazo compounds and six amino acid pyrolysates on TA98 were induced 2~78-fold above controls, which are all known to be mutagenically activated by CYP 1 and/or 2 species. Compared with the reported results for rats treated with polychlorobiphenyls (PCB), the numbers of revertant colonies were the same or higher (0.7~1.9-fold). In addition, when rats of three strains were treated with either BI or PCB, liver S9 from ACI/N rats was inferior to those from SD and Wistar rats for the mutagenic activation of two aminoazo compounds and co-mutagenic effect by norharman was observed in their mutagenic activations, indicating that BI and PCB show a similar pattern of induction of CYP-dependent properties. In conclusion, these results demonstrate the use of BI for metabolic induction to be an effective alternative for induction with either PCB or a combination of phenobarbital and  $\beta$ -naphthoflavones.

**Keywords:** Salmonella/microsome test; rat liver CYP; *N*-benzylimidazole; potent S9 inducer; various carcinogens

#### 緒言

多くの癌原物質は代謝活性化されて突然変異活性を示すことから、プレスクリーニング法としての微生物突然変異原性試験, *in vitro* 染色体異常試験及び哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験等においては使用される代謝活性化系がその感度

に大きく影響することになる。代謝活性化系として一般に用いられるラット肝 9,000 g 上清 (S9) 中のチトクロム P-450 (CYP) のアイソザイムは多数が知られているが、環境性発癌物質の活性化にはヒトと実験動物肝 CYP1A1, 1A2, 2B1, 2E1 等の関与することが知られている (Guengerich,

\* This paper is dedicated to Professor Yoshifumi Maki on this occasion of his retirement from Gifu Pharmaceutical University in March 1994.



1993; Lewis *et al.*, 1993; Soucek and Gut, 1992). したがって、各種 CYP 誘導剤がそれぞれの目的によって使われているが、短期検索法としての変異原性試験では、polychlorobiphenyls (PCB) の使用が推奨されていた (Maron and Ames, 1983). しかし、PCB は特定化学物質に指定されたことにより、その入手と使用後の処理が困難となっている。PCB に代わる誘導剤としては phenobarbital (PB) と  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) の併用投与が有効であることも報告されている (Matsushima *et al.*, 1976). 市販の肝 S9 の調製で採用されている PB と  $\beta$ NF の併用投与では 1 匹のラットに 4 日間、計 5 回の投与が必要であることなどから、これらに代わりうる新規 CYP 誘導剤の開発が重要と考える。

Imidazole (Koop and Coon, 1984) と一連の N-置換誘導体 (Ritter and Franklin, 1987; Khan *et al.*, 1989) が家兎、ラット及びマウス肝 CYP を誘導すること、またこれらの中で N-benzylimidazole (BI) は、PCB と共通の誘導パターンを示すことが薬物代謝酵素活性の測定から (Papac and Franklin, 1988) 報告された。著者らは、種々の *in vitro* 変異原性試験に有用な CYP 誘導剤の開発を目的として、CYP1 または 2 により代謝活性化されるそれぞれ異なったタイプの 18 種癌原物質の変異原性を Wistar 系ラット肝 S9 共存下で Ames 法により検討し、BI の PCB 型誘導の特徴を明らかにした (Mori *et al.*, 1993).

そこで、本論文では、BI の Ames 試験における有用性を更に確認するために、BI 自身の変異原性と肝 S9 への残留性、繁用の Sprague-Dawley (SD) 系ラットとアミノアゾ化合物による発癌に対して低感受性の ACI/N 系ラット (Mori *et al.*, 1987) との系統差及び norharman による助変異原効果における BI 処置の影響等について検討した。

## 実験材料と方法

### 1. 試薬

BI (純度 99%, CAS No. 4238-71-5), 2-amino-fluorene (AF, 153-78-6) 及び norharman は Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA),

aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>, 1162-65-8) は Makor Chemicals Ltd. (Jerusalem, Israel) 並びに N-nitroso-dimethylamine (DMN, 62-75-9), 2-acetyl-AF (AAF, 53-96-3), benzo[a]pyrene (BP, 50-32-8), 3-methylcholanthrene (MC, 56-49-5), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ, 76180-96-6), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ, 77094-11-2), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1, 62450-06-0) acetate, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) acetate, 2-amino-6-methylpyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1, 67730-11-4)·HCl, 2-aminopyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-2, 67730-10-3)·HCl, PCB (mixture of hexa-isomers), Tween 20 及び dimethyl sulfoxide (DMSO) は和光純薬工業株式会社より購入した。Glucose-6-phosphate (G6P), NADPH, ATP, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) 及び NADP<sup>+</sup> はオリエンタル酵母工業株式会社より入手した。N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP, 60599-38-4), N-nitroso-2,6-dimethylmorpholine (NDMM, 1456-28-6), N-nitrosomethyl(2-hydroxypropyl)amine (MHP, 75411-83-5), N-nitrosobis(2-acetoxypentyl)amine (BAP, 60414-81-5), 3'-methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene (3'-CH<sub>3</sub>-DAB, 55-80-1) 及び 3'-hydroxymethyl-DAB(3'-CH<sub>2</sub>OH-DAB, 35282-68-9) は当研究室で合成した (Mori *et al.*, 1978; 1980). N-nitrosamine の純度は高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) により 99% 以上であることを確認した。

### 2. BI 前処置法とミクロゾーム (Ms) の CYP 含量の測定

雄性 Wistar, SD 及び ACI/N 系ラットは 6 週齢で日本エスエルシー株式会社より入手した。BI は 0.5% Tween 20 で懸濁し (30 mg/ml), 75 mg/kg 用量を 1 日に 1 回、3 日間腹腔内 (*ip*) 又は胃ゾンデで強制的に胃内 (*ig*) に投与し、最終投与から 2 日 (12 時間の絶食) 後に、氷冷した 1.15% KCl で灌流後肝を摘出した。PCB は綿実油に溶解後、500 mg/kg を 1 回 *ip* 投与し、5 日後に肝

を摘出した。Ms と S9 画分は常法に従い調製し (Mori *et al.*, 1983), また Ms タンパクと CYP 含量は Bradford 等 (1976) と Omura と Sato (1964) の方法に従ってそれぞれ測定した。

### 3. 変異原性試験

各試験は、*S. typhimurium* TA98 または TA100 を菌株として、すべてプレインキュベーション法 (Yahagi *et al.*, 1977) で行った。化合物と S9 の用量は、アミノ酸熱分解物は Smith 等 (1992), AFB<sub>1</sub> は Ueno 等 (1978), アミノアゾ化合物と N-nitrosamine は Mori 等 (1980; 1985) 及びその他の化合物は Maron と Ames (1983) により、PCB 処置したラット肝 S9 共存下についてそれぞれ報告されている条件を採用した。すなわち、S9 量は 5 種 N-nitrosamine, 2 種アミノアゾ化合物及び AFB<sub>1</sub> は 150  $\mu$ l, MC は 100  $\mu$ l, 2 種芳香族アミンと B(a)P は 50  $\mu$ l, 6 種アミノ酸熱分解物は 10  $\mu$ l でそれぞれ行った。5 種 N-nitrosamine (10 mg), Trp-P-1 (0.3  $\mu$ g) と Trp-P-2 (0.03  $\mu$ g) の酢酸塩及び Glu-P-1 (0.03  $\mu$ g) と Glu-P-2 (33  $\mu$ g) の塩酸塩は 0.1 ml 水に、アミノアゾ化合物 (1  $\mu$ mol), MC (50  $\mu$ g), AAF (50  $\mu$ g), B(a)P (5  $\mu$ g), AF (2  $\mu$ g), IQ (0.33  $\mu$ g), MeIQ (0.33  $\mu$ g), AFB<sub>1</sub> (1  $\mu$ g) 及び BI は 0.1 ml DMSO にそれぞれ溶解した。S9 混液は S9 と N-nitrosamine では NADP<sup>+</sup>, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl を他の化合物では NADP<sup>+</sup> の代わりに NADPH, NADH, G6PDH, ATP (長尾, 1978) を加え、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で全量 0.5 ml になるよう調製した。37°C で 15 時間培養した菌懸濁液 100  $\mu$ l (約 1~2 $\times$ 10<sup>8</sup> 個に相当) を加え、アミノアゾ化合物は 37°C で 1 分間、他の化合物は 20 分間プレインキュベイトした。norharman 添加の場合は 50  $\mu$ l DMSO に溶解した 0.2 mg norharman を加えてプレインキュベイトした。

### 4. BI の TA98 と TA100 菌株の生菌数に対する影響

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 10<sup>8</sup> 倍希釈した菌懸濁液 100  $\mu$ l と BI を、ラット肝 S9 混液共存又は非共存下で、20 分間プレインキュベイト

した。0.5 mM histidine と 0.5 mM biotin を含むソフトアガー 2 ml と混合し、0.8% Difco nutrient broth と 0.5% NaCl を添加した 1.5% Difco BiTek アガープレート上で 37°C で 48 時間インキュベイトした後、生成したコロニー数を計数した (Maron *et al.*, 1981; Mori *et al.*, 1985).

### 5. HPLC による分析

HPLC 装置として島津 LC-9A システム (島津製作所) とカラムに Finepak SIL C<sub>18</sub> (内径 4 mm  $\times$  25 cm, 日本分光工業) を用いた。肝 S9 中 BI の測定においては、300  $\mu$ l S9 に 550  $\mu$ l CH<sub>3</sub>CN とリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて全量 1 ml とし、1500 g で遠心分離後の上清をサンプルとした。尿中 BI の測定は、BI 投与したラットを個別に代謝ケージ中で飼育し、投与後 24 時間の尿を洗浄液と共に 100 ml にした。これを Sep-Pak カートリッジ C<sub>18</sub> (Waters Associates) に吸着させ、10 ml の水で洗浄後、2 ml CH<sub>3</sub>CN で溶出した。それぞれのサンプル 20  $\mu$ l を HPLC 装置に注入し、CH<sub>3</sub>CN-0.05 M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液 (15:85) を用い、流速 1.5 ml/min で溶出した (Cavriani *et al.*, 1982).

## 結果

### 1. BI 処置ラット肝 Ms タンパクと CYP 含量

Table 1 には、BI で 3 日間 *ig* 又は *ip* 処置した時の 3 系統ラットについてのいくつかのパラメータを示した。SD 系ラットの未処置群と Tween 20 のみを処置したコントロール群では、Ms タンパクと CYP 含量は共に有意差がなかった。BI で *ig* 処置した場合は未処置群に比べ肝重量、Ms タンパク及び CYP 含量でそれぞれ 1.5, 1.7 及び 2.7 倍と明らかに上昇した。更に、CYP の CO 差スペクトルは 451 nm から 449 nm へシフトした。一方、*ip* 処置した場合の Ms タンパクと CYP 含量はそれぞれ 1.5 と 1.2 倍であり、差スペクトルのシフトは 450 nm であった。*ig* と *ip* 処置群を比較すると、3 系統ラットすべてにおいて CYP 含量は *ig* 処置が 1.5~2.8 倍高く、また CYP の CO 差スペクトルの挙動は ACI/N と Wistar 系においても同様であった。PCB 処置した Wistar 系



Table 1. Microsomal protein and cytochrome P-450 (CYP) contents in rat liver

Parameter	SD		ACI/N		Wistar		PCB
	<i>ig</i>	<i>ip</i>	<i>ig</i>	<i>ip</i>	<i>ig</i>	<i>ip</i>	
b.w. (g)	147-179	170-200	120-125	163-181	172-179	143-169	130-160
No. of rats	10	5	3	5	5	3	10
Liver/b.w. (%)	5.96	4.95	6.47	5.32	7.50	6.10	7.00
Protein content (mg/ml)	7.38	6.40	7.50	6.27	8.00	6.40	10.94
CYP content nmol/mg (nm)	2.33	1.05	2.44	1.07	2.92	1.03	1.72
	449	450	449	450	449	450	449

Male rats were treated with 75 mg/kg of BI *ig* or *ip*, once daily for 3 days. PCB was given as a single *ip* injection at a dose of 500 mg/kg.

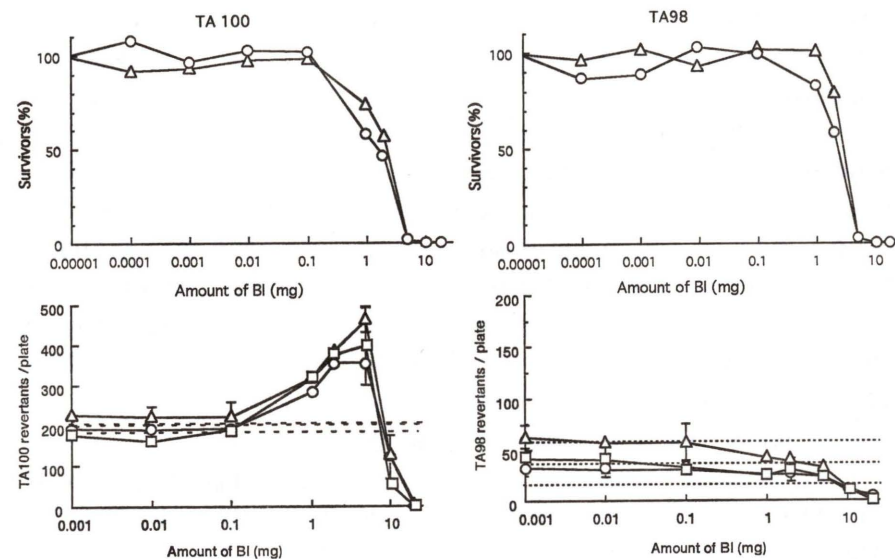


Fig. 1. Toxicity and mutagenicity of commercially available BI on TA100 and TA98 in the absence (○) or presence of 0.15 ml liver S9 from untreated (□) or BI-treated (△) Wistar rats. Survivors represent the percentages of 680~966 (TA100) or 480~945 (TA98) bacteria that survived exposure to BI. Dotted lines indicate the numbers of spontaneous revertants.

ラット肝の結果も Table 1 に示したが、BI で *ig* 処置したときの CYP 誘導能はいずれの場合もそれより 1.4~1.7 倍高かった。

## 2. BI のサルモネラ菌株に対する毒性と変異原性

市販 BI の TA98 と 100 に対する致死効果と変異原性について、0.01  $\mu$ g~20 mg/plate の BI 用量で Wistar 系ラット肝 S9 について検討した結

果を Fig. 1 に示した。BI はラット肝 S9 非共存下では TA100 と 98 に対してそれぞれ 1 と 2 mg 用量で 58% に生菌数を減少させた。S9 共存下でも TA100 に対して 2 mg 用量で 56% に減少させ、5 mg 用量ではいずれの場合もほぼ 100% の致死効果を示した。BI の変異原性は未処置肝 S9 を添加した場合も合わせて検討したが、TA98 では 3 条件下で 0.1 mg 迄はそれぞれの条件下での自然復帰変異数と差は認められず、10 mg 以上の

用量では明らかな致死効果の影響が現われた。TA100 に対しては、肝 S9 非共存下で 0.1~5 mg で用量依存的に活性が上昇し、10~20 mg 用量では自然復帰変異数以下となった。しかし、BI 処置と未処置肝 S9 はいずれも直接変異原活性に影響しなかった。市販 BI (淡黄色結晶性粉末、融点 68~70°C) を methanol で再結晶したところ、白色結晶性粉末の BI (融点 67~68°C) が得られた。そこで再結晶 BI について TA100 を試験菌株に BI 処置肝 S9 の共存下と非共存下で検討したが、いずれの場合も変異原性は認められなかった。

## 3. BI による環境性発癌物質の変異原活性誘導能

BI の代謝活性化誘導能を評価するために、PCB 誘導ラット肝 S9 について既知の実験条件下で、18 種の癌原物質の SD 系ラット肝 S9 共存下での変異原性を検討した。未処置群とコントロール群の間では、すべての癌原物質で変異原活性に有意差はなかった。Fig. 2 に示したように、コントロール群の 3'-CH<sub>3</sub>-DAB、3'-CH<sub>2</sub>OH-DAB、Glu-P-1、Glu-P-2、MC、DMN 及び B(a)P の活性は自然復帰変異数の 3 倍以下であったが、BI の *ig*

処置群ではこれらが 2~78 倍に強く誘導された。その他の 11 種癌原物質はコントロール群でも明らかな変異原性を示したが、BI の *ig* 処置群はそれらの活性をコントロール群の 2~34 倍に上昇させた。

2 種アミノアゾ化合物の 3 系統ラット間での系統差を、PCB と BI 処置群について TA98 を試験菌株に検討した。Fig. 3 には PCB 処置した SD と ACI/N 系ラット肝 S9 についての用量-応答曲線を示したが、両化合物ともに ACI/N 系ラット肝はすべての用量で顕著に低い活性を示した。逆に、Wistar 系ラット肝 S9 共存下での 1  $\mu$ mol の 3'-CH<sub>3</sub>-DAB と 3'-CH<sub>2</sub>OH-DAB の自然復帰変異数を引いた活性はそれぞれ 333 と 360 revertants/plate であり、SD 系ラットとの系統差はなかった。BI を *ig* 処置した ACI/N 系ラット肝 S9 共存下での 3'-CH<sub>3</sub>-DAB と 3'-CH<sub>2</sub>OH-DAB 1  $\mu$ mol 用量での自然復帰変異数を引いた活性はそれぞれ 152 と 214 revertants/plate であった。SD 系ラットのそれら (Fig. 2) と比較すると、BI 処置した場合も Wistar と SD 系ラット間ではほぼ一致するのに対して、ACI/N 系ラット肝 S9 は低い活性を示した。この系統差が CYP1 により代謝活性化される癌原物質に共通の現象であるのかを確認

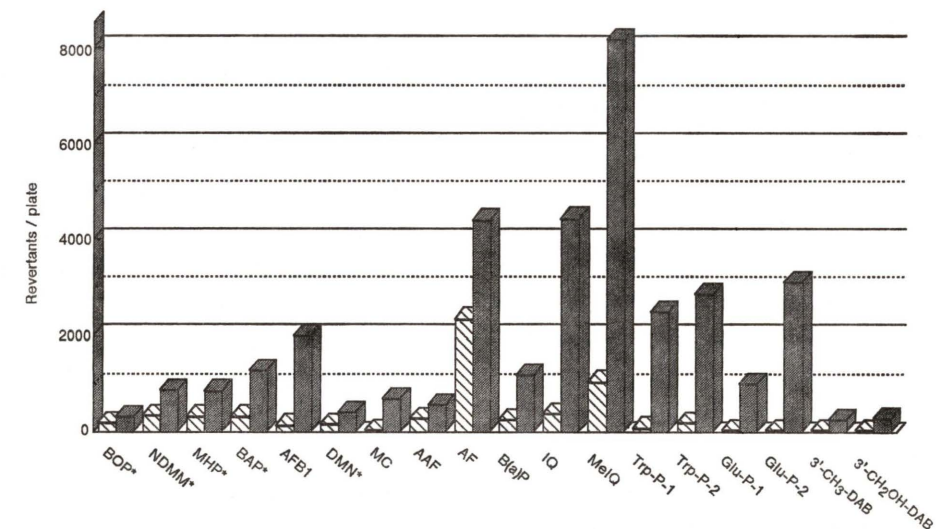


Fig. 2. Mutagenic activities of various carcinogens in the presence of liver S9 from control rats (▨) and from SD rats treated with BI *ig* (■). Each test was carried out in duplicates ( $n=4$ ) or triplicates ( $n=6$ , DMN, AAF, MeIQ and Glu-P-1). Spontaneous revertant colonies (TA98, 30; \* TA100, 135) were subtracted.



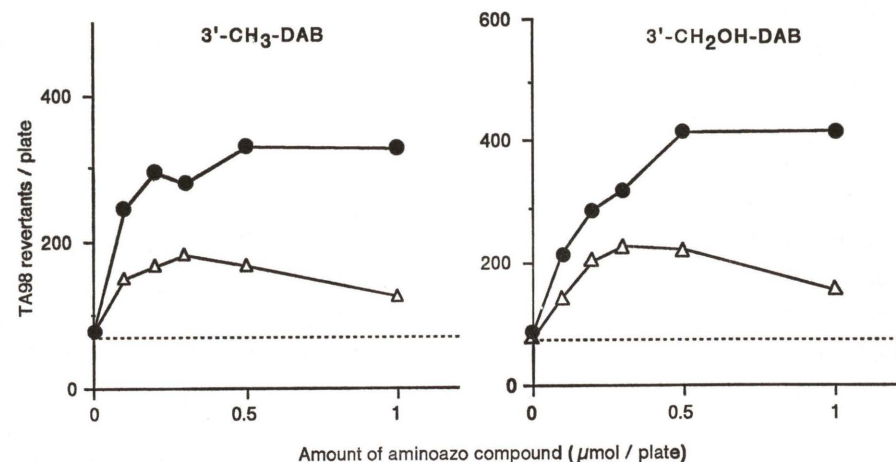


Fig. 3. Strain differences in mutagenicity of aminoazo compounds in the presence of liver S9 from SD (●) and ACI/N (△) rats treated with PCB *ip*. Dotted line indicates the number of spontaneous revertants ( $n=4-8$ ).

Table 2. Strain differences in mutagenicity of amino acid pyrolysates in the presence of liver S9 from rat treated with BI *ig*

Strain	TA98 Revertants/plate					
	IQ	MelQ	Trp-P-1	Trp-P-2	Glu-P-1	Glu-P-2
SD	4428 (1.0)	8139 (1.0)	2481 (1.0)	2861 (1.0)	982 (1.0)	3113 (1.0)
ACI/N	3841 (0.9)	8392 (1.0)	2531 (1.0)	2779 (1.0)	1492 (1.5)	2991 (1.0)

Spontaneous revertant colonies (30) were subtracted. Each test was carried out in duplicates ( $n=4$ ). Values in parentheses show the ratio to the revertants obtained with SD rats.

するために、6種アミノ酸熱分解物について検討した。Table 2 には SD 系ラットの結果と比較して示したが、ACI/N 系ラット肝の活性は Glu-P-1 では 1.5 倍高く、その他では SD 系ラットのそれらとよく一致した。

norharman による助変異原性については、BI の *ig* と *ip* 処置または PCB 処置肝 S9 共存下で検討した (Fig. 4)。norharman を添加した場合はいずれの処置群でも助変異原効果は顕著であり、3'-CH<sub>3</sub>-DAB の変異原活性は SD 系で 9~12 倍、ACI/N 系で 12~16 倍及び Wistar 系で 7~11 倍上昇し、3'-CH<sub>2</sub>OH-DAB のそれは同様にそれぞれ 7~11 倍、5~15 倍及び 8~9 倍の上昇であった。また、3'-CH<sub>3</sub>-DAB の Wistar 系ラット肝の活性を除くと、BI を *ip* 処置した場合の norharman 共存下の変異原活性はすべて *ig* 処置と PCB 処置群よりも明らかに低かった。すなわち、PCB

処置または BI を *ig* 処置したときの活性はいずれも BI を *ip* 処置したときのその 1.4~3.6 倍であった。

#### 4. BI 処置ラット肝 S9 と尿中 BI の検出

標品 BI を添加した Wistar 系ラット肝 S9 サンプルからの回収率は、0.08, 0.17, 0.33 及び 0.66 mg/0.3 ml 肝 S9 の BI を添加して HPLC 法で分析したところ、90±1.2% と良好であった。Fig. 5 には未処置肝 S9 に 0.2 mg/ml の BI を添加したとき、未処置肝 S9 及び BI 処置肝 S9 のクロマトグラムを示したが、BI 処置ラット肝 S9 中に BI は全く検出されなかった (検出限界 11.7 µg/0.3 ml 肝 S9)。

BI の投与法の違いにより、肝 CYP 含量誘導能に大きな差が認められたので (Table 1), BI を *ig* または *ip* 処置した Wistar 系ラットの投与後 24

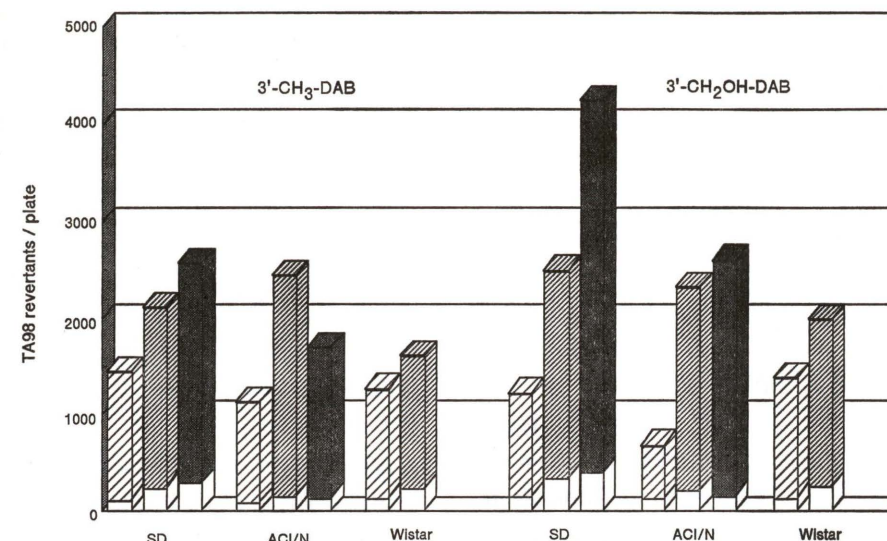


Fig. 4. Mutagenic activities of aminoazo compounds in the presence of liver S9 from rats treated with BI *ip* (▨), BI *ig* (■) or PCB *ip* (▤) with or without (open marks) 0.2 mg of norharman. Spontaneous revertant colonies (TA98, 30; \* TA100, 135) were subtracted.

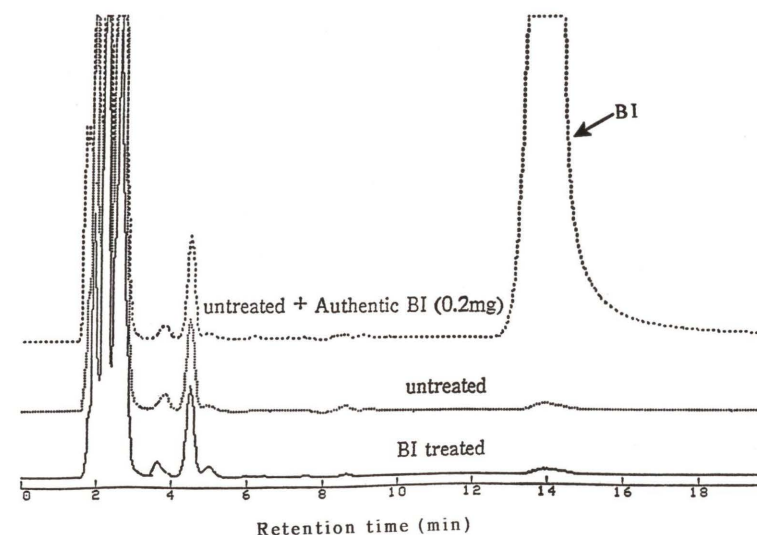


Fig. 5. High performance liquid chromatograms of the supernatant extracts from liver S9 from Wistar rats treated with or without BI.

時間の尿中 BI 量を測定した。*ig* と *ip* 処置ラット尿中への BI の排泄量はそれぞれ 192.3±5.6 と 58.6±3.8 µg であり、投与量のそれぞれ 1.28 と 0.39% であった。尚、この場合の尿と洗液を Sep-Pak カートリッジで処理した時の BI の添加回収率は 88% であった。

#### 考 察

BI が試験菌株 TA98 と 100 に対して顕著な致死作用を示すことは、miconazole, clotrimazole 及び tioconazole 等が抗真菌剤であること (鈴木, 1985) を考え合わせると、N-置換 imidazole 骨格の 1 つの共通した特徴であることが推察され



る。市販 BI が TA100 に対して弱い直接変異原性を示したが、0.3 ml 肝 S9 中には BI が全く検出されなかったこと (Fig. 5), 処置した BI がすべて肝に分布すると仮定し計算してもその量は 0.23 mg/0.15 ml 肝 S9 であること及び BI 処置した Wistar 系ラット肝 S9 共存下の自然復帰変異数 (Fig. 1) は両菌株において PCB 誘導した場合などのバックグラウンドと等しいこと等の理由から、Ames 試験での変異原の検出には全く問題とはならない。市販 BI の直接変異原性は致死効果が観察される高用量でのみ認められ、未処置ラットと BI 処置ラット肝 S9 がその活性に影響しなかったが、著者らは、同様の現象を *N*-ニトロソ化合物について観察しており (Mori *et al.*, 1987), 市販の試料中に含まれる微量の不純物に起因することも証明している。

BI を *ig* 又は *ip* 処置した Wistar, ACI/N 及び SD 系ラット間では肝 Ms のタンパクと CYP 含量に有意な差は認められず (Table 1), BI を *ig* 処置した SD 系ラット肝については報告値 (Papac and Franklin, 1988) とよく一致し、またいずれも PCB 処置よりも高い CYP 誘導能であった。変異原活性を指標とすると主に CYP2 により代謝活性化される NDMM, MHP, BAP 及び BOP (Mori *et al.*, 1985) または AFB<sub>1</sub> (Tagashira *et al.*, 1985) の BI を *ig* 処置した SD 系ラット肝 S9 共存下での活性はコントロール群の 2~15 倍であった (Fig. 2)。同様に CYP1 と 2 により活性化される DMN と MC (Tagashira *et al.*, 1985) ではそれぞれ 3 と 32 倍に上昇し、また主に CYP1 により活性化される 2 種アミノアゾ化合物 (Mori *et al.*, 1983) また B(a)P, AF, AAF 及び 6 種アミノ酸熱分解物 (Tagashira *et al.*, 1985; Kamataki and Kato, 1985; Soucek and Gut, 1992) では 2~78 倍の誘導であった。これらの活性と PCB 処置ラット肝 S9 共存下のほぼ同じ実験条件下で検討された報告値とを比較すると、AAF で PCB の代謝活性化能の 0.5 倍また AF, MeIQ, Glu-P-2 及び MC でそれぞれ 1.6, 1.8, 1.8 及び 1.9 倍と差が認められたが、13 種癌原物質では 0.7~1.1 倍の範囲で一致した。尚、AAF の報告値は試験菌株が TA1538 であり、

TA100 菌株での比較ができなかった。したがって、PCB 処置ラット肝 S9 についての結果と BI 処置ラット肝を用いて得られる変異原性の結果は定性的にも定量的にも比較することが可能であると考えられる。AF, MeIQ, Glu-P-2 及び MC の結果は CYP 含量に比例しているが、これら癌原物質の代謝活性化には BI 誘導される主要な CYP 以外のアイソザイムの関与することも推察される。また、BI を *ig* 処置した Wistar 系ラットの結果 (Mori *et al.*, 1993) と、DMN を除く 17 種癌原物質において、0.7~1.4 倍の範囲ではほぼ一致した。

ACI/N 系ラット肝 S9 は PCB 処置と BI 処置いずれの場合もアミノアゾ化合物に対する活性化能が明らかに低く (Fig. 3), ラットの発癌感受性と肝 S9 の代謝活性化能が相関していた。一方、同様に CYP1 で活性化される 6 種アミノ酸熱分解物においては ACI/N 系ラット肝 S9 の活性化能は SD 系ラットのそれらと比べ低くはなかった (Table 2)。しかし、一部の癌原物質の活性化能が低いことは、短期検索法の活性化系に ACI/N 系ラットの使用は推奨することができない。いずれにしても、これらのことを解明するためには、BI 処置したラット肝の CYP アイソザイムについて更に精査する必要がある。

BI 処置後 24 時間のラット尿中に検出される BI 量は投与量の 1.3% 以下と低かったが、*ip* 処置したときは *ig* 処置のその 1/3 であることから、それぞれの処置法による BI の CYP 含量と変異原性 (Mori *et al.*, 1993) に対する誘導能の大きな違いはラット体内での BI 吸収に差のあることが一因であると考えられる。clotrimazole をラットに経口投与すると、投与量の約 10% が 24 時間尿中に排泄され、しかも未変化体の排泄量は僅かであることまた miconazole のラット経口投与では投与量の 20% が投与後 4 日間に尿中に代謝産物として排泄され、55% 以上が 6 日間の糞中に未変化体で排泄されることが報告されている (鈴木, 1985)。BI と imidazole 化合物の尿中排泄量が少ないことが一致することから、BI は吸収が悪いか、吸収されたものはほとんど代謝されることが推察される。したがって、投与方法による BI 誘

導能の差異を説明するためには、代謝産物を含めた分析をするなど、BI 吸収について更に精査する必要がある。

norharman が DAB に対して助変異原効果を示すことと不活性化反応であるアゾ基の還元を抑制すること (Hayashi, 1981), またアゾ基還元には CYP の関与すること (Fujita and Peisach, 1978) 等が知られている。著者らも、3'-CH<sub>3</sub>-DAB と 3'-CH<sub>2</sub>OH-DAB に対する PCB 肝 S9 共存下での助変異原効果とこれらのアゾ基還元活性の抑制を観察しているが (未発表データ), BI 処置した 3 系統ラット肝 S9 共存下においても norharman による顕著な助変異原効果が観察された (Fig. 4)。これらの助変異原作用における *ip* と *ig* 処置により誘導される変異原活性の違いが CYP 誘導の差と一致することは、アミノアゾ化合物の助変異原作用には CYP が関与するという仮説を支持している。

BI の CYP 誘導効果は、繁殖ラットである SD 系と Wistar 系に *ig* 処置すると CYP1 と 2 により代謝活性化される癌原物質の変異原活性をいずれも顕著に誘導すること、アミノアゾ化合物発癌において系統差の知られる ACI/N 系ではその差が観察されること及び CYP によるアゾ基還元の関与が知られる助変異原効果の認められること等、いずれも PCB と同様の作用を示すことが Ames 試験の結果から判明した。したがって、BI は、特定化学物質 PCB 又は PB と  $\beta$ NF の併用投与に十分に代わりうる、Ames 試験で代表される *in vitro* 変異原性試験における代謝活性化系の CYP 誘導剤として重要であることが明らかになった。

## 参考文献

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Cavrini, V., A.M.D. Pietra and M.A. Raggi (1982) High-pressure liquid chromatographic (HPLC) analysis of imidazole antifungals in commercial dosage forms, *International J. Pharmaceutics*, **10**, 119-124.

- Fujita, S. and J. Peisach (1978) Liver microsomal cytochrome P-450 and azoreductase activity, *J. Biol. Chem.*, **253**, 4512-4513.
- Guengerich, F.P. (1993) Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals, *Drug Metab. Dispos.*, **21**, 1-6.
- Hayashi, K. (1981) Effects of harman and norharman on the metabolism of aniline and *p*-dimethylaminoazo benzene, *Jpn. J. Hyg.*, **36**, 495-505.
- Kamataki, T. and R. Kato (1985) Activation of carcinogenic compounds by purified cytochrome P-450 in reconstitutive systems, in: Y. Tagashira and S. Omura (Eds.), *P-450 and Chemical Carcinogenesis*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Gann Monograph on Cancer Research, No. 30, pp. 81-91.
- Khan, W.A., C. Kuhn, H.F. Merk, S.S. Park, H.V. Gelboin, D.R. Bickers and H. Mukhtar (1989) Isozyme-specific monoclonal antibody-directed assesment of induction of hepatic cytochrome P-450 by clotrimazole, *Drug Metab. Dispos.*, **17**, 360-364.
- Koop, D.R. and M.J. Coon (1984) Purification of liver microsomal cytochrome P-450 isozymes 3a and 6 from imidazole-treated rabbits. Evidence for the identity of isozyme 3a with the form obtained by ethanol treatment, *Mol. Pharmacol.*, **125**, 494-501.
- Lewis, D.F.V., C. Ioannides and D.V. Parke (1993) Validation of a novel molecular orbital approach (COMPACT) for the prospective safety evaluation of chemicals, by comparison with rodent carcinogenicity and Salmonella mutagenicity data evaluated by the U.S. NCI/NTP, *Mutat. Res.*, **291**, 61-77.
- Maron, D.M. and B.N. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215.
- Maron, D., J. Katzenellenbogen and B.N. Ames (1981) Compatibility of organic solvents with the Salmonella/microsome test, *Mutat. Res.*, **88**, 343-350.
- Matsushima, T., M. Sawamura, K. Hara and T. Sugimura (1976) *In vitro* metabolic activation, in: F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot (eds.), *Mutagenesis Testing*, Elsevier, Amsterdam, pp. 85-88.
- Mori, H., T. Tanaka, S. Sugie, T. Kuniyasu, H. Iwata, H. Nii, A. Nishiwaki and Y. Mori (1987) Hepato carcinogenic activities of hydroxymethyl derivatives of 4-(*N,N*-dimethylamino)azobenzene in ACI/N rats, *J. National Cancer Institute*, **79**, 1159-1161.
- Mori, Y., K. Iimura and K. Hirano (1993) *N*-Benzyl imidazole, a potent inducer of rat liver



enzymes involved in mutagenic activation of various carcinogens, *Mutat. Res.*, **302**, 129-133.

Mori, Y., T. Hori and K. Toyoshi (1978) Analysis of biliary and urinary metabolites of 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene in rat, *Gann*, **69**, 757-762.

Mori, Y., H. Yamazaki and Y. Konishi (1987) Mutagenicity of *N*-nitrosodiethanolamine in the Salmonella/microsome test, *Mutat. Res.*, **192**, 91-94.

Mori, Y., H. Yamazaki, K. Toyoshi, T. Makino, T. Obara, Y. Yokose and Y. Konishi (1985) Mutagenic activation of carcinogenic *N*-nitrosopropylamines by rat liver: evidence for a cytochrome P-450 dependent reaction, *Carcinogenesis*, **6**, 415-420.

Mori, Y., T. Niwa and K. Toyoshi (1983) Immunochemical study on the contributions of two molecular species of cytochrome P-450 in mutagenesis by selected aminoazo dyes, *Carcinogenesis*, **4**, 1487-1489.

Mori, Y., T. Niwa, T. Hori and K. Toyoshi (1980) Mutagenicity of 3'-methyl-*N,N*-dimethyl-4-aminoazo-benzene metabolites and related compounds, *Carcinogenesis*, **1**, 121-127.

Omura, T. and R. Sato (1964) The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, *J. Biol. Chem.*, **239**, 265-275.

Papac, D. I. and M. R. Franklin (1988) *N*-Benzylimidazole, a high magnitude inducer of rat hepatic cytochrome P-450 exhibiting both polycyclic aromatic hydrocarbon- and phenobarbital-type induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes, *Drug Metab. Dispos.*,

**16**, 259-264.

Ritter, J. K. and M. R. Franklin (1987) Induction and inhibition of rat hepatic drug metabolism by *N*-substituted imidazole drugs, *Drug Metab. Dispos.*, **15**, 335-343.

Smith, C., V. Payne, D. J. Doolittle, A. K. Debnath, T. Lawlor and C. Hansch (1992) Mutagenic activity of a series of synthetic and naturally occurring heterocyclic amines in *Salmonella*, *Mutat. Res.*, **279**, 61-73.

Soucek, P. and I. Gut (1992) Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms, *Xenobiotica*, **22**, 83-103.

Tagashira, Y., H. Yonekawa, J. Watanabe, E. Hara, J. Hayashi, O. Gotoh and K. Kawajiri (1985) Metabolic activation of chemical carcinogens by two molecular species of cytochrome P-450, in: Y. Tagashira and S. Omura (Eds.) *P-450 and Chemical Carcinogenesis*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, *Gann Monograph on Cancer Research*, No. 30, pp. 69-79.

Ueno, Y., K. Kubota, T. Ito and Y. Nakamura (1978) Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, **38**, 536-542.

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.

鈴木郁夫 (監修) (1985) 常用医薬品辞典, 泌尿生殖器用剤, 広川書店, pp. 931-935.

長尾美奈子 (1978) 突然変異原物質と癌原物質, 蛋白質/核酸/酵素, **23**, 435-447.

*Environ. Mut. Res. Commun.*, **16**: 205-209 (1994)

一般論文

## Effects of Low-dose $\gamma$ -Irradiation on the Root Apical Meristem of Barley

Y. Taguchi<sup>1</sup>, N. Tsutsumi<sup>1</sup>, A. Tatara<sup>1</sup>, H. Eguchi<sup>2</sup> and S. Tano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Radiation Genetics, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan, <sup>2</sup>Research Center for Nuclear Science & Technology, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

(Received July 5, 1994; Accepted August 6, 1994)

### Summary

Effects of lower doses than 5.0 Gy gamma-ray irradiation on the following mitotic index and the incorporation quantity of <sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>H-TdR) in the root apical meristem of germinating barley were investigated. Dry seeds of barley, *Hordeum distichum* L. cv. Amagi 2-jyo were germinated for 48 h in distilled water at 25°C in the darkness, then treated with 0.03% hydroxyurea (HU) solution further 24 hrs. Two hours after washing away the chemicals, the seedlings were exposed with different doses of  $\gamma$ -ray and continued germination. They were fixed at 2 hr intervals. Meanwhile, the germinating seedlings were treated with <sup>3</sup>H-thymidine at different time after irradiation and the incorporated radioactivity in root meristem was measured. HU was found efficient in partially synchronizing the root apical meristem cells of germinating barley. An early increase of division cells in HU-treated meristem was delayed about 4 hrs 5.0 Gy-irradiation and the incorporation of <sup>3</sup>H-TdR into the meristem DNA also reduced a fourth. But, with 0.25 or 0.50 Gy, the duration of (the second half of S+G<sub>2</sub>) phase was reduced about 4 hrs and the 0.5 Gy-irradiation increased three times incorporation of <sup>3</sup>H-TdR into the meristem immediately after irradiation, as compared with that of non-irradiated meristem.

It was suggested, therefore that the progression of middle S phase cells to mitoses in 0.25 or 0.5 Gy-irradiated meristem was accelerated.

**Keywords:** Gamma-ray/mitotic index/<sup>3</sup>H-thymidine/barley

### Introduction

High doses of radiation are known to inhibit both cell division in the meristem of a plant and its subsequent growth, i.e., progression of interphase cells to mitosis temporally inhibited during the G<sub>2</sub> stage by  $\gamma$ -irradiation of 3.6 Gy, while the 20 Gy of irradiation completely stops the development (Yamaguchi and Tatara, 1973). Such effects have been explained by a defect occurring in the synthesis of DNA, RNA, or proteins, or by the presence of the G<sub>2</sub>-block that independently (Ishida *et al.*, 1979). Very low-dose X- and  $\gamma$ -irradiation produced hormesis effects

on plants, with several hypotheses having been proposed to interpret these effects (Shepard and Rejtnig, 1987; Kondo, 1988). On the other hand, only limited information is available concerning resultant low-dose effects on the DNA synthesis activity and the duration of the component phases in the cell cycle.

Hydroxyurea is used to synchronize multiplying cells by arresting at G<sub>1</sub>/S phase (Rosenkranz and Levy, 1965; Slater, 1973; Yamaguchi *et al.*, 1976). Then, germinating seedlings were previously treated with HU, in order to investigate the radiation effects



on the component phase of cell cycle. This led to the study which investigates the effects of less than 5.0 Gy of  $\gamma$ -irradiation on the root apical meristematic cells of HU-treated barley seedlings.

## Materials and Methods

### Partial synchronization of root meristem cells with hydroxyurea-treatment in barley

Barley seeds of *Hordeum vulgare* L. cv. Amagi 2-jyo (Two-rowed barley) were placed in petri dishes with distilled water and allowed to germinate in the dark for 48 hrs at 25°C. The young seedlings were immersed in a 0.03% HU solution for another 24 hrs. After washing three times with distilled water, they were continued germination in distilled water until  $\gamma$ -ray irradiation.

Non-treated seedlings were germinated under the same conditions for various durations until fixation.

### $\gamma$ -irradiation

Seedlings were exposed to 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, and 5.0 Gy of  $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -irradiation 2 hrs after HU treatment. Applied dose rates were from 0.0 to 0.5 Gy/min.

### Measurement of mitotic index

At 0.5, 2, 4, 6, 8, and 10 hr after irradiation (which were 2.5, 4, 6, 8, 10, and 12 h after HU treatment), lots of 10 irradiated seedlings were fixed with ethanol and acetic acid (3:1), then stained with Feulgen's reagent after squashing the root apical meristem (1~1.5 mm in length from the root tip) onto a slideglass. Using microscopy, we scored the number of division and total cells in the irradiated/non-irradiated roots. The proportion of mitotic to total cells (mitotic index, M.I.) was evaluated by observing at least 2000 cells. The experiments were triplicated.

### Assay of DNA synthesis activity

In order to evaluate the DNA synthesis activity in irradiated roots, the incorporation quantity of  $^3\text{H}$ -thymidine into the  $\gamma$ -irradiated or un-irradiated root meristem was investigated.

Ten barley seedlings were soaked for 30 min (25°C) in  $7.4 \times 10^4$  Bq/ml [ $^3\text{H}$ ]thymidine (0.74 TBq/mmol) at 0.5, 2.5, 4.5, and 6.5 h after irradiation (which were at 2.5, 4.5, 6.5, and 8.5 h after HU removed). Immediately

after the incorporation-treatment, the roots were cut and homogenized with 5 ml of grinding buffer (5 mM MES pH 7.6, 4 mM Mg-acetate, 0.25 M sucrose), the homogenate then being filtered through nylon mesh (50  $\mu\text{m}$  open) and centrifuged 6,000 g for 30 min at 4°C.

The pelleted precipitate was washed three times with 10 ml of 10% TCA, resuspended in an ethanol/ether (2:1) mixture (10 ml), and centrifuged again 2,000 g for 10 min at 4°C. This pellet was suspended in 1 ml of TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) and the radioactivity was determined by a liquid scintillation counter (Tri-CARB 4640, Packard Co., Ltd.). The total amount of recovered DNA were spectrophotometrically determined. The DNA synthesis activity was represented by the mean value of incorporated radioactivity per 1  $\mu\text{g}$  of DNA. Data from three identical experiments were evaluated.

## Results

It is generally known that HU is a specific, reversible inhibitor of DNA synthesis (Hartwell, 1971), having been used to synchronize the irregular progression of a plant cell population by arresting the cells at the  $G_1$  to S transition stage (Gudkov and Grodinsky, 1982).

Fig. 1 shows the resultant M.I. values versus the fixation time after HU treatment (HU-treated) or normal germination (non-treated). The M.I. in non-HU treated meristem kept a definite value of about 4~6% throughout the fixation time, while that for the HU-treated ones is close to zero at 0~4 h, then rapidly increased to a peak of about 22% at 8 h, followed by a decrease until 12 h. It was reported that the duration of S and  $G_2$  phase was about 4.5 and 4.0 hr respectively in six-rowed barley (Yamamoto and Yamaguchi, 1966). Thus, we supposed that a smaller proportion of multiplying cells were temporarily stopped at the  $G_1$ /S transition stage with HU treatment, whereas the majority of cells which were at or near the center of quiescent center required either a longer cell cycle time (Clowes, 1961) than 24 hrs (the duration of HU treatment). After HU treatment, about 20% of cells took about 8 h to reach mitosis, thereby suggesting that the

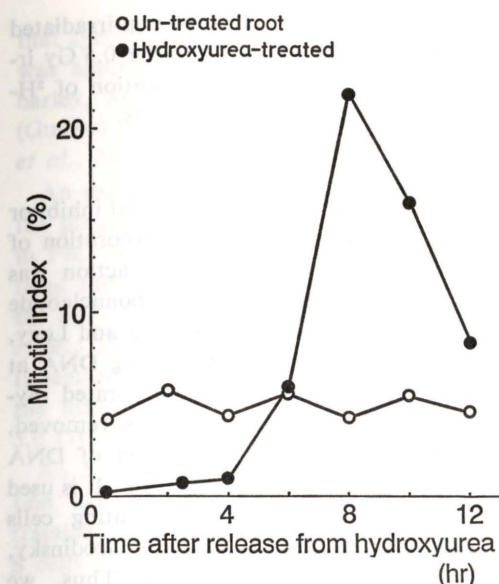


Fig. 1. Proportion of division cells to totally scored cells (Mitotic index, M.I.) in HU-treated or non-treated root meristem of germinating barley.

treatment may be effective in partially synchronizing this particular germinating cell population.

At 2 h after HU treatment, the seedlings were  $\gamma$ -irradiated with 1.0 or 5.0 Gy and the M.I. values were determined. The duration from the completing of HU treatment until the time which the M.I. reached 50% level of the M.I. on the ascending side of the peak was inferred as the time which was necessary for the HU arrested cells passing through S and  $G_2$  phase, then to mitosis.

The duration of S phase was already determined as 4.5 hr (Yamamoto and Yamaguchi, 1966). In present study, the seedlings were irradiated 2 hrs after HU removed, as mentioned in Materials and Methods. Then, we supposed that the interphase cells arrested at  $G_1$ /S stages was irradiated at the middle S period.

As shown in Fig. 2, in comparison with no irradiation, the M.I. in 5.0 Gy-irradiated roots increased about 4 hrs later than that in non-irradiated meristem, which indicates this dose of exposure extended the (shS+ $G_2$ ) stage. In present study, the middle S period and the second half of S phase was named mS and

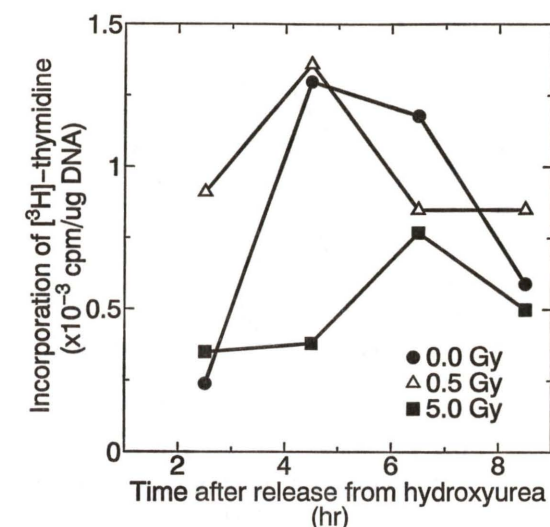


Fig. 2. Mitotic indices in the 1.0 and 5.0 Gy- $\gamma$ -irradiated meristem, relating to the fixation times of roots.

The M.I. of non-irradiated meristem was illustrated, in comparison with that in irradiated roots.

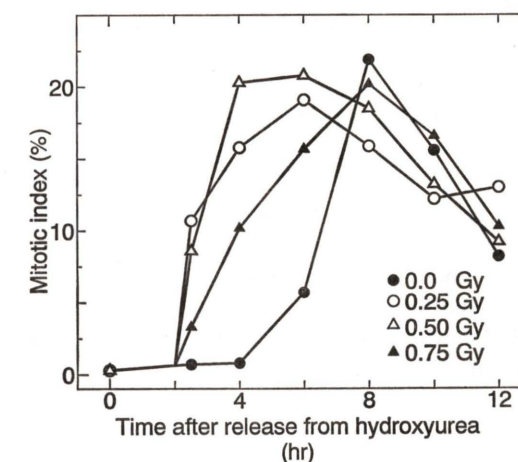


Fig. 3. Radiation effects of lower doses than 0.75 Gy- $\gamma$ -rays on the mitotic indices after HU-treatment in germinating barley.

shS, respectively. Such a delay in cell cycle progression was also induced by 3.6~7.8 Gy of  $\gamma$ -irradiation (Yamaguchi and Tataru, 1973). The 1.0 Gy irradiated roots had a higher M.I. value from 2.5~6 h, but it leveled off subsequently.

Effects of lower doses than 0.75 Gy are correspondingly shown in Fig. 3. The pro-



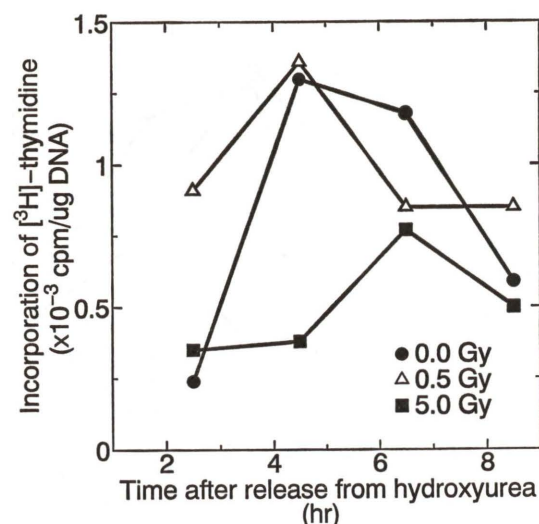


Fig. 4. Incorporation quantity of <sup>3</sup>H-thymidine into nuclear DNA fraction of  $\gamma$ -irradiated root meristem in barley.

portion of division cells increased earlier than that in non-irradiated meristem from 2.5 to 6.0 h and the M.I. in 0.25- and 0.50-Gy irradiated roots increased earlier to 19~20% until 6.0 hr than that of the non-irradiated meristem. The duration of (shS+G<sub>2</sub>) stage in non-irradiated cells was estimated as about 6.5 h, while it was shortened to about 2.5 hr with 0.25 or 0.5 Gy-irradiation towards the mS cells. Then, it was suggested that the progression of mS cells to mitoses was shortened about 4.0~4.5 hr with 0.25 or 0.5 Gy- $\gamma$ -irradiation. Obviously then, low dose irradiation was found to accelerate the appearance of mitotic cells.

Results of <sup>3</sup>H-TdR incorporation activity in root meristem at various times after removal of HU detected by pulse-labelling with <sup>3</sup>H-thymidine are shown in Fig. 4. The incorporated activity of non-irradiated seedlings has a maximum of  $1.25 \times 10^{-3}$  cpm/ $\mu$ g DNA at 4.5 h after eliminating HU. However, a 5.0 Gy of irradiation reduces the level to about  $0.3 \times 10^{-3}$  cpm/ $\mu$ g DNA at 4.5 h, which then recovers to nearly  $0.7 \times 10^{-3}$  cpm/ $\mu$ g DNA at 6.5 h, though it is well below that for the non-irradiated seedlings. The maximum radioactivity for 0.5 Gy occurred at the same time as the non-irradiated samples, being around four times greater at 2.5 h (30 min after ir-

radiation) than that of the non-irradiated seedlings. It was inferred that the 0.5 Gy irradiation stimulated the incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine into root meristem cells.

### Discussions

Hydroxyurea (HU) is a preferential inhibitor of DNA synthesis, inhibited incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine into DNA, and its action was a result of interference with ribonucleotide diphosphate reduction (Rosenkranz and Levy, 1965). And even cells synthesizing DNA at the time of HU was added incorporated thymidine again when the drug was removed, and allowed immediate resumption of DNA synthesis without lag (Slater, 1973). It is used to synchronize randomly proliferating cells arresting in S phase (Gudkov and Grodinsky, 1982; Yamaguchi *et al.*, 1976). Thus, we supposed that HU was likely an effective synchronizing agent for asynchronous population.

Germinating seedlings were exposed to 0.03% HU as described in Materials and Methods. With the HU treatment, about 20% of meristematic cells were partially synchronized 8 hrs after HU removed, whereas they showed a uniform mitotic proportion of 4~6% in normal (HU-unexposed) seedlings (Fig. 1). The root meristem cells of barley spent about 8.5 hrs for (S+G<sub>2</sub>) phase (Yamamoto and Yamaguchi, 1966; Yamaguchi and Tatara, 1973). Thus, we supposed that about 20% of interphase cells were arrested near G<sub>1</sub>/S-period during HU-treatment, while a few percent of division cell figures was observed at 2~6 hr after HU-removal. It was described that HU didn't completely suppressed the normal synthesis of DNA (Evans and Norman, 1968), and otherwise root apical meristem was organized with quiescent centre, cortex, cap initials, central stele and endodermis and so on, having different durations of cell cycle and the phases (Clowes, 1965). Then, we supposed that division cells appeared such early time after HU removed took different duration in cell cycle and the phases. Since an efficiency of synchronization applied in present study was relatively lower, as compared with that explained in bacterial culture or animal cell culture (Hochhauser *et al.*, 1981). However, present study suggested

that synchronization by 0.03% HU treatment was applicable to root meristematic cells of barley, as demonstrated in other organisms (Gudkov and Grodinsky, 1982; Yamaguchi *et al.*, 1976).

An exposure to 5.0 Gy delayed about 4 hrs the progress of mS cells to mitoses, as seen in Fig. 2. It was already indicated that ionizing radiation such as gamma-rays delayed the cell cycle advance of many species (Ishida *et al.*, 1979; Yamaguchi and Tatara, 1973). It seemed, therefore that the duration from the middle S to mitosis was extended with 5.0 Gy.

An 5 Gy-irradiation reduced the incorporation activity of <sup>3</sup>H-TdR in nuclear DNA fraction (Fig. 4) and also delayed arrival of S cells to mitoses (Fig. 2). It seemed likely that such a reduction of DNA synthesis activity with 5.0 Gy-irradiation was correlated with the delay of cell cycle progression. On the other hand, low dose of 0.5 Gy  $\gamma$ -ray increased incorporation of <sup>3</sup>H-TdR into nuclear DNA soon after irradiation, and further the duration of (shS+G<sub>2</sub>) phase was shortened by such irradiation. It was already suggested that ultraviolet light stimulated incorporation of tritiated-TdR into the DNA of human lymphocytes (Evans and Norman, 1968). But no results have been reported that low dose of  $\gamma$ -ray promoted an advance of S cells to following mitosis in plants. Then, we supposed that the reduction of (shS+G<sub>2</sub>) duration was probably relating to an increase of <sup>3</sup>H-TdR incorporation activity and of the M.I. in low dose-irradiated root.

Recently, Okamoto *et al.* (private communication) showed by short-term labelling with <sup>3</sup>H-TdR and chasing them that the 0.25 or 0.5 Gy reduced the duration of DNA synthesis, G<sub>2</sub> phase, and also cell cycle, besides the average number of silver grains per nucleus increased immediately after irradiation. It is unknown how the irradiated cells reduced the cell cycle duration. Further investigation for this results is required. Hydroxyurea is known to possess multi-function on cells (Harn *et al.*, 1986). It will be necessary to study whether present results reflect only gamma-irradiation or the mutual effects of HU and ionizing radiation.

### References

- Clowes, F. A. L. (1961) Duration of the mitotic cycle in a meristem, *J. Exptl. Botany*, **12**, 283-293.
- Clowes, F. A. L. (1965) The duration of the G<sub>1</sub> phase of the mitotic cycle and its relation to radiosensitivity, *New Phytology*, **64**, 355-359.
- Evans, R. G. and A. Norman (1968) Radiation stimulated incorporation of thymidine into the DNA of human lymphocytes, *Nature*, **217**, 455-456.
- Gudkov, I. N. and D. M. Grodinsky (1982) Cell radiosensitivity variation in synchronously dividing root meristems of *Pisum sativum* L. and *Zea mays* L. during the mitotic cycle, *Int. J. Biol.*, **41**, 401-408.
- Harn, P., L. N. Kapp, W. F. Morgan and R. B. Painter (1986) Chromosomal changes without DNA overproduction in hydroxyurea-treated cells: Implications for gene amplification, *Cancer Res.*, **46**, 4607-4612.
- Hartwell, L. H. (1971) Genetic control of the cell division cycle in yeast. II, Genes controlling DNA replication and its initiation, *J. Mol. Biol.*, **59**, 183-194.
- Hochhauser, S. J., J. I. Stein and J. S. Stein (1981) Gene expression and cell cycle regulation, *Int. Rev. Cytology*, **71**, 95-243.
- Ishida, R., T. Nishimoto and T. Takahashi (1979) DNA strand scission by neocardostatin and its relation to the inhibition of cell cycle traverse and DNA synthesis, *Cell Struct. Funct.*, **4**, 235-259.
- Kondo, S. (1988) Altruistic cell suicide in relation to radiation hormesis, *Int. J. Radiat. Biol.*, **53**, 95-102.
- Rosenkranz, H. S. and J. A. Levy (1965) Hydroxyurea: A specific inhibitor of deoxyribonucleic acid synthesis, *Biochim. Biophys. Acta.*, **95**, 181-183.
- Sheppard, S. C. and P. J. Reditnig (1987) Factors controlling the hormesis response in irradiated seed, *Health Physics*, **52**, 599-605.
- Slater, M. L. (1973) Effect of reversible inhibitor of deoxynucleic acid synthesis on the yeast cell cycle, *J. Bacteriology*, **113**, 263-270.
- Yamaguchi, H. and A. Tatara, (1973) A correlation between growth inhibition of the first leaf and mitotic delay after irradiation of soaking barley seeds, *Japan. J. Breed.*, **23**, 221-230.
- Yamaguchi, H., A. Tatara and I. Yamaguchi (1976) S phase synchronization in shoot apical cells of barley through the use of hydroxyurea, *Radioisotopes*, **22**, 21-22.
- Yamamoto, K. and H. Yamaguchi (1966) Radiation-induced chromosomal aberration in relation to DNA synthesis, *J. Radiation Res.*, **7**, 3-4.



## Ethyl Acrylate is Negative in the Bone Marrow Micronucleus Test Using BDF<sub>1</sub> Male Mice

T. Hara, M. Katoh, N. Horiya and T. Shibuya

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5  
Ochiai, Hadano, Kanagawa 257, Japan

(Received: July 15, 1994; Accepted: Sept. 2, 1994)

### Summary

Ethyl acrylate (EA) is a suspected human carcinogen that induces squamous-cell papillomas and carcinomas in the forestomach of mice and rats when orally administered. Both positive and negative results have been reported for EA in the mouse bone marrow micronucleus test. As part of the sixth collaborative study organized by CSGMT, we re-examined the ability of EA to induce bone marrow micronuclei using BDF<sub>1</sub> male mice. As the result of dose-finding assays, the MTD of EA was estimated to be 750 mg/kg for both single and double oral gavage, and in a preliminary test, 24 hr was selected as the optimum sampling time after single oral administration. All tests were conducted at that highest dose and sampling time. We found no evidence of increased micronucleus induction for single or double oral administration or single i.p. injection at any dose level. The relationship between micronucleus data and the positive results reported in the *in vitro* tests is discussed in view of metabolism.

**Keywords:** Micronucleus test; Ethyl acrylate; Non-genotoxic carcinogens

### Introduction

Ethyl acrylate is used as adhesives and emulsion polymers for a variety of materials, such as coatings and textiles. Oral administration of EA induces squamous-cell papillomas and carcinomas of the forestomach in both sexes of B6C3F<sub>1</sub> mice and Fischer 344/N rats (National Toxicology Program, 1983), while carcinogenicity is not induced by skin application in C3H/HeJ mice (DePass *et al.*, 1984) or by inhalation exposure in B6C3F<sub>1</sub> mice and Fischer 344 rats (Miller *et al.*, 1985). No data, however, are available to evaluate the carcinogenicity of EA in humans. Thus, the IARC Working Group (IARC, 1987) concluded that EA is possibly carcinogenic to humans (Group 2B). When EA was examined in the bone marrow micronucleus test, which detects the ability of compounds that reach the bone marrow to cause chromosomal damage, conflicting results were

reported. Przybojewska *et al.* (1984) reported a high micronucleus incidence after i.p. injection of EA in Balb/c mice, while Ashby *et al.* (1989) reported negative results by the same route of administration in C57BL6J and Balb/c mice.

The study described here was part of the sixth collaborative study organized by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT). Its aim was to re-examine whether EA is detectable as a clastogen in the mouse micronucleus test.

### Materials and Methods

#### Animals

Eight-week-old male BDF<sub>1</sub> mice were purchased from Charles River Japan, Inc. and used at 9-10 weeks of age for all experiments. The body weights at dosing ranged from 23 to 31 g. The animals were randomly allocated to each group and treated



by single or double oral gavage or single intraperitoneal (i.p.) injection at a dose volume of 20 ml/kg body weight. The animals were individually housed in cages in an animal room (temperature;  $23\pm1^{\circ}\text{C}$ , relative humidity;  $55\pm5\%$ , lighting condition; 12L:12D) and fed commercial food pellets for mouse breeding (NMF, Oriental Yeasts Co.) and tap water *ad libitum*.

#### Test substances

Ethyl acrylate (CAS No. 140-88-5) was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Lot no.: 305P4044, Purity:  $>99.0\%$ ) and was homogenized in 2% Tween® 80. Cyclophosphamide (Sigma), which was used as the positive control, was dissolved in physiological saline.

#### Dose-finding assays

Male mice was given EA by single or double oral gavage at several dose levels. All animals were observed for 4 consecutive days and clinical signs and deaths were recorded. The maximum tolerated doses (MTDs) were selected as the highest doses for micronucleus test.

#### Micronucleus tests

Mice were sacrificed by cervical dislocation. For observation of micronuclei, bone marrow cells were smeared on glass slides and stained with 5% Giemsa's solution for 25 minutes. For observation of reticulocytes, bone marrow cells were supravitaly stained with New Methylene Blue (NMB) solution (0.5 g NMB and 1.6 g potassium oxalate in 100 ml DW) for 3 minutes, smeared on glass slides and stained with Giemsa's solution.

All slides were coded and observed in a blindfold manner. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in 2000 polychromatic erythrocytes was counted in each mouse, and the ratio of reticulocytes to 1000 erythrocytes was determined.

The MNPCE frequency was statistically analyzed by Tables of Kastenbaum and Bowman (1970) and the reticulocyte ratio by the *t*-test.

## Results

#### Dose-finding assays

To determine the doses for the single oral

gavage study, groups of six male mice were treated with either 250, 500, 750 or 1000 mg/kg EA. A decrease in spontaneous motor activity was observed at 500 mg/kg or more, and tremor was observed at 1000 mg/kg. All mice died at 1000 mg/kg 1 to 3 days after administration, while death was not seen at 750 mg/kg or less. Thus, the highest dose selected for the micronucleus test by single oral gavage was the MTD, 750 mg/kg.

To determine the doses for the double oral gavage study, groups of three male mice were dosed twice at 250, 375, 500, and 750 mg/kg EA. Death was not seen in any group, although a decrease in spontaneous activity was observed at 500 mg/kg or more, given twice. Since 1000 mg/kg was lethal by single oral gavage, the MTD for double oral gavage was again estimated to be 750 mg/kg and was used as the highest dose.

A dose-finding assay was not conducted for the single i.p. injection study and a wide range of doses was chosen for the main micronucleus test.

#### Preliminary micronucleus test

To determine the optimum sampling time after single oral administration, groups of four male mice were given 750 mg/kg EA by gavage and smear slides of bone marrow cells were prepared 24, 48, and 72 hr later. The MNPCE frequency was highest ( $0.39\pm0.10\%$ ) 24 hr after administration and the decrease in the ratio of reticulocytes to total erythrocytes was not remarkable ( $30.2\sim34.8\%$ ) at any sampling time. The optimum sampling time after single administration was therefore selected to be 24 hr.

#### Micronucleus tests by oral gavage

For the single oral gavage study, EA was administered to groups of six mice at 0, 188, 375, and 750 (mg/kg) with a sampling time of 24 hr (Exp. 1). The results are shown in Table 1. There was no significant difference in the MNPCE frequency between the vehicle control and any treatment group. In contrast, the MNPCE frequency of the positive control (CPA, 50 mg/kg) was significantly elevated ( $p<0.01$ ). There was no significant difference in the ratio of reticulocytes to total erythrocytes between the vehicle control and any treatment group.

Table 1. The results of the micronucleus tests by single or double oral gavage

Exp. no.	Dose (mg/kg)	No. of doses	Sampling time (h)	MN cells/2000 PCEs assessed per animal	MN cells (%) Mean $\pm$ S. D.	RETs (%) Mean $\pm$ S. D.
1	0 <sup>a</sup>	1	24	1 4 4 0 2 3	0.12 $\pm$ 0.08	57.8 $\pm$ 9.7
	188	1	24	1 2 0 0 2 0	0.04 $\pm$ 0.05	55.5 $\pm$ 9.5
	375	1	24	7 2 6 1 1 4	0.18 $\pm$ 0.13	58.7 $\pm$ 10.9
	750	1	24	3 4 2 0 4 2	0.13 $\pm$ 0.08	46.4 $\pm$ 8.7
	CPA50 <sup>b</sup>	1	24	46 41 21 19 28 21	1.47 $\pm$ 0.58**	45.9 $\pm$ 9.1
2	0 <sup>a</sup>	1	24	4 1 2 4 6 0	0.14 $\pm$ 0.11	52.3 $\pm$ 15.7
	375	1	24	3 3 8 4 4 4	0.22 $\pm$ 0.09	49.5 $\pm$ 15.4
	750	1	24	2 5 8 3 3 3	0.20 $\pm$ 0.11	46.7 $\pm$ 9.2
	0 <sup>a</sup>	2	24	6 5 4 3 6 2	0.22 $\pm$ 0.08	58.3 $\pm$ 6.9
	188	2	24	4 3 6 4 4 3	0.20 $\pm$ 0.05	60.7 $\pm$ 8.4
	375	2	24	4 1 5 3 3 1	0.14 $\pm$ 0.08	58.9 $\pm$ 9.1
	750	2	24	6 0 4 1 3 1	0.13 $\pm$ 0.11	39.6 $\pm$ 10.2**
	CPA 50 <sup>b</sup>	1	24	41 43 40 55 35 31	2.04 $\pm$ 0.41**	45.1 $\pm$ 7.4

<sup>a</sup> Vehicle control (2% Tween® 80). <sup>b</sup> Positive control (Cyclophosphamide 50 mg/kg).

\*\*  $p<0.01$  (Kastenbaum and Bowman). \*\*  $p<0.01$  (*t*-test).

Table 2. The results of the micronucleus test by single i.p. injection

Dose (mg/kg)	Sampling time (h)	MN cells/2000 PCEs assessed per animal	MN cells (%) Mean $\pm$ S. D.	RETs (%) Mean $\pm$ S. D.
0 <sup>a</sup>	24	3 3 5 4 2 2	0.16 $\pm$ 0.06	57.6 $\pm$ 8.4
375	24	0 3 2 5 4 4	0.15 $\pm$ 0.09	51.1 $\pm$ 10.3
500	24	7 1 2 1 3 3	0.14 $\pm$ 0.11	43.9 $\pm$ 16.9
750	24	9 0 5 4 5 1	0.20 $\pm$ 0.16	27.7 $\pm$ 12.5***
CPA 50 <sup>b</sup>	24	42 30 45 27 39 44	1.89 $\pm$ 0.38**	42.6 $\pm$ 10.1*

<sup>a</sup> Vehicle control (2% Tween® 80). <sup>b</sup> Positive control (Cyclophosphamide 50 mg/kg by oral gavage).

\*\*  $p<0.01$  (Kastenbaum and Bowman). \*  $p<0.05$  (*t*-test). \*\*\*  $p<0.001$  (*t*-test).

Another test was conducted by single oral gavage at 0, 375, and 750 mg/kg and by double oral gavage at 0, 188, 375, and 750 mg/kg at the same sampling time (Exp. 2). Again there was no significant treatment effect, although the MNPCE frequency significantly increased in the positive control ( $p<0.01$ ). A significant reduction in the reticulocyte ratio was only seen in the 750 mg/kg double oral gavage group ( $p<0.01$ ).

#### Micronucleus test by i.p. injection

The results of the i.p. injection study are shown in Table 2. Groups of six mice were treated with 0 or 375 mg/kg EA or 50 mg/kg CPA (positive control by oral gavage); eight mice received 500 mg/kg and groups of nine mice received 750, 1000, or 1500 mg/kg EA. All the mice in the 1000 or 1500 mg/kg groups and one in the 750 mg/kg group died. Slides were prepared and observed for the 0 and 375

treatment groups and for the positive control group and six animals of the 500 and 750 mg/kg treatment groups. Again, there was no significant increase in micronucleus induction in any treatment group, although the MNPCE frequency significantly increased in the positive control group ( $p<0.01$ ). The reticulocyte ratio was significantly reduced in the 750 mg/kg group ( $p<0.001$ ).

## Discussion

Przybojewska *et al.* (1984) were the first to report the results of micronucleus testing of EA. Balb/c male mice were injected twice i.p. at 24 hr intervals and bone marrow samples were taken 6 hr later. High incidences of MNPCE were observed and significant increases were detected within a wide dose range (225-1800 mg/kg). Ashby *et al.* (1989), however, did not obtain posi-



tive results either by single i.p. injection with C57BL male and female mice or by almost the same protocol as Przybojewska *et al.* with C57BL or Balb/c male mice. In this study, we used BDF<sub>1</sub> male mice and three types of administration—single and double oral gavage and single i.p. injection. No significant increase in MNPCEs was observed for any type of administration. As Ashby *et al.* (1989) noted, this discordance among laboratories may be attributed to a difference in purity of EA, or to a difference in metabolism among mouse strains or sub-strains. But, no matter what the reason may be, EA can not be consistently detected in the mouse bone marrow micronucleus test.

EA was positive in the *in vitro* chromosome aberration test with CHL cells (Ishidate *et al.*, 1983) and induced small colonies in the *in vitro* mutagenicity assays with mouse lymphoma cells (L5178Y), further suggesting its clastogenicity (Moore *et al.*, 1988). Micronucleus tests, however, did not detect EA clastogenicity in mouse bone marrow. This discordance may be explained in view of EA metabolism. NTP data (National Toxicology Program, 1983) showed that after p.o. administration of 200 mg/kg in corn oil to Fischer 344 rats, EA was detected in the portal venous blood after 15 or 30 min (up to 27 µg/ml), but detectable amount was not present in blood samples from the retro-orbital venous plexus after 15, 30 or 60 min. This suggests that EA is metabolized rapidly in the blood and/or liver after absorption and therefore does not circulate throughout the body. Metabolism may be by hydrolysis (National Toxicology Program, 1983) or by binding to nonprotein sulfhydryls such as glutathione (Miller *et al.*, 1981). Thus, there is a good possibility that not enough EA reached the bone marrow to induce micronuclei, although the presence of some EA or toxic metabolites was suggested by bone marrow suppression in the highest dose of the double oral gavage or single i.p. injection.

At present, EA is thought to be a local carcinogen that induces squamous-cell papillomas and carcinomas only in the forestomach after oral administration (National Toxicology Program, 1983). The most con-

vincing hypothesis for the mechanism of tumor production by EA is that local damage or inflammation promotes cell proliferation, and this, ultimately, leads to carcinogenesis (Ghanayem *et al.*, 1986; Clayson *et al.*, 1991). Data from *in situ* genotoxicity tests at forestomach, such as unscheduled DNA synthesis tests or mutagenicity tests with transgenic mice, are needed to conclude whether genotoxic damage is involved in the initiation of EA carcinogenesis.

### References

- Ashby, J., C.R. Richardson, and H. Tinwell (1989) Inactivity of ethyl acrylate in the mouse bone marrow micronucleus assay, *Mutagenesis*, **4**, 283-285.
- Clayson, D.B., F. Iverson, E.A. Nera, and E. Lok (1991) Early indicators of potential neoplasia produced in the rat forestomach by non-genotoxic agents: the importance of induced cellular proliferation, *Mutat. Res.*, **248**, 321-331.
- DePass, L.R., E.H. Fowler, D.R. Meckley, and C.S. Weil (1984) Dermal oncogenicity bioassays of acrylic acid, ethyl acrylate, and butyl acrylate, *J. Toxicol. Environ. Health*, **14**, 115-120.
- Ghanayem, B.I., R.R. Maronpot, and H.B. Matthews (1986) Ethyl acrylate-induced gastric toxicity. III. Development and recovery of lesions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**, 576-583.
- IARC (1987) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Suppl. 7, Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs Vol. 1-42, International Agency for Research on Cancer, Lyon (France).
- Ishidate, M., Jr. and Staff, Eds. (1983) The Data Book of Chromosomal Aberration Tests *In Vitro* on 587 Chemical Substances Using a Chinese Hamster Fibroblast Cell Line (CHL Cells), Tokyo, The Realize Inc., p. 197.
- Kastenbaum, M.A. and K.O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, **9**, 527-549.
- Miller, R.R., J.A. Ayres, L.W. Rumpy, and M. J. McKenna (1981) Metabolism of acrylate esters in rat tissue homogenates, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1**, 410-414.
- Miller, R.R., J.T. Young, R.J. Kociba, D.G. Keyes, K.M. Bodner, L.L. Calhoun, and J.A. Ayres (1985) Chronic toxicity and oncogenicity bioassay of inhaled ethyl acrylate in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice, *Drug Chem. Toxicol.*, **8**, 1-42.
- Moore, M.M., A. Amtower, C.L. Doerr, K.H. Brock, and K.L. Dearfield (1988) Genotoxicity of acrylic acid, methyl acrylate, ethyl acrylate, methyl methacrylate, and ethyl methacrylate in L5178Y mouse lymphoma cells, *Environ. Mol. Mutagenesis*, **11**, 49-63.
- National Toxicology Program (1983) NTP Technical Report on the Carcinogenesis Studies of Ethyl Acrylate (Cas No. 140-88-5) in F344/N Rats and B6C3F<sub>1</sub> Mice (Gavage Studies) (Technical Report Series No. 259), Research Triangle Park, NC.
- Przybojewska, B., E. Dziubaltowska, and Z. Kowalski (1984) Genotoxic effects of ethyl acrylate and methyl acrylate in the mouse evaluated by the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **135**, 189-191.



2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) から  
生成する炭素ラジカルの変異原性

Mutagenicity of the carbon radical generated from 2,2'-azobis  
(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)

加藤 哲太, 福原 亜紀, 菊川 清見

Kato, T., A. Fukuhara and K. Kikugawa

東京薬科大学 薬学部  
192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

Tokyo College of Pharmacy, 1432-1 Horinouchi, Hachioji,  
Tokyo 192-03, Japan

(受付: 1994 年 3 月 22 日; 受理: 1994 年 5 月 2 日)

Summary

The mutagenicity of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) was measured by Ames method and the micronucleus assay. AAPH was mutagenic on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains without metabolic activation showing 59 and 470 His<sup>+</sup> revertants/100  $\mu$ mol AAPH, respectively. Addition of S9-mix reduced the mutagenicity. Induction of micronuclei in mouse peripheral blood reticulocytes was not found. The mutagenicity of AAPH was reduced by addition of spin trapping agent *N*-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN). Because PBN trapped the carbon radical generated from AAPH effectively, the reduction of the mutagenicity may due to the loss of the radical by PBN. The mutagenicity of AAPH was found to be due to the carbon radical.

**Keywords:** 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride; carbon-centered radical; mutagenicity; Ames method; micronucleus test

緒 言

最近, 活性酸素ラジカル種が DNA の修飾や切断を引き起こす反応が注目され, これらの反応と癌の発生や変異原性の発現との関連性について検討が行われている. 金属とアスコルビン酸(Chiou, 1983), ポリフェノール (Shirahata *et al.*, 1985), 糖 (Morita and Komano, 1983), 過酸化水素 (Inoue and Kawanishi, 1987), 脂質過酸化物 (Ueda *et al.*, 1985) などの反応で生成するヒドロキシラジカルは, DNA 鎖を切断することが知られている. 一方, hydrazine 類には変異原性 (Kimball, 1977; Parodi *et al.*, 1981) や発癌性 (Toth, 1976) を有するものが報告されているが, これらには hydra-

zine 類から生成した炭素ラジカルによる DNA 鎖の切断が関与することが示唆されている (Augusto *et al.*, 1984; 1990; Leite and Augusto, 1989). また変異原性を示す芳香族 diazo 化合物の diazoquinone (Kato *et al.*, 1992) や 5-diazouracil (Hiramoto *et al.*, 1994) および benzenediazonium 塩 (Griffiths and Murphy, 1992) から生成した炭素ラジカル (phenyl radical) が DNA 鎖切断に関与していることが報告されている.

2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) は分解して脂肪族炭素ラジカルを生成することが知られており, 脂質過酸化反応 (Niki *et al.*, 1985) や有機重合反応のイニシエーターとし



てよく知られた化合物である。我々は AAPH を脂肪族炭素ラジカルのモデルとして用い、DNA 鎖の切断について検討した結果、AAPH の炭素ラジカルにより DNA 鎖が切断されることが明らかになった (Hiramoto *et al.*, 1993)。そこで今回、AAPH の変異原性について *Salmonella* 菌を用いた Ames 法およびマウス末梢血を用いた小核試験により検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 試薬

2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride [2997-92-4] (AAPH) は和光純薬工業(株)製の市販品を用いた。N-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitron [3376-24-7] (PBN) は Aldrich Chem. Co. 製のものをを用いた。

### 2. Ames 法による変異原性試験および変異原性抑制試験

各種濃度の AAPH 水溶液 100  $\mu$ l について変異原性試験を行った。また 100  $\mu$ mol AAPH を含む水溶液 50  $\mu$ l に各種濃度の PBN を含む dimethylsulfoxide (DMSO) 50  $\mu$ l を加えたものを検液として変異原性試験を行い、PBN を加えないときの活性に対する比率から変異原性抑制率を求めた。変異原性試験は *Salmonella typhimurium* TA98 および TA100 株 (Ames *et al.*, 1975) を用い、37°C で 20 分間のプレインキュベーションを行う Yahagi ら (1977) の方法に基づいて行った。S9-mix は phenobarbital と 5,6-benzo-flavone で処理したラット肝臓から分離した S9 (和光純薬工業(株)製)の 50  $\mu$ l を含むものを用いた。試験は各サンプルについて 2 枚以上のプレートで行い、変異原活性は、各検液の His<sup>+</sup> revertant 数の平均値からコントロールにおける平

均値を引いた値で示した。

### 3. 小核試験

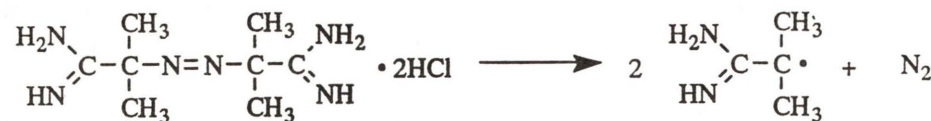
7~8 週齢の ICR 系雄マウス (クレア(株)) を用いて行った。各種濃度の AAPH を含むリン酸緩衝液を 1 濃度当り 5~6 匹のマウスに腹腔内投与し、24 および 48 時間後の末梢血網状赤血球中に発現する小核を Hayashi ら (1990) の方法に基づき測定した。

### 結果および考察

AAPH は Scheme 1 に示すように、三級炭素原子に炭素ラジカルを生成して、スーパーコイル DNA を切断することが示された (Hiramoto *et al.*, 1993)。今回、AAPH の DNA 鎖切断活性と変異原性発現の関連性について検討するため、*Salmonella typhimurium* TA98 および TA100 株を用いた Ames 法およびマウス末梢血を用いた小核試験を行った。

Fig. 1 に Ames 法による変異原性試験の結果を示す。S9-mix 非存在下で TA98 および TA100 株のいずれにおいても AAPH の濃度に依存して His<sup>+</sup> revertant 数は増加し、AAPH が変異原性を示すことがわかった。活性は AAPH 濃度 100  $\mu$ mol/plate で TA 98 株において 59, TA 100 株において 470 His<sup>+</sup> revertant であった。これらの活性は S9-mix の存在下では 50~65% にまで減少した。先に Hiramoto ら (1994) は 5-diazouracil から生成したラジカルに基づくと考えられる変異原活性が S9-mix 中の補酵素の NADH, NADPH および ATP によって阻害されたことを報告している。今回の AAPH の変異原活性の S9-mix による阻害も、AAPH から生成したラジカルと補酵素類との反応によると考えられる。

次に DNA 鎖切断作用をもち、微生物に対して



AAPH

Scheme 1

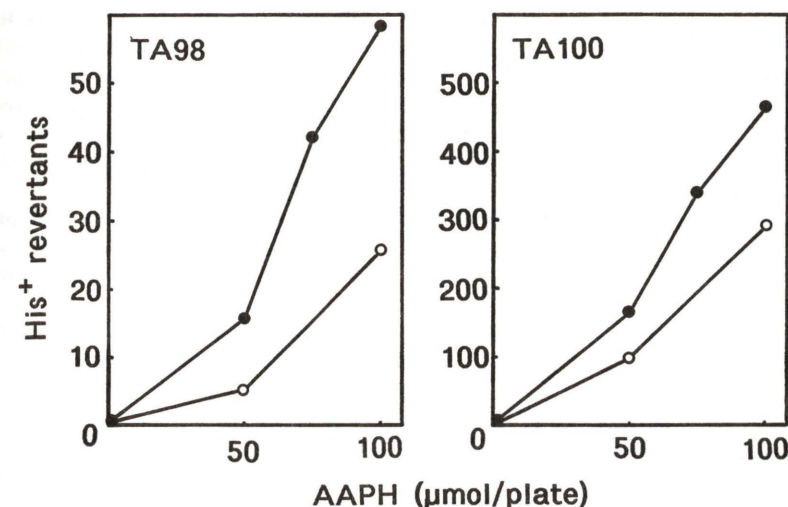


Fig. 1. Dose-response curves of mutagenicity of AAPH on *S. typhimurium* TA98 and TA100 with (○) and without (●) S9 mix.

も変異原性を有する AAPH が哺乳動物における変異誘発におよぼす影響について検討するため、マウス末梢血を用いた小核試験を行った。7~8 週齢の雄マウスに AAPH を 50~100 mg/kg 腹腔内投与後 24 および 48 時間に末梢血網状赤血球中に認められる小核の頻度は 0.03~0.3% で、コントロールと有意差は認められなかった (AAPH 150 mg/kg 投与時は死亡)。マウス小核試験において変異原活性が認められなかったのは、生体内に投与された AAPH から生成したラジカルが、DNA 以外の生体成分と速やかに反応したためと考えられる。

AAPH はスピントラップ剤である PBN によって炭素ラジカルとしてトラップされることが ESR スペクトルの結果から明らかにされている (Hiramoto *et al.*, 1993)。また AAPH による DNA 鎖切断が酸素の有無にかかわらず PBN によって阻害されたことから、AAPH から生成した炭素ラジカルが DNA 鎖切断に関与していることが示唆された。Ames 法で認められた AAPH の変異原性が AAPH から生成したラジカルによることを明らかにするため、AAPH の変異原活性に及ぼす PBN の影響について検討を行った (Fig. 2)。AAPH の変異原活性は PBN によって濃度依存的に阻害され、AAPH に対して等モル (100  $\mu$ mol) 添加時に約 50% の阻害率を示した。

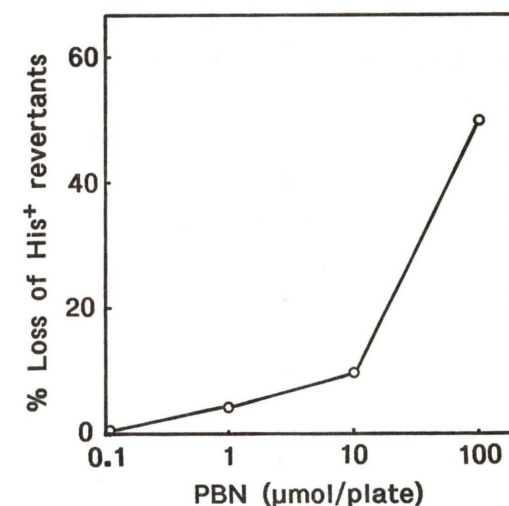


Fig. 2. Effect of PBN on the mutagenicity of AAPH. The mutagenicity of AAPH (100  $\mu$ mol/plate) was tested with *S. typhimurium* TA100 without S9 mix in the presence of PBN.

AAPH による DNA 鎖切断の場合と同様、スピントラップ剤の PBN による阻害効果が Ames 法による変異原性試験においても認められたことから、変異原活性の発現にも AAPH 炭素ラジカルが関与していることが示唆された。AAPH は炭素ラジカルを生成した後、酸素と反応しペルオキシラジカルとなる可能性があるが、ESR スペクトルの結果からはこのようなラジカルに起因するシ



グナルは得られていない (Hiramoto *et al.*, 1993). 変異原活性の発現には AAPH の炭素ラジカル自身が直接関与していると考えられる.

Athar ら (1989; 1991) は AAPH が良性 papilloma の癌化を引き起こすこと, およびこの癌化が retinoic acid で阻害されることを報告している. またこの AAPH による癌化反応には, 生成した炭素ラジカルやそのペルオキシラジカルによる遺伝子の変化が関与していることが示唆されている. 従って DNA を切断する作用をもつ AAPH 炭素ラジカルは, 遺伝子を修飾し, 変異原性の発現や癌発現の progression 段階などに複雑に影響を及ぼしていると考えられる.

これまでに変異原性や癌原性を持つ多くの hydrazine 類や diazo 化合物が知られており, これらは炭素ラジカルにより DNA 鎖を切断することが明らかにされている (Augusto *et al.*, 1984; 1990; Leite and Augusto, 1989; Kato *et al.*, 1992; Griffiths and Murphy, 1992; Hiramoto *et al.*, 1994). 今回の結果も AAPH の炭素ラジカルが変異原性の発現に深く関与していることを示しており, 炭素ラジカルによる DNA 鎖切断が変異原性および癌原性の発現に対して重要な役割を担っていると考えられる.

#### 参 考 文 献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.
- Athar, M., J. R. Lloyd, D. R. Bickers and H. Mukhtar (1989) Malignant conversion of UV radiation and chemically induced mouse skin benign tumors by free-radical-generating compounds. *Carcinogenesis*, **10**, 1841-1845.
- Athar, M., R. Agarwal, Z. Y. Wang, J. R. Lloyd, D. R. Bickers and H. Kukhtar (1991) All-trans retinoic acid protects against conversion of chemically induced and ultraviolet B radiation-induced skin papillomas to carcinomas. *Carcinogenesis*, **12**, 2325-2329.
- Augusto, O., A. Faljoni-Alario, L. C. C. Leite and F. G. Nobrega (1984) DNA strand scission by the carbon radical derived from 2-phenylethylhydrazine metabolism. *Carcinogenesis*, **5**, 781-784.
- Augusto, O., E. L. Cavalieri, E. G. Rogan, N. V. S. RamaKrishna and C. Kolar (1990) Formation of 8-methylguanine as a result of DNA alkylation by methyl radicals generated during horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of methylhydrazine. *J. Biol. Chem.*, **265**, 22093-22096.
- Chiou, S.-H. (1983) DNA- and protein-scission activities of ascorbate in the presence of copper ion and a copper-peptide complex. *J. Biochem.*, **94**, 1259-1267.
- Griffiths, J. and J. A. Murphy (1992) Cleavage of DNA resulting from exposure to phenyl radicals. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 24-26.
- 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 slide. *Mutat. Res.*, **245**, 245-249.
- Hiramoto, K., H. Johkoh, K. Sako and K. Kikugawa (1993) DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride(AAPH). *Free Rad. Res. Commun.*, **19**, 323-332.
- Hiramoto, K., T. Kato and K. Kikugawa (1994) Mechanisms of the DNA breaking activity of mutagenic 5-diazoacil. *Mutat. Res.*, **306**, 153-163.
- Inoue, S. and S. Kawanishi (1987) Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res.*, **47**, 6522-6527.
- Kato, T., K. Kojima, K. Hiramoto and K. Kikugawa (1992) DNA strand breakage by hydroxyphenyl radicals generated from mutagenic diazoquinone compounds. *Mutat. Res.*, **268**, 105-114.
- Kimball, R. F. (1977) The mutagenicity of hydrazine and some of its derivatives. *Mutat. Res.*, **39**, 111-126.
- Leite, L. C. C. and O. Augusto (1989) DNA alterations induced by the carbon-centered radical derived from the oxidation of 2-phenylethylhydrazine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **270**, 560-572.
- Morita, J. and T. Komano (1983) Induction of strand break in DNA by reducing sugar phosphates. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 11-18.
- Niki, E., A. Kawakami, M. Saito, Y. Yamamoto, J. Tsuchiya and Y. Kamiya (1985) Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.*, **260**, 2191-2196.
- Parodi, S., S. DeFlora, M. Cavanna, A. Pino, L. Robbiano, C. Bennicelli and G. Brambilla (1981) DNA-damaging activity in vivo and bacterial mutagenicity of sixteen hydrazine derivatives as related quantitatively to their carcinogenicity. *Cancer Res.*, **41**, 1469-1481.
- Shirahata, S., H. Murakami, K. Nishiyama, I. Sugata, K. Shinohara, G. Nonaka, I. Nishioka and H. Omura (1985) DNA breakage by hydrolyzable tannins in the presence of cupric ion. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1033-1040.
- Toth, B. (1976) Tumorigenicity of  $\beta$ -phenylethylhydrazine sulfate in mice. *Cancer Res.*, **36**, 917-921.
- Ueda, K., S. Kobayashi, J. Morita and T. Komano (1985) Site-specific DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Biochim. Biophys. Acta*, **824**, 341-348.
- Yahagi, T., M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella. *Mutat. Res.*, **48**, 121-136.



## Detection of Nongenotoxic Hepatocarcinogens by Immunohistochemical Staining with Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Monoclonal Antibody

K. Sugimoto, A. Nagahara and M. Kikuchi

Research and Development Division, Kikkoman Corporation,  
399 Noda, Noda City, Chiba 278, Japan

(Received: March 24, 1994; Accepted: June 11, 1994)

### Summary

Four nongenotoxic (Ames-negative) hepatocarcinogens, carbon tetrachloride, clofibrate, phenobarbital sodium, and safrole were assessed for cell proliferative activity by immunohistochemical staining with anti-PCNA monoclonal antibody, using paraffin-embedded rat liver sections. Male F344 rats were treated once with each nongenotoxic compound by gavage. In this study, the spontaneous PCNA index in rat livers was less than 1%. However PCNA indexes in the rat livers treated with these compounds increased significantly, being 9.8% for carbon tetrachloride, 11.6% for safrole, 4.1% for clofibrate, and 4.1% for phenobarbital sodium. Similar results were obtained using bromodeoxyuridine.

Our *in vivo* hepatocyte proliferation test using PCNA appears to be comparable in sensitivity to that of the *in vivo-in vitro* procedure using [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine.

**Keywords:** cell proliferation; rat liver; nongenotoxic hepatocarcinogen; proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

### Introduction

The Ames test has been generally used as a short term test for predicting chemical carcinogenicity. During the mid 1970s, 90% of assayed carcinogens were mutagenic and 90% of assayed non-carcinogens were non-mutagenic in the Ames test (McCann *et al.*, 1975; Purchase *et al.*, 1976). However, recent reports have indicated that only 50% of those carcinogens were mutagenic (Tennant *et al.*, 1987; Zeiger *et al.*, 1990). The reason for this is that the Ames test cannot detect hepatocarcinogens such as aliphatic and aromatic halogenated hydrocarbons and peroxisome inducers (Uno *et al.*, 1992d).

To detect putative nongenotoxic (Ames-negative) hepatocarcinogens, an *in vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test was established (Uno *et al.*, 1992a; 1992b). This test uses primary hepatocytes prepared

from the livers of rats treated with hepatocarcinogens and noncarcinogens. In the RDS test, cell proliferation is evaluated by the number of <sup>3</sup>H-thymidine-labeled hepatocytes. This test detects a large number of nongenotoxic hepatocarcinogens (Furihata *et al.*, 1993; Uno *et al.*, 1992c; 1994).

Immunohistochemical staining with anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) monoclonal antibody is useful for evaluating cell proliferation (van Dierendonck *et al.*, 1991; Kawakita *et al.*, 1992; Hayashi *et al.*, 1993). PCNA is a 36 kDa acidic nuclear protein synthesized during the G1 and S phases of the cell cycle. Recently, a method assessing the proliferation and growth of tumors using anti-PCNA monoclonal antibody has been used to examine prognosis. This antibody labels proliferating cells in paraffin-embedded tissue. Thus, the PCNA index has



been used in some tumors as an independent prognostic variable (Matsuta *et al.*, 1993; Woods *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1991).

In this report, we describe the usefulness of the *in vivo* hepatocyte proliferation test using PCNA as a rapid detection assay for putative nongenotoxic hepatocarcinogens.

## Materials and Methods

### 1. Animals

Male F344 rats (9 weeks old, 215–242 g) were obtained from Charles River Laboratories (Atsugi, Japan). Animals were housed in a temperature-controlled room with a 12-h light/dark cycle. A balanced diet (MF, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) and water were given *ad libitum*.

### 2. Model compounds

The four nongenotoxic hepatocarcinogens, carbon tetrachloride, safrole, clofibrate, and phenobarbital sodium, were obtained from Wako Pure Chemical Co. (Osaka, Japan). Corn oil was obtained from Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan).

### 3. Animal treatment

All compounds were dissolved in corn oil except phenobarbital sodium, which was dissolved in water. Test compounds in 2 ml of corn oil or water were given by p.o. administration at various concentrations which were the maximum tolerated dose (MTD), 1/2 MTD and 1/4 MTD. The HTD of each compound was set at about half of the LD<sub>50</sub> value from three references (Lenga, 1988; Uno *et al.*, 1992a; 1992b), and the MTD values of these compounds were as follows; 1400, 1000, 470, 75 mg/kg b.w. for carbon tetrachloride, safrole, clofibrate and phenobarbital sodium respectively. Animals in the control group received 2 ml of the corn oil or water without test compounds.

### 4. Tissues

One hour before dissection, the rat was given 100 mg/kg b.w. of BrdU (Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) in physiological saline intraperitoneally (ip).

The rat was anesthetized by an ip injection of 5% pentobarbital sodium at a dose

of 0.1 ml/100 g b.w. The liver was perfused with HBSS for 3 min and 75% ethanol for 3 min, then removed for routine processing for histological and immunohistological examination. Conventional histological sections (3  $\mu$ m thick) were prepared from paraffin-embedded tissues. The sections were mounted on gelatin-coated glass slides and air dried overnight at room temperature.

### 5. Antibodies

Peroxidase-labeled anti-PCNA (anti-PCNA/HRP) was obtained from DAKO Japan Co. (Kyoto, Japan). Anti-bromodeoxyuridine (BrdU) monoclonal antibody was obtained from Sanbio bv (Amsterdam, Holland). The avidin biotin complex (ABC) kit and the substrate kit for 3,3'-diaminobenzidine (DAB) were obtained from Vector Laboratories inc. (Burlingame, USA).

### 6. Immunohistochemistry

The sections were dewaxed, passed through a series of alcohol, then immersed for 15 min in methanol with 0.3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity. The sections were then washed in water and immunostained with anti-PCNA/HRP. The antibody at a dilution of 1:6 and an incubation period of 1 h were optimal for staining the samples. Sites of anti-PCNA/HRP binding were detected by the DAB kit. The protocol for detection of BrdU incorporated DNA was as described (Sugihara *et al.*, 1986; Tatematsu *et al.*, 1988). The sections were also counterstained with haematoxylin.

### 7. PCNA index

Random fields were sampled and 1000 hepatocyte were analyzed. The PCNA index was calculated as follows:

$$\text{PCNA index (\%)} = \frac{\text{No. of hepatocytes with positive staining}}{\text{Total no. of hepatocytes analyzed}} \times 100$$

The BrdU labeling index was also calculated by same formula.

## Results

### 1. Fixation and staining conditions

To optimize the immunostaining to detect PCNA, various fixation protocols were tested. The results are summarized in Table 1. Immunoreactivity was detectable with all fixatives except acetone. Satisfactory anti-PCNA/HRP immunostaining was obtained by means of alcohol perfusion. We fixed the tissue by means of 75% ethanol perfusion methods, as it was less toxic compared with the other fixation studied.

### 2. PCNA-positive cells

The number of PCNA-positive cells increased in the rats treated with hepatocarcinogens. In those treated with carbon tetrachloride, the number of PCNA-positive cells increased and necrosis was observed in the tissue (Fig. 1).

Table 1. The effect of various fixative on anti-PCN immunoreactivity in rat hepatocytes

Fixative	Immunoreactivity	
	by dipping	by perfusion
Formalin	+	+
Methanol	+	++
75% Ethanol	+	++
Acetone	—	—

Scored as negative (—) positive (+) and strongly positive (++)

Clofibrate increased the number of PCNA-positive cells, however necrosis was not evident and PCNA-positive cells diffused in the

Table 2. PCNA indexes in various lobes of the rat liver

Test chemical	Lobes of the rat liver	PCNA index (%) (mean $\pm$ SD)
Carbon tetrachloride	Median	5.6 $\pm$ 1.10
	Left	7.5 $\pm$ 1.37
	Right	5.1 $\pm$ 0.84
	Caudate	5.9 $\pm$ 0.31
Safrole	Median	13.2 $\pm$ 3.52
	Left	14.1 $\pm$ 3.46
	Right	15.1 $\pm$ 3.29
	Caudate	14.9 $\pm$ 2.53
Clofibrate	Median	5.0 $\pm$ 1.40
	Left	5.1 $\pm$ 1.57
	Right	5.4 $\pm$ 2.05
	Caudate	6.1 $\pm$ 1.97
Phenobarbital sodium	Median	3.4 $\pm$ 0.78
	Left	4.3 $\pm$ 0.71
	Right	4.4 $\pm$ 1.25
	Caudate	4.2 $\pm$ 0.64
Control	Median	0.6 $\pm$ 0.21
	Left	0.7 $\pm$ 0.42
	Right	0.5 $\pm$ 0.21
	Caudate	0.9 $\pm$ 0.67

Dose, 1/2MTD; Time, 39 h;  $\pm$ SD, (n=4).

PCNA index calculated from the number of positively stained cells in 1000 hepatocytes/liver.

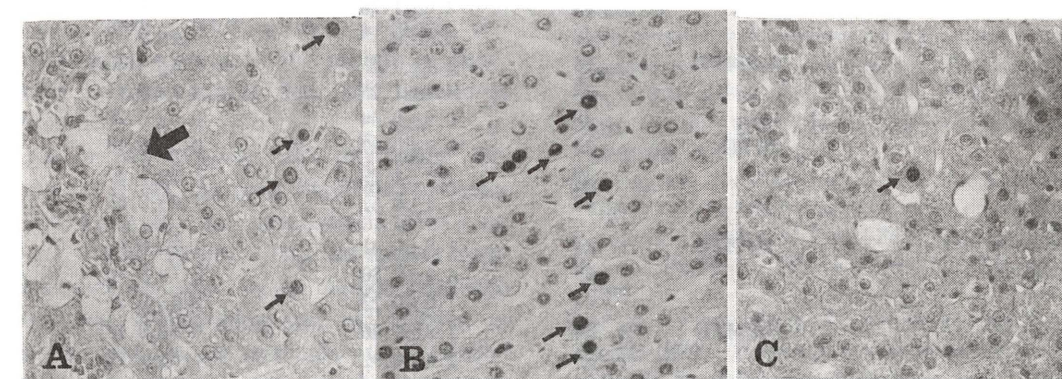


Fig. 1. Immunoperoxidase staining with PCNA MAb of livers from rats given Ames test-negative hepatocarcinogens.

Carbon tetrachloride (A) Clofibrate (B) Control (C).

Dose, 1/2MTD: Time, 39 h after carcinogen administration ( $\times$ 300). In the rats treated with carbon tetrachloride, necrosis (bold arrow) was observed (A). Some cells (small arrows) had stronger nuclear staining (PCNA-positive) than the majority of cells in the tissue section (A, B, C).



tissue. Safrole and phenobarbital sodium also produced similar results (data not shown).

### 3. The PCNA index in different lobes of the liver

The rat liver consists of several lobes. To investigate cell proliferation, the PCNA indexes in these lobes were examined. The test compounds were given at 1/2 MTD. Thirty nine hours thereafter, the liver was

fixed. Four lobes (median, left, right and caudate) were studied individually. Table 2 shows slight differences in the PCNA index among the four lobes, but they were not statistically significant ( $P>0.05$ ,  $t$ -test). Therefore we mainly examined the PCNA indexes in the left and right lobes of rat livers treated with test chemicals or control rats to evaluate cell proliferation.

Table 3. Time-course of cell proliferation in the rat liver

Test chemical	Treatment dose	Time (h)	PCNA Index (%) (mean±SD)	BrdU Labeling Index (%) (mean±SD)
Carbon tetrachloride	1/4MTD	24	0.3±0.08	0.2±0.07
		39	0.4±0.20	0.6±0.32
		48	0.5±0.17	0.2±0.08
	1/2MTD	24	1.0±0.65	0.7±0.13
		39	7.6±4.23	8.0±2.30
		48	0.4±0.13	0.7±0.19
	MTD	24	0.7±0.42	2.4±2.90
		39	9.8±3.36	15.8±4.49
		48	1.1±0.88	0.9±1.20
Safrole	1/4MTD	24	1.7±0.76	1.4±0.38
		39	7.2±1.62	7.1±2.47
		48	3.2±1.38	2.7±1.06
	1/2MTD	24	2.4±0.70	1.2±0.74
		39	11.6±4.70	12.0±3.42
		48	4.4±2.83	4.1±2.47
	MTD	24	0.9±0.60	0.7±0.22
		39	3.0±2.71	0.4±0.13
		48	8.0±2.38	6.6±1.26
Clofibrate	1/4MTD	24	1.3±0.97	1.3±0.91
		39	2.6±1.28	3.3±0.73
		48	0.8±0.13	0.5±0.17
	1/2MTD	24	2.4±0.83	1.4±0.53
		39	4.1±1.25	4.1±0.44
		48	0.9±0.34	0.4±0.20
	MTD	24	0.7±0.27	0.5±0.18
		39	1.6±1.29	1.3±1.37
		48	1.1±0.62	1.3±0.56
Phenobarbital sodium	1/4MTD	24	1.7±0.41	1.6±0.45
		39	4.1±0.80	3.7±0.76
		48	1.0±0.23	0.4±0.11
	1/2MTD	24	1.8±0.46	0.6±0.14
		39	2.5±0.92	1.5±1.16
		48	0.8±0.13	0.3±0.08
	MTD	24	2.9±0.61	1.6±0.62
		39	3.9±1.45	2.9±0.67
		48	1.8±0.68	0.6±0.26
control		39	0.9±0.36	0.5±0.25

PCNA index and BrdU labeling index were calculated from the number of positively stained cells in 1000 hepatocytes/liver. ±SD ( $n=4$ ) control ( $n=20$ ).

### 4. Time-course and dose-response of cell proliferation in rat liver

The time course and dose-response of cell proliferation in the rat liver are shown in Table 3. The time-course with the MTD, 1/2 MTD, and 1/4 MTD of each compound was studied and we found that the PCNA indexes were elevated 39 h after the administration of all of the compounds. The mean value of spontaneous PCNA index never exceeded 1%. PCNA indexes increased significantly, being indexes were 9.8, 11.6, 4.1 and 4.1% for carbon tetrachloride, safrole, clofibrate and phenobarbital sodium respectively. Similar results were obtained using BrdU.

### Discussion

The traditional method of assessing cell proliferation requires *in vivo* or *in vitro* labeling with [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine or its non-radioactive analog, bromodeoxyuridine. The procedure using [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine involves autoradiography for 7 days. Detection with bromodeoxyuridine requires HCl treatment before immunostaining.

PCNA was discovered by Miyachi *et al.* using auto antibodies in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (Miyachi *et al.*, 1978). PCNA is an auxiliary protein of DNA polymerase  $\delta$ . An anti-PCNA monoclonal antibody which can act on paraffin-embedded tissue has been developed (Wassem *et al.*, 1990). This antibody enables cell proliferation to be easily and rapidly assessed, which is more useful than the traditional methods.

An *in vivo-in vitro* RDS test using perfused rat livers has been established to detect putative nongenotoxic hepatocarcinogens (Uno *et al.*, 1992a; 1992b). This test used primary hepatocyte cultures. In the method described here, cell proliferation can be assessed in paraffin sections to minimize the artificial effect of culture; it can also be applied to tissues that are difficult to culture. The characteristics of hepatocytes in culture may change. Some organs are difficult to establish in primary cultures.

The hepatocarcinogens studied here reportedly increase the index of replicative DNA

synthesis, according to the *in vivo-in vitro* RDS test using the perfused rat liver (Uno *et al.*, 1992b; 1994). Therefore we consider that hepatocarcinogens will be detected to a similar degree by means of PCNA immunohistochemical staining using paraffin-embedded rat liver sections.

Our results indicated that nongenotoxic hepatocarcinogens can be detected by the PCNA method. We therefore think that our PCNA method will be useful as a rapid means of detecting putative nongenotoxic hepatocarcinogens.

### Acknowledgments

We thank Dr. K. Yoshikawa and Dr. Y. Uno for valuable discussions, as well as T. Sekine and the members of animal experiment group for excellent technical assistance.

### References

- Furihata, C. and Y. Uno (1993) Overview on *in vivo-in vitro* UDS and RDS tests in rats and mice, Environ. Mutagen Res. Commun., **15**, 155-171.
- Hayashi, Y., M. Fukuyama, M. Koike, S. Kaseda, T. Ikeda and T. Yokoyama (1993) Cell-cycle analysis detecting endogenous: Comparison with BrdU-*in vivo* labeling and an application to lung tumors, Acta Pathol. Jpn., **43**, 313-319.
- Kawakita, N., S. Seki, H. Sakaguchi, A. Yanai, T. Kuroki, Y. Mizoguchi, K. Kobayashi and T. Monna (1992) Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver diseases fixed in formaldehyde, Am. J. Pathol., **140**, 513-520.
- Lenga, R.E. (1988) Sigma-Aldrich library of chemical safety data.
- Matsuta, M., U. Imamura, S. Kon and K. Sasaki (1993) Immunohistochemical study on melanocytic skin tumors with anti-PCNA/cyclic monoclonal antibody, Jpn. J. Dermatol., **103**, 1053-1059.
- 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.
- Miyachi, K., M.J. Fritzler and E.M. Tan (1978) Autoantibodies to a nuclear antigen in Proliferating cells, J. Immunol., **121**, 2228-2234.
- Purchase, I.F.H., E. Longstaff, J. Ashby, J.A. Styles, D. Anderson, P.A. Lefevre and F.R.



*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine による変異の解析Analysis of mutation caused by  
*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

幾 田 由 里 子

Yuriko Ikuta

三井石油化学工業(株)

分析研究所 製品安全試験室

740 山口県玖珂郡和木町和木 6-1-2

Chemicals Safety Testing, Analysis Laboratories

Mitsui Petrochemical Ind. Ltd.

6-1-2, Waki, Waki-cho, Kuga-gun, Yamaguchi-ken 740, Japan

(受付: 1994 年 6 月 12 日; 受理: 1994 年 9 月 1 日)

## Summary

Mutation analysis of genotype of *Salmonella typhimurium* TA1535 strain treated with mutagen MNNG was performed. The bacteria were preincubated with the mutagen. The bacteria were cultured in Voger-Bonner medium E containing both histidine and biotin at 37°C for 4 h to cause mutation, then in the medium with biotin and without histidine at 37°C for 14 h to grow histidine-independent revertants selectively. The bacterial DNA was extracted and *his G* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a set of primers which give 343 bp DNA around the site of mutation. The double stranded DNA was directly cycle-sequenced by AmpliTaq DNA polymerase with fluorescent labeled primer and analyzed in the automatic DNA sequencer. The analyzed data pattern of the *hisG46* codon showed -TCC-, which was also observed in purified revertants DNA, over the base sequence of mutant, -CCC-. The method, newly devised here, may be useful in estimating the genetic level of mutation and the mechanism of the mutation.

**Keywords:** Polymerase chain reaction (PCR), Cycle-sequencing, *Salmonella typhimurium* TA1535, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)

## 緒 言

Ames 試験ではアミノ酸要求性の有無で変異原性を検出しており、遺伝子レベルでは物質の構造特異的な変異の多様性を示しているにも関わらず、変異を単一のタンパクレベルでの変化としてしか検出することができない。遺伝子レベルでの変異情報が得られれば、変異機構の解明へと導くことも可能となると考えられる。そこで、Ames 試験菌株を用いて変異原処理菌株 DNA の変異部位の塩基配列を DNA シーケンサで直接解析する

ことにより、遺伝子レベルでの変異を簡便に検出する方法について検討した。

## 実験材料および方法

変異原性物質として精製水に溶解した *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, Cos. No. 70-25-7) (Aldrich) 1 µg/プレート相当を、菌株として *Salmonella typhimurium* TA1535 を用いた。

- Westwood (1976) Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use, *Nature* (Lond.), **264**, 624-627.
- Sugihara, H., T. Hattiri and M. Fukuda (1986) Immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine in formalin-fixed tissues, *Histochemistry*, **85**, 193-195.
- Tatematsu, M., H. Tsuda and N. Ito (1988) Detection of DNA replication by BrdU, *Toxicology Forum*, **11**, 269-278.
- 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.
- 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 early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: 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 early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens: Assessment of judgment criteria, *Toxicol. Lett.*, **63**, 201-209.
- Uno, Y., Y. Iwase and K. Yoshikawa (1992c) From standpoint of mutagenicity test performance: Recommendation of *in vivo-in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test using rat livers, *Environ. Mutagen. Res. Commun.*, **14**, 75-83.
- Uno, Y., H. Takasawa, 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.
- Van Dierendonck, J. H., J. H. Wijsman, R. Keijzer, C. I. H. van de Velde and C. J. Cornelisse (1991) Cell-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies, *Am. J. Pathol.*, **138**, 1165-1172.
- Waseem, N. H. and D. P. Lane (1990) Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), *J. Cell Science*, **96**, 121-129.
- Woods, A. L., P. A. Hall, N. A. Shepherd, A. M. Hanby, N. H. Waseem, D. P. Lane and D. A. Levison (1991) The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction and prognosis, *Histopathol.*, **19**, 21-27.
- Yu, C. C.-W., P. A. Hall, C. D. M. Fletcher, R. S. Camplejohn, N. H. Waseem, D. P. Lane and D. A. Levison (1991) 13 Haemangiopericytoma: The prognostic value of immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA), *Histopathol.*, **19**, 29-33.
- Zeiger, E., J. K. Haseman, M. D. Shelby, B. H. Margolin and R. W. Tennant (1990) Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity or predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **16** (Suppl. 18), 1-14.



## 標準法 Ames 試験

Ames 試験 Revised methods (Maron, D. M., 1983) に準じた。

## DNA シーケンシング法

菌株の前培養からプレインキュベーションまでは標準法 Ames 試験と同様に行った。すなわちアルミキャップ付き 5 ml 試験管に入れた検体溶液 0.1 ml, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) (20 mM sodium phosphate, monobasic dihydrate (和光純薬), 80 mM sodium phosphate, dibasic, anhydrous (和光純薬)) 0.5 ml に菌懸濁液 0.1 ml を加え, 37°C で 20 時間, 60 cpm で振盪培養した。

その後, 変異誘起のため, これに 0.5 mM の L-histidine, D-biotin を 0.18 ml, 10 倍濃度 Vogel-Bonner 最少培地 E を 0.11 ml および 20% glucose 溶液を 0.11 ml 加え, 37°C で 4 時間振盪培養し, 菌の増殖を行った。培養時間は後述の変異誘起培養時間設定のための変異率の測定において, MNNG による変異率が溶媒対照と比べて有意に増加するために要する時間として設定した。

次に復帰変異株の選択的増殖を行うため, 遠心分離 (4000×g, 10 分) した後, 菌体をリン酸緩衝液で洗浄し, 変異誘起のための培養時と同じ組成で L-histidine のみを含まない液体培地を用い, 37°C で 14 時間振盪培養した。培養時間は後述の復帰変異株の選択的培養時間の設定に従って決定した。その後遠心分離して菌体をリン酸緩衝液で再洗浄し, これを収集した。

増殖させた復帰変異株の菌体への 95°C, 5 分間の加熱処理によって, 菌体から DNA を抽出し, フェノール抽出, エタノール沈澱 (Maniatis, T., 1990) により DNA を精製した。

この抽出 DNA の *hisG* 遺伝子変異部位の周辺 (Barnes, W., 1982; Carlomagno, M. S., 1988) をポリメラーゼ連鎖増幅反応 (PCR) (Saiki, R.K., 1988) により増幅させた。これには次に示す配列の 2 種の合成プライマー S2104, A2106 を用いた。

S2104: 5'-GCGATGATTACGAGAATTGC-3' (+鎖)  
A2106: 5'-GGATATGAGGTAGCGATACG-T-3' (-鎖)

プライマーの合成は DNA 合成装置 Gene Assembler Plus (ファルマシア) によった。PCR にはザイモリアクター (ATTO) を用い, AmpliTaq PCR reagent kit (宝酒造) により反応を行った。テンプレート DNA は 100 ng/μl, プライマー濃度は 0.5 μM とし, 反応条件は次の通りとした。

94°C	1.5 分	
94°C	1 分	↑
55°C	2.5 分	30 サイクル
72°C	3.4 分	↓
72°C	5 分	

これにより, 343 bp の DNA が増幅された。PCR 後はゲルろ過 (cDNA spin column, ファルマシア) を用いてプライマーおよび未反応モノマーを除去した。

その後, 5' 位に蛍光ラベルしたプライマー A2106 を 1 μM 用い, ザイモリアクター中, AmpliTaq Sequencing Kit (宝酒造) によって, 2 本鎖のままサイクルシーケンシング反応 (Murray, V., 1989) を行なった。テンプレート DNA を 67 fmol/μl とし, 反応条件は次の通りとした。

95°C	30 秒	↑
50°C	30 秒	15 サイクル
72°C	90 秒	↓
		↓
95°C	30 秒	↑
		15 サイクル
72°C	90 秒	↓

次いで蛍光式自動 DNA シーケンサ SQ-3000 (日立) で解析した。泳動は 7 M の尿素 (Bio Rad) を含む 5.5% のハイドロリンクゲル (AT Biochem) で行った。サンプルアプライ量は 2 μl とした。

## 変異誘起培養時間設定のための変異率の測定

プレインキュベーション後の溶液を上記条件で 4, 6, 8, 24 時間振盪培養後, 菌体を遠心分離に

より収集, リン酸緩衝液で洗浄を行い, 0.5 mM L-histidine, D-biotin を 0.1 ml 塗布した最少グルコース寒天平板培地および 0.5 mM D-biotin を 0.1 ml 塗布した最少グルコース寒天平板培地上でコロニーを生育させた。前者で生育したコロニーの総数を全生菌数, 後方で生育したコロニーの総数を復帰変異株数として下記の式で変異率を算出した。

$$\text{変異率} = \frac{\text{復帰変異株数}}{\text{全生菌数}}$$

## 復帰変異株の選択的培養時間の設定

変異誘起後の溶液を上記条件で 0, 3, 14 時間培養後, 変異率の測定方法に準じて, 全生菌数および復帰変異株数を計測し, 両者が同レベルとなる時間を求めた。

## 単離された菌株 DNA のシーケンシング

標準法 Ames 試験により, 最少グルコース寒天平板培地上に復帰変異コロニーを生育させ, その histidine 非要求性株を histidine を含まない培地上に塗布して培養した。これを 3 回繰り返したものを単離された histidine 非要求性株と見なした。単離された histidine 非要求性株を Nutrient broth No. 2 (Oxoid) 培養液で培養した。

その後の操作は, DNA シーケンシング法における DNA 抽出以後と同様とした。

## 結果

変異原性物質として MNNG, 菌株として TA 1535 を用い, DNA シーケンシング法による変異原性検出および変異内容の解析の可能性を検討した。これとともに, DNA シーケンシング法による解析結果と比較するため, MNNG 処理によ

Table 1. DNA sequence at the *hisG46* codon in TA1535 DNA extracted from a single colony mutant and revertant induced by MNNG

Bacterial DNA	Base sequence
TA1535 (untreated)	5'-CCC-3'
3 revertants	5'-CTC-3'
3 revertants	5'-TCC-3'

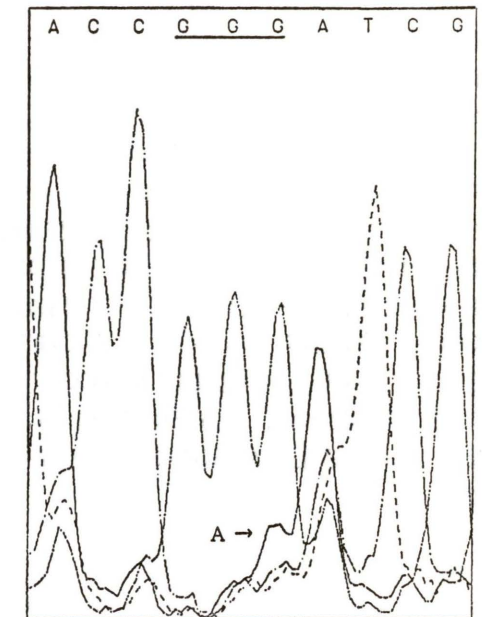


Fig. 1. DNA sequencing data of the *hisG46* region in MNNG treated TA1535. The *hisG46* codon is underlined. As the complementary sequence was used as a primer, the analysed data show complementary sequence.

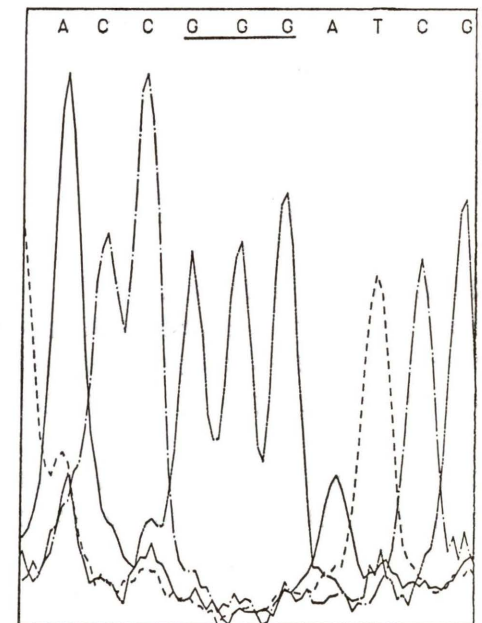


Fig. 2. DNA sequencing data of the *hisG46* region in solvent (H<sub>2</sub>O) treated TA1535. The *hisG46* codon is underlined. As the complementary sequence was used as a primer, the analysed data show complementary sequence.



# エームス試験で認められるラフ化コロニーの生因について Formation of rough-shaped revertant colonies in the Ames test

清水 登<sup>1</sup>, 高坂 芳男<sup>2</sup>  
Noboru<sup>1</sup>, S. and Y. Kousaka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>日清製粉(株)医薬研究所 製剤研究室 356 埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡 5-3-1  
<sup>2</sup>同社 上田工場 品質管理課 386 長野県上田市上塩尻 751

<sup>1</sup>Formulation & Pharmacokinetics Lab., Pharmaceutical Research Center,  
Nisshin Flour Milling Co., Ltd., 5-3-1 Tsurugaoka, Ohi-Machi,  
Iruma-Gun, Saitama 356, Japan, <sup>2</sup>Quality Assurance  
Department, Ueda Factory, ibid., 751 Kamishiojiri,  
Ueda-city, Nagano 386, Japan

(受付: 1994 年 5 月 17 日; 受理: 1994 年 8 月 22 日)

## Summary

We carried out the Ames test for every lot of agar plates to guarantee their quality. We sometimes detected rough-shaped revertant colonies (rough colonies) among normal-shaped revertant colonies (normal colonies). Rough colonies appeared when *S. typhimurium* TA100 and TA1535 strains were used, but did not when *S. typhimurium* TA98, TA1537 strains and *E. coli* WP2uvrA strain were used. The motilities of these five strains were compared and it was found that TA100 and TA1535 showed the motility higher than those of the others. TA100 formed rough colonies only when jelly strength of top agar was low enough to increase apparent motility of the strain. These results suggest that a tester strain can form rough colonies in the Ames test when it has high apparent motility in the top agar of low jelly strength.

**Keywords:** Ames test, rough-shaped revertant colony, motility, jelly strength

## 緒 言

当社ではエームス試験で使用する最少グルコース寒天培地(エームス培地)を製造しており、その品質検査のひとつとして溶媒および陽性対照物質を用いたエームス試験(D. M. Maron *et al.*, 1983)を実施している。これは製造ロットごとにエームス試験に使用可能かどうかを確認することが目的で、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98 および TA1537 と、*Escherichia coli* WP2uvrA の5株を試験菌株として用いている。判定時には復帰コロニー数のカウントとコロニー形態の観察を行っているが、これまでに変異原物質の有無に関わらず、TA100およびTA1535

で異常な形態を示すコロニー(ラフ化コロニー)を認めることがあった。ラフ化コロニーとは、直径が1~5mm程度のドーム状のコロニーで、周縁に不規則な切り込みと凸凹があるもの(Fig. 1)と、更にこれが大きくなった直径が10~20mm程度の扁平状で周縁に微小コロニーが離島状に存在するもの(Fig. 2)がある。

ラフ化コロニーは、①同一プレート上に正常な形態のコロニー(Fig. 3)と混在して出現し、②特にプレート中央部によく見られること、③TA100とTA1535においてよく観察されること、④代謝活性化の有無には関わらないことなどの特徴がある。これらの事実から、エームス培

る復帰変異株の単離された株からの抽出DNAの塩基配列解析を行った。

単離した復帰変異株6種のDNA解析結果をTable 1に示す。これらの変異はいずれもCからTへの変化に基づくものであった。

Fig. 1にMNNG, Fig. 2に溶媒対照により処理した菌株DNAのhis45周辺部塩基配列解析結果を示す。Fig. 1においてMNNG処理DNAの変異部位解析データは5'-GGG-3'(情報鎖: 5'-CCC-3')であるが、チャートには5'-GGG-3'に重なって5'-GGA-3'(情報鎖: 5'-TCC-3')という配列が観察された。一方Fig. 2では重なりがなく、元の変異株の5'-GGG-3'という配列のみであった。

## 考 察

DNAシーケンシング法について検討した結果、解析データ上MNNG処理菌株DNAには変異した塩基配列5'-TCC-3'が観察され、溶媒対照処理菌株DNAには元の株の塩基配列5'-CCC-3'のみが観察された。5'-TCC-3'という配列は単離された復帰変異株の塩基配列に観察されたものと同一であった。

MNNGによる変異はDNA上のグアノシンO6位をメチル化し、G・C塩基対をA・T塩基対に変化させるために起こるとされており(Yang, J.-L., 1991)、今回の結果はこれと一致した。

以上のことから、DNAシーケンシング法は変異原処理菌株DNAと溶媒対照処理菌株DNA解析データを比較することにより、変異原性の有無だけでなく、遺伝子レベルでの変異情報を得るために有用な手段であるということが確認できた。

DNAシーケンシング法のメリットは、標準法Ames試験と比較した場合に、検知のレベルが遺

伝子レベルということであり、他に抗菌性物質に対しても有効という点や無菌操作の必要度が低い点も利点と考えられる。しかし操作が煩雑であることを考慮すると、標準法Ames試験で変異原性の検出された物質について、DNAシーケンシング法を実施し、変異の内容を詳細に調べる手段とするのが効率的と思われる。今後は多様な変異原性物質を用いてDNAシーケンシング法の確立を目指すとともに、本方法を変異機構未解明の物質の機構解明に役立てていきたい。

## 参 考 文 献

- Barnes, W., E. Tuley and E. Eisenstadt (1982) Base-sequence analysis of his+ revertants of the hisG46 missense mutation in *salmonella typhimurium*, Environ. Mutagen, 4, 297.
- Carlomagno, M. S., L. Chiariotti, A. G. Nappo and C. B. Bruni (1988) Structure and function of the *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K-12 histidine operons, J. Mol. Biol., 203, 585-606.
- Maniatis, T., J. Sambrook, E. F. Fritsch (1990) Commonly used techniques in molecular cloning, Molecular Cloning (editor: N. Ford), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. E1-E39.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutat. Res., 113, 173-215.
- Murray, V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction, Nucleic Acids Res., 17, 8889.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, Science, 239, 487.
- Yang, J.-L., M.-C. Hu and C.-W. Wu (1991) Novel mutational spectrum induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the coding region of the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase gene in diploid human fibroblasts, J. Mol. Biol., 221, 421-430.



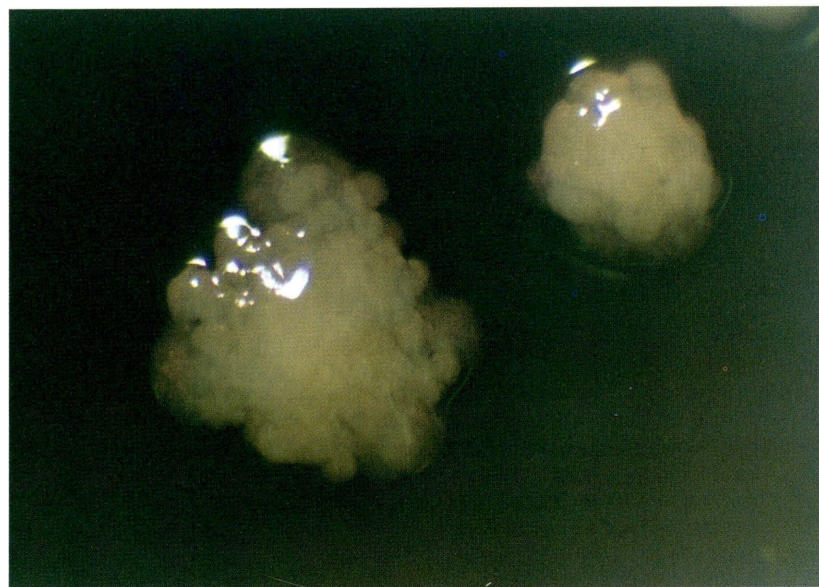


Fig. 1. Rough-shaped spontaneous revertant colonies (TA100).  
method: plate incorporation test without S9, diameter: 1-2 mm.

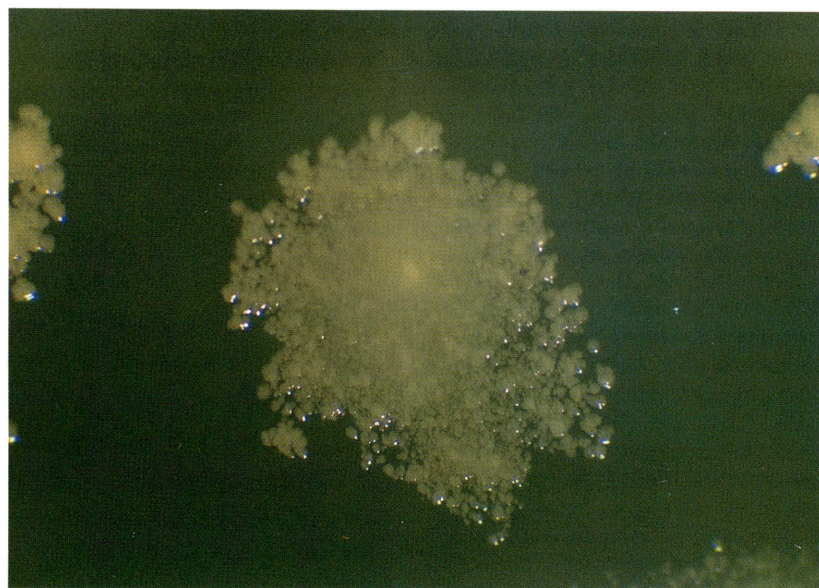


Fig. 2. A remarkable rough-shaped spontaneous revertant colony (TA100).  
method: plate incorporation test without S9, diameter: ca. 20 mm.

地の製造過程以外に主な原因があることは容易に推測出来た。

一方、遺伝的にコロニーの形状が決定されるという報告 (O. T. Avery *et al.*, 1979) はあるが予備実験を行ったところ、ラフ化コロニーは、①

継代培養すると正常な形態のコロニーに復帰し、② ヒスチジン、ビオチン要求性および生化学性状は正常な形態のコロニーと変わらないことから、遺伝的に変異を起こしたのではなく、形態にのみ異常を示すコロニーであると推測された。

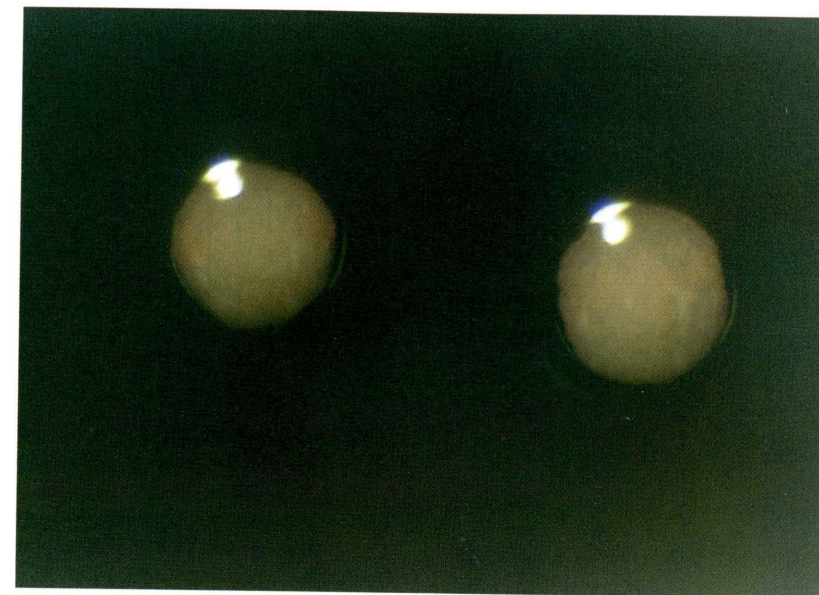


Fig. 3. Normal-shaped spontaneous revertant colonies (TA100).  
method: plate incorporation test without S9, diameter: ca. 1 mm.

そこで、ラフ化コロニーの発生原因について若干の検討を行った。

#### 実験材料および方法

##### 1. 実験材料

Dimethylsulfoxide (DMSO, 和光純薬工業(株), Cas No. 67-68-5), ニュートリエントブロス No. 2 (NB, OXOID 社), 寒天 (X 社, 製造ロット A, B, C, D, E, F および G) ならびに試験菌株として TA100, TA1535, TA98, TA1537 および WP2uvrA (Dr. Ames より入手) を使用した。

##### 2. 方法

##### 実験 1 試験菌株の運動性確認試験

NB に寒天 (ロット G) を加えて試験管に分注して滅菌調製した栄養寒天培地に、NB で 37°C, 8 時間静置培養して得られた各試験菌株を穿刺して 37°C で 48 時間培養後、培地の濁度変化から菌株の運動性の有無を確認した。栄養寒天培地は最終寒天濃度が 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 および 1.0% になるように調製した。

##### 実験 2 トップアガーに使用する寒天のゼリー強度とラフ化の関係

ゼリー強度の測定は以下の手順で行った。X 社

より任意に購入した 6 ロットの寒天 (ロット A, B, C, D, E および F) を用いて 0.6% 寒天溶液をロットごとに調製し、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後、47°C の恒温水槽に約 30 分浸してから、10 枚の滅菌シャーレに 30 ml ずつ分注した。固化後、25°C のふ卵器に約 15 時間静置し、レオメーター (不動工業(株), NRM-2002J 型) でゼリー強度を測定し、その平均値を算出した。

エームス試験は、L 字管で 37°C, 12 時間往復振とう培養した TA100 と DMSO を用いて、直接法およびプレート法で行った (D. M. Maron *et al.*, 1983)。トップアガーには、ゼリー強度の測定を行った 6 ロットの寒天を使用し、各ロットごとに寒天濃度が 0.6% になるように調製した。

##### 実験 3 試験菌株の運動性とラフ化の関係

試験菌株 (TA100) の運動性を定量的に把握するために 48 時間培養後の推定移動距離の測定を以下の手順で行った。エームス試験時にエームス培地に重層する溶液と同じ寒天濃度になるように滅菌調製した栄養寒天培地 (ロット A, B, D および E の寒天を使用した) に、後述するエームス試験で使った TA100 の菌液を 50  $\mu$ l 静かに重層して 37°C で培養を行った。培養中、培地上層部



から下層部に向けて培地が経時的に白濁したので、この白濁進行速度を菌体の移動速度とみなして測定し、48時間培養後の菌体の推定移動距離を算出した。

エームス試験は実験2と同様に行ったが、トップアガーの寒天濃度を0.2, 0.4, 0.6, 0.8 および1.0%とし、推定移動距離の測定に用いたのと同じ4ロットの寒天を用いた。

## 結果および考察

### 実験1 試験菌株の運動性確認試験

運動性のある細菌を平板培地で培養した時に、異常な形態のコロニーを認めた経験があったのでエームス試験に使用している5菌株の運動性を調べた。その結果すべての菌株に運動性があり、特にラフ化がよく認められるTA100とTA1535は、他の試験菌株よりも高い運動性があることがわかった (Table 1)。更に、菌株の運動性は寒天濃度に依存的事もわかった。また、後日行った鞭毛染色で、全菌株とも鞭毛を有することが明らかになった。

### 実験2 トップアガーに使用する寒天のゼリー強度とラフ化の関係

もしラフ化が試験菌株の運動性と何らかの関係があるのなら、トップアガーのゼリー強度 (固化後の堅さ) によってラフ化コロニーの発生が決定されることが推測される。そこでゼリー強度の異なる製造ロットの寒天を選んで、ゼリー強度とラフ化の関係をTA100について調べた結果がFig. 4である。ゼリー強度の低いロットEおよびFの寒天をトップアガーに使用した時のみラフ

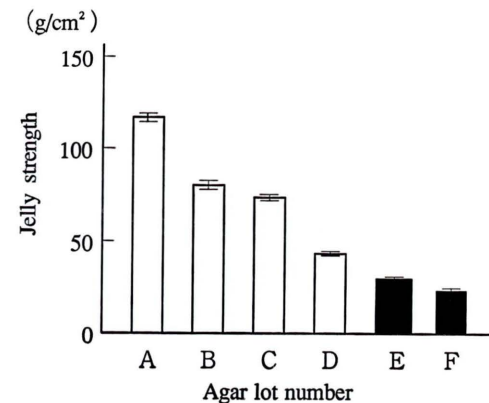


Fig. 4. Jelly strength and appearance of rough-shaped revertant colonies (TA100) in each lot of agar.

opened: with no rough-shaped revertant colonies, closed: with rough-shaped revertant colonies.

化コロニーが認められたことから、ラフ化現象はトップアガーに用いる寒天のゼリー強度に明らかに依存していることがわかった。更に、労働省ガイドライン (労働省安全衛生部化学物質調査課編, 1991) で定められている0.6%寒天濃度のトップアガーを調製しても、ゼリー強度の低い寒天を使用した場合にはラフ化現象が生じる可能性があることが分かった。

### 実験3 試験菌株の運動性とラフ化の関係

次に、試験菌株の運動性とラフ化との関係を明らかにするため、トップアガーの寒天濃度を変えた場合の菌株の推定移動距離 (48時間培養後) とラフ化コロニーの有無の関係について、TA100を用いて調べた。その結果、トップアガーの寒天濃度を低くすると見かけ上の運動性が高くなるだけでなく、ラフ化コロニーが検出されやすくなった (Fig. 5)。また、寒天のロット差も認められ、寒天濃度を0.4%にした場合、ゼリー強度の低いロットDおよびEでのみ、見かけ上の高い運動性とラフ化現象を確認することが出来た。これらの事実、トップアガーのゼリー強度もしくは寒天濃度が低いと試験菌株の見かけ上の運動性が高くなり、その結果としてラフ化現象が生じることを示している。このために、運動性の高い試験菌株ほどラフ化コロニーは出現しやすくなるものと推測される。

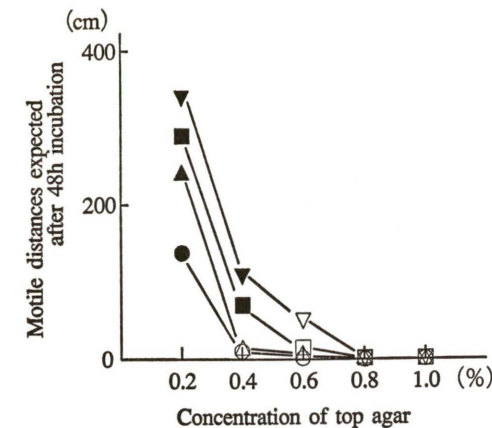


Fig. 5. Relationship between the concentration of top agar and appearance of rough-shaped revertant colonies (TA100).

○: agar lot A, △: agar lot B, □: agar lot D, ▽: agar lot E.

opened: with no rough-shaped revertant colonies, closed: with rough-shaped revertant colonies.

尚、データは示していないが、ラフ化によって復帰コロニー数の変動を認めることはなく、ラフ化現象が認められるような試験条件でエームス試験を行ったとしても、復帰コロニー数のバラツキの直接の原因とはならないことを確認することができた。ただし、著しいラフ化が認められるような場合は、コロニー同士の重なり合いで正確なカウントが困難になることがあるので、ラフ化の生じない条件でエームス試験を行うようにすべきである。具体的には、購入した寒天が少なくとも40~50 g/cm²以上のゼリー強度であることを予め確認した上で、トップアガーの調製に使用すると

よい。

Fig. 5の推定移動距離の測定では、NBを培地に加えているだけでなく、菌液を添加した時点からの移動距離を見ているために、エームス試験のような培養開始後ある確率で変異を起こした菌株が、栄養的に限定された平板培地上を遊走する場合とは明らかに条件が異なる。すなわち、推定移動距離はエームス試験時の相対的な遊走可能距離を表すものとみなすべきである。また、運動性があるのにも関わらずすべての試験菌株でラフ化コロニーを形成しないのは、菌株の運動性の強さの違いやトップアガーの物理的な遊走阻止だけが理由ではなく、エームス培地の低栄養性による間接的遊走阻止も理由の1つではないかと思われる。

## 謝辞

本研究を行うにあたって、エームス試験について東京慈恵会医科大学環境保健医学教室、清水英佑教授並びに教室の方々に、温かい御指導を賜りましたことを深謝いたします。

## 参考文献

- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215.
- Avery, O. T. C. M. MacLeod and M. McCarty (1979) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types, *J. Exp. Med.*, **149**(2), 137-158.
- 労働省安全衛生部化学物質調査課編 (1991) 微生物を用いる変異原性試験の具体的手法と結果の評価、安衛法における変異原性試験、中央労働災害防止協会, pp. 40-63.

Table 1. Motility of the tester strains

Strains	Agar concentration (%)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
TA100	+++	++	-	-	-
TA1535	+++	++	-	-	-
WP2uvrA	+	-	-	-	-
TA98	++	++	-	-	-
TA1537	+	-	-	-	-

+++ : very highly motile, ++ : highly motile, + : motile, - : not motile



## 第16期最初の総会開催される

平成6年8月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議の第16期が平成6年7月22日(金)からスタートし、7月25日から7月27日までの3日間、第119回総会が開催されました。今回の日本学術会議だよりでは、総会の概要等についてお知らせします。

### 日本学術会議第119回総会報告

平成6年7月22日から、第16期が開始されましたが、この第16期会員による最初の総会である、日本学術会議第119回総会が、7月25日から27日までの3日間にわたって開催されました。

初日(25日)の午前は、辞令交付式が、総理大臣官邸ホールで行われ、210名の会員のうち海外出張中等の22名を除く188名の会員が出席しました。式は、村山内閣総理大臣、五十嵐内閣官房長官、石原官房副長官、文田総理府次長等の出席を得て行われ、第1部から第7部までの全会員の名前が読み上げられた後、会員を代表して最年長である中田易直第1部会員が、村山内閣総理大臣から辞令を受け取りました。この後、村山内閣総理大臣が「会員の皆様には独創性豊かな学術研究の発展等のため、総合的観点に立って学術研究に係わる諸問題の解決に御尽力いただきたい」とあいさつし、これに応じて、中田易直第1部会員が「微力ながら全力を尽くし、重要な職責を全うし、国民の期待に応えたい」とあいさつしました。午後は、日本学術会議講堂において、総会が開催され、会長、副会長(2名)の互選が行われました。その結果、会長には、伊藤正男第7部会員が、人文科学部門の副会長には、利谷信義第2部会員が、自然科学部門の副会長には、西島安則第4部会員が、それぞれ選出され、伊藤会長及び利谷副会長(西島副会長は海外出張中)からそれぞれ就任のあいさつを行いました。続いて、各部会が開かれ、各部の部長、副部长及び幹事の選出等が行われました。(第16期の役員については、別掲を参照)

2日目(26日)は、午前10時から総会が開催され、近藤前会長が海外出張中のため代理として川田前副会長が第15期の総括的な活動報告を行い、続いて、会員推薦管理会報告として、久保亮五委員長代理として高岡事務総長が、第16期会員の推薦を決定するまでの経過報告を行いました。引き続き、事務総長から第16期会員対して実施した「第16期の日本学術会議が取り組むべき課題について」のアンケートの結果について説明がありました。総会終了後は、各運営審議会附置委員会、各部会、各常置委員会等が開催されました。また、夕方には、総理大臣官邸ホールにおいて、村山内閣総理大臣主催の日本学術会議第16期会員との懇談会が初めて開催されました。懇談会は、村山内閣総理大臣のあいさつで開会し、五十嵐内閣官房長官の発声による乾杯、伊藤会長の答礼のあいさつの後、懇談に入りました。来賓として、与謝野文部大臣、田中科学技術庁長官、吉田農林水産政務次官、藤田日本学士院院長ほか大勢の方が出席され、あふれんばかりの人々で歓談が続き盛会となりました。

3日目(27日)は、午前10時から総会が開会され、会長から「第16期活動計画の作成について」の中合せ案について提案があり、原案どおり可決されました。続いて、第16期の活動計画についての自由討議が行われ、各部長から各部会での意見が披露されるなど活発な発言がありました。総会終了後は、地区会議合同会議、各運営審議会附置委員会、各常置委員会等が行われました。その後、運営審議会が開催され、第16期の活動計画の素案作成のために、運営審議会構成員の中から起草委員を選出し、審議に入りました。



## 第16期日本学術会議役員

会 長	伊藤 正男 (第7部・生理科学)
	理化学研究所国際 フロンティア研究システム長
副会長	利谷 信義 (第2部・基礎法学)
	お茶の水女子大学 (生活科学) 教授
副会長	西島 安則 (第4部・化学)
	日本ユネスコ国内委員会会長

## 〔各部役員〕

第1部	部 長	中田 易直 (歴史学)
	副部長	戸川 芳郎 (哲学)
	幹 事	堀尾 輝久 (教育学)
	幹 事	森岡 清美 (社会学)
第2部	部 長	中山 和久 (社会法学)
	副部長	山口 定 (政治学)
	幹 事	兼子 仁 (公法学)
	幹 事	山中永之佑 (基礎法学)
第3部	部 長	柏崎利之輔 (経済政策)
	副部長	岡本 康雄 (経営学)
	幹 事	河野 博忠 (経済政策)
	幹 事	二神 恭一 (経営学)
第4部	部 長	伊達 宗行 (物理学)
	副部長	竹内 郁夫 (生物科学)
	幹 事	井口 洋夫 (化学)
	幹 事	新藤 静夫 (地質科学)
第5部	部 長	内田 盛也 (応用化学)
	副部長	大橋 秀雄 (機械工学)
	幹 事	増子 昇 (金属工学)
	幹 事	松尾 稔 (土木工学)
第6部	部 長	志村 博康 (農業工学)
	副部長	北村貞太郎 (農業工学)
	幹 事	島田 淳子 (家政学)
	幹 事	平田 熙 (農芸化学)
第7部	部 長	渥美 和彦 (内科系科学)
	副部長	金岡 祐一 (薬科学)
	幹 事	入江 賢 (内科系科学)
	幹 事	細田 泰弘 (病理科学)

## 〔常置委員会〕

第1常置	委員長	利谷 信義 (第2部)
第2常置	委員長	中塚 明 (第1部)
第3常置	委員長	村上 英治 (第1部)
第4常置	委員長	増本 健 (第5部)
第5常置	委員長	山中永之佑 (第2部)
第6常置	委員長	鹿取 廣人 (第1部)
第7常置	委員長	井口 洋夫 (第4部)

(注) カッコ内は、所属部・専門

## 第16期日本学術会議会員の概要について

この度任命された210人の第16期日本学術会議会員の概要を以下に紹介します。(カッコ内は第15期)

1 性別	男性209人	女性1人
2 年齢別	45～49歳 1人	50～54歳 3人
	55～59歳 26人	60～64歳 93人
	65～69歳 72人	70～74歳 12人
	75～79歳 1人	
	最年長 75歳 (74歳)	
	最年少 47歳 (54歳)	
	平均年齢 63.6歳 (63.3歳)	
3 勤務機関及び職名別		
(1) 大学関係	国立大学	59人
	公立大学	2人
	私立大学	111人
	公私立短期大学	2人
	計	174人
(2) 国立私立試験研究機関・病院等		9人
(3) その他	法人・団体関係	5人
	民間会社	6人
	無職	14人
	その他	2人
	計	27人
4 その他の分類		
(1) 前・元・新別	前会員	82人
	元会員	3人
	新会員	125人
(2) 地域別 (居住地)		
	北海道	3人 (5人)
	東 北	9人 (8人)
	関 東	136人 (133人)
	中 部	14人 (19人)
	近 畿	41人 (34人)
	中国・四国	3人 (5人)
	九州・沖縄	4人 (6人)

(注) 詳細については、日本学術会議月報7月号を参照

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

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

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、本会事務所に申込みものとする。

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

評議員は正会員の投票により選ぶ。

会長は評議員の互選によって定める。

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

役員および評議員の任期は2年とする。

役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。

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

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

第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。

会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。

第11条 本会の事務は暦年による。

第12条 本会に名誉会員をおく。

## 附 記

1. 本会則は平成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	菊 池 康 基 佐 藤 茂 秋
賞等選考委員	須 藤 鎮 世 武 部 啓 常 盤 寛 若 林 敬 二 渡 部 烈
編集委員	石 館 基 太 田 敏 博 菊 川 清 見 後 藤 純 雄 澁 谷 徹 島 田 弘 康 鈴 木 潤 三
企画委員	秋 山 実 利 葛 西 宏 能 美 健 彦 山 添 康

日本環境変異原学会平成6～7年評議員名簿

(五十音順)

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
澁 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。なお学会所定の下記の原稿用紙を使う場合は、下記の下記の原稿送付先まで請求する。

#### 4. 報論文の送り先

報文原稿は正 1 部コピー 2 部の計 3 部を、日本環

境変異原学会編集委員長宛に書留便で送付すること。なお、最終稿では正 1 部、コピー 1 部ならびに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：

〒192-03 八王子市堀之内 1432-1

東京薬科大学 第一衛生化学教室

菊川 清見

TEL 0426-76-4503

FAX 0426-76-4508

#### 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、著作者自身が自分の記事、論文などの一部を複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著作者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて申し出を行い、許諾を求めなければならない。

#### 6. 校正

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

#### 7. 著者負担金

1) 投稿論文は、組版代の一部負担金として刷り上がり 1 頁につき 2,000 円を著者が負担す

る。また規定の頁数を越えた分については、超過頁分についての実費は著者負担とする。

2) カラー印刷等特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。

3) 別刷りは著者負担とする。別刷り希望者は著者校正時に添付する申し込み書に 50 部単位で申し込むこと。

### 環境変異原研究執筆規定

1. 用語は日本語または英語とする。

2. 原稿は原則としてワープロを用い、左横書きで作成する。

日本語の場合：原稿は A4 版用紙に 1 行 22 字、1 頁 20 行で印字する（刷り上がりの 1/4 頁に相当する）。ただし、要約は英文（300 語以内）とする。また、別に英文の題名、著者名、所属機関名ならびに所在地を付ける。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。

英語の場合：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 頁は英文の要約 (Summary) およびキーワード (英文 5 語以内)、第 3 頁以下、緒言 (Introduction)、実験材料および方法 (Materials and Methods)、結果 (Results)、考察 (Discussion)、謝辞 (Acknowledgements)、参考文献 (References)、表・図の説明および図の順序とする。なお図と表の説明はすべて英文とする。

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

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

体で書く。

6. 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。

7. 略字を使用するときは、論文中にはじめて使用するときに完全な語とその略字を括弧内に示す。

8. 句読点はカンマ (,) およびピリオド (.) とする。

9. 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。

10. 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。

11. 表は表の上部に Table (一連番号) と説明を記入すること。表には縦罫を使用せず、また各語句の始めは原則として大文字とする。脚注を要するときは表示の語句の右肩に a, b, c…を付記し、表の下欄外にそれぞれの説明を記す。

12. 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。

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

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

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

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

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



日本環境変異原学会入会申込書

平成 年 月 日

日本環境変異原学会長 殿

貴学会に入会いたしたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

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

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

学 部	学部学校名	卒業年次	年
歴 大学院	課程学校名	修了年次	年
学 位		取得年	年
研究領域 (下記にあてはまる項の2, 3を○で囲んでください)			
1. 変異原 2. 検出系 3. 毒性 4. 発生異常 5. 汚染			
6. 疫学 7. 遺伝 8. がん 9. 微生物 10. 高等動物			
11. 高等植物 12. 食品 13. 気体・粉じん 14. 医薬品 15. 農薬			
16. 代謝 17. 分子機構 18. その他 ( )			
研究歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)			
加入学会名 (本学会以外の)			

推薦者 (日本環境変異原学会評議員)
氏名 (署名) 印
入会申込者との関係 (数行ご記入ください)



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	㊦
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	

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
- エスビー食品株式会社 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
- キャノン株式会社 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



# Kikkoman S-9

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-ベンゾフラボン  
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ますので、-80℃で保存して下さい。まれに解凍後分離すること  
がありますが活性には異常がありませんので、よく攪拌して御使用下さい。

●包装単位：1.5ml×12本誌 ●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 アク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

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

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

Salmonella typhimurium TA-100,  
Benzo(a)pyrene 5μg/plate

## 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



-S-9 Mix



+S-9 Mix

家田貿易株式会社

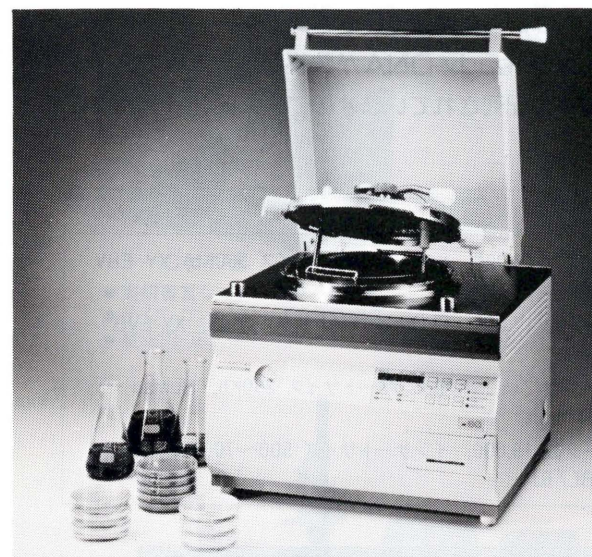
東京：〒113 東京都文京区本郷3-14-16 EKビル  
TEL.03(3816)2861 FAX.03(3814)5347  
大阪：〒564 大阪府吹田市南金田1-14-5  
TEL.06(338)1518 FAX.06(338)5626

# modern Laboratory

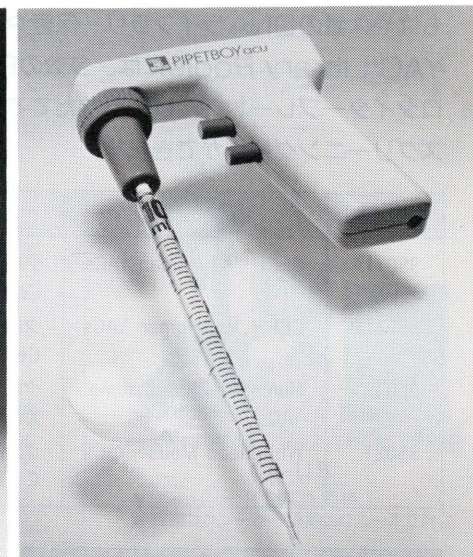
TEC  
NO  
MARA

Laboratory Technique  
for Microbiology  
and Biotechnology

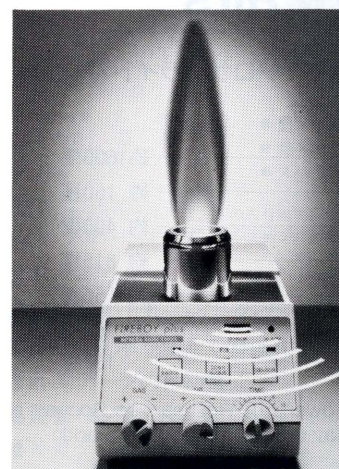
## テクノシステム



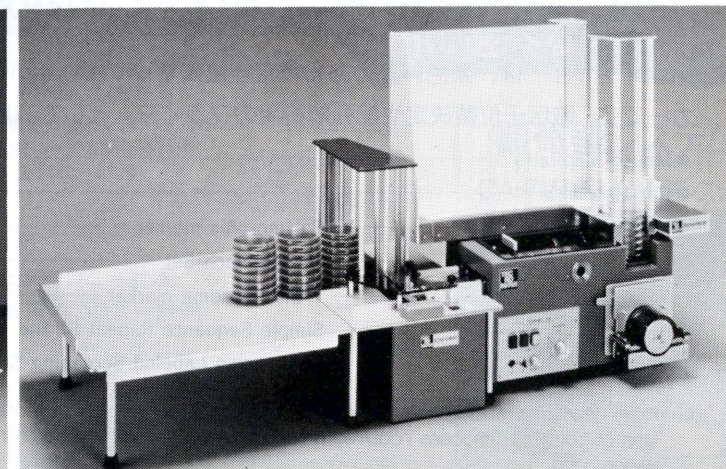
アガークレープ(培地滅菌、オートクレープ供用)



ピペットボーイ・アキュ



ファイヤーボーイ・プラス



全自動寒天平板作成装置

発売元 **グンゼ産業株式会社** 理化学機器部

☎(03)5211-1807 ☎(06)944-2623





確かな品質、優れた試薬を世界から。

研究用

Research Genetics (略号: RSG)

リサーチ・ジェネティクス社の **ゲノム研究用試薬**

## YAC Library DNA Pools

もはや大量のDNAライブラリー保管や多大なDNA調整操作は不要です。

YAC Library Poolsには、多数のPCR\* ready DNAが数枚から数十枚のマイクロタイタープレート(96穴)に系統だててプール配列されていますので、システムテックにスクリーニング操作ができます。

品番	品名	内容
95011A	CEPH "A" Human YACs	クローン数 18,000, 平均インサートサイズ 560Kb, XY EBV Cell line
95011B	CEPH "B" Human YACs	クローン数 17,000, 平均インサートサイズ 1Mb, XY EVB Cell line
95030	Human Y Chromosome YACs	クローン数 214, 平均インサートサイズ 250Kb, Human XYYYY male
95021	Whitehead Mouse YACs	クローン数 19,000, インサートサイズ 500~700Kb, Female C 57BL/6J

## Microsatellite markers-MapPairs™

MapPairs™は、染色体上のある特定座位にマップされているマイクロサテライトマーカーです。遺伝子位置決定や配列解析用のプライマーとして有用です。

● Mouse MapPairs™	約1600種										
● Rat MapPairs™	約 150種										
● Human MapPairs™	<table> <tr> <td>Polymorphic marker</td><td>約 400種</td></tr> <tr> <td>Weissenbach Set</td><td>約 815種</td></tr> <tr> <td>Y Chromosome marker</td><td>約 150種</td></tr> <tr> <td>Simple Sequence Repeat Strand</td><td>約 100種</td></tr> <tr> <td>Fluorescein Labeled Screening Set</td><td>135種</td></tr> </table>	Polymorphic marker	約 400種	Weissenbach Set	約 815種	Y Chromosome marker	約 150種	Simple Sequence Repeat Strand	約 100種	Fluorescein Labeled Screening Set	135種
Polymorphic marker	約 400種										
Weissenbach Set	約 815種										
Y Chromosome marker	約 150種										
Simple Sequence Repeat Strand	約 100種										
Fluorescein Labeled Screening Set	135種										

⑧ \*PCR (Polymerization Chain Reaction) process is covered by patents owned by Hoffman La Roche. Use of the PCR process requires a license. A license for research may be obtained by the Perkin Elmer corp.

※詳しくは弊社までお問い合わせ願います。

信頼をお届けする

**コスモ・バイオ株式会社**

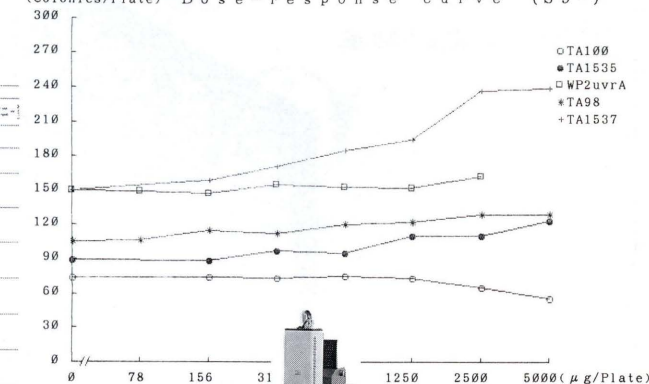
〒103 東京都中央区日本橋本町4-13-5(第20中央ビル)  
電話 03(3663)0723/FAX. 03(3663)0725

## 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 (S9-)



被験物質の名称: TEST

代謝活性 化系の 有 無	被験物質濃度 (μg/プレート)	復帰変異数(コロニー)	塩基対置換型
	TA100	TA1535	WP2uvrA
S9Mix (-)			
		150	
		149	
		147	
		155	
		153	
		152	
		162	
		128	254*
		127 (128)	237* (236)
		129	232*
		127 (128)	243* (238)
		132	231
		132 (132)	230 (231)
		133	
		121 (127)	
S9Mix (+)			
	156	35	
		36 (36)	
		28	
	313	29	
		29 (29)	
	625	29	
		29 (29)	
		30	
	1250	31	
		31 (31)	
	2500	31	
		31 (31)	
	5000	9*	
		9*	
陽性を必要とするもの	名称	AF-2	
	濃度 (μg/プレート)	8.0	
		43	
	コロニー数/プレート	43	
対照	名称	2AA	
	濃度 (μg/プレート)	1.0	
		15	
	コロニー数/プレート	16	

(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、菌の沈澱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
- 豊富なソフトウェア
- 背景データの検索プログラム
- 生育阻害編集機能
- 一太郎、ロータス1-2-3対応

※依頼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)

CA-7II

- 実績豊富なコロニーアナライザー
- サイズ、コントラストによる分離機能
- 阻止円・正式法の力価計算

S9Mix (+)

陽性を必要とするもの

対照

PCA-11S

- 最高級で豊富な機能を備えたシステム
- 接触したコロニーの自動分離計測
- スパイラル法コロニー計測

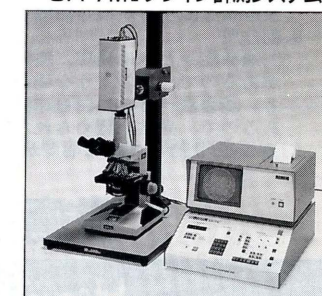
CA-11S

- コンパクト一体型で低価格
- 細菌コロニーから細胞コロニーまで計測

自由に選べるラインナップ。

顕微鏡システム

CA-7II グレイン計測システム



CA-7MII



# 6員環を持つ世界初の H<sub>2</sub>-受容体拮抗剤です。

帝国臓器製薬

薬価基準収載



## 【効能・効果】

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

急性胃炎、慢性胃炎の急性増悪期

## 【使用上の注意】

### 1. 一般的注意

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

③消化器＝ときに便秘、下痢、悪心、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H<sub>2</sub>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

一般に高齢者では生理機能が低下しているので慎重に投与すること。

### 5. 妊婦、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に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、投薬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ことがあるので、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

H<sub>2</sub>-受容体拮抗剤

**アルタット<sup>®</sup>カプセル75**  
(塩酸ロキサチジンセタートカプセル)

■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

東亜合成が高度な修飾技術と豊富なグレードで幅広いニーズにお応えします。

# オリゴDNA受託合成

超特価

¥400/base

20mer オリゴマー（非修飾・未精製品）が  
¥8,000でお手元に！

## ●高品質に絶対の信頼

## ●グラム・オーダーの大量合成にも対応

### 非修飾品

グレード	基本料金	保証OD <sub>260</sub> *
未精製	0円	5
PCR	3,000円	5
シークエンス	6,000円	3

\* 通常スケール

●未精製グレードで30 OD<sub>260</sub>の場合、ならびにPCRグレードで20 OD<sub>260</sub>の場合、通常スケールの価格の2倍です。  
通常スケールの保証OD<sub>260</sub>以上を必要とされる場合にはお申し付けください。

### 修飾内容

官能基導入・標識化	末端修飾追加料金
アミノ化、カルボキシル化、リボース化(3'末端)	5,000円
ビオチン化、ジゴキシゲニン化、ダンシル化、ジニトロフェニル化	10,000円
ホスホロチオエート化(S-オリゴ)、イノシン挿入(～5カ所)	15,000円
FITC化	20,000円

●テキサスレッド化、テトラメチルローダミンイソシアネート化も可能

●数種の同時修飾(5'末端修飾+3'末端修飾)にも対応します。

●ミックスプローブは追加料金なし。

●鎖内修飾の追加料金はお問い合わせください。

## ●納期

未精製品およびPCRグレード品の非修飾体の納期は、通常受注後約7日です。

各種修飾体および大量合成、また、特にお急ぎの場合などには、お問い合わせください。

### 注文方法

●ご注文の塩基配列を下記宛にFAXしてください。申し込み用紙を用意しておりますのでご請求ください。

●ご注文内容についての秘密は厳守いたします。

販売元 フナコシ株式会社 ライフサイエンス推進本部 研究試薬部

FAX.03-5684-1634 TEL.03-5684-1616

ご注文は

**フナコシ株式会社**

〒113 東京都文京区本郷2-9-7 ユビテル・ユニビルディング

ライフサイエンス推進本部 研究試薬部

TEL.03-5684-1616 FAX.03-5684-1634



核酸有機合成化学のパイオニア

**東亜合成株式会社**

〒105 東京都港区西新橋1-14-1

バイオサイエンス開発部

TEL.03-3597-7360 FAX.03-3597-7371



**ブルーコットン**  
(CB-0200-01)

ブルーコットン（青綿）は、青色色素トリスルホ銅フタロシアニンを脱脂綿に共有結合させたもので、通常約10  $\mu$ moles / gの銅フタロシアニン核を含有しています。

- 変異原性物質、殊に、3環以上の多環性芳香族化合物を強く吸着します。
- 変異原性物質を希薄な水溶液中から吸着・回収するのに適しています。

**ブルーレーヨン**  
(DW-0000-05)

ブルーレーヨンは、脱脂綿の代わりに非晶質レーヨンを使用しているため、ブルーコットンの約3倍（約31  $\pm$  2  $\mu$ mole / g）の銅含有量を示し、変異原性物質の吸着・濃縮・分画に威力を発揮します。

- 青色色素の漏出がほとんどありません。
- Trp-P-1等、多くの変異原性物質を吸着します。

**変異原性物質吸着剤**

Mutagen Adsorbents

※詳細は下記宛にお問い合わせ下さい。

フナコシのライフサイエンス研究用試薬と機器

**フナコシ株式会社**

〒113 東京都文京区本郷2丁目9番7号 ユピテル・ユニビルディング

価格・在庫・納期に関するお問い合わせ……

ライフサイエンス推進本部

営業業務部・研究試薬部・研究機器部 Tel. (代表) 03-5684-1616 Fax. 03-5684-1634

製品内容・資料請求に関するお問い合わせ……

研究開発本部

技術情報部 Tel. (直通) 03-5684-1620 Fax. 03-5684-1775

**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、蛍光プライマー

**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  
⋮  
A09 AgA ATT ggA CgA

CMN-A20

A20 TTg CCg ggA CCA  
A21 gTg ACC gAT CCA  
A22 TCC AAg CTA CCA  
A23 AAg Tgg Tgg TAT  
⋮  
A29 ATC TTC AAA gAT

CMN-A40

A40 gCg gAg gAA CCA  
A41 Tgg TAC ggT ATA  
A42 gAg CAg gAA TAT  
A43 ACT CTT CTA CAA  
⋮  
A49 TAC TAC TgT ggA

※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



## 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
	太田 敏博
	後藤 純雄
	澁谷 徹
	島田 弘康
	鈴木 潤三

---

環境変異原研究 第16巻 第2号 1994年

平成6年9月28日 印刷  
平成6年9月30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、新開発の露出演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(代) FAX.03-3256-8959