

# 環境変異原研究

Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

Vol.17 No.1 1995

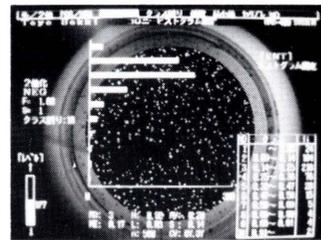
# 日本環境変異原学会 第23回大会

1995 静岡 大会会場での1コマ

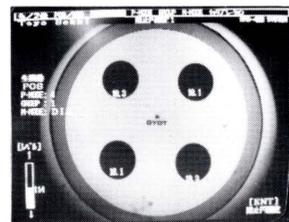
## バイオ・マルチスキャナー BMS-400

- ① 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
- ② MIC測定 (寒天希釈法による、27菌株の同時測定)
- ③ 阻止円測定 (4個の阻止円を同時測定)

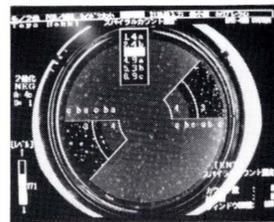
東洋測器のこの1台がすべてを瞬時測定



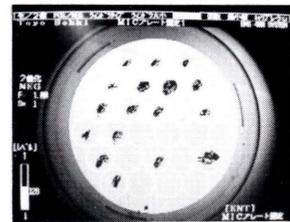
コロニーサイズ別ヒストグラム表示



阻止円直径測定



スパイラルコロニーカウント



MIC測定

## M/Gエアースンプラー



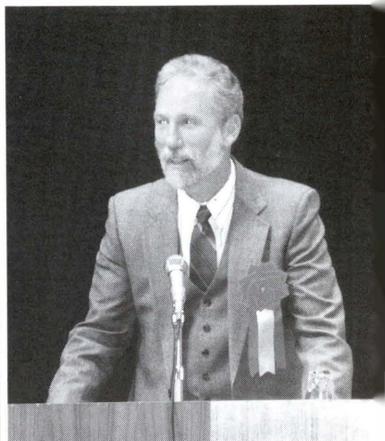
### NASA基準 空中浮遊菌測定器

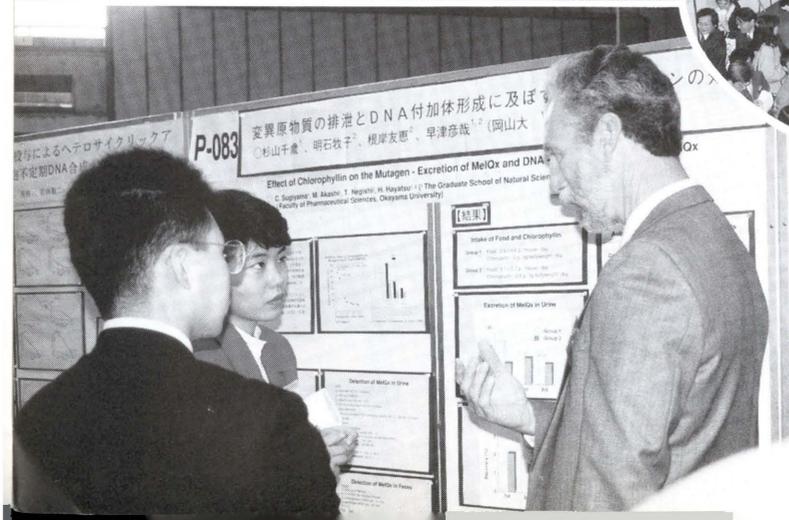
米国NASA基準の空中浮遊菌測定法によりデータは国際的に通用します。  
測定時間は5分から連続1時間まで幅広い測定時間が得られます。  
クラス100のバイオクリーンルームも1回の測定で評価できる大量吸引測定。

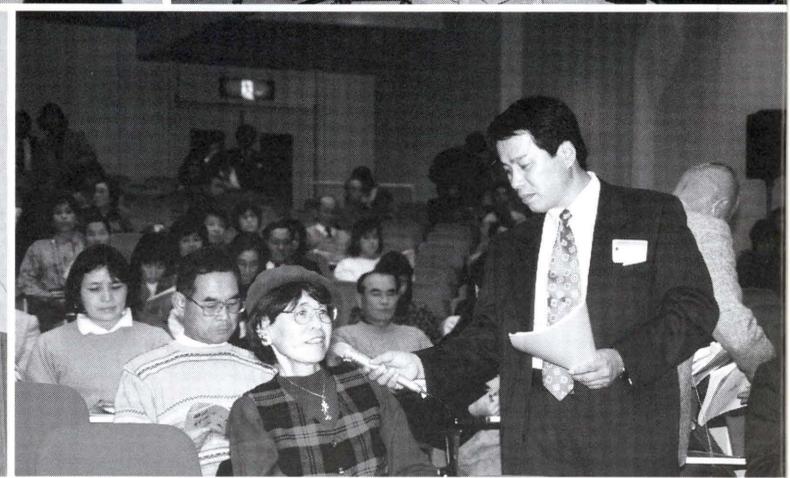
\* 詳細は、お問い合わせ下さい。

**TOYO SOHBI 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 17, Number 1 1995

### 目次

#### 第23回大会特別講演

Chlorophylls as Anticarcinogens and Tumor Modulators in Fish and Mammalian Models

G. S. Bailey..... 1

#### 総説

##### 学術賞授賞講演

ヘテロサイクリックアミンの変異・がん原性に関する研究

杉村 隆..... 7

##### 研究奨励賞授賞講演

香料成分の抗変異原性作用機構

太田敏博..... 23

##### 研究奨励賞授賞講演

アルキル化剤による変異誘発に対する修飾作用の分子機構

高橋和彦..... 35

#### 一般論文

Micronuclei Induction of Methyl Bromide in Rats and Mice by Sub-chronic Inhalation

Toxicity Test

A. Araki, F. Kato, T. Matsushima, N. Ikawa and K. Nozaki..... 47

#### 特別企画 第23回大会パネルディスカッション

「環境変異原の複合作用とその評価」

細菌および培養細胞におけるヘテロサイクリックアミン類の変異原性増強効果とその

作用機序

下位香代子, 宮村理恵子, 加藤智子, 木苗直秀..... 57

水質汚濁性物質の変異原性増強作用

佐々木 有, 木苗直秀..... 65

金属と発がん性有機化合物との相互作用による酸化的DNA損傷

平工雄介, 及川伸二, 川西正祐..... 75

ヘテロサイクリックアミンの複合によるラット肝発癌の促進

長谷川良平, 白井智之, 伊東信行..... 83

複合効果の理論的考察—*In vivo* 小核誘発性について— 林 真, 鈴木孝昌, 祖父尼俊雄..... 93

#### 特別企画 第23回大会シンポジウム

「植物成分によるがん予防とそのメカニズム」

香辛料 caraway のアルキル化剤に対する抑制効果

木内武美, 片岡佳子, 東元 稔, J. Purintrapiban, 有持秀喜, S. M. Shaheduzzaman,

秋本 茂, 松本久男, U. Vinitketkumnuen, 大西克成..... 99

植物中の抗変異原, 抗発がんプロモーターとその作用機作: ジスルフィッド化合物と茶葉成分	中村好志, 富田 勲	107
フラボノイドの食事発がん物質 Trp-P-2 に対する脱変異原活性	金沢和樹	115
Cancer Chemoprevention by Natural Carotenoids	H. Nishino	123
Chemopreventive Effects of Plant Derived Phenolic, Organosulfur and Other Compounds on Carcinogenesis in Digestive Organs	H. Mori, T. Tanaka, S. Sugie and N. Yoshimi	127
緑茶成分による消化器がんの予防	山根哲郎, 松本浩彦, 菊岡範一, 中谷浩久, 大矢和彦, 高橋俊雄	135

日本学術会議だより (No. 36, 37)		143
------------------------	--	-----

付記

日本環境変異原学会 会則		147
” 平成6~7年 役員名簿		148
” ” 評議員名簿		149
環境変異原研究 投稿規定		150
” 執筆規定		151
日本環境変異原学会入会申込書		152
住所・所属等変更届		154
賛助会員		155
広告		156

広告掲載会社一覧

- 家田貿易株式会社
- オリエンタル酵母工業株式会社
- 化学物質点検推進委員会
- 加商株式会社
- ケイオー電子工業株式会社
- システムサイエンス株式会社
- 株式会社東京エム・アイ商会
- 東洋測器株式会社 (表2)
- フナコシ株式会社
- モレキュラーダイナミックスジャパン株式会社 (表4)
- 和光純薬工業株式会社

(50音順)

第23回大会特別講演

## Chlorophylls as Anticarcinogens and Tumor Modulators in Fish and Mammalian Models

George S. Bailey

Department of Food Science and Technology, Oregon State University,  
Corvallis, Oregon, 97331 U.S.A.

(Received: March 23, 1995; Accepted: May 31, 1995)

Summary

Chlorophyllin (CHL), a well-known antimutagen, has been studied for its anticarcinogenic properties in rainbow trout liver, rat colon, and mouse skin tumorigenesis models. For the trout studies, fingerling trout were fed increasing doses of tritiated aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) at 10-160 ppb for two weeks to generate liver AFB<sub>1</sub>-DNA binding and tumor dose-response curves. Three additional groups were similarly treated, but received dietary chlorophyllin (CHL) at 500, 2000, and 4000 ppm with the AFB<sub>1</sub>. Co-feeding of CHL was found to progressively decrease hepatic AFB<sub>1</sub>-DNA adduction at the end of the two-week treatment, and to decrease tumor response nine months later. Quantitative molecular dosimetry analysis indicated that CHL-mediated reduction of AFB<sub>1</sub>-DNA adduction accounted entirely for reduced tumor response at CHL doses up to 2000 ppm, but only 50% of the reduction in tumor response at 4000 ppm CHL. We have shown CHL and AFB<sub>1</sub> to form a strong non-covalent complex *in vitro*, which may be responsible for reduced AFB<sub>1</sub> uptake and DNA damage *in vivo*. In mammalian models, Park *et al.* demonstrated that CHL, when applied either topically or by gavage, strongly reduced benzo(a)pyrene-induced skin papillomas in mice (Proc. Am. Assn. Cancer Res. 35: 828, 1994). Mechanisms were not examined. Against these protective effects, Nelson has reported that 1.5 mM CHL in drinking water given chronically after dimethylhydrazine promoted colorectal tumor response in F344 rats (Anticancer Res. 12: 737, 1992). The CHL promotional mechanisms and their pertinence to human chemoprevention remain to be elucidated.

Keywords: chlorophyllin, trout, aflatoxin B<sub>1</sub>, chemoprevention, molecular dosimetry

Introduction

Hundreds of natural and synthetic compounds display anticarcinogenic behavior, with many operating through induction of xenobiotic metabolizing enzymes and subsequent reduction in carcinogen-DNA damage (Wattenberg, 1993; Morse and Stoner, 1993; Kelloff *et al.*, 1994). While such agents are of interest for human intervention, a notable disadvantage lies in their potential for enhanced bioactivation of certain carcinogen classes, or alteration in metabolism of hormones and other endogenous substrates leading to unknown and possibly deleterious consequences. The common phytochemical chlorophyll and its water soluble sodium/copper salt derivative chlorophyllin (CHL) are well

known to have potent antigenotoxic activity in several prokaryotic and eukaryotic mutagenesis and cell transformation bioassays (Whong *et al.*, 1988; Negishi *et al.*, 1989; Warner *et al.*, 1991; Romert *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1994; Negishi *et al.*, 1994). Interest in these compounds stems especially from their ubiquity, non-toxicity to humans (Harrison *et al.*, 1954; Young and Beregi, 1980), and apparently simple protective mechanisms (Sakar *et al.*, 1994). These have been postulated to involve non-covalent complexation to reduce carcinogen uptake (Dashwood, 1992; Guo and Dashwood, 1994; Breinholt *et al.*, 1995a; Hayashi *et al.*, 1995), enzyme inhibition (Imai *et al.*, 1986; Dashwood and Guo, 1992), and trapping of carcinogen or its electrophile intermedi-

ates (Arimoto *et al.*, 1980; Arimoto *et al.*, 1993; Tachino *et al.*, 1994), without evidence for enzyme induction (Imai *et al.*, 1986). We recently showed that CHL could inhibit aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) mutagenesis *in vitro*, and hepatic DNA adduction *in vivo* in rainbow trout (Dashwood *et al.*, 1991a). Here we review our recent studies (Breinholt *et al.*, 1995b), which used this well established model to demonstrate that CHL can inhibit carcinogenesis in the whole animal. Recent findings by other researchers regarding CHL effects in rodent carcinogenesis models are also discussed.

#### Materials and Methods

These studies have been reported in detail elsewhere (Breinholt *et al.*, 1995b). Briefly, triplicate tanks of 130 fingerling rainbow trout (1.5–2 grams each) were fed standard Oregon Test Diet containing a specified dose of AFB<sub>1</sub> (10, 20, 40, 80, or 160 ppb), each diet being 5 ppb in tritiated AFB<sub>1</sub> (18.8 Ci/mmol), in combination with 0, 500, 2000, or 4000 ppm CHL (Sigma). After two weeks of feeding, 30 trout were removed from each tank for determination of liver AFB<sub>1</sub>-DNA adducts, and the remaining 100 fish in each tank were returned to control diet for 9 months. To evaluate post-initiation effects, duplicate tanks received 80 ppb AFB<sub>1</sub> for 4 weeks, followed by control diet, 1500 ppm indole-3-carbinol (I3C) as a known promoter (Dashwood *et al.*, 1991b), 1500 ppm CHL, or 1500 ppm CHL plus 1500 ppm I3C for 9 months. Procedures for determination of DNA adducts and histopathology have been

described (Breinholt *et al.*, 1995b).

#### Results

Tumor phenotypes were similar among all treatment groups, with the majority of tumors being mixed hepatocellular/cholangiocellular carcinoma (data not shown). Among the few tumors obtained at high CHL dose, this was the only phenotype observed. As seen in Table 1, 4000 ppm CHL inhibited tumor response at 40, 80, and 160 ppb AFB<sub>1</sub> by 67–73% ( $P \leq 0.01$  each comparison), with some indication of inhibition at other CHL/AFB<sub>1</sub> combinations. Unfortunately, tumor response was less than anticipated for this study (e.g. response was only 0–3% at 10 and 20 ppb AFB<sub>1</sub> (data not shown) rather than the expected 40–60%), which impeded our ability to observe significant CHL anticarcinogenic effects at every dose combination.

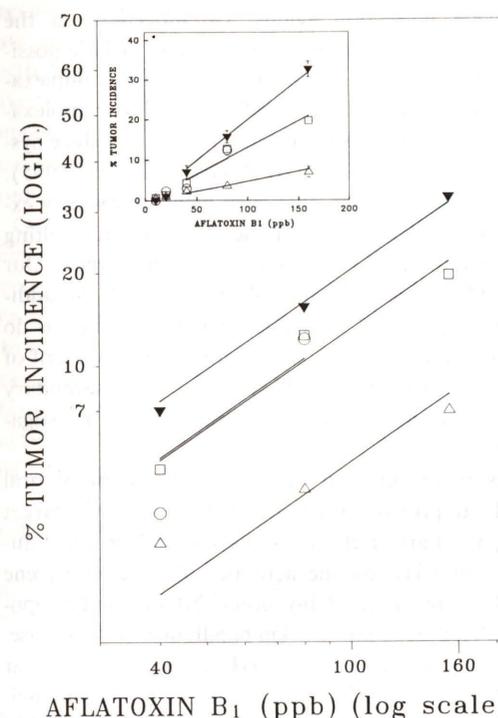
Within this limitation, dose-response relationships can be modeled in several ways to provide useful quantitative summaries of the effects of CHL over the range of carcinogen and inhibitor doses examined. At the three highest AFB<sub>1</sub> doses, increasing CHL dose can be seen to progressively decrease the slope of AFB<sub>1</sub> tumor dose-response curves plotted simply as incidence vs. AFB<sub>1</sub> dose (Fig. 1, inset). Percentage inhibition of tumor response at any dose “x” of CHL can be defined as  $100[1 - \text{slope}_x / \text{slope}_{\text{control}}]$ , which calculates to be 35 (CI=13–53%), 34 (CI=19–47%), and 77% inhibition (CI=68–84%) for CHL doses of 500, 2000, and 4000 ppm, respectively. An alternative analysis examines

Table 1. Tumor response among animals fed varying doses of AFB<sub>1</sub> and CHL

AFB <sub>1</sub> Dose (ppb)	CHL Dose (ppm)	Tumor Incidence per tank (n=100)	Overall Incidence (three tanks)	P values <sup>a</sup> vs. 0 CHL Control
40	0	3, 9, 9	7.0	
40	500	2, 3, 4	3.0	0.04
40	2000	3, 4, 6	4.33	0.22
40	4000	0, 3, 4	2.33	0.01
80	0	12, 17, 18	15.7	
80	500	10, 12, 15	12.3	0.29
80	2000	12, 13, 13	12.7	0.35
80	4000	2, 3, 6	3.67	<0.001
160	0	29, 32, 37	32.7	
160	500	ND <sup>b</sup>		
160	2000	19, 20, 20	19.7	<0.001
160	4000	5, 6, 10	7.0	<0.001

<sup>a</sup> Within each set receiving same AFB<sub>1</sub> dose, pairwise comparisons to the 0 ppm CHL control were conducted using the Fischer's exact test on each 2-by-2 table constructed by pooling replicate tanks.

<sup>b</sup> ND, not done; this group was inadvertently excluded from the experiment.



AFBLATOXIN B<sub>1</sub> (ppb) (log scale)

Fig. 1. Tumor response vs. AFB<sub>1</sub> dose, with various levels of CHL co-treatment. Symbols represent 0 (▲), 500 (○), 2000 (□) and 4000 (△) ppm dietary CHL. Data points are mean tumor incidences for 3 tanks of 100 fish, and bars are (SE). Incidences were modeled only for AFB<sub>1</sub> doses  $\leq 40$  ppb, where there was evidence for CHL effects. Pooled tumor incidences were modeled as logit incidence vs. log AFB<sub>1</sub> dose given. Lines are maximum likelihood fits for a parallel linear logistic regression model, which explains the variation in tumor incidence (lack of fit vs., full model; 6 degrees of freedom;  $P=0.26$ ; test of homogeneity of slopes, 3 degrees of freedom,  $P=0.15$ ). The model indicates highly significant differences among treatment groups (test of common intercepts, 3 degrees of freedom,  $P < 0.0001$ ), except for no difference between 500 and 2000 ppm CHL. *Inset*—Lines are maximum likelihood fits for modeling incidence as proportional to dose with a different slope for each CHL treatment. The model explains the variation in incidence for the data points examined (lack of fit vs. full model, 7 degrees of freedom,  $P=0.28$ ) and indicates highly significant CHL effects (test of common slope, 3 degrees of freedom,  $P < 0.0001$ ), except for no difference between 500 and 2000 ppm CHL.

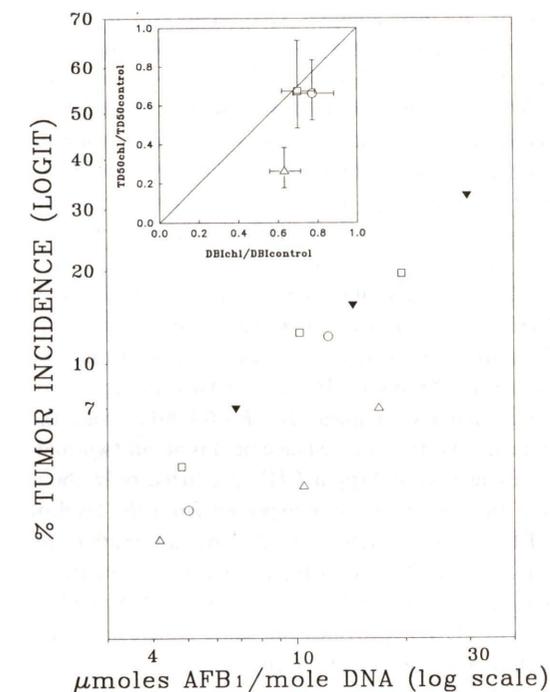


Fig. 2. CHL fractional inhibition of AFB<sub>1</sub>-DNA binding and tumorigenesis, for 500, 2000, and 4000 ppm CHL. Symbols are as in Fig. 1.

Pooled tumor incidences (from Table 1) versus mean AFB<sub>1</sub>-DNA binding (on log scale) for each AFB<sub>1</sub> and CHL treatment group. For this logistic regression analysis a parallel line model with a single line for all CHL treatments except the 4000 ppm line fits the data well (lack of fit vs., full model, 8 degrees of freedom,  $P=0.54$ ), and the 4000 ppm line is significantly shifted away from the rest ( $P < 0.0001$ ). *Inset*—Ratio of TD<sub>50</sub> values versus ratio of DNA binding indices (DBI), for each level of CHL. Data points, estimates, and 95% confidence intervals for DNA adducts were obtained by linear modeling of DNA adduction data for the three top AFB<sub>1</sub> doses and all CHL combinations (not shown). The TD<sub>50</sub> and DBI ratios were significantly different from each other only for the 4000 ppm CHL ( $P < 0.0001$ ).

CHL effects on logit-derived TD<sub>50</sub> values for the AFB<sub>1</sub> dose-response curves, when plotted as logit incidence vs. log carcinogen dose for each level of CHL used (Fig. 1). Percent inhibition at each CHL dose is defined in this model as  $100[1 - \text{TD}_{50 \text{ control}} / \text{TD}_{50x}]$  at each CHL dose “x”. The results (33, 34, 74% inhibition at 500, 2000, 4000 ppm CHL) are virtually identical to the slope analysis

results. By these analyses, CHL at 4000 ppm provided approximately 75% inhibition of AFB<sub>1</sub> tumorigenesis, at any AFB<sub>1</sub> dose in the range 40–160 ppb.

What is the relationship between reduced liver AFB<sub>1</sub>-DNA adduction and reduced tumor response? This is shown by the molecular dosimetry analyses in Fig. 2. The simplest analysis plots logit tumor incidence vs. log AFB<sub>1</sub>-DNA adducts. By this approach, all data for 0, 500, and 2000 ppm CHL clearly describe the same line; this means that CHL reduction in DNA adducts accounted totally for reduced tumorigenic response. By contrast, the data for 4000 ppm CHL at the two highest AFB<sub>1</sub> doses departs significantly ( $P < 0.0001$ ) from the data set. Horizontal displacement is about two-fold, meaning that 4000 ppm CHL produced only about half the tumor response expected from the level of AFB<sub>1</sub>-DNA adducts formed. An alternative approach (Fig. 2 inset), which analyzes the fractional effects of CHL on TD<sub>50</sub> values and DNA binding indices (DBI), provides the same conclusion; protection against AFB<sub>1</sub> tumorigenesis is quantitatively predicted by reduction of DNA adduction up to 2000 ppm CHL, whereas at 4000 ppm CHL tumor protection is twice that expected based on reduced DNA damage.

We also examined post-initiation effects of CHL in the trout model. Four groups of trout were initiated with AFB<sub>1</sub> and then fed one of four diets for 31 weeks: control diet, 1500 ppm CHL, 1500 ppm I3C, or 1500 ppm I3C plus 1500 ppm CHL. Tumor responses for the four diets were, respectively, 57/200 (29%), 44/200 (22%), 162/200 (81%), and 147/200 (74%). Controls fish had 0/200 (0%) response. Post-initiation treatment at 1500 ppm thus did not significantly alter tumor response ( $P = 0.1671$ ), I3C provided strong promotion as expected ( $P < 0.0001$ ), and CHL was not able to antagonize I3C promotion ( $P < 0.0001$ ).

#### Discussion

Mechanisms of CHL protection against AFB<sub>1</sub> have been examined. CHL provides protection against genotoxicity by AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxide (Dashwood *et al.*, 1991a) as well as parent AFB<sub>1</sub> (Whong *et al.*, 1988; Warner *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1994; Dashwood *et al.*, 1991a), which suggests some form of electrophile trapping. The ability of CHL to form a strong, non-covalent CHL:AFB<sub>1</sub> complex of 1:1 stoichiometry and dissociation constant of 1.4  $\mu$ M (Breinholt *et al.*, 1995b) thus may be expected to

provide protection against carcinogenesis in the whole organism at two levels. These include possible anti-genotoxic action via CHL:AFB<sub>1</sub> complexation within target organ cells, as well as complexation within the gastrointestinal tract to reduce systemic uptake of dietary AFB<sub>1</sub> (Hayashi *et al.*, 1995). We stress, however, that such mechanisms may explain only that portion of chemoprotection resulting from reduced AFB<sub>1</sub>-DNA adduction *in vivo*. Our results here show that, at 4000 ppm CHL, an additional protective mechanism having nothing to do with reduced adduction accounted for about half of the anti-tumorigenic effect seen. This secondary protective mechanism is currently under investigation.

Is there sufficient systemic distribution of oral CHL to provide protection at the level of the target organ? Park *et al.* (1994) have examined the influence of CHL on the activities of benzo(a)pyrene (BP), 4-nitrophenylvinyl ether (NPVE) and its epoxide (NPO) to initiate skin papillomas in the mouse. Topical application of CHL at an 8-fold molar excess prior to BP painting reduced papilloma incidence 50–88% at all times examined. A similar result was seen when CHL was administered by gavage. This important finding demonstrates adequate systemic CHL uptake and biodistribution in the mouse to provide protection against carcinogen applied to a remote target organ site. CHL by gavage was also effectively anticarcinogenic when given 30 min prior to NVPE or NPO application. The role of complex formation, the relationship between reduced DNA damage and papilloma formation, and possible post-initiation effects of chronic CHL treatment were not examined.

The trout model indicated no post-initiation promotion by 1500 ppm CHL, and perhaps a suggestion that suppression may be seen at higher doses. Nelson has examined the effects of CHL (1.5 mM in drinking water) on dimethylhydrazine (DMH)-initiated colorectal cancer risk in F344 rats (Nelson, 1992). Tumor incidence and multiplicity were 10% and 0.1 in animal receiving DMH only, 23% and 0.27 for those receiving CHL during DMH treatment, and 47% and 0.53 ( $P < 0.005$ ) for those receiving CHL chronically following DMH treatment. These results indicate that CHL can act as a post-initiation tumor promoter in this colorectal cancer model. The possible role of mobilized copper as a prooxidant and other promotional mechanisms were not investigated. The effect may also be initiator-

specific. In a recent preliminary result, male F344 rats initiated with heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and then given 1.5% CHL in drinking water showed strong suppression, not enhancement, in the numbers and size of aberrant crypt foci in the colon (R. Dashwood, personal communication).

Overall, these results indicate encouraging chemopreventive activity of CHL, especially since potent protection can be seen at doses of CHL only a fraction of the chlorophyll content of spinach. However, additional research is needed to understand the basis of CHL pro-toxic effects such as those reported by Nelson (1992), and to establish if native chlorophylls can also block tumor initiation without any evident toxicities.

#### Acknowledgements

The trout studies were supported by U.S. Public Health Service grants ES00210, ES03850, and CA34732.

#### References

- Arimoto, S., S. Fukuoka, C. Itome, H. Nakano, H. Rai and H. Hayatsu (1993) Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity, *Mutat. Res.*, **287**, 293–305.
- Arimoto, S., T. Negishi and H. Hayatsu (1980) Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens, *Cancer Lett.*, **11**, 29–34.
- Breinholt, V., M. Schimerlik, R. Dashwood and G. Bailey (1995a) Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B<sub>1</sub>: Complex formation with the carcinogen, *Chem. Res. Toxicol.* (In Press)
- Breinholt, V., J. Hendricks, C. Pereira, D. Arbogast and G. Bailey (1995b) Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B<sub>1</sub> hepatocarcinogenesis in rainbow trout, *Cancer Res.*, **55**, 57–62.
- Dashwood, R. H. (1992) Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) to rat liver DNA, *Carcinogenesis*, **13**, 113–118.
- Dashwood, R. H., V. Breinholt and G. S. Bailey (1991) Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)-DNA binding *in vivo* and antimutagenic activity against AFB<sub>1</sub> and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay, *Carcinogenesis*, **12**, 939–942.
- Dashwood, R. and D. Guo (1992) Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ)-DNA binding by chlorophyllin: studies of enzyme inhibition and molecular complex formation, *Carcinogenesis*, **13**, 1121–1126.
- Guo, D. and R. Dashwood (1994) Inhibition of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ)-DNA binding in rats given chlorophyllin: dose-response and time-course studies in the liver and colon, *Carcinogenesis*, **15**, 763–766.
- Hayashi, T., M. Schimerlik and G. S. Bailey (1995) Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis: Inhibition of aflatoxin B<sub>2</sub> uptake into rainbow trout liver and bile, in preparation.
- Imai, K., T. Aimoto, M. Sato, K. Watanabe, R. Kimura and T. Murata (1986) Effects of sodium metallochlorophyllins on the activity and components of the microsomal drug-metabolizing enzyme system in rat liver, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4287–4293.
- Kelloff, G. J., C. W. Boone, J. A. Crowell, V. E. Steele, R. Lubet and C. C. Sigman (1994) Chemopreventive drug development: Perspectives and progress, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **3**, 85–98.
- Morse, M. A. and G. D. Stoner (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects, *Carcinogenesis*, **14**, 1737–1746.
- Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki and H. Hayatsu (1989) Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), *Carcinogenesis*, **10**, 145–149.
- Negishi, T., H. Nakano, A. Kitamura, C. Itome, T. Shiota and H. Hayatsu (1994) Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*, *Cancer Lett.*, **83**, 157–164.
- Romert, L., M. Curvall and D. Jenssen (1992) Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity, *Mutagenesis*, **7**, 349–355.
- Sarkar, D., A. Sharma and G. Talukder (1994) Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects, *Mutat. Res.*, **318**, 239–247.
- Tachino, N., D. Guo, W. H. Dashwood, S. Yamane, R. Larsen and R. Dashwood (1994) Mechanisms of the *in vitro* antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[*a*]pyrene: Studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen, *Mutat. Res.*, **308**, 191–203.
- Warner, J. R., J. Nath and T.-M. Ong (1991) Antimutagenicity studies of chlorophyllin using the *Salmonella* arabinose-resistant assay system, *Mut. Res.*, **262**, 25–30.
- Wattenberg, L. W. (1993) Prevention-therapy-basic science and the resolution of the cancer problem: presidential address, *Cancer Res.*, **53**, 5890–5896.
- Whong, W.-Z., J. Stewart, H. E. Brockman and T.-M. Ong (1988) Comparative antimutagenicity of chlorophyllin and five other agents against aflatoxin B<sub>1</sub>-induced reversion in *Salmonella-typhimurium* strain A98, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **8**, 215–224.
- Wu, Z. L., J. K. Chen, T. Ong, H. E. Brockman and W.-Z. Whong (1994) Antitransforming activity of chlorophyllin against selected carcinogens and complex mixtures, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **14**, 75–81.

第一回日本環境変異原学会学術賞授賞講演

### ヘテロサイクリックアミンの変異・がん原性に関する研究

## Mutagenicity and carcinogenicity of heterocyclic amines

杉村 隆

Takashi Sugimura

国立がんセンター名誉総長 東邦大学学長

President Emeritus, National Cancer Center President, Toho University

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年5月31日)

#### Summary

The history and development of the study of mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines (HCAs) were summarized. A series of HCAs were isolated from heated amino acids, proteins and meat. They were classified into non-IQ and IQ types of HCA, both of which are highly mutagenic to *Salmonella typhimurium* TA98 in the presence of a metabolic activation system. Most of the HCAs isolated were hitherto unknown compounds. Their synthesis, metabolism, carcinogenicity, quantitative measurement in daily food, risk-estimation and the prevention of their formation were reviewed.

**Keywords:** heterocyclic amines, mutagens, carcinogens, multiple carcinogenic steps, multiple genetic alterations

#### はじめに

日本環境変異原学会が創設されたのは昭和47年(1972年)のことで、当時、田島彌太郎先生、近藤宗平先生、故賀田恒夫先生が中心となられ、第一回年会在静岡県三島で行われた。折しも食品添加物 AF-2 の突然変異原性が証明され、世間は騒然としている時代であった。世界的にも、環境中の変異原物質に科学者が注目し、米国の Alexander Hollaender 博士、欧州ではオランダの Frederik H. Sobels 等が中心となり、米国、欧州の環境変異原学会がそれぞれ結成されたばかりであった。

私達は昭和二十年代の終わりに、4-ニトロキノリン1-オキシド(4NQO)が微生物に変異原性があり、一方ではマウスにがん原性を示すこと(Nakahara *et al.*, 1957)を見出した。更に、4NQO が *in vivo* で DNA と結合体を作ること

(Matsushima *et al.*, 1967)、4NQO の代謝物 4-ヒドロキシアミノキノリン1-オキシドが *in vitro* で DNA 鎖切断を起こしたり(Sugimura *et al.*, 1968)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を形成する(Hozumi, 1969) ことなどを発見し、報告した。ついで昭和四十年頃に、有名な変異原物質 MNNG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) をラットに皮下注射すると、繊維肉腫が発生すること(Sugimura *et al.*, 1966)、飲料水として混ぜると、ラットの腺胃にがんが発生すること(Sugimura and Fujimura, 1967)を見出した。

このような状況下で、日本環境変異原学会の創設と共に会員にさせていただき、多くの知己を得たことは幸いであった。1973年には、第一回の国際環境変異原学会を Bruce N. Ames 教授がカリフォルニア州のアシローマで開催し、いわゆるエームス法と言われる、S9 mix の代謝活性化分画を加え

た *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1538 を用いる変異原物質検出法が、一世を風靡するようになった。

### 魚の焦げの煙からヘテロサイクリックアミンの分離と発がん性の証明まで

今回、静岡県立大学で日本環境変異原学会の年会在木苗直秀教授の下で行われるにあたって、ヘテロサイクリックアミンの研究に関して第一回の日本環境変異原学会の学術賞をいただくというのは、私にとっては特別の感懐である。というのは、ヘテロサイクリックアミンの研究は、この大学の校舎がまだ小鹿地区にあった頃、小菅卓夫教授との協同研究で出発したからである。

煙草の煙のタール成分として多くの発がん物質が見出されている。また喫煙と、肺がんをはじめとするいろいろな臓器のがん発生との間に相関性があるという多くの疫学的研究がある。ある日、公務員住宅のアパートで、昼食にと魚を焼いて発生する煙に関心を持ち、その変異原性を調べることになった。当時、国立がんセンター研究所生化学部の長尾美奈子君、矢作多貴江君等により、実際にかかなり強い変異原性があることがわかった。すぐに変異原物質は塩基性分画にあり、代謝活性化を受けて変異原活性を表すことがわかった (Sugimura *et al.*, 1977a; Nagao *et al.*, 1977a)。また魚肉でも牛肉でも、加熱すると変異原物質が発生することがわかった。この研究の一つの流れは、魚や肉等の成分の中、蛋白質だけが加熱により変異原物質を生じるという研究となり (Nagao *et al.*, 1977b)、蛋白質を構成するアミノ酸の加熱により生じる変異原を分離するという研究が、小菅教授のグループに東大の岡本敏彦教授、首藤紘一助教授等も加わり、協同で進められた。その結果、Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2 等がトリプトファン、グルタミン酸の加熱物より分離され、構造決定された (Sugimura *et al.*, 1977b; Yamamoto *et al.*, 1978)。また、専売公社の吉田大輔博士らがアミノ- $\alpha$ -カルボリン等を大豆グロブリンを加熱したものより単離した (Yoshida *et al.*, 1978)。もう一つの流れは、我々と国立がんセンターの生物学部の葛西宏君、西村暹君、John H.

Weisburger 博士、Neil E. Spingarn 博士 (American Health Foundation) との協同により行われたものである。すなわち、加熱した食品を直接、変異原物質の分離の出発材料として用いた。加熱肉汁より部分精製した試料を持って、国立がんセンター生化学部に来日、研究した Spingarn 博士の貢献 (Spingarn *et al.*, 1980) は忘れられがちだが、大きな推進力になった。魚、牛肉等の加熱物から IQ, MeIQ, MeIQx 等が次々と分離された (Kasai *et al.*, 1980a, b; 1981)。

Fig. 1 に、現在までに私共を中心として得られたヘテロサイクリックアミンの構造と、Table 1 に、化合物名、略名、その構造発見の年次を示す。Table 2 には、発がん性が証明された動物と、発がんする臓器名および発がん性証明の年次とが示されている (Sugimura, 1986, 1992; Ohgaki *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1991a; Tamano *et al.*, 1994)。これらのヘテロサイクリックアミンの中、アミノ- $\alpha$ -カルボリンを除けば、全ての化合物が Chemical Abstract に未登録であった新規化合物である。また PhIP 及び IQx が米国のローレンスリバモア国立研究所の James S. Felton 博士等 (Felton *et al.*, 1986; Becher *et al.*, 1988) により発見されたことを除けば、すべて日本人により記載されたものである。これらの物質の精製は、幾多の困難を伴ったが、幸いに Ames 博士の *Salmonella typhimurium* の変異原性検出法をモニターとして使うことが出来たので、能率よく、的確に研究が進展した。

### ヘテロサイクリックアミンの有機化学

発がん実験にはマウスとラットを用い、多数の動物に長期間、餌に物質を混ぜたものを投与するので、多量の純粋な物質が必要である。この目的を達成するために、東大の首藤紘一博士のグループや (Takeda *et al.*, 1977)、武田薬品研究所の野村容朗博士 (Akimoto *et al.*, 1977)、株式会社ナード研究所の荒川守正博士らの協力により、多量合成のための方法が確立された。Fig. 2 に一例として PhIP の高収率合成法を示す。

Fig. 1 に見られるように、一連の発見された物質のすべては、ヘテロサイクリックアミンとして分類される。大別して、イミダゾキノリンのよう

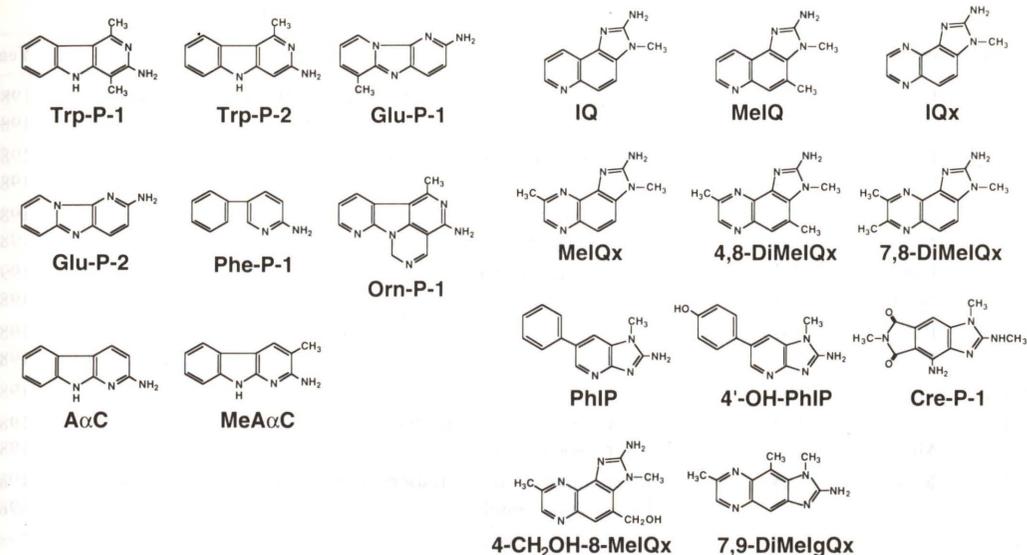


Fig. 1. Structures of heterocyclic amines.

Table 1. Chemical names, abbreviations and year of discovery of heterocyclic amines

Chemical name	Abbreviation	化合物発見の年
2-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	Trp-P-1	1977
3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	Trp-P-2	1977
2-Amino-6-methyldipyrro[1,2- $\alpha$ :3',2'-d]imidazole	Glu-P-1	1978
2-Aminodipyrro[1,2- $\alpha$ :3',2'-d]imidazole	Glu-P-2	1978
2-Amino-5-phenylpyridine	Phe-P-1	1977
4-Amino-6-methyl-1H,2,5,10,10b-tetraazafluoranthene	Orn-P-1	1981
2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indole	A $\alpha$ C	1978
2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole	MeA $\alpha$ C	1978
2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline	IQ	1980
2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline	MeIQ	1980
2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline	IQx	1988
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	MeIQx	1981
2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	4,8-DiMeIQx	1985
2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	7,8-DiMeIQx	1984
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine	PhIP	1986
2-Amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[4,5-b]pyridine	4'-OH-PhIP	1992
4-Amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1H,6H-pyrrolo[3,4-f]-benzimidazole-5,7-dione	Cre-P-1	1991
2-Amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline	4-CH <sub>2</sub> OH-8-MeIQx	1994
2-Amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline	7,9-DiMeIQx	1994

にイミダゾール部分が構造に組み込まれたもの (IQ-type) と、イミダゾール部分のないもの (non-IQ-type) とがある。non-IQ-type のものは、酸性条件下で 2 mM の亜硝酸処理により環外のアミノ基が水酸基となり、不活性化される。IQ-type のアミノ基は、2 mM の亜硝酸処理では変化しない。一

方、IQ-type と non-IQ-type のヘテロサイクリックアミンとも次亜塩素酸処理により不活性化される。これら化学反応性の差を利用すると、加熱物中の IQ-type 及び non-IQ-type ヘテロサイクリックアミンの比率を求めることができる (Tsuda *et al.*, 1985)。魚肉、牛肉等を加熱した時に IQ-type

Table 2. Carcinogenicities of heterocyclic amines in rats and mice

Chemical	Species	Concentration (%)	Target organs	Year
IQ	Rats	0.03	Liver, small & large intestines, Zymbal gland, clitoral gland, skin	1984
	Mice	0.03	Liver, forestomach, lung	1984
MeIQx	Rats	0.03	Large intestine, Zymbal gland, skin, oral cavity, mammary gland	1989
	Mice	0.04, 0.01	Liver, forestomach	1986
MeIQ	Rats	0.04	Liver, Zymbal gland, clitoral gland, skin	1988
	Mice	0.06	Liver, lung, hematopoietic system	1987
PhIP	Rats	0.04	Large intestine, mammary gland	1991
	Mice	0.04	Lymphoid tissue	1989
Trp-P-1	Rats	0.015	Liver	1985
	Mice	0.02	Liver	1981
Trp-P-2	Mice	0.02	Liver	1981
Glu-P-1	Rats	0.05	Liver, small & large intestines, Zymbal gland, clitoral gland	1984
	Mice	0.05	Liver, blood vessels	1984
Glu-P-2	Rats	0.05	Liver, small & large intestines, Zymbal gland, clitoral gland	1984
	Mice	0.05	Liver, blood vessels	1984
AaC	Mice	0.08	Liver, blood vessels	1984
MeAaC	Rats	0.02, 0.01	Liver	1994
	Mice	0.08	Liver, blood vessels	1984

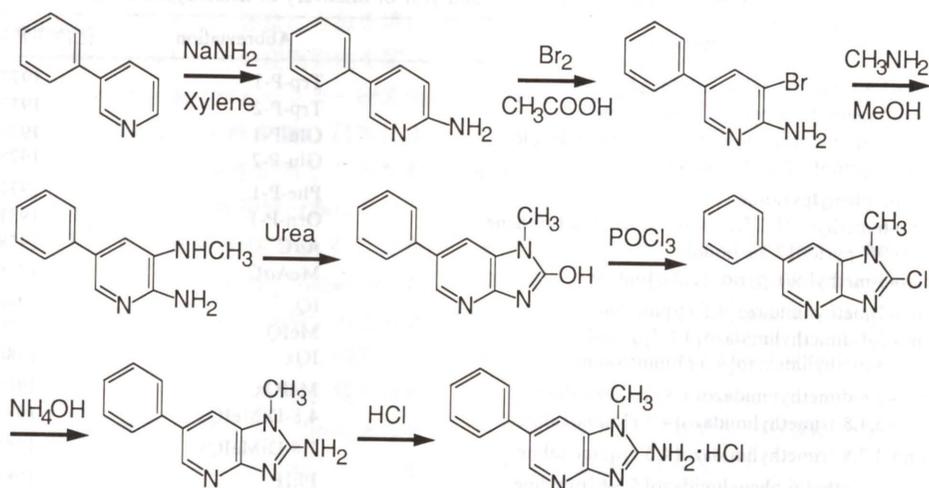


Fig. 2. Chemical synthesis of PhIP (ナード研究所提供).

が多く、煙草のタール等には non-IQ-type のヘテロサイクリックアミンが多い。

IQ-type の生成には、筋肉中に含まれるクレアチン、糖及びアミノ酸が関与していることが、スウェーデンの Margaretha Jägerstad 博士らにより証明された。Fig. 3 に MeIQx 及び PhIP の生成経路を示す (Jägerstad *et al.*, 1984; Shioya *et al.*, 1987)。

#### ヘテロサイクリックアミンの生物学

ヘテロサイクリックアミンのアミノ基は、チトクローム P450、とくにラット肝で PCB またはメチルコラントレンで誘導されるチトクローム P448 により活性化され、ヒドロキシアミノ体になることが、慶應大学の加藤隆一教授らにより、極めて早期に報告された (Ishii *et al.*, 1980a, b)。その後、このチトクローム P450 は P450IA2 分子種であることが培養細胞・発現ベクター系を用い

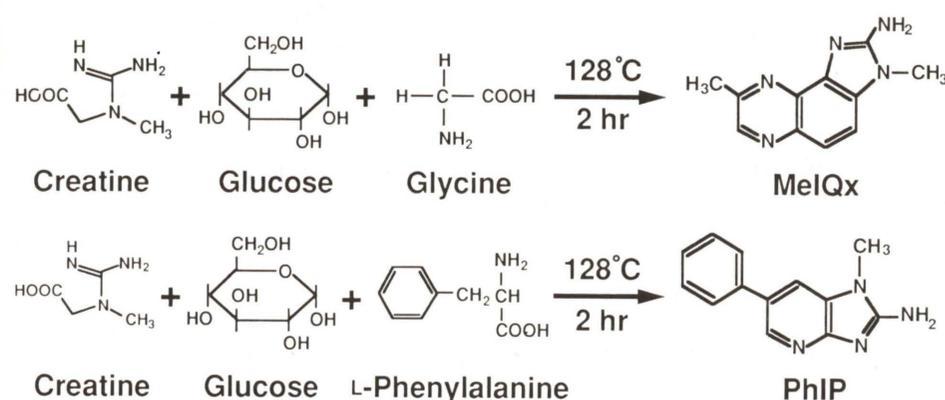


Fig. 3. Formation of MeIQx and PhIP by heating mixture of creatine, glucose and amino acid.

た研究によりわかった (Aoyama *et al.*, 1989)。生成されたヒドロキシアミノ体は、さらにアセチルトランスフェラーゼでアセチル化、スルホトランスフェラーゼで硫酸エステル化されたり、またはプロリン-tRNA 合成酵素によりプロリル化され、最終活性型 (ultimate form) となり、グアニンの C-8 との付加体を形成する (Hashimoto *et al.*, 1980a, b; Snyderwine *et al.*, 1988; Ochiai *et al.*, 1993)。Fig. 4 に MeIQx の代謝活性化経路を示す。ヘテロサイクリックアミンの変異原性は、*Salmonella typhimurium* TA98 に、TA100 よりはずっと強く現れる。これは平面構造を有するヘテロサイクリックアミンが、TA98 の GC 塩基対の繰り返しの多い変異塩基配列部位に intercalate するためと思われる。ヘテロサイクリックアミンのヒドロキシアミノ体は活性酸素を産生し、DNA 鎖の切断を起こす (Wakata *et al.*, 1985)。このことは、姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange) の誘導にも関係すると思われる (Tohda *et al.*, 1980)。

ヘテロサイクリックアミンの発がん部位は Table 2 にすでに示したが、PhIP はラットに大腸がんを発生させるが、肝がんは発生させない (Ito *et al.*, 1991a)。また Glu-P-1, Glu-P-2, AaC, MeAaC が、マウスの肩胛骨間にある褐色脂肪の部位に血管内皮肉腫を高率に発生させることは興味深い (Ohgaki *et al.*, 1984)。さらに、がん原性物質でありながら、発がんとは違った特異的病変を起こすこともわかった。MeAaC はラットの唾液腺および膵臓の萎縮を起こす (Takayama *et al.*,

1985)。また PhIP, IQ 等は心臓に対し毒性を示し、ミトコンドリアの数を減少させる (Davis *et al.*, 1994)。おそらく、これらヘテロサイクリックアミンは心臓のミトコンドリアの DNA に付加体を作り、長期に亘る変性を来し、老化、生物の寿命を決める一因になるものと推察される。

ヘテロサイクリックアミンの発がん性の意味するもの

#### 変異原性の強さ

ヘテロサイクリックアミン化合物の変異原性の強さは並々ならぬものがある。とくに *Salmonella typhimurium* TA98 には変異原性が強い。MeIQ の如きは、超変異原物質とも称されるべきものであり、これより変異原性の高いものは 1,8-ジニトロピレン以外にはない。Table 3 には、各種ヘテロサイクリックアミンと典型的ながん原物質の変異活性を示す (Sugimura, 1986; Wakabayashi *et al.*, 1992)。ベンツ (a) ピレン (B(a)P) のような典型的ながん原物質に比べて、MeIQ の変異活性は、何と 1000 倍も高い。ヘテロサイクリックアミンの中では MeAaC, AaC 等の変異活性は B(a)P と、大体、同じレベルである。このようにヘテロサイクリックアミンの変異原性はとても強いので、かつて食品添加物として使われたニトロフラン系化合物の AF-2 (*Salmonella typhimurium* TA 100 を用いた場合) を除けば、普通に調理した魚や肉類の変異原性といえば、ほとんど大部分がヘテロサイクリックアミン由来のものになる。

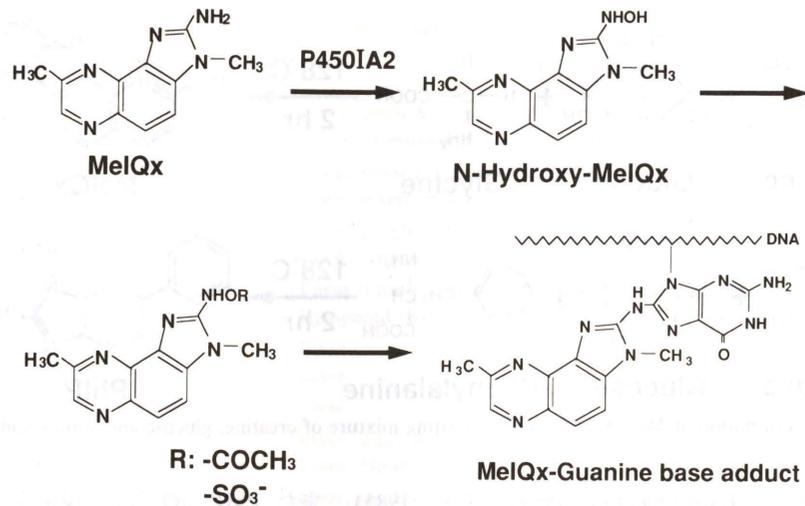


Fig. 4. Metabolic activation pathway of MeIQx.

Table 3. Mutagenicities of heterocyclic amines and typical carcinogens in *S. typhimurium*

Revertants/ $\mu$ g		Revertants/ $\mu$ g	
MeIQ	661,000	1,8-Dinitropyrene	940,000
IQ	433,000		
4,8-DiMeIQx	183,000	1,6-Dinitropyrene	230,000
7,8-DiMeIQx	163,000		
MeIQx	145,000		
Trp-P-2	104,200		
4-CH <sub>2</sub> OH-8-MeIQx	99,000		
IQx	75,000		
Orn-P-1	56,800		
Glu-P-1	49,000	AF-2	42,000
Trp-P-1	39,000	Aflatoxin B1	28,000
Cre-P-1	19,000		
Glu-P-2	1,900		
PhIP	1,800	MNNG	870
7,9-DiMeIQx	670	Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	660
A $\alpha$ C	300		
MeA $\alpha$ C	200	N-Methyl-N-nitrosourea	47
Phe-P-1	41		
4'-OH-PhIP	2	N,N-Dimethylnitrosamine	0.23

Heterocyclic amines, Dinitropyrenes; TA98, Others; TA100.

### がん原性の強さ

ヘテロサイクリックアミンの変異原性は *Salmonella typhimurium* TA98 を使う限り、超変異原物質といってよい程高いが、ジフテリア毒素抵抗性を指標とした哺乳動物培養細胞を用いた変異原性試験では、それらの比活性は他の変異原物質、がん原物質と大体同じレベルである (Nakayasu *et al.*, 1983).

一般に、がん原性の証明には、皮下注射、胃管を通しての投与等があるが、ヘテロサイクリックアミンの場合、最大耐量と、その何分の一かを飼料に混入して、長期間継続投与する一番正統的な方法を用いた。実際には0.01~0.08%の濃度で飼料に混入し、飼料中に存在するヘテロサイクリックアミンの量を測定、確認した後、動物に投与した。動物は雌雄のラット (F344) とマウス (CDF<sub>1</sub>)

を用い、1グループ20~40匹で実験を開始した。実験終了日は、動物が、がん発生か老化による衰弱死等を待つので、大体2ヶ年に及ぶ。発がん実験という一言ですむが、その正確な実施には注意深い忍耐を要する。マウスの実験は大垣比呂子博士が中心となり、ラットの実験は高山昭三博士と伊東信行博士一門が中心となって行った。

発がん性の強さは、本来50%の動物にがんが発生する量を、各レベルの発がん物質濃度の実験結果より曲線を描き、内挿法により決定するが、便宜的にがん発生時期を関数に入れて、単一濃度のレベルでの実験から計算し、近似値を得る方法がある (Gold *et al.*, 1984)。それにより得られたヘテロサイクリックアミンの発がん強度の値 (TD<sub>50</sub>) は、既知のニトロソアミン、アゾ色素等と同じオーダーである。超変異原物質ではあっても、超発がん物質ではない。

### 人体のヘテロサイクリックアミンに対する曝露量

ヘテロサイクリックアミンの定量法は様々工夫されてきたが、実際に摂取している食物中に含まれるものを定量する方法が現在確立されている (Takahashi *et al.*, 1985; Wakabayashi *et al.*, 1993)。加熱食品より希塩酸溶液でヘテロサイクリックアミンを抽出し、中性溶液でブルーコットンカブルーレイオンに吸着させ、メタノール-アンモニアで溶出、陽イオン交換繊維 IONEX のカラムクロマトグラフィー、HPLCを行い、紫外線吸収、蛍光発生、電気化学的検出等を組み合わせて定量するものである。代表的な加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの定量値を Table 4 に示す (Wakabayashi *et al.*, 1993)。

摂取されたヘテロサイクリックアミンが体内で代謝され DNA に結合したりするが、一部はそのまま尿中に排泄される。ヒト尿中に未変化体として排泄される割合は、MeIQx で 1.2~4.3%、PhIP で 0.6~2.3% と報告されている (Lynch *et al.*, 1992)。一方、手術後、中心静脈から栄養補給を受けている患者の尿中からは、ヘテロサイクリックアミンは検出されない (Ushiyama *et al.*, 1991)。

ヘテロサイクリックアミンは主として肝臓で代謝されて、種々の臓器に DNA 付加物 (DNA-adduct) を作るが、<sup>32</sup>P-postlabel 法でそれを高感度に検出できる。広い範囲 (10<sup>4</sup> order) に亙り、log-log scale で plot すると、摂取量と adduct 量につき直線関係が得られる (Yamashita *et al.*, 1990)。DNA-adduct を検出する方法は、<sup>32</sup>P 標識法の他に、結合体に対する単クローン抗体を用いる方法、高感度マスペクトルを応用する方法があるが、<sup>32</sup>P-ポストラベル法よりは感度よく DNA adduct を検出できない。最近、<sup>32</sup>P-ポストラベル法を用いて、人の腎臓の DNA から実際に MeIQx の DNA-adduct が検出された。又、ヘモグロビンとの結合物を研究した報告もある (Umemoto *et al.*, 1992)。

### ヘテロサイクリックアミン摂取と疫学

ヘテロサイクリックアミンを多く含む食物、焼き肉、バーベキュー料理の肉類等の摂取と大腸、直腸がん、膵臓がん、および膀胱がんの発生頻度に、正の相関があるという複数の報告が、米国およびスウェーデンから発表されている (Norell *et al.*, 1986; Steineck *et al.*, 1990; Schiffmann and Felton, 1990; Gerhardsson *et al.*, 1991)。また焼き魚

Table 4. Amounts of heterocyclic amines in cooked foods

Sample	Amount (ng/g cooked food)									
	IQ	MeIQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	PhIP	Trp-P-1	Trp-P-2	A $\alpha$ C	MeA $\alpha$ C	
Broiled beef	0.19		2.11		15.7	0.21	0.25	1.20		
Fried ground beef			0.64	0.12	0.56	0.19	0.21			
Broiled chicken			2.33	0.81	38.1	0.12	0.18	0.21		
Broiled mutton			1.01	0.67	42.5		0.15	2.50	0.19	
Food-grade beef extract			3.10		3.62					
Fried cod fish	0.16	0.03	6.44	0.10	69.2					

の摂取量と胃がん発生に関し、正の関係があるという報告が日本からもでている (Ikeda *et al.*, 1983). がんの疫学的研究は、職業的、医原的に、あるいは事故により、単一な発がん要因に多量に曝露された場合、また曝露量推定が容易な喫煙以外は、他の発がん要因と重なりあって解析が非常に難しい。焼き肉、焼き魚摂取量と発がんの正の関係を推論する疫学研究が5報もあることは、却って重大な意味をもっているものと思われる。単にヘテロサイクリックアミンの動物実験の発がん量と日常の摂取量とを比較して、数値上、何千分の一になるので無視してよいとか、また無視しないのがおかしいというような論議も出来るが、事はそう簡単ではない。がん発生には多くのがん関連遺伝子の変化が必要であり、また多段階発がん過程を経ているという認識に立つことが必要である (Sugimura, 1992; Sugimura *et al.*, 1992).

#### 多重がん関連遺伝子変異と多段階発がん発がん予防

がん細胞は決して一種類、一個だけの遺伝子変化で起こるのではない。細胞内に多種類あるがん関連遺伝子の複数が変化して、がん化する。したがって、がん化の過程が多段階であり、正常から極めて悪性ながん細胞に変換するのには、Fig. 5のような過程をとっている。当然のことではあるが、階段を中途まで昇った細胞は、まだ全然昇っていない細胞に比べてがんになりやすい。つまり、少量の曝露でがん化する。最近特に遺伝子不安定性 (genetic instability, genomic instability) を生ずる突然変異が起こると、突然変異が次々と起こるようになり、発がんの段階が早まるプロセスが明らかにされてきている。これらにはDNA修復酵素の遺伝子の変化 (Fishel *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995), DNA複製酵素の遺伝子変化 (da Costa *et al.*, 1995), 細胞の均等分裂にかかわる蛋白質の遺伝子の変化等 (Loeb, 1994) が関与している。Fig. 5に見られるように、遺伝子不安定性が起こると、そのあとの複数の遺伝子変化が急に起こるようになる。

最近の分子生物学研究により、がん細胞はモノクローナルな増殖によっていることが明らかに

なった (Tsuda *et al.*, 1988). すなわち単一細胞由来の増殖である。1個の細胞ががん細胞になると個体が死ぬ。Fig. 6に示すように、人間の体重はラットの250倍あるが、総勢250匹に1個のがん細胞を発生させる発がん量では、1匹のラットは死亡するが、249匹は生存している。ところが1個のがん細胞が発生しただけで1人の人間は死ぬことになる。同一発がん量で、人間はラットの250倍感受性が高いということになる。これを量子毒性学 (quantum toxicology) という言葉で表現することが出来る (Sugimura *et al.*, 1994). 食事の中のヘテロサイクリックアミン含量の測定値に基づき、寿命、体重等を単純に計算に入れると、ヘテロサイクリックアミンもかなり人間の発がん発生にインパクトを持っているという結果となる。勿論これは沢山の仮定と単純化の上に成り立っている話である。

#### 多重発がん要因と多重発がん修飾要因

先にも述べたように、職業がん、事故、医原性の曝露の場合を除くと、通常、人間に発生するがんの要因は実に様々あり、それぞれがどれ程のインパクトを持っているかは分かり難い。外因性のもは相加的に作用する。一定量の一種類のヘテロサイクリックアミンを投与するのと、ほぼ同じ強さを持つ五種類のヘテロサイクリックアミンの1/5量ずつを投与するのでは、同じ効果がある。1/25量ずつ5種類投与する効果は、大ざっぱにいうと、1種を1/5量投与する効果に近い (Ito *et al.*, 1991b). 限られた量のTrp-P-2を皮膚に塗布して、発がんしない条件でホルボールエステルを投与すると、動物にパピローマ、偏平皮膚がんが発生する (Takahashi *et al.*, 1986).

一方、ヘテロサイクリックアミンの*in vitro*における変異原性、*in vivo*における発がん性は、クロロフィル、クロロフィリン等により顕著に抑制される (Dashwood, 1992; Hayatsu *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1995). これはクロロフィルのテトラピロールの平面構造とヘテロサイクリックアミンが複合体を形成することによるものと考えられている。またIQをクロロフィリンと一緒にラットに投与すると、IQ及び代謝物の尿中への排泄

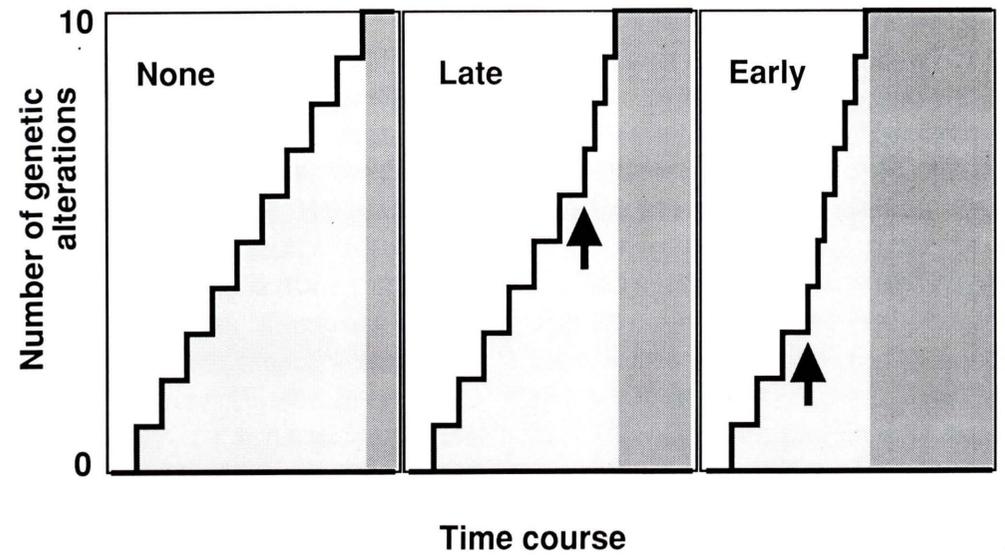


Fig. 5. Genomic instability in carcinogenesis.

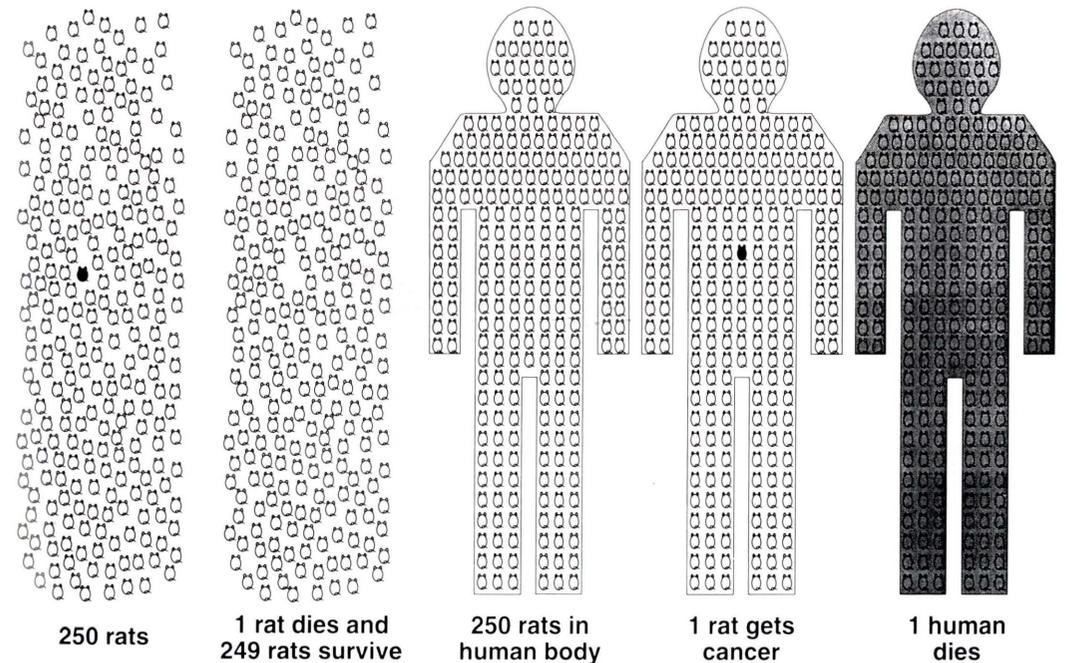


Fig. 6. Concept of quantum toxicology.

が少なくなる (Dashwood, 1992). これは腸管からの吸収が少なくなるためと思われる。この他に、*in vitro* または *in vivo* の系で、ヘテロサイクリックアミンの変異原性、がん原性と結抗するものには、オレイン酸、リノール酸等の不飽和脂肪酸、

植物繊維、及び 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) 等の抗酸化剤がある (Hayatsu *et al.*, 1981; Barnes *et al.*, 1983; Kada *et al.*, 1984; Hirose *et al.*, 1995).

外因性のがん発生要因としては、ヘテロサイク

リックアミン以外に、ニトロソアミン、芳香族炭化水素化合物、植物アルカロイド、カビ毒等がある。内因性のものとしては、活性酸素、一酸化窒素、その反応生成物であるニトロソアミン等がある。活性酸素は8-ヒドロキシデオキシグアノシンを生成する (Kasai *et al.*, 1986)。一酸化窒素合成酵素によりマクロフェージ等でL-アルギニンから生成されるNO体は、メチルシトシンの脱アミノ化によるチミンへの変換、すなわち、CG塩基対のTA塩基対への変換を起こす (Hibbs *et al.*, 1987; Wink *et al.*, 1991)。寄生虫、細菌、ウイルス感染等に伴う炎症反応は、これら内因性発がん要因の生成を促進する。C型肝炎ウイルス感染は、細胞の死と再生を促し、細胞分裂に伴うDNA複製と娘細胞への均等分布にエラーを惹起する。様々な要因が、がん化に必要な遺伝子変化を起こしている。したがって、ある特定の物質のみにより生じる発がんを考えることには、それ自体矛盾がある。Fig. 7に示す氷山のようなものを考えてみた。氷山の大部分は水面下にある。水面上には自分の研究している主題がある。ともすると、自

分の主題だけを重視する傾向があるが、実は他の要因も大切である。同じように、がん予防に効く因子の場合も、どれか一種の物質だけが効いているのではない。

ヘテロサイクリックアミンの一種PhIPで発生した大腸がんには、遺伝子不安定性が誘導されているので、一つの物質で多数の遺伝子変化が引き起こることになる (Canzian *et al.*, 1994)。ヘテロサイクリックアミンの人間における発がんのリスクは、事故死した人間の肝臓で活性化されることや (Yamazoe *et al.*, 1988)、IQの経口投与で猿にも肝がんが発生すること (Adamson *et al.*, 1990) 等を考えると、さらに現実的なものになる。したがって、ヘテロサイクリックアミンへの曝露をできるだけ少なくすることが望ましい。これは勿論、ヘテロサイクリックアミンのみに限ったことでなく、他の発がん物質でも同じことがいえる。ヘテロサイクリックアミンの生成は、電子レンジを使うと極めて少ない (Felton, 1990)。また魚、肉が直接炎と接触することを避けるのもよい。アルミフォイルにくるむこと、また物理的に

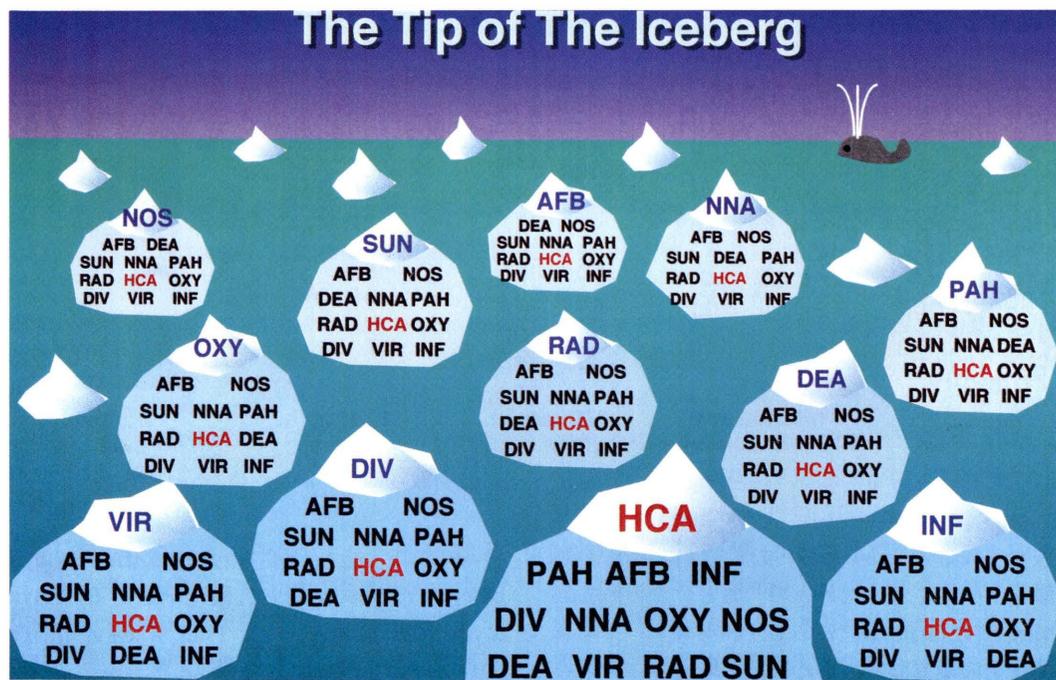


Fig. 7. The tip of the iceberg.

箸等で焦げた所を除去するのもよい。

#### おわりに

このヘテロサイクリックアミンの研究を始めたのは、1976年(昭和51年)である。振り返ってみると、魚の焦げる時の煙に注目したのは、煙草のタールの変異原性、がん原性物質の知識があつての連想がはたらいたものと思われる。このことを日本の学会に発表したのは、昭和50年10月、京都で肺がん学会が長石忠三京都大学名誉教授の下で行われた時である。当時、共同通信の科学記者の伊藤正治氏が報道してくれて、世の中の注目を引いた。当時がんの発生原因の主要なものは、人工の工業化学物質や自動車の排気ガス等と考えられており、天然のものは外因性、内因性ともに軽視されていた。

外国の学会に発表したのは、1976年にトロントで米国及びカナダの癌学会の連合会が行われた折に、Sidney Weinhouse博士の組織したシンポジウムで話をしたのが最初である。更に、Origins of Human Cancerというシンポジウムがコールド・スプリング・ハーバーで行われた時に、この調理による変異原物質発生の話をした (Sugimura *et al.*, 1977a)。我々の加熱食品の変異原に関する第一報は1977年のCancer Letterであり (Nagao *et al.*, 1977a)、構造に関するものは1977年のProceedings of the Japan Academyであり (Sugimura *et al.*, 1977b)、がん原性に関するものはScienceの1981年である (Matsukura *et al.*, 1981)。この間、米国のBarry Commonerが、加熱調理した牛肉および牛肉エキスに変異原性があるという報告をScienceに発表した (Commoner *et al.*, 1978)。米国の多くの友人は、それは日本の国立がんセンターのグループの方が先にしていた仕事だと、私等を励ましてくれた。その後、ヘテロサイクリックアミンの研究は欧米でも発展し、数多くの論文が発表されている。

この間、何となく“魚の焦げに発がん物質”というポピュラーな表現により過大評価されたり、また反対に過小評価されたりすることもあったが、科学者としての立場を終始一貫失わなかった多くの協同研究者に、感謝を捧げたい。

また1990年にカロリンスカ研究所の教授で、この研究を精神的にバックアップしてくれたBo Holmstedt教授が、ルンド大学のErik Widmark博士の、焼いた馬肉の有機溶媒抽出物をマウスの皮膚に塗布すると腫瘍が発生する、という報告 (Widmark, 1939)にたまたま気が付き、手紙をくれた。IQ-typeのヘテロサイクリックアミンがクレアチニン、糖とアミノ酸から形成されることを報告したJägerstad博士は、ルンド大学の準教授である。ルンド大学は栄養学に伝統のある大学である。私も1982年に訪ねたことがあるが、大学構内にあるWidmarkの胸像には気が付かなかった。Jägerstad博士も毎日その胸像の前を通っていながら、全く誰だか気が付かなかったということである。研究は、このように以前あったことを知らないままに発展することもあるという例になった。

以上、紹介したヘテロサイクリックアミンの研究は、文中に引用した研究者および多数の研究協力者によって発展したものである。更に、対がん十ヶ年総合戦略による国際協力によって猿の研究も進んだ。また文部省、厚生省、高松宮妃癌研究基金、財団法人がん研究振興財団および、ブリストルマイヤーズスクイブ社よりの財団を通じての研究費等によって行われたものであり、謝意を表したい。もとより、日本環境変異原学会の会員諸氏よりの支援によっていることも多い。

#### References

- Adamson, R. H., U. P. Thorgeirsson, E. G. Snyderwine, S. Thorgeirsson, J. Reeves, D. W. Dalgard, S. Takayama and T. Sugimura (1990) Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in nonhuman primates: Induction of tumours in three Macaques, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 10-14.
- Akimoto, H., A. Kawai, H., Nomura, M. Nagao, T. Kawachi and T. Sugimura (1977) Syntheses of potent mutagens in tryptophan pyrolysates, *Chem. Lett.*, pp. 1061-1064.
- Aoyama, T., F. J. Gonzalez and H. V. Gelboin (1989) Mutagen activation by cDNA-expressed P<sub>1</sub>450, P<sub>3</sub>450, and P<sub>4</sub>50a, *Mol. Carcinog.*, **1**, 253-259.
- Barnes, W. S., J. Maiello and J. H. Weisburger (1983) In vitro binding of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline to dietary fibers, *J. Natl. Cancer Inst.*, **70**, 757-760.

- Becher, G., M. G. Knize, I. F. Nes and J. S. Felton (1988) Isolation and identification of mutagens from a fried Norwegian meat product, *Carcinogenesis*, **9**, 247-253.
- Canzian, F., T. Ushijima, T. Serikawa, K. Wakabayashi, T. Sugimura and M. Nagao (1994) Instability of microsatellites in rat colon tumors induced by heterocyclic amines, *Cancer Res.*, **54**, 6315-6317.
- Commoner, B., A. J. Vithayathil, P. Dolara, S. Nair, P. Madyastha and G. C. Cuca (1978) Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking, *Science*, **201**, 913-916.
- da Costa, L. T., B. Liu, W. S. El-Deiry, S. R. Hamilton, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, S. Markowitz, J. K. V. Willson, A. de la Chapelle, K. M. Downey and A. G. So (1995) Polymerase  $\delta$  variants in RER colorectal tumours, *Nature Genetics*, **9**, 10-11.
- Dashwood, R. H. (1992) Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) to rat liver DNA, *Carcinogenesis*, **13**, 113-118.
- Davis, C. D., A. Farb, S. S. Thorgeirsson, R. Virmani and E. G. Snyderwine (1994) Cardiotoxicity of heterocyclic amine food mutagens in cultured myocytes and in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **124**, 201-211.
- Felton, J. S. (1990) Heterocyclic amines in food; methods of analysis. In: *Proceedings of the 1990 Summer Meeting of the Toxicology Forum*, Aspen, Colorado, pp. 2-17, Washington, The Toxicology Forum.
- Felton, J. S., M. G. Knize, N. H. Shen, P. R. Lewis, B. D. Andresen, J. Happe and F. T. Hatch (1986) The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis*, **7**, 1081-1086.
- Fishel, R., M. K. Lescoe, M. R. S. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane and R. Kolodner (1993) The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer, *Cell*, **75**, 1027-1038.
- Gerhardsson de Verdier, M., U. Hagman, R. K. Peters, G. Steineck and E. Overvik (1991) Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm, *Int. J. Cancer*, **49**, 520-525.
- Gold, L. S., C. B. Sawyer, R. Magaw, G. M. Backman, M. de Veciana, R. Levinson, N. K. Hoopper, W. R. Havender, L. Bernstein, R. Peto, N. C. Pike and B. N. Ames (1984) A carcinogenic potency database of the standardized results of animal bioassays, *Environ. Health Perspect.*, **58**, 9-319.
- Hasegawa, R., M. Hirose, T. Kato, A. Hagiwara, P. Boonyaphohat, M. Nagao, N. Ito and T. Shirai (1995) Inhibitory effect of chlorophyllin on PhIP-induced mammary carcinogenesis in female F344 rats, *Carcinogenesis*, in press.
- Hashimoto, Y., K. Shudo and T. Okamoto (1980a) Metabolic activation of a mutagen, 2-amino-6-methylidopyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole. Identification of 2-hydroxyamino-6-methylidopyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole and its reaction with DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 971-976.
- Hashimoto, Y., K. Shudo and T. Okamoto (1980b) Activation of a mutagen, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole. Identification of 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole and its reaction with DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 355-362.
- Hayatsu, H., S. Arimoto, K. Togawa and M. Makita (1981) Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: inhibition by oleic and linoleic acids, *Mutat. Res.*, **81**, 287-293.
- Hayatsu, H., T. Negishi, S. Arimoto and T. Hayatsu (1993) Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens, *Mutat. Res.*, **290**, 79-85.
- Hibbs, J. B. Jr., R. R. Taintor and Z. Vavrin (1987) Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite, *Science*, **235**, 473-476.
- Hirose, M., K. Akagi, R. Hasegawa, M. Yaono, T. Satoh, Y. Hara, K. Wakabayashi and N. Ito (1995) Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis by antioxidants in F344 female rats, *Carcinogenesis*, **16**, 217-221.
- Hozumi, M. (1969) Production of hydrogen peroxide by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, *Gann*, **60**, 83-90.
- Ikeda, M., K. Yoshimoto, T. Yoshimura, S. Kono, H. Kato and M. Kuratsune (1983) A cohort study on the possible association between broiled fish intake and cancer, *Gann*, **74**, 640-648.
- Ishii, K., M. Ando, T. Kamataki, R. Kato and M. Nagao (1980a) Metabolic activation of mutagenic tryptophan pyrolysis products (Trp-P-1 and Trp-P-2) by a purified cytochrome P-450-dependent monooxygenase system, *Cancer Lett.*, **9**, 271-276.
- Ishii, K., Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato (1980b) Metabolic activation of mutagenic tryptophan pyrolysis products by rat liver microsomes, *Cancer Res.*, **40**, 2596-2600.
- Ito, N., R. Hasegawa, M. Sano, S. Tamano, H. Esumi, S. Takayama and T. Sugimura (1991a) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis*, **12**, 1503-1506.
- Ito, N., R. Hasegawa, T. Shirai, S. Fukushima, K. Hakoi, K. Takaba, S. Iwasaki, K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1991b) Enhancement of GST-P positive liver cell foci development by combined treatment of rats with five heterocyclic amines at low doses, *Carcinogenesis*, **12**, 767-772.
- Jägerstad, M., K. Olsson, S. Glivas, C. Negishi, K. Wakabayashi, M. Tsuda, S. Sato and T. Sugimura (1984) Formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in a model system by heating creatinine, glycine and glucose, *Mutat. Res.*, **126**, 239-244.
- Kada, T., M. Kato, K. Aikawa and S. Kiriya (1984) Adsorption of pyrolysate mutagens by vegetable fibers, *Mutat. Res.*, **141**, 149-152.
- Kasai, H., Z. Yamaizumi, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Yokoyama, T. Miyazawa, N. E. Spingarn, J. H. Weisburger and S. Nishimura (1980a) Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditions, *Proc. Jpn. Acad.*, **56B**, 278-283.
- Kasai, H., Z. Yamaizumi, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Yokoyama, T. Miyazawa and S. Nishimura (1980b) Structure and chemical synthesis of Me-IQ, a potent mutagen isolated from broiled fish, *Chem. Lett.*, 1391-1394.
- Kasai, H., Z. Yamaizumi, T. Shiomi, S. Yokoyama, T. Miyazawa, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura and S. Nishimura (1981) Structure of a potent mutagen isolated from fried beef, *Chem. Lett.*, 485-488.
- Kasai, H. and S. Nishimura (1986) Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical-forming agents, *Environ. Health Perspect.*, **67**, 111-116.
- Liu, B., N. C. Nicolaidis, S. Markowitz, J. K. V. Willson, R. E. Parsons, J. Jen, N. Papadopolous, P. Peltomaki, A. Chapelle, S. R. Hamilton, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1995) Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability, *Nature Genetics*, **9**, 48-55.
- Loeb, L. A. (1994) Microsatellite instability: Marker of a mutator phenotype in cancer, *Cancer Res.*, **54**, 5059-5063.
- Lynch, A. M., M. G. Knize, A. R. Boobis, N. J. Goodehrham, D. S. Davies and S. Murray (1992) Intra- and interindividual variability in systemic exposure in humans to 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, carcinogens present in cooked beef, *Cancer Res.*, **52**, 6216-6223.
- Matsukura, N., T. Kawachi, K. Morino, H. Ohgaki, T. Sugimura and S. Takayama (1981) Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolyzate, *Science*, **213**, 346-347.
- Matsushima, T., I. Kobuna and T. Sugimura (1967) *In vivo* interaction of 4-nitroquinoline-1-oxide and its derivatives with DNA, *Nature*, **216**, 508.
- Nagao, M., M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi and T. Sugimura (1977a) Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat, *Cancer Lett.*, **2**, 221-226.
- Nagao, M., M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, T. Kawachi and T. Sugimura (1977b) Mutagenicities of protein pyrolysates, *Cancer Lett.*, **2**, 335-340.
- Nakahara, W., F. Fukuoka and T. Sugimura (1957) Carcinogenic action of 4-nitroquinoline 1-oxide, *Gann*, **48**, 129-137.
- Nakayasu, M., F. Nakasato, H. Sakamoto, M. Terada and T. Sugimura (1983) Mutagenic activity of heterocyclic amines in Chinese hamster lung cells with diphtheria toxin resistance as a marker, *Mutat. Res.*, **118**, 91-102.
- Norell, S. E., A. Ahlbom, R. Erwald, G. Jacobson, I. Lindberg-Navier, R. Olin, B. Tornberg and K. L. Wiechel (1986) Diet and pancreatic cancer: a case-control study, *Am. J. Epidemiol.*, **124**, 894-902.
- Ochiai, M., H. Nagaoka, K. Wakabayashi, Y. Tanaka, S.-B. Kim, A. Tada, H. Nukaya, T. Sugimura and M. Nagao (1993) Identification of *N*<sup>2</sup>-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline 3',5'-diphosphate, a major DNA adduct, detected by nuclease P1 modification of the <sup>32</sup>P-postlabeling method, in the liver of rats fed MeIQx, *Carcinogenesis*, **14**, 2165-2170.
- Ohgaki, H., N. Matsukura, K. Morino, T. Kawachi, T. Sugimura and S. Takayama (1984) Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from glutamic acid and soybean globulin pyrolysates, *Carcinogenesis*, **5**, 815-819.
- Ohgaki, H., S. Takayama and T. Sugimura (1991) Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food, *Mutat. Res.*, **259**, 399-410.
- Schiffman, M. H. and J. S. Felton (1990) Fried foods and the risk of colon cancer, *Am. J. Epidemiol.*, **131**, 376-378.
- Shioya, M., K. Wakabayashi, S. Sato, M. Nagao and T. Sugimura (1987) Formation of a mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in cooked beef, by heating a mixture containing creatinine, phenylalanine and glucose, *Mutat. Res.*, **191**, 133-138.
- Snyderwine, E. G., P. P. Roller, R. H. Adamson, S. Sato and S. S. Thorgeirsson (1988) Reaction of *N*-hydroxylamine and *N*-acetoxy derivatives of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline with DNA. Synthesis and identification of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-IQ, *Carcinogenesis*, **9**, 1061-1065.
- Spingarn, N. E., H. Kasai, L. L. Vuolo, S. Nishimura, Z. Yamaizumi, T. Sugimura, T. Matsushima and J. H. Weisburger (1980) Formation of mutagens in cooked foods. III. isolation of a potent mutagen from beef, *Cancer Lett.*, **9**, 177-183.
- Steineck, G., U. Hagman, M. Gerhardsson and S. E. Norell (1990) Vitamin A supplements, fried foods, fat and urothelial cancer. A case-referent study in Stockholm in 1985-87, *Int. J. Cancer*, **45**, 1006-1011.
- Sugimura, T. (1986) Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan, *Science*, **233**, 312-318.
- Sugimura, T. (1992) Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective, *Science*, **258**, 603-607.
- Sugimura, T. and S. Fujimura (1967) Tumor production in glandular stomach of rat by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-

- nitrosoguanidine, *Nature*, **216**, 943-944.
- Sugimura, T., M. Nagao and Y. Okada (1966) Carcinogenic action of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, *Nature*, **210**, 962-963.
- Sugimura, T., H. Otake and T. Matsushima (1968) Single strand scissions of DNA caused by a carcinogen, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, *Nature*, **218**, 392.
- Sugimura, T., M. Nagao, T. Kawachi, M. Honda, T. Yahagi, Y. Seino, S. Sato, N. Matsukura, T. Matsushima, A. Shirai, M. Sawamura and H. Matsumoto (1977a) Mutagen-carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods, In: H. H. Hiatt, J. D. Watson and J. A. Winsten (Eds.), *Origins of Human Cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 1561-1577.
- Sugimura, T., T. Kawachi, M. Nagao, T. Yahagi, Y. Seino, T. Okamoto, K. Shudo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Wakabayashi, Y. Iitaka and A. Itai (1977b) Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products, *Proc. Jpn. Acad.*, **53**, 58-61.
- Sugimura, T., M. Terada, J. Yokota, S. Hirohashi and K. Wakabayashi (1992) Multiple genetic alterations in human carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, **98**, 5-12.
- Sugimura, T., M. Nagao and K. Wakabayashi (1994) Heterocyclic amines in cooked foods: candidates for causation of common cancers, *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 2-4.
- Takahashi, M., K. Wakabayashi, M. Nagao, M. Yamamoto, T. Masui, T. Goto, N. Kinae, I. Tomita and T. Sugimura (1985) Quantification of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) in beef extracts by liquid chromatography with electrochemical detection (LCEC), *Carcinogenesis*, **6**, 1195-1199.
- Takahashi, M., F. Furukawa, Y. Miyakawa, H. Sato, R. Hasegawa and Y. Hayashi (1986) 3-Amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole initiates two-stage carcinogenesis in mouse skin but is not a complete carcinogen. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **77**, 509-513.
- Takayama, S., Y. Nakatsuru, H. Ohgaki, S. Sato and T. Sugimura (1985) Atrophy of salivary glands and pancreas of rats fed on diet with amino-methyl- $\alpha$ -carboline, *Proc. Jpn. Acad.*, **61**, 277-280.
- Takeda, K., T. Ohta, K. Shudo, T. Okamoto, K. Tsuji and T. Kosuge (1977) Synthesis of a mutagenic principle isolated from tryptophan pyrolysate, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2145-2146.
- Tamano, S., R. Hasegawa, A. Hagiwara, M. Nagao, T. Sugimura and N. Ito (1994) Carcinogenicity of a mutagenic compound from food, 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA $\alpha$ C), in male F344 rats, *Carcinogenesis*, **15**, 2009-2015.
- Tohda, H., A. Oikawa, T. Kawachi and T. Sugimura, (1980) Induction of sister-chromatid exchanges by mutagens from amino acid and protein pyrolysates, *Mutat. Res.*, **77**, 65-69.
- Tsuda, M., C. Negishi, R. Makino, S. Sato, Z. Yamaizumi, T. Hirayama and T. Sugimura (1985) Use of nitrite and hypochlorite treatments in determination of the contributions of IQ-type and non-IQ-type heterocyclic amines to the mutagenicities in crude pyrolyzed materials, *Mutat. Res.*, **147**, 335-341.
- Tsuda, H., S. Hirohashi, Y. Shimosato, M. Terada and H. Hasegawa (1988) Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma, *Gastroenterology*, **95**, 1664-1666.
- Umamoto, A., Y. Monden, S. Grivas, K. Yamashita and T. Sugimura (1992) Determination of human exposure to the dietary carcinogen 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1) from hemoglobin adduct: the relationship to DNA adducts. *Carcinogenesis*, **13**, 1025-1030.
- 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 inpatients receiving parenteral alimentation, *Carcinogenesis*, **12**, 1417-1422.
- Wakabayashi, K., M. Nagao, H. Esumi and T. Sugimura (1992) Food-derived mutagens and carcinogens, *Cancer Res. (Suppl.)*, **52**, 2092s-2098s.
- Wakabayashi, K., H. Ushiyama, M. Takahashi, H. Nukaya, S-B. Kim, M. Hirose, M. Ochiai, T. Sugimura and M. Nagao (1993) Exposure to heterocyclic amines, *Environ. Health Perspect.*, **99**, 129-133.
- Wakata, A., N. Oka, K. Hiramoto, A. Yoshioka, K. Negishi, Y. Wataya and H. Hayatsu (1985) DNA strand cleavage *in vitro* by 3-hydroxyamino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole, a direct-acting mutagen formed in the metabolism of carcinogenic 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole, *Cancer Res.*, **45**, 5867-5871.
- Widmark, E. M. P (1939) Presence of cancerproducing substances in roasted food, *Nature*, **143**, 984.
- Wink, D. A., K. S. Kasprzak, C. M. Maragos, R. K. Elespuru, M. Misra, T. M. Dunams, T. A. Cebula, W. H. Koch, A. W. Andrews, J. S. Allen and L. K. Keefer (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors, *Science*, **254**, 1001-1003.
- Yamamoto, T., K. Tsuji, T. Kosuge, T. Okamoto, K. Shudo, K. Takeda, Y. Iitaka, K. Yamaguchi, Y. Seino, T. Yahagi, M. Nagao and T. Sugimura (1978) Isolation and structure determination of mutagenic substances in L-glutamic acid pyrolysate, *Proc. Jpn. Acad.*, **54B**, 248-250.
- Yamashita, K., M. Adachi, S. Kato, H. Nakagama, M. Ochiai, K. Wakabayashi, S. Sato, M. Nagao and T. Sugimura (1990) DNA adducts formed by 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in rat liver: dose-response on chronic administration, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 470-476.
- Yamazoe, Y., M. Abu-Zeid, K. Yamaguchi and R. Kato (1988) Metabolic activation of pyrolysate arylamines by human liver microsomes: possible involvement of a P-448-H type cytochrome P-450, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 1159-1167.
- Yoshida, D., T. Matsumoto, R. Yoshimura and T. Matsuzaki (1978) Mutagenicity of amino- $\alpha$ -carbolines in pyrolysis products of soybean globulin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 915-920.

研究奨励賞授賞講演

## 香料成分の抗変異原性作用機構

### Mechanisms of antimutagenic action of flavorings

太田 敏博

Toshihiro Ohta

東京薬科大学 生命科学部  
192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science,  
1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年5月31日)

#### Summary

Some naturally occurring flavorings such as cinnamaldehyde, coumarin, anisaldehyde, and vanillin inhibited the formation of mutations in *E. coli*. Antimutagenic effects was observed on mutations induced by UV-light or 4-nitroquinoline-1-oxide, but not on those by methylating agents. These compounds did not prevent the induction of the SOS repair function. The frequency of interplasmidic recombination was significantly increased in the presence of vanillin. It is considered that these flavorings act as antimutagens by promoting the *recA*-dependent DNA recombinational repair system in bacteria. In mammalian cells, post-treatment with vanillin suppressed the following mutagenicity: 6-thioguanine-resistant mutations induced by UV or X-rays in cultured V79 cells, structural chromosome aberrations induced by UV, X-rays, mitomycin C, or bleomycin in CHO cells, micronuclei induced by mitomycin C in mouse bone marrow cells, and ethylnitrosourea-induced somatic mutations in the mouse spot test. Treatment with vanillin in the G2 phase of the cell cycle suppressed breakage-type, but not exchange-type chromosome aberrations induced by UV. On the contrary, the frequency of sister-chromatid exchanges (SCEs) induced by UV or mitomycin C was obviously enhanced when CHO cells were post-treated with vanillin. Since an antimutagenic compound found in a certain condition became ineffective, or even potentiated mutations when the endpoints investigated are varied, the elucidation of the mechanisms of antimutagenesis is indispensable for the evaluation of antimutagens.

**Keywords:** antimutagen; antimutagenesis; cinnamaldehyde; flavorings; vanillin

#### 1. はじめに

私たちの環境中には多種多様な変異原が存在するが、一方でこれらの変異原の作用を阻害する物質も存在する。自然突然変異あるいは変異原によって誘発される突然変異の発生頻度を減少させる作用をもつ因子は、抗変異原 (antimutagen) と総称される。このうち変異原と反応して変異原性を消失させる作用をもつものは Desmutagen と呼ばれる。突然変異が抑制される原因としては、

この他にもいろいろな場合が考えられるが、これらに関しては著者らの総説、著書を参照されたい (Kada *et al.*, 1986; 太田, 並木, 1988; Ohta, 1993; 太田, 1993a, 1993b, 1995a, 1995b)。本稿では変異原の作用で DNA 損傷が生じた細胞において、DNA 修復過程を修飾することによって突然変異の誘発を抑制する活性をもつ抗変異原 (bio-antimutagen) の検索とその作用機構について、著者の研究室で行なってきた研究成果を中心に述べる。

## 2. 抗変異原性を有する香料成分

抗変異原を検索する対象として、天然物、特に香料成分に注目した。香料は我々の日常生活において化粧品や芳香剤をはじめ、食品、アルコール飲料、菓子類の添加物としても多くの種類の天然香料、合成香料が使用されている。これらの香料成分には化学的に活性な構造を持つものも多く、単に、香りの効果だけでなく未知の生理活性を有している可能性があると考えた。大腸菌 WP2s 株を UV あるいは 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) で処理した後、香料成分を添加した寒天プレートにまいて Trp<sup>+</sup> 復帰突然変異の頻度を調べた (Table 1)。その結果、anisaldehyde, cinnamaldehyde, coumarin, vanillin, vanillal の抗変異原性を見いだした (Ohta *et al.*, 1983a, 1983b, 1986b)。これらの抗変異原の構造式を Fig. 1 に示す。Cinnamaldehyde は肉桂の樹皮を蒸留して得

Table 1. Antimutagenic activity of flavorings on 4-NQO-induced mutagenesis in *E. coli*

Flavorings	Antimutagenic activity
Anethole	-
<i>p</i> -Anisaldehyde	+
<i>n</i> -Butyl acetate	-
Cinnamaldehyde	+
Citral	-
Coumarin	+
<i>n</i> -Decylaldehyde	-
Estragole	-
Ethyl acetate	-
Ethyl acetoacetate	-
Ethyl anthranilate	-
Ethyl benzoate	-
Ethyl <i>n</i> -caprylate	-
Ethyl cinnamate	-
Ethyl isovalerate	-
Ethyl phenylacetate	-
Geraniol	-
Isoamyl <i>n</i> -butyrate	-
Isoamyl formate	-
Jasmone	-
Linalool	-
<i>dl</i> -Methnol	-
Methyl salicylate	-
<i>dl</i> -Perillaldehyde	-
Piperonal	-
Vanillin	+
Vanillal (ethyl vanillin)	+

られるシナモンオイルの主成分であり、強いシナモン臭を有し嗜好食品、化粧品、医薬品などに広く用いられている。また、coumarin はトンカ豆、カシア油に配糖体として存在する天然物で、石鹼、ローション、タバコ、消臭剤などに利用されている。Vanillin はラン科植物バニラの豆から得られるバニラエッセンスの主要香気成分であり、食品添加物として菓子類、アイスクリームを中心に広く使われている。

Cinnamaldehyde の誘導体について抗変異原性を調べたところ、cinnamyl alcohol, および cinnamic acid やそのエステル類には活性が全く認められないことからアルデヒド基が重要であることがわかった (Ohta *et al.*, 1983b)。一方、vanillin と anisaldehyde, vanillal は類似化合物でいずれも強い抗変異原性を示すことから、benzaldehyde 誘導体について構造活性相関を調べた。大腸菌 WP2s 株において 4-NQO 誘発突然変異に対する抑制効果で調べたところ、ほとんどの benzaldehyde 誘導体に抗変異原性が認められた。なかでも vanillin, vanillal, protocatechualdehyde, 2,5-dimethoxybenzaldehyde, 2,3-dihydroxybenzaldehyde, 2,5-dihydroxybenzaldehyde, *o*-anisaldehyde, *m*-anisaldehyde, *o*-hydroxybenzaldehyde が特に強い抗変異原性を示すことがわかった (Watanabe *et al.*, 1988)。この場合にもアルデヒド基は活性にとって必須であり、vanillic acid や vanillyl alcohol

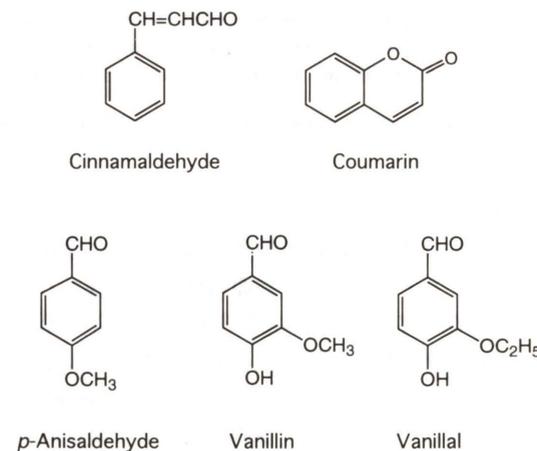


Fig. 1. Structures of antimutagens found in naturally occurring flavorings.

には抗変異原活性はない。さらに benzaldehyde のオルト位またはメタ位にメトキシ基があると活性が増強され、メトキシ基がエトキシ基になると活性は弱くなった。

## 3. 微生物における抗変異原性

### (1) 変異原に対する特異性

香料成分の抗変異原活性がどのような変異原に対して有効かについて検討を行なった (Ohta *et al.*, 1983c, 1986b)。Vanillin や cinnamaldehyde の細菌における抗変異原性は UV, 4-NQO の他に、captan, furylfulamide (AF-2), methylglyoxal などの変異原で誘発される突然変異に対しても認められた。これに対し、メチル化剤である *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) や *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) によって誘発される突然変異に対しては全く抑制効果を示さなかった (Fig. 2)。また、*N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) や *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU), ethylmethanesulfonate (EMS),  $\beta$ -propiolactone などのエチル化剤で誘発される突然変異に対しては、弱い抑制効果があった。一方、サルモネラ菌 TA98 を用いて 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]-indole (Trp-P-2), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]-quinoline (IQ) で誘発されるフレームシフト変異についても調べたが、vanillin の抗変異原活性は

検出されなかった。このように vanillin や cinnamaldehyde の抗変異原性の有無は用いる変異原物質の種類によって大きく異なる。したがって、Table 1 で抗変異原性が認められなかった香料成分も、4-NQO 以外の変異原を用いた場合に抗変異原性が検出される可能性はある。なお、vanillin や cinnamaldehyde には 4-NQO, AF-2 などの変異原と直接反応して不活性化させる作用、すなわち desmutagen としての活性はない。

### (2) 変異原処理した菌の生存率に対する作用

Bio-antimutagen の作用機構を解析するため種々の DNA 修復機能欠損変異株を利用することは有力な手段であるが、DNA 修復変異株のなかには変異原で突然変異を十分に誘発すること自体が困難であるものがあり、突然変異の抑制効果を指標にした解析法には限界があった。特に、SOS 修復機能を欠損した *umuC* 変異株や DNA 組換え機能を欠損した *recA* 変異株では UV や 4-NQO による突然変異が生じないので、抗変異原性の測定は不可能であった。そこで、変異原処理した菌の生存率に対する抗変異原の致死軽減効果を指標として、種々の DNA 修復機能欠損変異株を用いて比較する手法を確立した。突然変異頻度を指標にしない間接的な解析ではあるが、抗変異原がどの修復系に作用しているかを推定することが可能に

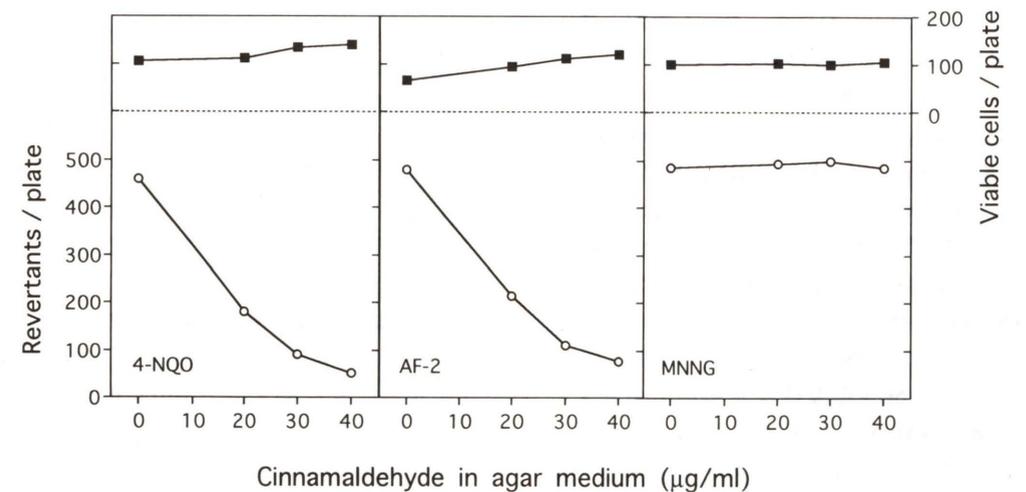


Fig. 2. Effects of cinnamaldehyde on cell viability (■) and on mutation (○) in *E. coli* WP2s (*uvrA*) treated with 4-NQO at 2 μg/ml [left], AF-2 at 0.4 μg/ml [middle], or MNNG at 2 μg/ml [right].

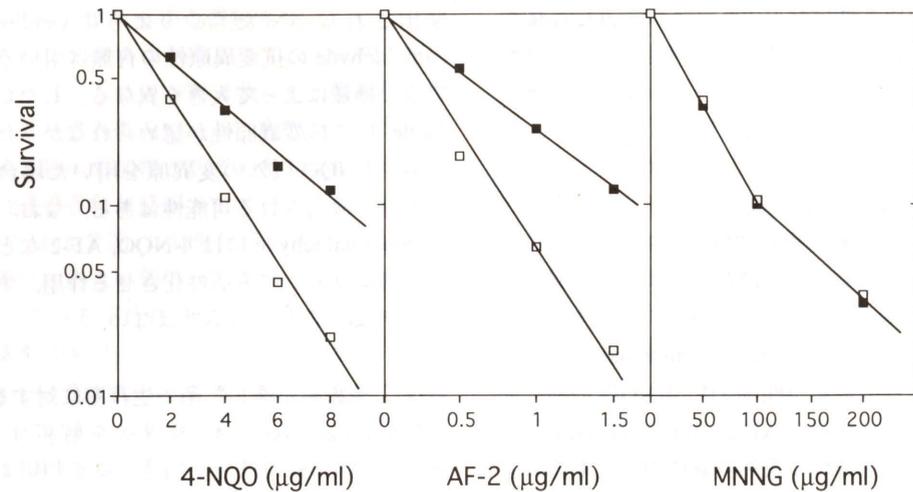


Fig. 3. Effects of cinnamaldehyde on cell viability after treatment with 4-NQO [left], AF-2 [middle], or MNNG [right] at lethal doses. The treated WP2s cells were diluted and plated on trypton plates with (■) and without (□) 80 µg/ml cinnamaldehyde.

なった (Ohta *et al.*, 1983c, 1986b, 1988).

抗変異原性の検出に用いた大腸菌 WP2s 株をリン酸緩衝液中で 4-NQO, AF-2, または MNNG で 15~60 分間処理した。変異原の濃度は生存率がおおよそ 1~20% になるところを選び、cinnamaldehyde を含むプレートと含まないプレートにまいて生存率を比較した。Fig. 3 に示すように、4-NQO, あるいは AF-2 で処理した菌の生存率は cinnamaldehyde を含んだプレートでは数倍高くなった。一方、MNNG 処理した菌の生存率に対しては全く影響がみられなかった。したがって、cinnamaldehyde による突然変異の抑制作用と生存率の上昇作用は関連しており、同一の作用に基づいていると考えられた。そこで、大腸菌 B/r 株および K-12 株由来の種々の DNA 修復変異株 (*uvrA*, *uvrB*, *polA*, *lexA*, *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *umuC* 変異株) を 4-NQO 処理し、cinnamaldehyde の存在下と非存在下で生存率を比較した (Table 2)。

Table 2. Effect of cinnamaldehyde on cellular viability of DNA repair mutants after treatment with 4-NQO.

Strain	Relevant genotype	Increasing ratio at 1% survival
<i>E. coli</i> B/r		
WP2	<i>uvrA</i>	8.5
CM561	<i>lexA</i>	2.6
CM571	<i>recA</i>	1.0
WP67	<i>uvrA</i> , <i>polA</i>	9.8
CM611	<i>uvrA</i> , <i>lexA</i>	2.5
ZA159	<i>uvrB</i>	9.0
<i>E. coli</i> K-12		
TK603	<i>uvrA</i>	2.7
AB2463	<i>recA</i>	0.95
AB2480	<i>uvrA</i> , <i>recA</i>	0.28
MO1594	<i>uvrA</i> , <i>recB</i>	1.5
JC3914	<i>uvrA</i> , <i>recB</i> , <i>recC</i>	1.4
JC3913	<i>uvrA</i> , <i>recF</i>	3.2
JC3881	<i>recB</i> , <i>recC</i> , <i>recF</i>	1.8
TK610	<i>uvrA</i> , <i>umuC</i>	3.8

変異株では *recA* 遺伝子産物の *RecA* 蛋白が欠損している。菌を変異原で処理すると DNA 損傷がシグナルとなって *recA* 遺伝子の発現が誘導される結果、細胞内の *RecA* 蛋白量が急激に増大するが、この *recA* 遺伝子の誘導が起きない変異株 (*lexA*) では cinnamaldehyde による生存率上昇作用は弱くなった。一方、DNA 組換え機能が低下

した *recB* 変異株, *recC* 変異株, および *recB recC recF* 三重変異株では、cinnamaldehyde による生存率上昇作用は僅かしか認められなかった。しかし、DNA 組換え機能に関しては野生株と変わらない *recF* 変異株では生存率の上昇が野生株の場合と同程度に観察された。このように、cinnamaldehyde による生存率の上昇効果の強さと、菌のもつ DNA 組換え能の間に相関がみられた。この現象は、vanillin を作用させた場合でも認められ、また、UV や AF-2 で処理した菌の生存率についても同様であった。生存率の上昇は UV 照射や変異原処理によって生じた DNA 損傷が、抗変異原存在下においてより効率よく修復されたと解釈された。

### (3) DNA 組換えに対する作用

DNA 組換え頻度を定量するための方法として、2 種類のプラスミド pACYC184 と pBR322 の相同な遺伝子間の組換えを測定する系を作成した。Fig. 4 に示すように、テトラサイクリン耐性遺伝子の異なる部位に 4 塩基対のフレームシフト変異を人工的に導入してあり、それぞれの間の 2 箇所で組換えが生じたときにテトラサイクリン耐性となる。この組換え頻度に対する vanillin の効果を調べたところ、vanillin 存在下では有意に組換え頻度が高くなっていることが示された (Ohta *et al.*, 1988)。次に組換えの中間体と考えられている D-ループと呼ばれるヘテロ 2 重鎖の形成反応に対する抗変異原の作用を調べた。RecA 蛋白は様々な酵素活性を持っているが、相同な塩基配列

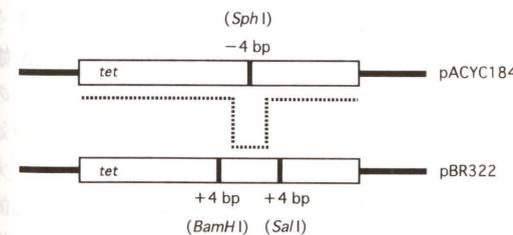


Fig. 4. 4 Base pairs insertions at the *Bam*HI and *Sal*I cleavage sites, and 4 base pairs deletion at the *Sph*I site were introduced in each plasmid. A functional *tet* gene is formed by double recombination as indicated by a dotted line between pACYC184 and pBR322.

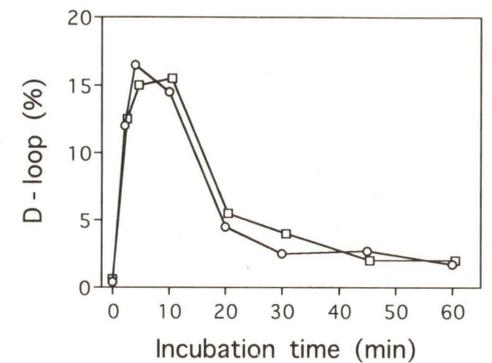


Fig. 5. D-loop formation catalyzed by RecA protein *in vitro* from homologous DNA molecules of fd phage RFI DNA and ssDNA fragments in the presence (■) and absence (○) of 2.5 mM cinnamaldehyde.

を持つ 2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA とを ATP 存在下で対合させて D-ループを形成させる。fd ファージの 1 本鎖 DNA 断片および環状 2 本鎖 DNA と、RecA 蛋白を用いて D-ループの形成を *in vitro* で行い、cinnamaldehyde 添加の影響をいくつかの実験条件下で調べたが、この反応を促進する効果は今のところ認められていない。In vitro ではまだ反応系に不足している要因があるものと考えている (Fig. 5)。

### (4) SOS 修復の阻害作用

異常塩基を持った DNA が複製されると、DNA ポリメラーゼ III による娘鎖 DNA 合成反応は鋳型 DNA 鎖の異常塩基が存在する場所で止まる。大腸菌やサルモネラ菌などの細菌では、このような状況下では SOS 修復と呼ばれる修復系が新たに誘導される。この SOS 修復には異常塩基を取り除く機能はないが、SOS 修復に必要な RecA, UmuC, UmuD の三種類の蛋白質が存在すると、DNA ポリメラーゼ III の DNA 合成反応が異常塩基存在下でも継続される。しかし、DNA ポリメラーゼ III による塩基対合の精度は低下してしまうので高頻度で突然変異が生じる。したがって、SOS 修復遺伝子の発現誘導の阻害物質や、発現された SOS 修復機能の阻害物質は突然変異を抑制すると予測される。sulA'-lacZ 融合遺伝子 (sulA 遺伝子は SOS 応答遺伝子群の一つ) の

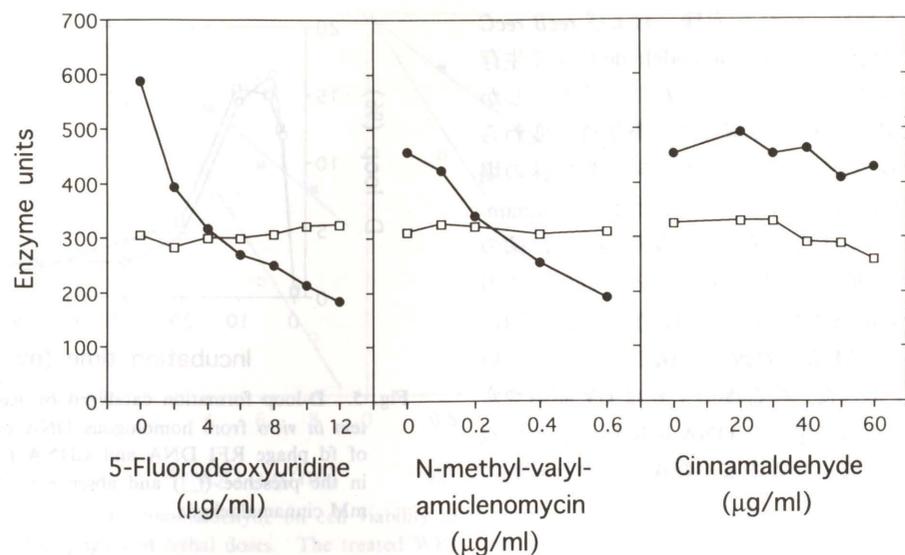


Fig. 6. Effect of cinnamaldehyde, *N*-methyl-valyl-amcliclenomycin, and 5-fluorodeoxyuridine on the UV-induction of the SOS gene in *E. coli*. ●, Inducible  $\beta$ -galactosidase activity derived from *sulA'*-*lacZ* gene; □, Constitutive alkaline phosphatase activity as a control for inhibitory effects on protein synthesis.

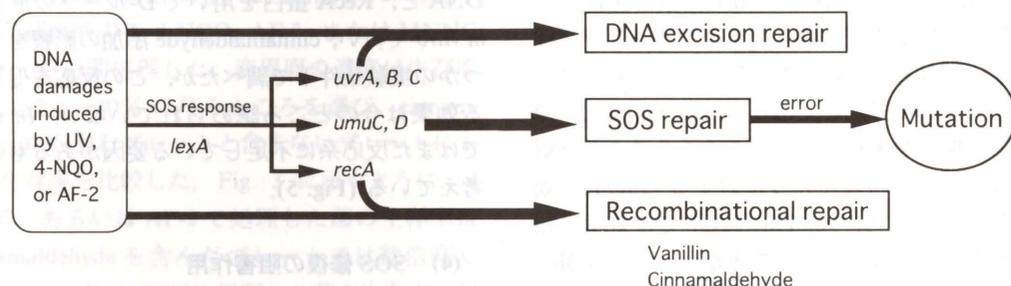


Fig. 7. DNA repair pathways and mutation formation in *E. coli*.

UV 照射による発現を $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で測定することによって、SOS 応答を特異的に阻害する物質を検索した。その結果、5-fluorodeoxyuridine や放線菌の代謝産物 *N*-methylvalyl-amcliclenomycin に阻害作用と抗変異原性を見いだしたが (Ohta *et al.*, 1986a; Yamada *et al.*, 1993), vanillin, cinnamaldehyde などの香料成分については SOS 応答の阻害作用は観察されなかった (Fig. 6).

#### (5) 微生物における抗変異原性作用機構

DNA 修復機構の一つである組換え修復は、UV, 4-NQO, mitomycin C (MMC) など多くの変

異原の作用で生じる DNA 損傷の修復に働いている。DNA 鎖の切断や変異原が付加した異常塩基が修復される前に DNA の複製が始まってしまうと、鋳型 DNA 鎖の損傷部位で相補的な DNA 娘鎖が合成できないためギャップが生じる。このギャップ部分をもう 1 本の合成中の DNA 鎖の対応する部分と組換えて修復を行う機構である。大腸菌では RecA 蛋白質がこの組換え反応で中心的な役割をになっており、その他にも *recB*, *recC* 遺伝子産物であるエキソヌクレアーゼ V をはじめ多くの酵素や蛋白質が関与している。Vanillin や cinnamaldehyde が作用している修復系は RecA 蛋白質の関与する組換え修復であると推定され、こ

これらの物質は突然変異生成経路である SOS 修復を阻害しているのではなく、組換え修復活性を促進することによって抗変異原活性を示すと考えられた (Fig. 7).

#### 4. 哺乳動物細胞における抗変異原性

##### (1) 6-チオグアニン耐性突然変異

チャイニーズハムスター肺由来の培養細胞である V79 株細胞を用いて、X 染色体上の HGPRT 遺伝子座における突然変異を 6-thioguanine (6-TG) に対する耐性を指標にして調べた。V79 細胞を UV や X 線で照射した後、突然変異発現期間の 5~7 日間培地中に vanillin を添加しておく、6-TG 耐性突然変異の誘発頻度が著しく抑制された (Fig. 8)。この濃度の vanillin 添加では細胞の増殖速度に影響は見られず、また、照射された細胞の生存率も vanillin 存在下のほうが高くなっていることから、vanillin による細胞毒性が原因で突然変異が抑制されたのではないことが確認された。Vanillin の他、cinnamaldehyde, *p*-anisaldehyde, coumarin にも同様の作用が認められた (Imanishi *et al.*, 1990).

##### (2) マウススポットテスト

Vanillin の *in vivo* での抗変異原性は、マウスの毛色に関する 5 種類の遺伝子のいずれかに生じる劣性の体細胞突然変異を検出するスポットテストを用いて検討した。ENU を妊娠 10 日目の雌マウスに 50 mg/kg で腹腔内に投与し、その後 3 日間連続で vanillin を 500 mg/kg で経口投与した。この用量の vanillin では胎児毒性はなかった。生まれた仔の毛色を観察して突然変異によって現われる白色斑の出現頻度を比べた結果、vanillin 投与群において約 50% の抑制が認められた (Imanishi *et al.*, 1990).

##### (3) *in vitro* 染色体異常

染色体異常抑制作用に関してはチャイニーズハムスター CHO 細胞株において、UV や X 線照射後、または MMC 処理後に vanillin を培地に添加して培養を続けると、生存率の上昇と共に染色体異常の出現頻度が減少することを明らかにした。X 線の場合は切断型 (染色分体型ギャップおよび切断、無動原体断片、断片化) と交換型 (染色分体型交換、環状染色体) の染色体異常のいずれも減少が認められるのに対し、UV や MMC の場合は切断型の異常のみが抑制され、交換型の染色体

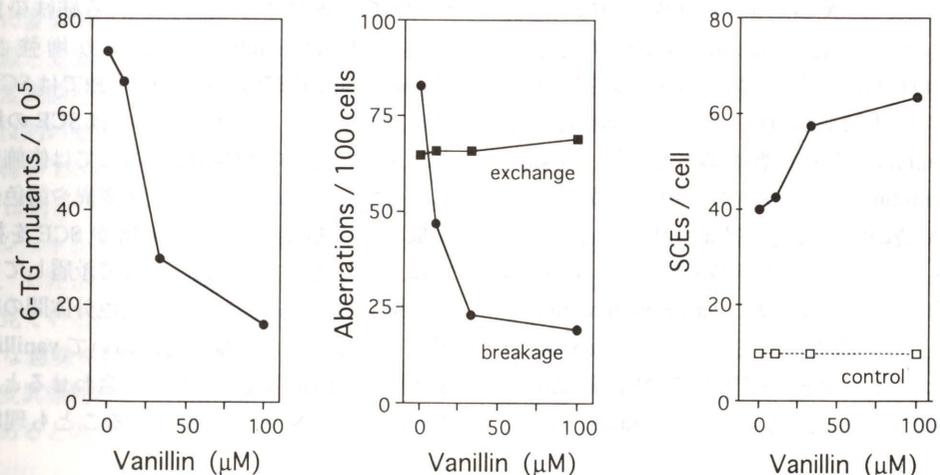


Fig. 8. Modifying effects of vanillin on UV-induced genotoxicity in mammalian cells in culture. [left], Suppression of 6-TG<sup>r</sup> mutation in Chinese hamster V79 cells induced by 25 J/m<sup>2</sup> UV. [middle], Effects on structural chromosome aberrations in Chinese hamster CHO cells irradiated by 25 J/m<sup>2</sup> UV. ●, Breakage-type; ■, Exchange-type. [right], Enhancement of UV (2.5 J/m<sup>2</sup>)-induced SCEs (●) in CHO cells. □, Control of non-irradiated cells.

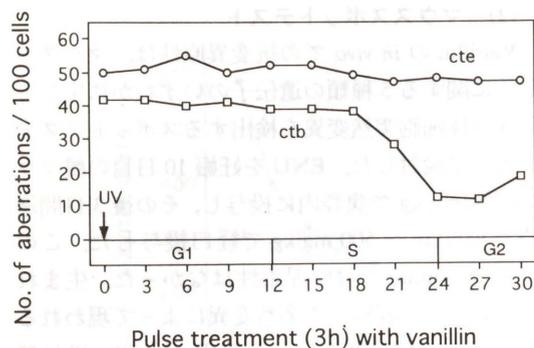


Fig. 9. Effect of pulse treatment with vanillin in different cell stages on UV-induced chromosome aberrations. Synchronized CHO cells were irradiated with 25 J/m<sup>2</sup> UV and then treated with 0.1 mM vanillin for 3 h. ctb, Number of breakage-type chromatid aberrations; cte, Number of exchange-type chromatid aberrations.

異常の出現頻度に変化は認められなかった (Fig. 8). 一方, メチル化剤である MNNG や MNU で誘発される染色体異常には全く抑制効果がなかった (Sasaki *et al.*, 1987a, 1990a).

CHO 細胞を同調培養して 3 時間ごとの vanillin のパルス処理を行なった実験から, UV や MMC で誘発される染色体異常の抑制は vanillin を G2 期の細胞に作用させたときに認められた (Fig. 9). これに対し, X 線誘発染色体異常の抑制作用は主に G1 期の細胞を vanillin で処理したときに顕著に現われた. X 線照射した CHO 細胞に生じた DNA の 1 本鎖切断の量をアルカリ溶出法で定量して vanillin 添加の影響を調べた結果, X 線照射後に vanillin を含む培地中に細胞を保持すると, DNA 鎖切断の修復が促進されることが判明した. さらに, この作用が DNA ポリメラーゼ β の特異的阻害剤である 2',3'-dideoxythymidine の添加により見られなくなることから, vanillin は DNA ポリメラーゼ β が関与する DNA 鎖切断の修復を促進するものと考えられた (Sasaki *et al.*, 1990a).

#### (4) 小核

さらにマウス小核試験を用いて染色体異常誘発の抑制効果を *in vivo* で検討した. 2 mg/kg の

Table 3. Effect of post-treatment with vanillin at different intervals on the frequency of micronuclei induced by MMC or X-rays

Interval (h)	Micronucleated PCEs (%): mean ± SD	
	MMC (500 mg/kg)	X-ray (2 Gy)
0	4.30 ± 0.62	1.55 ± 0.47**
3	3.63 ± 0.74	1.83 ± 0.26**
6	3.23 ± 1.16*	1.90 ± 0.24**
9	2.23 ± 0.50**	1.95 ± 0.71*
12	3.60 ± 1.14	2.30 ± 0.71
15	3.57 ± 0.72	3.52 ± 0.55
18	4.00 ± 0.10	3.31 ± 0.31
21	4.47 ± 0.98	
Control	4.50 ± 0.72	3.45 ± 0.71

\*0.01 < p < 0.05; \*\*0.001 < p < 0.01

MMC の腹腔内投与, または, 2 Gy の X 線照射の数時間後に 500 mg/kg の vanillin を経口投与することにより小核の出現頻度に有意な減少が見られた (Inoue *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1990b). MMC の場合は投与 6~9 時間後に vanillin を投与すると抑制効果が認められるのに対し, X 線の場合には照射直後から 9 時間の間に vanillin 処理することで抑制が現われた (Table 3).

#### (5) 姉妹染色分体交換

Fig. 8 に示したように, CHO 細胞において UV や MMC 処理によって誘発される姉妹染色分体交換 (SCE) は vanillin 添加により増強された (Sasaki *et al.*, 1987b). Vanillin 単独では SCE の誘発は認められない. 興味深いのは SCE の場合でも, メチル化剤の MNNG に対しては修飾効果が認められないことである. 突然変異や染色体異常を抑制する抗変異原の vanillin が SCE を抑制せずに, 逆に増強するのは一見して矛盾しているように思えるが, SCE が相同な染色分体間の組換え現象であることと, 微生物において vanillin が組換え反応を促進したことを考え合わせると, vanillin によって SCE が増強されることも理解できる.

### 5. 抗変異原研究の今後の課題

#### (1) 抗変異原の作用の多面性

Vanillin の構造類似体の *o*-hydroxybenzaldehyde

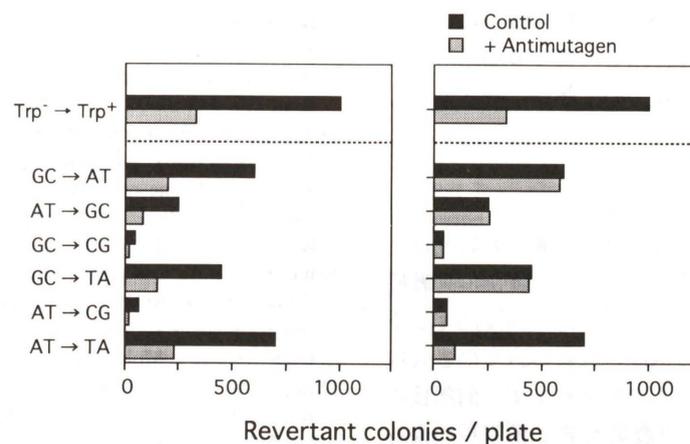


Fig. 10. Schematic mutational specificity of antimutagenic effects. [left], All kinds of mutations are suppressed. [right], A specific mutational event (e.g. AT→TA) is suppressed.

や 3-methoxy-2-hydroxybenzaldehyde (*o*-vanillin) は UV や 4-NQO で誘発される突然変異や染色体異常を抑制するが, メチル化剤である MNNG や MNU による誘発突然変異は逆に増強する. 突然変異抑制の場合には変異原処理の後で *o*-vanillin を作用させる必要があるが, 突然変異や染色体異常の増強の場合には変異原処理を行なう前に作用させるか, あるいは変異原と同時に作用させると効果が認められる (Watanabe *et al.*, 1989, 1990; Matsumura *et al.*, 1993; Watanabe and Ohta, 1993a). この様に変異原の種類を変えた場合だけでなく, 抗変異原と変異原を作用させる順序の違いによっても抗変異原性がなくなったり, 突然変異増強という正反対の結果になることもありうる. また, 使用菌株の DNA 修復機能が野生型か欠損型か, あるいは対象とした突然変異が塩基対置換かフレームシフトかということも結果に大きな影響を与える. したがって, 抗変異原性の現象の一側面だけを見ているかぎり, 抗変異原が生体に対してどのような意味を持つかを評価することはできない. 抗変異原性はその作用機構を理解することが必須であると考えられる.

#### (2) 抗変異原性と突然変異のスペクトル

1 塩基対の変化に起因する突然変異には 6 種類の塩基置換変異 (G·C→A·T, G·C→C·G, G·C→T·A, A·T→C·G, A·T→T·A, A·T→G·C) と 4

種類のフレームシフト変異 (+1G·C, -1G·C, +1A·T, -1A·T) が存在する. 変異原の中には特定のタイプの変異のみを誘発する場合もあるが, 多くの場合, 多種のタイプの変異を異なった頻度で誘発する. サルモネラ菌や大腸菌を用いた変異原性試験で復帰突然変異の指標としているヒスチジンやトリプトファン要求性のマーカーでは, 理論的には 6 種類の塩基対置換のうち 3~4 種類のものだけが検出可能であり, しかも, それらが混じった状態で復帰変異コロニーとして観察している. したがって, このような菌株を用いて効果が検出された抗変異原について, その突然変異の内容を分けたときに Fig. 10 に示すように, 全てのタイプの突然変異が抑制されている場合と, ある特定のタイプの突然変異のみが抑制されている場合が考えられる. これを解析することは, 抗変異原の作用機構を知るうえでも重要であると思われる. そこで, 突然変異のスペクトル解析のために J. H. Miller らが作成した一連の Lac<sup>-</sup>変異株を利用し, この株に種々の DNA 修復欠損変異, および, *rfa* 変異を導入して同一の変異原で誘発される突然変異のスペクトルが DNA 修復機能欠損によってどのように変化するかを調べた (Watanabe and Ohta, 1993b; Watanabe *et al.*, 1994a, 1994b; Watanabe-Akanuma and Ohta, 1995). 今後, これまで大腸菌の Trp<sup>+</sup> 復帰変異や

サルモネラ菌の His<sup>+</sup> 復帰変異を指標にして研究されてきた抗変異原の作用を、各々の塩基対置換やフレームシフト変異について個別に調べていくことが重要であると考えている。

## 謝 辞

今回の受賞の対象となった抗変異原の研究は、財団法人残留農薬研究所において、賀田恒夫教授(国立遺伝学研究所)のご指導の下で開始され、下記の残留農薬研究所の共同研究者の方々の多大なる協力により為し得たものであります。前部長の白須泰彦博士(現、東京農業大学)、前室長の森谷正明博士(現、Naylor Dana Institute, American Health Foundation)、渡辺佳津子研究員、井上達生研究員(現、富士バイオメディックス)、仲村(棚橋)直子研究員、鈴木(塚本)令子研究員、佐々木有博士(現、八戸工業高等専門学校)、松村(今西)久子研究員、赤沼(渡辺)三恵博士、松元郷六博士、加藤朋子研究員(現、日本サイアナムィッド)。ここに深く感謝の意を表します。また、有益なご助言をいただきました国立遺伝学研究所の土川清先生、日本大学の井上正博士、静岡県立大学の下位香代子博士、名古屋市立大学の高橋和彦博士、東北大学の布柴達男博士、国立衛生試験所の能美健彦博士、麻布大学の黒田行昭教授に感謝いたします。

## 参考文献

- Inouye, T., Y. F. Sasaki, H. Imanishi, M. Watanabe, T. Ohta and Y. Shirasu (1988) Suppression of mitomycin C-induced micronuclei in mouse bone marrow cells by post-treatment with vanillin, *Mutat. Res.*, **202**, 93-95.
- Imanishi, H., Y. F. Sasaki, K. Matsumoto, M. Watanabe, T. Ohta, Y. Shirasu and K. Tutikawa (1990) Suppression of 6-TG-resistant mutations in V79 cells and recessive spot formations in mice by vanillin, *Mutat. Res.*, **243**, 151-158.
- Kada, T., T. Inoue, T. Ohta and Y. Shirasu (1986) Antimutagens and their modes of action. In: Shankel, D. M., P. E. Hartman, T. Kada and A. Hollaender (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, Plenum Press, New York, pp. 181-198.
- Matsumura, H., K. Watanabe and T. Ohta (1993) *o*-Vanillin enhances chromosome aberrations induced by alkylating agents in cultured Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, **298**, 163-168.
- Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, Y. Shirasu and T. Kada (1983a) Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **107**, 219-227.
- Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, Y. Shirasu and T. Kada (1983b) Antimutagenic effects of coumarin and umbelliferone on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide or UV irradiation in *E. coli*, *Mutat. Res.*, **117**, 135-138.
- Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, Y. Shirasu and T. Kada (1983c) Analysis of the antimutagenic effect of cinnamaldehyde on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mol. Gen. Genet.*, **192**, 309-315.
- Ohta, T., M. Watanabe, R. Tsukamoto, Y. Shirasu and T. Kada (1986a) Antimutagenic effects of 5-fluorouracil and 5-fluorodeoxyuridine on UV-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **173**, 19-24.
- Ohta, T., M. Watanabe, K. Watanabe, Y. Shirasu and T. Kada (1986b) Inhibitory effects of flavourings on mutagenesis induced by chemicals in bacteria, *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 51-54.
- 太田敏博, 並木満夫 (1988) 抗突然変異物質とその作用機構, *化学と生物*, **26**, 161-172.
- Ohta, T., M. Watanabe, Y. Shirasu and T. Inoue (1988) Post-replication repair and recombination in *uvrA umuC* strains of *Escherichia coli* are enhanced by vanillin, an antimutagenic compound, *Mutat. Res.*, **201**, 107-112.
- 太田敏博 (1993a) 突然変異, 染色体異常誘発に対する香料成分の抑制作用, *日本農芸化学会誌*, **67**, 24-26.
- 太田敏博 (1993b) 抗変異原の検出およびその作用機構, *変異原性試験*, **2**(2), 120-124.
- Ohta, T. (1993) Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives, *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**, 127-146.
- 太田敏博 (1995a) 抗発癌イニシエーター, *生物化学実験法: 食品中の生体機能調節物質研究法* (川岸舜朗編), 学会出版センター (印刷中).
- 太田敏博 (1995b) 細菌を用いる方法, *抗変異原・抗発がん物質とその検索法* (黒田行昭編), 講談社サイエントフィク (印刷中).
- Sasaki, Y. F., H. Imanishi, T. Ohta and Y. Shirasu (1987a) Effects of vanillin on sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by mitomycin C in cultured Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.*, **191**, 193-200.
- Sasaki, Y. F., H. Imanishi, T. Ohta and Y. Shirasu (1987b) Effects of antimutagenic flavourings on SCEs induced by chemical mutagens in cultured Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, **189**, 313-318.
- Sasaki, Y. F., H. Imanishi, M. Watanabe, T. Ohta and Y. Shirasu (1990a) Suppressing effect of antimutagenic flavourings on chromosome aberrations induced by UV-light or X-rays in cultured Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, **229**, 1-10.
- Sasaki, Y. F., T. Ohta, H. Imanishi, M. Watanabe, K.

Matsumoto, T. Kato and Y. Shirasu (1990b) Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde, and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by X-rays in mice, *Mutat. Res.*, **243**, 299-302.

Watanabe, K., T. Ohta and Y. Shirasu (1988) Antimutagenic effects of benzaldehyde and its derivatives on mutagenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide in *Escherichia coli*, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1041-1045.

Watanabe, K., T. Ohta and Y. Shirasu (1989) Enhancement and inhibition of mutation by *o*-vanillin in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **218**, 105-109.

Watanabe, K., T. Ohta, M. Watanabe, T. Kato and Y. Shirasu (1990) Inhibition of induction of adaptive response by *o*-vanillin in *Escherichia coli* B, *Mutat. Res.*, **243**, 273-280.

Watanabe, K., and T. Ohta (1993a) Mutation enhancing effect of *o*-vanillin in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*: characterization of mutational spectrum, *Mutat. Res.*, **302**, 13-18.

Watanabe, M., and T. Ohta (1993b) Analysis of muta-

tional specificity induced by heterocyclic amines in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*, *Carcinogenesis*, **14**, 1149-1153.

Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta (1994a) Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: I. Frameshift mutagenesis, *Mutat. Res.*, **314**, 27-37.

Watanabe, M., T. Nohmi and T. Ohta (1994b) Effects of the *umuDC*, *mucAB*, and *samAB* operons on the mutational specificity of chemical mutagenesis in *Escherichia coli*: II. Base-substitutional mutagenesis, *Mutat. Res.*, **314**, 39-49.

Watanabe-Akanuma, M., and T. Ohta (1994) Effects of DNA repair deficiency on the mutational specificity in the *lacZ* gene of *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **311**, 295-304.

Yamada, T., T. Osawa, S. Kawakishi, S. Udaka and T. Ohta (1993) Antimutagenic effects of N-methyl-valylamclicenomyacin (BA-2) isolated from the metabolites of *Streptomyces* sp., *Mutat. Res.*, **286**, 293-297.

研究奨励賞授賞講演

### アルキル化剤による変異誘発に対する修飾作用の分子機構

## Molecular mechanisms for modulation of mutagenesis induced by alkylating agents

高橋 和彦

Kazuhiko Takahashi

名古屋市立大学薬学部  
467 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,  
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

(受付: 1995年3月23日; 受理: 1995年5月31日)

#### Summary

Exposure of *Escherichia coli* cells to a low concentration of methylating agents increase their resistance to both mutagenic and cytotoxic effects of a subsequent challenge of alkylating agents. This process is known as the adaptive response and is related to the induced synthesis of enzymes that repair alkylated lesions in DNA. In this process, Ada protein, the product of the *ada* gene, plays a major role; it acts as O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGase) which accepts the methyl groups of O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>4</sup>-methylthymine or methylphosphotriester in the DNA, and the methylated Ada protein acts on the *ada* promoter to enhance transcription of the *ada* gene. Modulations of induction of the adaptive response were investigated. Methyl iodide, a very weak mutagen, induced the adaptive response in *E. coli* to a similar extent to those induced by potently mutagenic methylating agents. It is suggested that the mechanism of induction of the adaptive response may involve direct methylation of Ada protein itself. On the other hand, metal ions such as Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> inhibited induction of the adaptive response by MNU with neither severe suppression of cell growth nor induction of the SOS response, and potentiated mutagenicity of MNU. Both Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> inhibited transcriptional-promoting activity of the methylated Ada protein over the doses which did not inhibit MGase activity.

**Keywords:** Adaptive response, methyl iodide, cadmium, mercuric, O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase

#### 1. はじめに

アルキル化剤は遺伝子 DNA をアルキル化し、細胞に致死作用や突然変異誘発作用を示すし、発癌性も強いことが知られている。細胞をメチル化剤にさらすと、その DNA 中に少なくとも 10 種類以上のメチル化塩基が生成する。しかし、大部分の生物はこのようなアルキル化剤の作用に対して抵抗する手段を持っている。たとえば、大腸菌

を低濃度のメチル化剤にさらすと、高濃度のメチル化剤による致死作用や突然変異誘発作用に対して抵抗性を獲得する (Samson and Cairns, 1977)。この反応は「適応応答」と呼ばれ、多種多様の DNA 損傷で誘導される修復経路「SOS 応答」とは明らかに異なった機構で誘導される (Little and Mount, 1982; Lindahl *et al.*, 1988; Waker, 1985)。この適応応答はメチル化剤による DNA 損傷を修

復する酵素群が誘導合成された結果であると考えられている。この反応には *ada*, *alkA*, *alkB* などのいくつかの遺伝子が含まれていることが明らかとなっているが (Volker, 1988), そのうち *ada* 遺伝子が中心的な役割を果たしている。 *ada* 遺伝子がコードする Ada タンパク質はメチル化 DNA 損傷の修復酵素 O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGTAse) 活性をもつと同時に、一連の遺伝子群の正の転写調節因子として機能している。 Ada タンパク質は 354 個のアミノ酸からなり、MGTAse としては 69 番目のシステイン残基上にメチルリン酸トリエステルからのメチル基を、321 番目のシステイン残基上には変異誘発に関与する O<sup>6</sup>-メチルグアニンか O<sup>4</sup>-メチルチミンからのメチル基を受け取る活性をもつ、一種の自殺酵素である。このうち Cys-69 にメチル基を受け取った Ada タンパク質は、*ada* 遺伝子を含めた一連の遺伝子群の転写促進因子として機能する (Nakabeppu and Sekiguchi, 1986; Sekiguchi and Nakabeppu, 1987; Teo et al., 1986)。

我々は、修復酵素、あるいは、転写調節因子などのタンパク質の化学修飾が変異原性に対する複合効果を理解する上で重要であると考えて検討を行ってきた (Kawazoe et al., 1981)。近年、遺伝子工学的手法を用いてラクロースオペロンの一つである *lacZ* 遺伝子を結合させた融合遺伝子が作成され、産生される  $\beta$ -galactosidase 活性により遺伝子の発現を迅速に測定する方法が確立された。このうち、遺伝子傷害全般により誘導される SOS 遺伝子の発現を指標にして、*umu* テスト (Oda et al., 1985) や SOS クロモテスト (Quillardet et al., 1982) などの変異原物質の一次スクリーニング法が開発されている。我々は、このような手法を用いて適応応答に関与する遺伝子の発現を指標にして、適応応答に影響を与える因子について検討してきた。その結果、変異原性の極めて弱いヨウ化メチルが適応応答を強く誘導し、この作用は今まで知られていた誘導機構では説明できないこと、また、金属イオンのうち Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> がメチル化剤による適応応答の誘導を強く阻害し、メチル化剤の変異原性を高めることなどを明らかにした。ここでは、分子生物学的手法を用いてこれら

の作用機構を検討した結果を含めて、我々が行った最近の研究について紹介する。

## 2. ヨウ化メチルによる適応応答の誘導とその分子機構

メチル化剤の変異原性は、その化学的反応性に依存する (Lawley, 1974; Hemminki, 1983)。 *N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素 (MNU) や *N*-メチル-*N*'-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG) などの SN1 的反応性を示すメチル化剤は、メチルメタンスルホン酸 (MMS) やジメチル硫酸 (DMS) などの SN2 的反応性を示すメチル化剤に比べて酸素原子との反応性が高い。これらのメチル化剤は DNA との反応により変異誘発に関与する O<sup>6</sup>-メチルグアニンや O<sup>4</sup>-メチルチミンを多く生成するために強い変異原性を示すと同時に、Ada タンパク質の転写促進因子としての活性化のシグナルとなるメチルリン酸トリエステルも多く生成するために、適応応答も強く誘導する (Otsuka et al., 1985)。これに対して、典型的な SN2 型メチル化剤に分類されるハロゲン化メチルは哺乳動物細胞や微生物に対して変異原性が極めて弱いが、これはタンパク質中の SH 基との反応性が高く DNA との反応性が低いためと考えられている。

我々は九大生医研・関口教授のグループが開発した *alkA'*-*lacZ* 融合プラスミドを持つ大腸菌を用いて、*alkA* 遺伝子の発現を指標にしてアルキル化剤の適応応答の誘導能を検討してきた (Otsuka et al., 1985)。このうち、変異原性の極めて弱いヨウ化メチル (MeI) が *alkA* 遺伝子の発現を著しく促進することを見出した (Fig. 1)。しかし、MeI は *alkA* 遺伝子とは異なった機構で発現が制御される *umuC* 遺伝子の発現をわずかしか促進せず、修復酵素の遺伝子の発現を指標にした場合にも遺伝子傷害性が弱かった。このように、遺伝子の発現を指標にしたときに変異原性の弱い MeI が適応応答を強く誘導することが示された。そこで、実際に大腸菌において適応応答が誘導されているかどうかを調べた。大腸菌 WP2 株を増殖培地中で MeI を 37°C、90 分間前培養すると、MNU の致死作用、変異誘発作用に対して抵抗性を獲得し (Fig. 2)、また、大腸菌内で適応応答の key

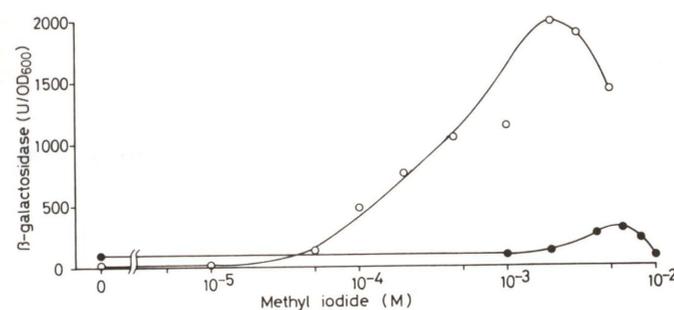


Fig. 1.  $\beta$ -galactosidase activity induced by methyl iodide (Takahashi and Kawazoe, 1987b).

The tester strains were treated with methyl iodide in K-medium. After incubation at 37°C for 2 h, the optical density at 600 nm was measured and  $\beta$ -galactosidase activity was quantified according to the method of Miller (1972). (○) in *E. coli* CSH26/pMCP1000 carrying *alkA'*-*lacZ* gene; (●) in CSH26/pSK1002 carrying *umuC'*-*lacZ* gene.

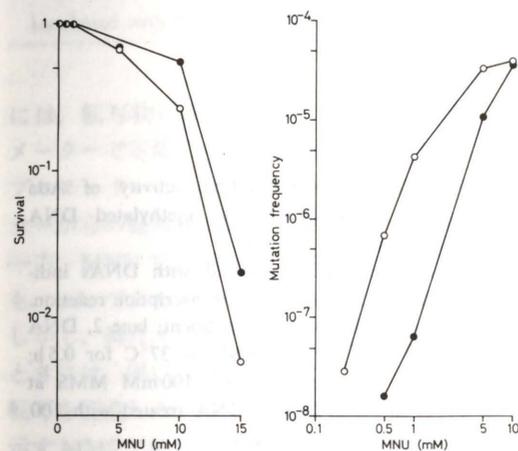


Fig. 2. Killing and mutagenic effects of MNU in *E. coli* WP2 cells adapted by pretreatment with 0.5 mM methyl iodide (Takahashi and Kawazoe, 1987a; 1987b).

(●) in the adapted cells; (○) in the unadapted cells.

enzyme である MGTAse も誘導合成されていた (Table 1)。このように、MeI が大腸菌において適応応答を誘導することが明らかとなり、今まで知られている誘導の機構では説明することはできない。そこで我々は、MeI は Ada タンパク質を直接メチル化することにより転写促進因子として活性化することにより適応応答を誘導する考え、精製タンパク質を用いた *in vitro* の実験により証明することを試みた。

まず、メチル化剤の Ada タンパク質の持つ MGTAse 活性に対する不活化作用について、大腸

Table 1. Induction of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by methyl iodide in *E. coli* WP2

Methyl iodide (mM)	Activity* (units/mg protein)
0	0.85
0.01	3.87
0.03	22.80
0.1	20.96

\* One unit of activity represents acceptance of 1 pmol of methyl group from methylated DNA.

菌より精製した Ada タンパク質を用いて検討した。Fig. 3 には、メチル化剤として反応性の異なる MNU, MMS, MeI を用い、メチル化剤で処理した DNA による MGTAse の不活化作用と、直接メチル化剤を Ada タンパク質に作用させた時の不活化作用を比較した。MGTAse 活性は [<sup>3</sup>H] MNU 処理した *M. luteus* DNA を基質として、酸不溶性分画に取り込まれた放射活性により測定した (Nakabeppu et al., 1985)。MGTAse の不活性化は、メチル化剤の化学反応性とよく一致している。SN1 的反応性を示す MNU の場合には DNA をメチル化したときに効率よく Ada タンパク質を不活性化した。メチル化剤の SN2 反応性が増加するに伴い、直接メチル化することにより Ada タンパク質が不活性化されやすくなった。SN2 的反応性を示す MeI の場合には Ada タンパク質と直接処理することにより効率よく不活性化させ、DNA をメチル化した場合にはわずかしか不活性化しなかった。

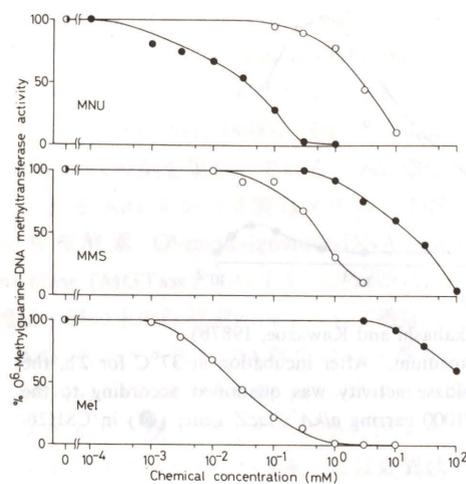


Fig. 3. Inactivation of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase activity by direct and DNA-mediated methylation of Ada protein (Takahashi *et al.*, 1988a).

The remaining methyltransferase activities after incubation with methylated DNA (●) and the activity of directly methylated Ada protein (○) are plotted against concentrations of the agents used.

次に、メチル化剤で直接メチル化した Ada タンパク質が *ada* 遺伝子の転写促進因子として活性化されるかを明らかにするために、Nakabeppu と Sekiguchi の方法 (1986) による試験管内転写再構成系を用いて検討した。 *ada* 遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片に Ada タンパク質、RNA polymerase ホロ酵素を加えて転写開始複合体を形成させた後、ヘパリンと [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP を含む基質溶液を加えて転写を行った。また、内部標準として RNA polymerase ホロ酵素だけで転写が進行する *lacUV5* 遺伝子のプロモーター領域をもつ DNA 断片を用いた。ここではヘパリンを添加して RNA polymerase ホロ酵素のプロモーター領域への再結合を阻害することにより、mRNA の生成量を転写開始複合体の生成量に比例させている。

まず、メチル化剤で処理した DNA による Ada タンパク質の *ada* 遺伝子の転写促進活性を測定した。 Fig. 4 には、 *ada* 転写物と *lacUV5* 転写物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、オートラジオグラフィーを行った結果を示す。

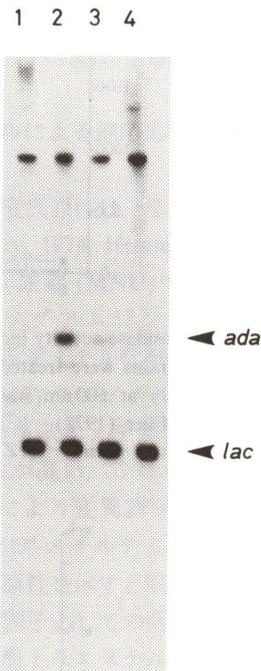


Fig. 4. Transcription-promoting activity of Ada protein preincubated with methylated DNA (Takahashi *et al.*, 1988a).

Ada protein was incubated with DNAs indicated and then applied to transcription reaction. Lane 1, DNA without treatment; lane 2, DNA treated with 10mM MNU at 37°C for 0.5 h; lane 3, DNA treated with 100mM MMS at 37°C for 16 h; lane 4, DNA treated with 100 mM MeI at 37°C for 16 h.

*ada* 転写物は 98 塩基の mRNA, *lacUV5* 転写物は 63 塩基の mRNA として検出される。未処理の DNA を添加した場合には、 *ada* プロモーターからの転写は促進されない。 10 mM の MNU で、 37°C, 30 分間処理した DNA を共存させると、効率よく *ada* プロモーターからの転写が促進される。メチル化剤として MMS を用いた場合には、MNU に比べて *ada* プロモーターの転写促進活性は弱い。これに対して、MeI の場合には、MMS と同じ条件で DNA を処理しても *ada* プロモーターからの転写は促進されず、MeI は DNA のメチル化を介して *ada* 遺伝子の転写を促進しないことが明らかとなった。

次に、Ada タンパク質を直接メチル化したときの *ada* 遺伝子の転写促進活性を測定した。 Table 2

Table 2. Methyltransferase and transcription-promoting activities of Ada protein treated with methylating agents (Takahashi *et al.*, 1988b)

Ada protein treated with	MGTase activity (%)	Relative transcription level
None (control)	100	1.0
MNU		
5 mM	85	1.2
10 mM	57	1.2
20 mM	16	1.2
MMS		
0.15 mM	63	20.5
0.30 mM	52	36.1
0.60 mM	31	82.1
MeI		
0.02 mM	66	5.0
0.04 mM	42	8.0
Incubated with MNU-treated DNA		88.2

には、転写物のオートラジオグラムをデンストメーターで定量した結果を示す。ここでは、 *ada* プロモーターからの転写量は、 *lacUV5* プロモーターからの転写量に対する相対値で示してある。一方、MNU で Ada タンパク質をメチル化しても、 *ada* プロモーターからの転写は促進しない。しかし、MeI で Ada タンパク質をメチル化したときには、弱いながらも *ada* プロモーターからの転写を促進した。MNU と MeI の中間の反応性を示す MMS で処理した場合には、Ada タンパク質は *ada* プロモーターからの転写を強く促進し、 *ada* 遺伝子の転写量は MNU 処理した DNA 共存下の場合と同程度であった。このように、Ada タンパク質はメチル化剤で直接メチル化されても、 *ada* 遺伝子の転写促進因子として活性化された。特に、変異原性の弱い MeI が適応応答を誘導するには今までに知られているような DNA のメチル化を介するのではなく、Ada タンパク質を直接メチル化して Ada タンパク質を転写促進因子として活性化することにより適応応答を誘導する新しい機構が存在することを明らかになった。しかし、MMS の場合には変異原性を示すことから、細胞内ではどちらの経路で適応応答が誘導されるかは今のところ明確ではない。

MeI の Ada タンパク質上の作用部位に関しては、今のところ明らかとなっていない。転写調節

機能には Ada タンパク質の C 末端が重要であることが知られており (Shevell *et al.*, 1988), その部分への非特異的なメチル化が Ada タンパク質の活性化に参与する可能性が考えられる。

### 3. 金属イオンの変異増強作用とその分子機構

金属イオンはタンパク質に配位することが知られており、ある種のタンパク質では活性発現に金属イオンが配位することが必須なものがある。一方、金属イオンが動物に癌を誘発させる可能性については古くから検討され、疫学的調査研究によりヒトに対しても発癌性が結論付けられているものもある。しかし、多くの金属イオンは微生物や哺乳動物培養細胞を用いた変異原性試験では遺伝子傷害性を示さず、金属イオンによる発癌の機構については不明な点が多い。

我々は、15 種類の金属イオンについて *ada*'-*lacZ* 融合遺伝子を用いて *ada* 遺伝子の発現に対する影響を検討した。これらの金属イオンのうち、Fig. 5 に示すように、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> は MNU による *ada* 遺伝子の発現を阻害したが、 *ada* 遺伝子とは異なった機構で制御されている *umuC* 遺伝子の発現は阻害せず、むしろ、わずかに促進した。高濃度の Hg<sup>2+</sup> では *ada* 遺伝子、 *umuC* 遺伝

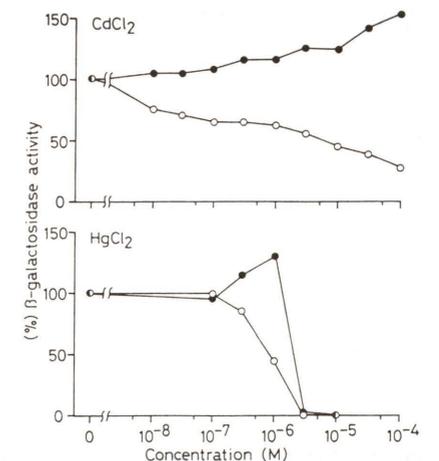


Fig. 5. Effect of CdCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub> on  $\beta$ -galactosidase activity induced by 0.5 mM MNU.

The procedure is as described in Fig. 1. (○) in *E. coli* CSH26/pYM3 carrying *ada*'-*lacZ* gene; (●) in CSH26/pSK1002 carrying *umuC*'-*lacZ* gene.

Table 3. Effect on induction of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in *E. coli* AB1157 (Takahashi *et al.*, 1991)

Concentration (M)		Activity (units/mg protein)
Unadaptive Control		0.744
CdCl <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>-8</sup>	16.314 (100.0%)
	1 × 10 <sup>-7</sup>	17.072 (104.6%)
	1 × 10 <sup>-6</sup>	16.172 (99.1%)
	1 × 10 <sup>-5</sup>	15.308 (93.8%)
	1 × 10 <sup>-4</sup>	10.505 (64.4%)
HgCl <sub>2</sub>	1 × 10 <sup>-4</sup>	5.921 (36.6%)
	1 × 10 <sup>-7</sup>	13.914 (85.3%)
	3 × 10 <sup>-7</sup>	10.798 (66.2%)
	1 × 10 <sup>-6</sup>	8.932 (54.7%)

Values in parentheses are the percent of the control value obtained without metal ions.

子のいずれの発現も抑制されているが、これは Hg<sup>2+</sup> の細胞毒性により増殖が抑制されたためである。このように、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> が大腸菌でのメチル化剤による適応応答の誘導を阻害する可能性が示されたので、適応応答の key enzyme である MGTase 活性に対する影響について検討した (Table 3)。大腸菌 AB1157 株を 0.5 mM MNU の存在下で 37°C、2 時間培養すると、MGTase 活性は約 22 倍増加する。この時に Cd<sup>2+</sup> または Hg<sup>2+</sup> が共存すると MGTase の誘導合成が濃度依存的に抑制され、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> が適応応答の誘導を阻

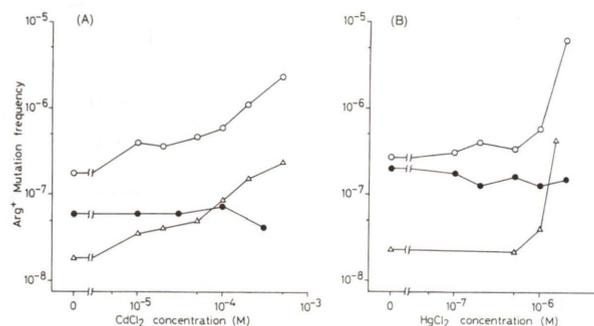


Fig. 6. Effect of CdCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub> on MNU-induced mutagenesis in *E. coli* K-12 strains (Takahashi *et al.*, 1991).

Cells were grown at 37°C for 4 h in K medium containing various concentrations of metal ion, as well as MNU. The numbers of surviving cells and Arg<sup>+</sup> revertants formed in the reaction mixture were measured. (A) CdCl<sub>2</sub>: The concentrations of MNU were 0.5 mM for AB1157 (○) and TK712 (△) strains and 5 μM for PJ5 (●) strain. (B) HgCl<sub>2</sub>: The procedure and symbols are as described in (A), except that the concentration of MNU for the PJ5 strain was 10 μM.

害していることが明らかとなった。そこで、これらの金属イオンの MNU の変異誘発作用に対する影響について検討した (Fig. 6)。ここでは変異原性試験として、大腸菌試験株を MNU の存在下、K 培地中で 37°C、2 時間培養し、この間に生成した復帰変異菌数を測定する方法を用いた (Takahashi *et al.*, 1988b; 1991)。Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup> いずれも、大腸菌 AB1157 株において MNU による変異誘発頻度を濃度依存的に増加させた。また、SOS 依存の変異を誘発することのできない TK712 (*umuC36*) 株でも MNU による変異誘発頻度を増加させた。しかし、適応応答を誘導することのできない PJ5 (*ada-5*) 株では、MNU に対して高感受性であるが、変異誘発頻度を増加することができなかった。以上の結果より、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> はメチル化剤による適応応答の誘導を阻害し、メチル化剤の変異誘発性を特異的に増強することを結論するに至った。なお、Fig. 5 において、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> が MNU による *umuC* 遺伝子の発現を促進したのは、*ada* network に属する酵素の誘導合成が抑制された結果、MNU による DNA 損傷が修復されずに残り、*umuC* 遺伝子の発現が高まったものと考えられる。

Scicchitano and Pegg (1987) と Bhattacharyya ら (1988) は、大腸菌、ラット肝臓、あるいはヒト胎盤から部分精製した MGTase に対する金属イ

Table 4. Effect on MNU-induced mutagenesis in adapted *E. coli* AB1157 (Takahashi *et al.*, 1991)

Concentration (M)	Arg <sup>+</sup> revertants/10 <sup>7</sup> survivors	
	in unadapted cells	in adapted cells
CdCl <sub>2</sub>	0	54.9
	5 × 10 <sup>-5</sup>	107.0
	1 × 10 <sup>-4</sup>	93.7
	2 × 10 <sup>-4</sup>	136.6
HgCl <sub>2</sub>	0	67.9
	2 × 10 <sup>-7</sup>	77.8
	5 × 10 <sup>-7</sup>	112.0
	1 × 10 <sup>-6</sup>	305.2

*E. coli* K-12 AB1157 cells were pretreated with 0.5 mM Mel at 37°C for 90 min in K-medium. After incubation of the cells with MNU at 37°C for 4 h in K-medium, the number of surviving cells and Arg<sup>+</sup> revertants formed in the reaction mixture were measured.

オンの阻害作用について検討した。その結果、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> を含む数種類の金属イオンが MGTase のメチル基受容部位であるシステイン残基の SH 基に金属イオンが可逆的に結合し、MGTase 活性を阻害することを報告している。従って、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> による適応応答の誘導の阻害作用は MGTase 活性の阻害に起因している可能性が推測できる。大腸菌での適応応答の誘導阻害がこの作用機構によるとすると、MGTase 活性が高い大腸菌では MGTase 活性の低い菌に比べ変異増強作用が強く現れることが予想される。そこで、適応応答を誘導して MGTase 活性を高めた大腸菌 AB1157 株に対する Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> の変異増強作用を検討した。ここでは適応応答を誘導するメチル化剤として、前述した変異原性が極めて弱く、効果的に適応応答を誘導することができるヨウ化メチルを用いた。Table 4 に示すように、ヨウ化メチルで前処理した大腸菌 (adapted cells) では、非処理の大腸菌 (unadapted cells) に比べ、MNU に対して抵抗性となった。ところが、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> の変異増強作用は unadapted cells で見られ、adapted cells では MNU による変異誘発頻度をわずかに増加したにすぎなかった。以上の結果は、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> が Ada タンパク質の MGTase 活性を阻害しているのではなく、転写促

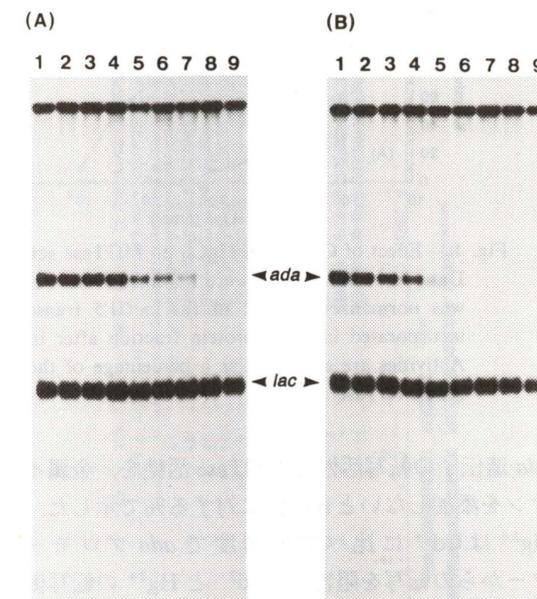


Fig. 7. Effects of CdCl<sub>2</sub> and HgCl<sub>2</sub> on formation of *ada* and *lacUV5* transcripts in the reconstituted system (Suzuki *et al.*, 1991).

The transcription reaction was performed in the presence of (A) CdCl<sub>2</sub> (0, 1, 3, 6, 10, 30, 100, 300 pmol, lane 1-8, respectively) and (B) HgCl<sub>2</sub> (0, 1, 3, 6, 10, 30, 100, 300 pmol, lane 1-8, respectively). In lane 9, the reaction was performed in the absence of methylated DNA.

進活性を阻害していることを示していると考えられる。このことを実証するために、精製タンパク質を用いた *in vitro* 実験系により、Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> の *ada* 遺伝子の転写活性に対する作用と MGTase 活性に対する作用を比較した。

まず、前章で述べた試験管内転写再構成系を用い、*ada* 遺伝子の転写に及ぼす影響について検討した。Fig. 7 には、*ada* 転写物と *lacUV5* 転写物をポリアクリルアミドゲルにより分離し、オートラジオグラフィーを行った結果を示す。Cd<sup>2+</sup> と Hg<sup>2+</sup> はともに、*lacUV5* プロモーターからの転写は阻害せず、*ada* プロモーターからの転写を濃度依存的に阻害した。これを定量的に比較するために、オートラジオグラフィー上のそれぞれの転写物のバンドの強度をデンストメーターで定量し、*ada* 転写量を RNA polymerase ホロ酵素だけで転写される *lacUV5* 遺伝子の転写量で補正した値を求めた (Takahashi *et al.*, 1992)。Fig. 8 には、

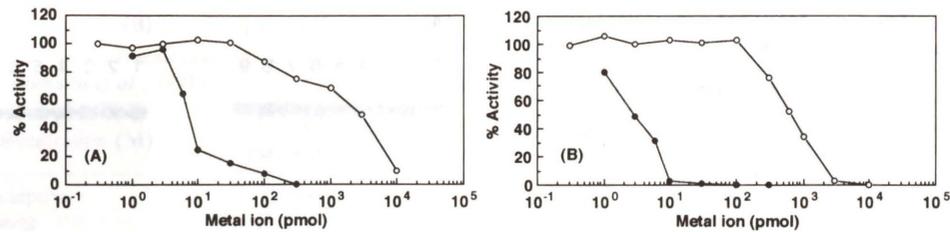


Fig. 8. Effect of  $\text{CdCl}_2$  and  $\text{HgCl}_2$  on MGTase activity and *ada* transcription (Suzuki *et al.*, 1991). Data for transcription were obtained from autoradiogram shown in Fig. 7. The *ada* transcription level was normalized to that of the *lacUV5* transcript. MGTase activity was quantitated by radioactivity incorporated into the protein fraction after incubation of the Ada protein with [ $^3\text{H}$ ]methylated DNA. Activities are expressed as a percentage of the control. (A)  $\text{CdCl}_2$ , (B)  $\text{HgCl}_2$ : (●) *ada* transcription, (○) MGTase activity.

*ada* 遺伝子の転写活性と MGTase 活性を、金属イオンを添加しないときの値に対する%で示した。 $\text{Hg}^{2+}$  は  $\text{Cd}^{2+}$  に比べて低濃度で *ada* プロモーターからの転写を阻害し、 $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Hg}^{2+}$  の転写促進活性に対する  $\text{ED}_{50}$  値は、それぞれ 8, 3 pmol/tube であった。MGTase 活性に対しては、 $\text{Cd}^{2+}$  は 100 pmol/tube 以上の濃度で濃度依存的に阻害したが、MGTase 活性を全く阻害しない濃度 (30 pmol/tube) においても *ada* プロモーターからの転写を約 80% 阻害した。同様に、 $\text{Hg}^{2+}$  も 300 pmol/tube 以上の濃度で MGTase 活性を濃度依存的に阻害したが、MGTase 活性を全く阻害しない濃度 (30 pmol/tube) においても *ada* プロモーターからの転写を 100% 阻害した。以上の結果は、 $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Hg}^{2+}$  はメチル化 Ada タンパク質の転写促進活性を阻害して、適応応答の誘導を阻害していることを示すものである。また、 $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Hg}^{2+}$  の *ada* 遺伝子の転写促進活性に対する  $\text{ED}_{50}$  が、Ada タンパク質に対してそれぞれ 4 等量, 1.5 等量であり、これらの金属イオンが極めて効果的にメチル化 Ada タンパク質の転写促進活性を阻害していることを示している。

メチル化された Ada タンパク質は、*ada* プロモーター領域上で RNA polymerase と転写開始複合体を形成するが、その DNA 上の結合部位は DNase I フットプリント法により解析されている (Sakumi and Sekiguchi, 1989)。Ada タンパク質の *ada* 遺伝子の転写促進活性の阻害機構を検討する目的で、転写開始複合体形成に対する  $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Hg}^{2+}$  の効果を DNase I フットプリント法により

検討した。*ada* プロモーター領域を含む DNA 断片を  $^{32}\text{P}$  で標識し、DNase I で DNA を部分消化し、その生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離後、オートラジオグラフィを行った。Fig. 9 には、 $\text{Hg}^{2+}$  の転写開始複合体の形成に対する影響を、DNase I フットプリント法により解析した結果を示す。メチル化 Ada タンパク質により -62 から -50, -48 から -41, -36 から -31 の領域が DNase I 消化から保護された (Fig. 9, lane 2)。メチル化 Ada タンパク質と共に RNA polymerase を加えると結合領域は広がり、-66 から -3 の広範囲の領域が DNase I 消化から保護された (Fig. 9, lane 8)。10 pmol, 30 pmol の  $\text{Hg}^{2+}$  の存在下では、メチル化 Ada タンパク質により保護される領域には変化はないが、-49 と -50 のバンドの強度が増大した (Fig. 9, lane 2-4)。この濃度の  $\text{Hg}^{2+}$  でメチル化 Ada タンパク質と RNA polymerase の両方を加えた場合には、-49 と -50 のバンドの強度はさらに増大した。100 pmol 以上の濃度では、メチル化 Ada タンパク質の *ada* プロモーター領域への結合は阻害され、RNA polymerase も結合できなくなっている。Fig. 10 には、 $\text{Cd}^{2+}$  の転写開始複合体の形成に対する影響を解析した結果を示す。 $\text{Hg}^{2+}$  と同様に、 $\text{Cd}^{2+}$  の場合も 30 pmol 以下の濃度ではメチル化 Ada タンパク質の存在下で -49 と -50 のバンドの強度が増大し、RNA polymerase を加えることによりこれらのバンドの強度がさらに増大した。100 pmol 以上の濃度では、メチル化 Ada タンパク質の *ada* プロモーター領域への結合は阻害され、RNA

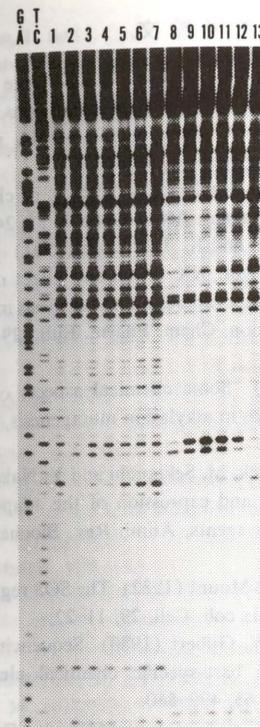


Fig. 9. Effect of  $\text{HgCl}_2$  on binding of methylated Ada protein and RNA polymerase to the *ada* promoter sequence.

DNase I footprinting was performed as described by Sakumi and Sekiguchi (1989): 0.1 pmol of 176 bp *ada* promoter DNA fragment, labeled at the 3' end, were incubated with 0.6 pmol of the methylated Ada protein together with 1 pmol *E. coli* RNA polymerase at 37°C for 30 min, and then treated with 20 ng of DNase I at 22°C for 30 s. The sample were analyzed by denaturing 12% polyacrylamide gel electrophoresis. Positioned numbers at the right site of the gel pattern correspond to base numbered from the transcription initiation site (Nakabeppu and Sekiguchi, 1986). The -10 and -35 boxes are indicated by hatched boxes, and *ada* regulatory sequence (AAAGCGCA) by an open box. Filled boxes indicate the regions protected by methylated Ada protein and RNA polymerase (right) in the absence of metal ion. G·A and T·C show the sequence determined by the Maxam and Gilbert (1980) method. Lane 1, no protein; lanes 2-7, methylated Ada protein with 0, 10, 30, 100, 300, 1000 pmol  $\text{HgCl}_2$ , respectively; lanes 8-13, methylated Ada protein and RNA polymerase with 0, 10, 30, 100, 300, 1000 pmol  $\text{HgCl}_2$ , respectively.

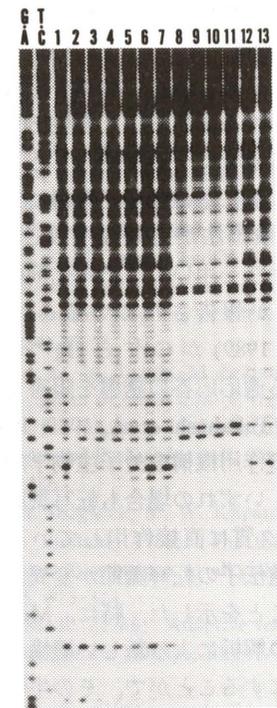


Fig. 10. Effect of  $\text{CdCl}_2$  on binding of methylated Ada protein and RNA polymerase to the *ada* promoter sequence.

The procedure and symbols are as described in Fig. 9. Lane 1, no protein; lanes 2-7, methylated Ada protein with 0, 10, 30, 100, 300, 1000 pmol  $\text{CdCl}_2$ , respectively; lanes 8-13, methylated Ada protein and RNA polymerase with 0, 10, 30, 100, 300, 1000 pmol  $\text{CdCl}_2$ , respectively.

polymerase も結合できなくなっている。以上の結果より、 $\text{Cd}^{2+}$  と  $\text{Hg}^{2+}$  はいずれも 100 pmol 以上の濃度においては、Ada タンパク質に作用して、その *ada* プロモーター領域への結合を阻害し、その結果、転写開始複合体の形成をすることが明らかとなった。また、30 pmol 以下の濃度では、メチル化 Ada タンパク質の *ada* プロモーター領域への結合そのものは顕著には阻害されていないが、正常とは異なった様式で *ada* プロモーター領域に結合し、転写を開始できる複合体が形成されないものと考えられる。

#### 4. おわりに

以上のように、大腸菌を用いて変異原性の弱い

メチル化剤であるヨウ化メチルが適応応答を強く誘導すること、金属イオンのうち  $Cd^{2+}$  と  $Hg^{2+}$  がメチル化剤による適応応答の誘導を阻害してメチル化剤の変異原性を高めることを見出し、その作用機構に関する研究について紹介した。本研究では、修復酵素の遺伝子の発現を指標にした適応応答の誘導能の検出法が有効な手段となった。我々は、同様の手法を用いてメチル化剤の変異原性を高めることが報告されている *o*-バニリン (Watanabe *et al.*, 1989) が  $Cd^{2+}$  と  $Hg^{2+}$  と同様にメチル化剤による適応応答の誘導を阻害することを明らかにした (Takahashi *et al.*, 1989; 1990)。

また、これらの作用機構を分子生物学的手法を用いて検討した。いずれの場合も転写調節因子である Ada タンパク質に直接作用していることが明らかとなり、遺伝子の転写調節が変異誘発の重要な因子であることを示した。特に、MeI による適応応答の誘導の解析により新しい機構が存在することを明らかにすることができ、その生物学的意義が大きいものであった。今後、これらの作用機構をタンパク質レベルで詳細に解析することにより、Ada タンパク質の転写促進因子としての活性化機構を解明することができる可能性が期待できる。環境変異原研究において、分子生物学的手法を用いた作用機構の解析が広く行われることを望んでいる。

## 謝 辞

今回の日本環境変異原学会奨励賞の受賞は多くの方々のご協力によるものでありますが、終始御指導下さいました名古屋市立大学薬学部・川添豊教授と九州大学生医研・関口睦夫教授の御理解と御協力なくして成し遂げることができなかったものであり、深く感謝いたします。また、共同研究者である名古屋市立大学薬学部・今枝孝夫修士、鈴木任博士、九州大学生医研・関口睦夫教授、中別府雄作博士、作見邦彦博士と、本研究に対して多くの助言と激励をいただきました国立衛生試験所変異遺伝部・能美健彦博士に深く感謝いたします。

## 参考論文

- Bhattacharyya, D., A. M. Boulden, R. S. Foote and S. Mitra (1988) Effect of polyvalent metal ions on the reactivity of human  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase, *Carcinogenesis*, **9**, 683-685.
- Hemminki, K. (1983) Nucleic acid adducts of chemical carcinogens and mutagens, *Arch. Toxicol.*, **52**, 249-285.
- Kawazoe, Y., M. Kato and K. Takahashi (1981) Studies on chemical carcinogens. XX. Inhibitory effect of alkyl isocyanates and isothiocyanates on mutagenesis in *E. coli* by ultraviolet radiation, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2631-2638.
- Lawley, P. D. (1974) Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis, *Mutat. Res.*, **23**, 283-295.
- Lindhal, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents, *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 233-157.
- Little, J. W. and D. W. Mount (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*, *Cell*, **29**, 11-22.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages, *Methods Enzymol.*, **65**, 499-560.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Nakabeppu, Y., H. Kondo, S. Kawabata, S. Iwanaga and M. Sekiguchi (1985) Purification and structure of the intact Ada regulatory protein of *Escherichia coli* K12,  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 7281-7288.
- Nakabeppu, Y. and M. Sekiguchi (1986) Regulatory mechanisms for induction of synthesis of repair enzymes in response to alkylating agents: Ada protein acts as a transcriptional regulator, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **83**, 6297-6301.
- Oda, Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa (1985) Evaluation of the new system (*umu*-test) for detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutation Res.*, **147**, 219-229.
- Otsuka, M., Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1985) Ability of various alkylating agents to induce adaptive and SOS responses: a study with *lacZ* fusion, *Mutat. Res.*, **146**, 149-154.
- Quillardet, P., O. Huisman, R. D'ari and M. Hofnung (1982) SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **79**, 5971-5975.
- Sakumi, K. and M. Sekiguchi (1989) Regulation of expression of the *ada* gene controlling the adaptive response: interaction with the *ada* promoter of the Ada protein and RNA polymerase, *J. Mol. Biol.*, **205**, 373-385.
- Samson, L. and J. Cairns (1977) A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*, *Nature*, **267**, 281-283.
- Scicchitano, D. A. and A. E. Pegg (1987) Inhibition of  $O^6$ -alkylguanine-DNA-alkyltransferase by metals, *Mutat. Res.*, **192**, 207-210.
- Sekiguchi, M. and Y. Nakabeppu (1987) Adaptive response: induced synthesis of DNA repair enzymes by alkylating agents, *Trends Genet.*, **3**, 51-54.
- Shevell, D. E., P. K. LeMotte and G. C. Walker (1988) Alteration of the carboxyl-terminal domain of Ada protein influences its inducibility, specificity, and strength as a transcriptional activator, *J. Bacteriol.*, **170**, 5263-5271.
- Suzuki, M., K. Takahashi, Y. Kawazoe, K. Sakumi and M. Sekiguchi (1991) Inhibitory effect of cadmium and mercury ions on transcription of the *ada* gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **179**, 1517-1521.
- Takahashi, K. and Y. Kawazoe (1987a) Methyl iodide, a potent inducer of the adaptive response without appreciable mutagenicity in *E. coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 447-453.
- Takahashi, K. and Y. Kawazoe (1987b) Potent induction of the adaptive response by a weak mutagen, methyl iodide, in *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, **180**, 163-169.
- Takahashi, K., Y. Kawazoe, K. Sakumi, Y. Nakabeppu and M. Sekiguchi (1988a) Activation of Ada protein as a transcriptional regulator by direct alkylation with methylating agents, *J. Biol. Chem.*, **263**, 13490-13492.
- Takahashi, K., T. Imaeda and Y. Kawazoe (1988b) Effect of metal ions on the adaptive response induced by *N*-methyl-*N*-nitrosourea in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 1124-1130.
- Takahashi, K., M. Sekiguchi and Y. Kawazoe (1989) A specific inhibition of induction of adaptive response by *o*-vanillin, a potent comutagen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 1376-1381.
- Takahashi, K., M. Sekiguchi and Y. Kawazoe (1990) Effects of vanillin and *o*-vanillin on induction of DNA-repair networks: modulation of mutagenesis in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **230**, 127-134.
- Takahashi, K., T. Imaeda and Y. Kawazoe (1991) Inhibitory effect of cadmium and mercury ions on induction of the adaptive response in *Escherichia coli*, *Mutation Res.*, **254**, 45-53.
- Takahashi, K., M. Suzuki, M. Sekiguchi and Y. Kawazoe (1992) Effect of metal ions on transcription of the *ada* gene which encodes  $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase of *Escherichia coli*, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2483-2486.
- Teo, I., B. Sedgwick, M. W. Kilpatrick, T. V. McCarthy and T. Lindahl (1986) The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*, *Cell*, **45**, 315-324.
- Volkert, M. R. (1988) Adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage, *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 241-255.
- Walker, G. C. (1985) Inducible DNA repair system, *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 25-57.
- Watanabe, K., T. Ohta and Y. Shirasu (1989) Enhancement and inhibition of mutation by *o*-vanillin in *Escherichia coli*, *Mutat. Res.*, **218**, 105-109.

## Micronuclei Induction of Methyl Bromide in Rats and Mice by Sub-chronic Inhalation Toxicity Test

Akihiro Araki, Fumiyo Kato, Taijiro Matsushima,  
Naoki Ikawa and Kosuke Nozaki

Japan Bioassay Laboratory, Japan Industrial Safety and Health Association,  
Hirasawa, Hadano, Kanagawa, 257, Japan

(Received: September 30, 1994; Accepted: February 16, 1995)

### Summary

Micronuclei induction of methyl bromide was examined on BDF<sub>1</sub> mice and F344 rats in the sub-chronic inhalation test which was performed as preliminary dose finding study on the carcinogenicity test. Concentrations of methyl bromide were 0, 154, 200, 260, 338 and 440 ppm, and the duration of the exposure was 6 hours per day, 5 days per week for 2 weeks (10 exposures). In mice, polychromatic erythrocytes with micronuclei in the bone marrow were induced 0.62% (2.6-fold higher than that of the control) in males of 154 ppm, 0.58% (5.8-fold) in females of 154 ppm and 2.51% (10.5-fold) in males of 200 ppm, and those in peripheral blood were induced 0.28% (4.0-fold) in males at 154 ppm, 1.03% (2.6-fold) in females at 154 ppm and 2.28% (32.6-fold) in males of 200 ppm as a result of this treatment. In rats, polychromatic erythrocytes containing micronuclei in the bone marrow were induced 0.26% (13.7-fold) in males of 338 ppm and 0.08% (2.7-fold) in females of 338 ppm on this treatment.

**Keywords:** methyl bromide, micronucleus test, bone marrow, peripheral blood, sub-chronic inhalation test

### Introduction

Methyl bromide (CAS registry number 74-83-9) is widely used for fumigation of crops, storehouses and soil. It is gas with a melting point of  $-93^{\circ}\text{C}$ , and a boiling point of  $4.6^{\circ}\text{C}$ . Short-term tests of mutagenicity on methyl bromide reported positive results in fluctuation test using *Klebsilla pneumonia* (Kramers *et al.*, 1985), plate test using *Salmonella typhimurium* TA100 (Kramers *et al.*, 1985), gas exposure test using *S. typhimurium* TA100 (Simmon *et al.*, 1977) and using *S. typhimurium* TA100, TA 1535 and *Escherichia coli* WP2uvrA (Moriya *et al.*, 1983), forward mutation test on the TK and HGPRT locus in L5178Y mouse lymphoma cells (Kramers *et al.*, 1985), and in sex-linked recessive lethal test using *Drosophila melanogaster* (Kramers *et al.*, 1985), and negative result in unscheduled DNA synthesis test in primary rat-liver cells (Kramers *et al.*, 1985). Methyl bromide induced squamous cell carcinomas in the forestomach of rats treated by oral gavage (Danse *et al.*, 1984). How-

ever methyl bromide was not tested in the *in vivo* mutagenicity study by the inhalation method. We performed a sub-chronic toxicity study of methyl bromide by inhalation method in order to find the doses of a two-year carcinogenicity study. Schelegel and MacGregor report that bone marrow and peripheral blood micronucleus test integrated with sub-chronic toxicity studies of several compounds such as triethylenemelamine and nitrogen mustard (Schelegel and MacGregor, 1982; MacGregor *et al.*, 1983a). Therefore, we examined whether the methyl bromide induced micronuclei containing erythrocytes in this sub-chronic inhalation toxicity study. We report that methyl bromide induced micronuclei containing erythrocytes in the bone marrow and peripheral blood.

### Materials and Methods

#### Materials

Methyl bromide (Monobromomethane, MB; purity of more than 99%) was obtained from Taiho

Sangyo Co., Yokohama, Japan, May-Grünward Giemsa solution, a commercial product, from Merck, Darmstadt, West Germany, Wright solution, which was used for Hematrack hematomorphology analyzer, from Sakuraseiki Co., Tokyo, Japan, and methylgreen pyronine solution was from Muto Kagaku Co., Tokyo, Japan.

#### Gas exposing systems

Gas exposing chambers, control systems for gas concentration and recording systems for concentration were designed by Japan Bioassay Laboratory, Hadano, Japan. The size of housing without hopper, and inner volume including hopper, of the stainless steel gas exposing chambers were W1250/D950/H607 mm and 1.06 m<sup>3</sup> for rats and W910/D700/H605 mm and 0.52 m<sup>3</sup> for mice. Ventilation of air in the chamber with fresh air was 15 times per hour.

The test substance gas was released from a cylinder to a mixing vessel and mixed with air. Diluted test substance gas was further diluted with fresh air, which was HEPA-filtered and temperature and humidity controlled, and blown into the gas exposing chamber. Gas concentrations in the chambers were controlled by changing the ratio of volume of diluted test substance gas and fresh air. Gas concentrations in the chambers were examined by gas chromatograph analysis every 15 minutes during the exposure period. Samples of the chamber atmosphere was taken with an automatic sampling system and analyzed with a Shimadzu® Model GC-8AIF gas chromatograph analyzer with a flame ionization detector. Samples were chromatographed isothermally at 70°C on a 3 m × 3 mm I.D. stainless steel column packed with 20% DC-200 liquid phase on a 60/80 mesh chromosorb W solid phase.

Gas concentration in the chamber was reached at the target concentration for 10 minutes after the beginning of exposure and gas concentration in the chamber was controlled within ±5% to the target concentration during the exposure period. At the end of the exposure, the test substance gas in the chamber was quickly replaced with fresh air.

#### Animals

Male and female BDF<sub>1</sub> mice and F344 rats were purchased from Charles River Japan, Inc., Atsugi, Japan. Animals were introduced at 4 weeks old and then 6 weeks old (body weights of male mice were 23.6–25.8 g, female mice were 18.0–20.4 g, male rats

were 121–142 g and female rats were 96–108 g), were used for the sub-chronic toxicity study after one week of quarantine in animal rooms (temperature; 22 ± 1°C, relative humidity; 60 ± 5%, lighting condition; 12L:12D, Ventilating condition; 15–17 times/hour) and one week of acclimatization for the inhalation chamber (temperature; 23–26°C, relative humidity; 45–70%, lighting condition; 12L:12D, Ventilating condition; 15 times/hour). The animals were randomly allocated to each group and ten male and 10 female animals were housed individually in hanging wire-net cages located in the exposure chamber. Pellet diet (CRF-1, Oriental Yeast Co., Chiba, Japan) and water were given to animals ad libitum except during the exposure period.

#### Methods

The sub-chronic toxicity study of methyl bromide was performed after the single-exposure study in order to determine the concentration of the thirteen-week study and the two-year carcinogenicity study. In single exposure studies in rats, all males and females in the groups of 760 ppm and higher doses died by the 15th day after single exposure. The 506 ppm, 338 ppm and 225 ppm concentrations induced the pathological changes in the nasal cavity. In single-exposure studies in mice, almost all males and females exposed at 506 ppm and higher doses died until 15th day after exposure. The 338 ppm concentration induced the pathological changes in the nasal cavity. The maximum exposure concentration of 440 ppm was selected for the sub-chronic toxicity study, and concentrations of methyl bromide in the sub-chronic toxicity study were performed at 0, 154, 200, 260, 338 and 440 ppm, and ten 6-week-old male and female mice and rats were used for each concentration. Animals of test groups were exposed to air containing methyl bromide and control groups (0 ppm) were exposed to fresh air. Durations of exposure were 6 hours per day and 5 days per week for 2 weeks (10 exposures). All animals were observed during the exposure period, and clinical signs, deaths and body weights were recorded.

Animals surviving 2 weeks' inhalation of methyl bromide were anesthetized with diethyl ether and killed by phlebotomy on the 15th day. At the time of phlebotomy, peripheral blood was collected from descending aortas into test tubes with EDTA-2K and smears were prepared. After the observation and sampling of tissues, remaining femurs were used for micronucleus observation. Bone marrow cells of

mice and rats were collected from femurs and smears were prepared by the Schmid method (Schmid, 1975). Peripheral blood smears were prepared from 6 male and 8 female mice in control groups, 7 male and 8 female mice in 154 ppm groups and 4 male and 2 female mice in 200 ppm groups. Bone marrow smears were prepared from 5 male and 5 female mice and 5 male and 5 female rats in control groups, 5 male and 5 female mice and 5 male and 5 female rats in 154 ppm groups, 5 male and 4 female mice and 5 male and 5 female rats in 200 ppm groups, 5 male and 5 female rats in 260 ppm groups, and 5 male and 3 female rats in 338 ppm groups. However, bone marrow smears from one female mouse and one female rat in control groups were lost accidentally and bone marrow smears from 3 female mice in 200 ppm group could not be prepared because of a decrease in bone marrow cells by toxicity of methyl bromide.

Slides of bone marrow cells of mice were stained by May-Grünward and Giemsa solution according to the following method. Slides were treated with 100% May-Grünward solution for 3 min. and treated with 50% May-Grünward solution for 2 min and rinsed with water for 10 sec. and then slides were treated with 14% Giemsa solution (pH 6.8) for 10 min. After staining, slides were washed with water, and dehydrated with 95% and 100% ethanol for a few min. Slides were then treated with xylene and mounted with cover glass using Eukit (Merck, Co., Darmstadt, West Germany). Methyl green pyronine stain was used in order to count micronuclei containing erythrocytes in rats' bone marrow cells, because May-Grünward Giemsa stain could not distinguish between granule and micronuclei in the erythrocytes. However, slides were stained by May-Grünward and Giemsa solution to determine the ratio of polychromatic erythrocytes and normochromatic erythrocytes. Slides were treated with 100% methyl green pyronine solution for 20 min. After staining, slides were treated with 95% and 100% isopropanol for few seconds and dried. Slides were then treated with xylene and mounted with cover glass using Eukit. In this step, staining of bone marrow smears from one male rat in 154 ppm and 200 ppm groups failed because freshly prepared bone marrow smears were not used. Slides of peripheral blood of mice were stained by Wright solution (which were the same slides for the hematomorphology analysis) according to the following method. Slides were treated with 100% Wright

solution for 2 min and treated with 50% Wright solution (pH 7.2) for 5 min and rinsed with water for 10 sec and then slides were washed with buffer pH 7.2 and dried. Micronuclei induction of peripheral blood in the rats was not tested because the micronuclei containing erythrocytes are eliminated by the spleen of rats.

In bone marrow, polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) were scored until the number of PCE reached 1000 or more for each animal, and the ratio of PCE/NCE was determined. Micronuclei containing polychromatic erythrocytes (MNPCE) in PCE and micronuclei containing normochromatic erythrocytes (MNNCE) in NCE were also recorded and the incidence of micronuclei induction was obtained. In peripheral blood, at least 500 PCE and 1000 NCE were scored in each animal and the incidence of micronuclei induction and ratio of the PCE to 1000 NCE were obtained.

Statistical analysis was performed between the control group and the exposed group. The incidence of micronuclei induction was evaluated with the Kastenbaum and Bowman method (Kastenbaum and Bowman, 1970). The group means of body weights and PCE/NCE data were evaluated by one-tailed Student t-test.

#### Results

Surviving numbers of mice and rats on the 15th day after the first inhalation (next day of last inhalation) and body weights of animals before inhalation and of surviving animals on the 15th day are shown in Tables 1 and 2.

The body weights were decreased significantly in male mice exposed at 154 ppm and 200 ppm ( $p \leq 0.01$ ) and in female mice exposed at 154 ppm ( $p \leq 0.05$ ) and at 200 ppm ( $p \leq 0.01$ ). In rats, body weight was decreased significantly in males exposed at more than 200 ppm ( $p \leq 0.01$ ) and in females exposed at 154 ppm ( $p \leq 0.05$ ) and at more than 200 ppm ( $p \leq 0.01$ ).

On the 15th day, survivals for male mice were 9/10 (154 ppm), 5/10 (200 ppm) and 1/10 (260 ppm), and for female mice were 10/10 (154 ppm) and 2/10 (200 ppm), and for male rats were 10/10 (154 ppm), 10/10 (200 ppm), 10/10 (260 ppm) and 3/10 (338 ppm), and for female rats were 10/10 (154 ppm), 10/10 (200 ppm), 10/10 (260 ppm) and 9/10 (338 ppm), respectively. All male mice exposed at more than 338 ppm, all female mice exposed at more than 260

Table 1. Survival and body weight of mice in the sub-chronic inhalation study of methyl bromide

Sex	Concentration (ppm)	Survival <sup>b</sup>	Body weight (g) Mean ± S.D.		Weight after inhalation relative to controls (%)
			Before inhalation (0 day)	After inhalation (15th day)	
Male	0 <sup>a</sup>	10/10	24.7 ± 0.7	26.6 ± 1.1	100.0
	154	9/10	24.7 ± 0.7	21.1 ± 1.9**	79.3
	200	5/10	24.7 ± 0.7	16.1 ± 0.8**	60.5
	260	1/10	24.7 ± 0.7	15.8	59.4
	338	0/10	24.6 ± 0.7	—	—
	440	0/10	24.7 ± 0.7	—	—
Female	0 <sup>a</sup>	10/10	19.3 ± 0.9	21.1 ± 1.1	100.0
	154	10/10	19.1 ± 0.7	17.3 ± 3.9*	82.0
	200	2/10	19.1 ± 0.7	13.5 ± 0.5**	64.0
	260	0/10	19.1 ± 0.7	—	—
	338	0/10	19.6 ± 0.3	—	—
	440	0/10	19.1 ± 0.7	—	—

<sup>a</sup>Control (HEPA-filtered air). <sup>b</sup>Number surviving/number initially in group.  
\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  (*t*-test).

Table 2. Survival and body weight of rats in the sub-chronic inhalation study of methyl bromide

Sex	Concentration (ppm)	Survival <sup>b</sup>	Body weight (g) Mean ± S.D.		Weight after inhalation relative to controls (%)
			Before inhalation (0 day)	After inhalation (15th day)	
Male	0 <sup>a</sup>	10/10	130 ± 5	192 ± 5	100.0
	154	10/10	130 ± 5	189 ± 9	98.4
	200	10/10	131 ± 5	176 ± 12**	91.7
	260	10/10	131 ± 5	166 ± 11**	86.5
	338	3/10	131 ± 5	106 ± 2**	55.2
	440	0/10	131 ± 6	—	—
Female	0 <sup>a</sup>	10/10	102 ± 3	132 ± 4	100.0
	154	10/10	102 ± 3	126 ± 6*	95.5
	200	10/10	102 ± 3	123 ± 5**	93.2
	260	10/10	102 ± 3	120 ± 5**	90.9
	338	9/10	102 ± 4	112 ± 6**	84.8
	440	0/10	102 ± 3	—	—

<sup>a</sup>Control (HEPA-filtered air). <sup>b</sup>Number surviving/number initially in group.  
\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  (*t*-test).

ppm, and all male and female rats exposed at 440 ppm died. Lethal concentration of 50% of mice by methyl bromide exposed for 2 weeks was approximately 200 ppm in males and 175 ppm in females. Lethal concentration of 50% of rats by methyl bromide exposed for 2 weeks was approximately 300 ppm in males and 380 ppm in females.

Clinical signs such as decreased locomotor movement, piloerection, lacrymation, bradypnea, opacity of eyes and diarrhea were observed in dead mice and

decreased locomotor movement, bradypnea, ataxic gait, subnormal temperature, tremors, lacrymation, soiled, anemic color, hunchback posture and piloerection were observed in surviving male and female mice of inhalation groups. In rats, decreased locomotor movement, soiled, piloerection, lacrymation, serous or hemorrhagic discharges of the nose, diarrhea, anemic color, hunchback posture and irregular breathing were observed in the groups of more than 338 ppm, and piloerection, soiled and hemorrhagic

discharges of the nose were observed in males and females of 260 ppm group. No clinical signs were observed in male and female rats of 154 ppm and 200 ppm groups (data are not shown).

In the pathological study, degeneration of the granular layer of the cerebellum, tubular necrosis and regeneration of the kidney, extramedullary hematopoiesis and atrophy of the spleen, karyorrhexis of the thymus, necrosis of the heart and necrosis of the olfactory epithelium of the nasal cavity were observed in mice exposed at 200 ppm and higher doses. Tubular necrosis of the kidney, ulcer of the stomach, atrophy of the testis, atrophy of the spleen, atrophy and karyorrhexis of lymph nodes and necrosis of the heart were observed in mice exposed at 154 ppm.

Congestion and hemorrhage of the lungs, congestion, necrosis and fatty change of the liver, tubular necrosis of the kidney, necrosis of the heart, hemorrhage, necrosis and vacuolic change of the adrenal glands, necrosis and respiratory metaplasia of the olfactory epithelium of the nasal cavity, congestion of the thymus and inflammation of the bone marrow were observed in dead rats exposed at 400 ppm. Interstitial pneumonia of the lungs, karyorrhexis of the thymus, myocardial damage of the heart, vacuolic change of the adrenal glands and disarrangement and respiratory metaplasia of the olfactory epithelium of the nasal cavity were observed in rats exposed at 338 ppm. Disarrangement, necrosis and respiratory metaplasia of the olfactory epithelium of the nasal cavity, myocardial damage of the heart and vacuolic change of the adrenal glands were observed in rats at 260 ppm. Disarrangement and respiratory metaplasia of the olfactory epithelium of the nasal cavity and vacuolic change of the adrenal glands were observed in rats at 154 ppm. Disarrangement and respiratory metaplasia of the olfactory epithelium of the nasal cavity were observed in rats at 200 ppm (data are not shown).

The results of micronuclei inductions and ratio of the PCE to NCE on bone marrow of mice are shown in Table 3, and those on peripheral blood of mice are shown in Table 4. The micronuclei inductions on the bone marrow and peripheral blood of mice were increased significantly by exposure to methyl bromide.

In mice bone marrow, MNPCE frequencies of control groups were 0.24 ± 0.18% in males and 0.10 ± 0.11% in females, 154 ppm groups were 0.62 ± 0.25% in males and 0.58 ± 0.33% in females, and

200 ppm group was 2.57 ± 1.11% in males. Inductions of MNPCE were significantly increased 2.6-fold in males ( $p \leq 0.01$ ) and 5.8-fold ( $p \leq 0.01$ ) in females at the concentration of 154 ppm, and 10.7-fold ( $p \leq 0.01$ ) in males at 200 ppm compared to that of the control. Also, MNNCE frequencies of control groups were 0.35 ± 0.19% in males and 0.15 ± 0.17% in females, 154 ppm groups were 0.95 ± 0.30% in males and 0.39 ± 0.13% in females, and the 200 ppm group was 1.76 ± 0.88% in males. Inductions of MNNCE of male mice were significantly increased 5.0-fold ( $p \leq 0.01$ ) at the concentration of 200 ppm and 2.7-fold ( $p \leq 0.01$ ) at the concentration of 154 ppm compared to that of the control.

In mice peripheral blood, MNPCE frequencies of control groups were 0.07 ± 0.10% in males and 0.40 ± 0.37% in females, 154 ppm groups were 0.28 ± 0.31% in males and 1.03 ± 0.59% in females and 200 ppm groups were 2.28 ± 1.40% in males and 0.67 ± 0.40% in females. Inductions of MNPCE were significantly increased 32.6-fold ( $p \leq 0.01$ ) in males at the concentration of 200 ppm, and 2.6-fold ( $p \leq 0.01$ ) in females at 154 ppm compared to that of the control. Also, MNNCE frequencies of control groups were 0.08 ± 0.07% in males and 0.13 ± 0.11% in females, 154 ppm groups were 0.22 ± 0.23% in males and 0.12 ± 0.10% in females and 200 ppm groups were 0.43 ± 0.21% in males and 0.41 ± 0.02% in females. Inductions of MNNCE were significantly increased 5.4-fold ( $p \leq 0.01$ ) in males at the concentration of 200 ppm compared to that of the control.

In mice, ratios of the PCE to NCE were clearly increased in peripheral blood. Ratios of those were 0.007 ± 0.001 in males and 0.012 ± 0.002 in females at the concentration of 0 ppm, 0.070 ± 0.014 ( $p \leq 0.01$ ) in males and 0.136 ± 0.021 ( $p \leq 0.01$ ) in females at 154 ppm, and 0.100 ± 0.022 ( $p \leq 0.01$ ) in males and 0.111 ± 0.040 ( $p \leq 0.01$ ) in females at 200 ppm. Ratios of PCE to NCE in bone marrow were significantly increased at 154 ppm in males and increased at 200 ppm in females. However, increases in the ratio of the PCE to NCE in bone marrow were not clearly greater than that of peripheral blood.

The results of micronuclei inductions on bone marrow and the ratio of the PCE to NCE on bone marrow of rats are shown in Table 5. The micronuclei inductions on the bone marrow of rats were increased by exposure to methyl bromide. In rats bone marrow, MNPCE frequencies of control

Table 3. The results of the bone marrow micronucleus test in mice

Sex	Concentration (ppm)	MNPCE/PCE <sup>b</sup> [total]	(%) [mean±S.D.]	MNNCE/NCE <sup>c</sup> [total]	(%) [mean±S.D.]	Ration of PCE/NCE [mean±S.D.]
Male	0 <sup>a</sup>	3/1003	(0.30)	3/1017	(0.29)	0.99
		4/1002	(0.40)	5/1097	(0.46)	0.91
		0/1009	(0 )	2/1153	(0.17)	0.88
		1/1012	(0.10)	2/1035	(0.19)	0.98
		4/1006	(0.40)	7/1117	(0.63)	0.90
		[ 12/5032]	[0.24±0.18]	[19/5419]	[0.35±0.19]	[0.93±0.05]
	154	4/1212	(0.33)	7/1040	(0.67)	1.17
		10/1230	(0.81)	13/1017	(1.28)	1.21
		11/1163	(0.95)	8/1132	(0.71)	1.03
		6/1154	(0.52)	10/1184	(0.84)	0.97
		6/1233	(0.49)	13/1025	(1.27)	1.20
		[ 37/5992]**	[0.62±0.25]	[51/5398]**	[0.95±0.30]	[1.12±0.11]**
	200	31/1409	(2.20)	20/1056	(1.89)	1.33
		48/1071	(4.48)	32/1102	(2.90)	0.97
		24/1387	(1.73)	22/1060	(2.08)	1.31
27/1048		(2.58)	17/1195	(1.42)	0.88	
19/1012		(1.88)	6/1183	(0.51)	0.86	
	[149/5927]**	[2.57±1.11]	[97/5596]**	[1.76±0.88]	[1.07±0.23]	
Female	0 <sup>a</sup>	0/1005	(0 )	1/1093	(0.09)	0.92
		0/1016	(0 )	0/1073	(0 )	0.95
		2/1013	(0.20)	4/1027	(0.39)	0.99
		2/1039	(0.19)	1/1012	(0.10)	1.03
			[ 4/4073]	[0.10±0.11]	[ 6/4205]	[0.15±0.17]
	154	3/1087	(0.28)	4/1028	(0.39)	1.06
		9/1022	(0.88)	2/1073	(0.19)	0.95
		10/1022	(0.98)	6/1081	(0.56)	0.95
		3/1005	(0.30)	4/1052	(0.38)	0.96
		5/1043	(0.48)	5/1109	(0.45)	0.94
		[ 30/5180]**	[0.58±0.33]	[21/5343]	[0.39±0.13]	[0.97±0.05]
	200	5/1712	(0.29)	4/1005	(0.40)	1.70

<sup>a</sup>Control (air). <sup>b</sup>Number of micronuclei containing PCE/number of PCE counted. <sup>c</sup>Number of micronuclei containing NCE/number of NCE counted.

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

groups were  $0.02 \pm 0.04\%$  in males and  $0.03 \pm 0.05\%$  in females, 154 ppm groups were  $0.00 \pm 0.00\%$  in males and  $0.04 \pm 0.05\%$  in females, 200 ppm groups were  $0.03 \pm 0.05\%$  in males and  $0.02 \pm 0.04\%$  in females, 260 ppm groups were  $0.04 \pm 0.05\%$  in males and  $0.07 \pm 0.08\%$  in females, and 338 ppm groups was  $0.26 \pm 0.06\%$  in males and  $0.08 \pm 0.08\%$  in females. Inductions of MNPCE were significantly increased 13.0-fold ( $p \leq 0.01$ ) in males at the concentration of 338 ppm. Ratios of the PCE to NCE were significantly increased in female rats at the concentration of 338 ppm. However, ratios of the PCE to NCE were not increased in males.

#### Discussion

Monohalomethanes, such as methyl chloride, methyl bromide and methyl iodide are mutagenic to *Salmonella typhimurium* TA1535 and TA100 (McCann *et al.*, 1975; Andrews *et al.*, 1976; Asher and Zervos, 1977), and the order of relative mutagenic potency was methyl bromide > methyl iodide > methyl chloride (Millar, 1984). Especially, methyl bromide was the most potent compound among these monohalomethanes. In this study, methyl bromide is positive on the *in vivo* mice and rats' bone marrow micronucleus tests.

Concentrations of methyl bromide were 0, 154, 200, 260, 338 and 440 ppm, and the duration of the

Table 4. The results of the peripheral blood micronucleus test in mice

Sex	Concentration (ppm)	MNPCE/PCE <sup>b</sup> [total]	(%) [mean±S.D.]	MNNCE/NCE <sup>c</sup> [total]	(%) [mean±S.D.]	Ration of PCE/NCE [mean±S.D.]
Male	0 <sup>a</sup>	0/500	(0 )	0/1063	(0 )	0.006
		0/500	(0 )	1/1167	(0.09)	0.007
		1/500	(0.20)	2/1085	(0.18)	0.007
		0/500	(0 )	0/1107	(0 )	0.006
		1/500	(0.20)	1/1062	(0.09)	0.009
		[ 2/3000]	[0.07±0.10]	[ 5/6500]	[0.08±0.07]	[0.007±0.001]
	154	0/505	(0 )	2/1041	(0.19)	0.085
		0/512	(0 )	0/1159	(0 )	0.063
		1/522	(0.19)	0/1192	(0 )	0.060
		3/512	(0.59)	7/1093	(0.64)	0.048
		2/503	(0.40)	1/1017	(0.10)	0.074
		[10/3581]	[0.28±0.31]	[17/7863]	[0.22±0.23]	[0.070±0.014]**
	200	20/500	(4.00)	8/1154	(0.69)	0.100
		14/509	(2.75)	5/1075	(0.47)	0.127
		8/506	(1.58)	4/1094	(0.37)	0.073
4/503		(0.80)	2/1129	(0.18)	0.100	
		[46/2018]**	[2.28±1.40]	[19/4452]**	[0.43±0.21]	[0.100±0.022]**
Female	0 <sup>a</sup>	4/501	(0.80)	1/1050	(0.10)	0.013
		0/500	(0 )	1/1068	(0.09)	0.011
		3/511	(0.59)	2/1121	(0.18)	0.014
		1/507	(0.20)	0/1042	(0 )	0.014
		1/503	(0.20)	0/1051	(0 )	0.011
		[16/4040]	[0.40±0.37]	[11/8594]	[0.13±0.11]	[0.012±0.002]
	154	2/502	(0.40)	0/1051	(0 )	0.174
		1/518	(0.19)	1/1038	(0.10)	0.115
		8/538	(1.49)	2/1021	(0.20)	0.148
		4/523	(0.76)	1/1064	(0.09)	0.114
		8/511	(1.57)	2/1096	(0.18)	0.126
		[43/4144]**	[1.03±0.59]	[10/8454]	[0.12±0.10]	[0.136±0.021]**
	200	2/514	(0.39)	5/1192	(0.42)	0.083
		5/529	(0.95)	4/1030	(0.39)	0.139
			[ 7/1043]	[0.67±0.40]	[ 9/2222]	[0.41±0.02]

<sup>a</sup>Control (air). <sup>b</sup>Number of micronuclei containing PCE/number of PCE counted. <sup>c</sup>Number of micronuclei containing NCE/number of NCE counted.

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

exposure was 6 hours per day, 5 days per week for 2 weeks (10 exposures). Concentrations of this study were set to determine the dose finding of the thirteen-week inhalation study. However, these concen-

trations were not adequate for the micronucleus test, because almost all the mice died at 260 ppm in males and 200 ppm in females. From the results of the mortality and pathological study, methyl bromide

Table 5. The results of the bone marrow micronucleus test in rats

Concentration (ppm)	Male			Female		
	MNPCE/PCE <sup>b</sup> [total]	(%) [mean±S.D.]	Ration of PCE/NCE [mean±S.D.]	MNPCE/PCE <sup>b</sup> [total]	(%) [mean±S.D.]	Ration of PCE/NCE [mean±S.D.]
0 <sup>a</sup>	0/1096	(0 )	1.07	1/1013	(0.10)	0.83
	1/1000	(0.10)	1.07	0/1112	(0 )	0.72
	0/1017	(0 )	1.00	0/1164	(0 )	0.54
	0.1236	(0 )	0.96	0/1073	(0 )	0.85
	0/1035	(0 )	0.96			
	[1/5384]	[0.02±0.04]	[1.01±0.06]	[1/4362]	[0.03±0.05]	[0.74±0.14]
154	0/1112	(0 )	0.95	0/1017	(0 )	0.62
	0/1016	(0 )	0.94	1/1028	(0.10)	0.69
	0/1013	(0 )	1.03	0/1040	(0 )	0.86
	0/1065	(0 )	0.98	0/1073	(0 )	0.96
				1/1007	(0.10)	0.96
	[0/4206]	[0.00±0.00]	[0.98±0.04]	[2/5165]	[0.04±0.05]	[0.76±0.14]
200	0/1034	(0 )	1.07	0/1013	(0 )	0.52
	0/1070	(0 )	0.97	0/1023	(0 )	0.70
	0/1118	(0 )	0.98	0/1033	(0 )	0.91
	1/1022	(0.10)	0.97	1/1157	(0.09)	0.70
				0/1025	(0 )	0.87
	[1/4244]	[0.03±0.05]	[1.00±0.05]	[1/5251]	[0.02±0.04]	[0.74±0.16]
260	0/1026	(0 )	0.98	1/1072	(0.09)	0.96
	1/1010	(0.10)	1.00	0/1058	(0 )	0.91
	0/1013	(0 )	0.84	1/1007	(0.10)	0.79
	0/1038	(0 )	0.92	0/1012	(0 )	0.69
	1/1012	(0.10)	0.96	2/1122	(0.18)	0.65
	[2/5099]	[0.04±0.05]	[0.94±0.06]	[4/5271]	[0.07±0.08]	[0.80±0.13]
338	2/1022	(0.20)	1.06	0/1104	(0 )	0.93
	3/1012	(0.30)	0.85	0/1056	(0 )	1.11
	3/1024	(0.29)	0.97	2/1095	(0.18)	0.94
				1/1025	(0.10)	1.03
				1/1016	(0.10)	0.98
	[8/3058]	[0.26±0.06]	[0.96±0.11]	[4/5296]	[0.08±0.08]	[1.00±0.07]**

<sup>a</sup>Control (air). <sup>b</sup>Number of micronuclei containing PCE/number of PCE counted.

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

was more toxic to mice than rats, and species differences of toxicities by methyl bromide between mice and rats was observed. Micronuclei inductions on bone marrow in male and female mice were significantly increased by methyl bromide exposed at 154 ppm, and in male rats at 338 ppm. Sensitivity of micronuclei induction in the mice by methyl bromide was higher than that of the rats, and species difference of micronuclei induction between mice and rats was observed. McGregor reported that methyl bromide was negative on *in vivo* mammalian tests of the induction of sperm abnormalities in mice and dominant lethal mutations and chromosomal

aberrations in rats (McGregor, 1981). In our data, increases in micronuclei induction in bone marrow cells were observed by methyl bromide exposed to male rats at 338 ppm, and micronuclei induction was 10-fold higher than that of the control at the lethal concentration (mortality was 70%). The negative result of chromosomal aberrations in rats was due to the difference of exposure concentration and period.

MNPCE induction of bone marrow in male mice was 2.6-fold higher than that of the control at 154 ppm, and in females was 5.8-fold higher than that of the control at the same concentration. MNNCE induction of bone marrow in male mice was 2.7-fold

higher than that of the control at 154 ppm, and in females was 2.6-fold higher than that of the control at the same concentration. It seems that sex difference of micronuclei induction in PCE between male and female mice was observed. Frequency of MNPCE induction in bone marrow between males and females at 154 ppm groups was not statistically significant by the Kastenbaum and Bowman method. However, frequency of MNNCE induction in male was significantly higher than that of females. The National Toxicology Program reported that increases in SCE and MNPCE were observed in bone marrow cells of male and female B6C3F<sub>1</sub> mice exposed at 200 ppm methyl bromide 6 hours per day, 5 days per week for 2 weeks (NTP, 1990). Increases were more pronounced in females. No significant increases in either SCE or micronuclei were observed in male or female mice exposed at 120 ppm for 13 weeks (NTP, 1990). These data support our data that methyl bromide induced micronuclei containing erythrocytes in bone marrow, and sex difference was observed in mice. We also observed no significant increase in micronuclei induction in male and female mice exposed at 46.9 ppm for 13 weeks (data are not shown). Methyl bromide induced micronuclei in bone marrow by exposure of 6 hours per day, 5 days per week for 2 weeks at 154 ppm–200 ppm, which were corresponding to 50% mortality concentration of mice. Therefore, methyl bromide may induce micronuclei in bone marrow exposed at the limited concentration range.

In an acute single gavage or single exposure study, the test substance attacks bone marrow cells and erythroblasts get damaged by test substances, therefore the PCE/NCE ratio in bone marrow is decreased. However, the PCE/NCE ratio in bone marrow is sometimes increased in sub-chronic or chronic studies by erythropoiesis. In this study, a significant increase in the PCE/NCE ratio was observed in mice peripheral blood without increase in the PCE/NCE ratio in bone marrow erythrocytes at the concentration of 154 ppm. Extramedullary hematopoiesis of the spleen was observed in mice. Extramedullary hematopoiesis in mice may be caused by bone marrow cells strongly damaged in first period of exposure by methyl bromide, and hematopoiesis may be induced in the spleen and then erythropoiesis in bone marrow gradually recovered. We could not prepare bone marrow smears from 3 female mice at 200 ppm group, because of a decrease in bone marrow cells. An increase in the PCE/NCE

ratio was observed in bone marrow erythrocytes from one female mouse in the 200 ppm group. In rats, inflammation of the bone marrow was observed. Thus, signs of pathological change supported that methyl bromide was adsorbed in the lungs, and methyl bromide or its metabolites reached bone marrow cells, and an activated form of methyl bromide attacked bone marrow cells.

MacGregor *et al.*, reported that measurement of the frequency of micronuclei containing erythrocytes in the circulating blood of mice was easily integrated with acute, sub-chronic, or chronic toxicity experiments (MacGregor *et al.*, 1983b). In our study, increases in micronuclei containing erythrocytes in mice peripheral blood were observed. However, induction frequency of micronuclei was not higher than that of bone marrow. Frequency of micronucleus containing erythrocytes in peripheral blood may be decreased by dilution with newly produced erythrocytes from the spleen. It seems that a number of newly produced erythrocytes in females were larger than males, because the ratio of PCE/NCE in female mice in peripheral blood at 154 ppm was higher than that of the males. For these reasons, frequencies of micronuclei induction in bone marrow compared to that of the control were 2.6-fold in males < 5.8-fold in females, in peripheral blood were 4.0-fold in males > 2.6-fold in females at the concentration of 154 ppm.

In rats bone marrow, we used methyl green pyronine staining for observation of micronuclei induction. This staining technique was difficult and the contrast of stained micronuclei was not good and sometimes the small size of micronuclei could not be identified. We failed the staining of bone marrow smears from 2 male rats, and incidence of micronuclei induction in the control group seems to be low. Therefore, micronuclei induction of rats' bone marrow shows slightly lower than the actual value of induction. Recent studies, acridine orange fluorescent staining (Hayashi *et al.*, 1983) and Hoechst 33258 and pyronine Y fluorescent staining (MacGregor *et al.*, 1983b) were developed and these methods of stained micronuclei specifically and the contrast of stained micronuclei was good. These staining methods were of more benefit for rat micronucleus test than that of the methyl green pyronine staining method.

We applied the micronucleus test integrated with the sub-chronic toxicity test which performed as a dose finding study of the carcinogenicity study, and

we showed the micronuclei induction of methyl bromide. However, the integration study had the following problems; (1) As to the conflict with the pathological study on bone marrow, we could not get enough animals for the micronucleus test, and (2) dose setting was sometimes not adequate for the micronucleus test. If we solve these problems, micronucleus test procedures are combined with the sub-chronic toxicity test and micronuclei induction of the test substance is examined on the dose finding test of the carcinogenicity study.

#### References

Andrews, A. W., E. S. Zawistowski and C. R. Valentine (1976) A comparison of the mutagenic properties of vinyl and methyl chloride, *Mutat. Res.*, **40**, 273-276.  
 Asher, I. M., and C. Zervos (1977) Structural correlates of carcinogenesis and mutagenesis—A guide to testing priorities, DHEW Publication No. (FDA) 78-1046., In: Proceedings of the Second FDA Office of Sciences Summer Symposium, U.S. Naval Academy, August 31-September 2, 1977. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Food and Drug Administration, Rockville, pp. 1-4, 163-171.  
 Danse, L. H. J. C., F. L. van Velsen and C. A. van der Heijden (1984) Methyl bromide: Carcinogenic effects in the rat forestomach, *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, **72**, 262-271.  
 Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1983) An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **120**, 241-247.  
 Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, **9**, 527-549.  
 Kramers, P. G. N., C. E. Voogd, A. G. A. C. Knaap and C. A. van der Heijden (1985) Mutagenicity of methyl bromide in a series of short-term tests, *Mutat. Res.*, **155**, 41-47.  
 MacGregor, J. T., R. Schelengl, W. N. Choy and C. M. Wehr (1983a) Micronuclei in circulating erythrocytes: A rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, In: A. W. Hayes, R. C. Schnell,

T. S. Miya (Eds.), *Developments in the Science and Practice of Toxicology* Elsevier Science Publishers B.V., pp. 555-558.  
 MacGregor, J. T., C. M. Wehr and R. G. Langlos (1983b) A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronine Y, *Mutat. Res.*, **120**, 269-275.  
 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.  
 McGregor, D. B. (1981) Tier II mutagenic screening of 13 NIOSH priority compounds, individual compound report: methyl bromide. Report number 32. Cincinnati, Ohio, National Institute of Occupational Safety and Health.  
 Millar, J. D. (1984) Monohalomethanes—Methyl chloride, methyl bromide, methyl iodide, DHHS (NIOSH) Publication No. 84-117, Current Intelligence Bulletin 43, U.S. Department of Health and Human Service, Cincinnati, Ohio.  
 Moriya, M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato and Y. Shirasu (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacteria reversion assay system, *Mutat. Res.*, **116**, 185-216.  
 NTP (1990) Toxicology and carcinogenesis studies of methyl bromide in CAS-No. 91-2840 B6C3F1, mice, inhalation studies. Draft technical report. Research Triangle Park, NC. National Institute of Environmental Health Sciences (NTP TR 385 NIH Publication No. 91-2840, CAS-No. 74-83-9).  
 Schelegel, R. and J. T. MacGregor (1982) The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: Detection of chronic chromosome breakage in mice, *Mutat. Res.*, **104**, 367-369.  
 Schmid, W (1975) The micronucleus test, *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.  
 Simmon, V. F., K. Kauhanen and R. G. Tradiff (1977) Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water, In: D. Scott, B. A. Bridges and F. H. Sobels, (Eds.), *Progress in Genetic Toxicology*. Amsterdam, Elsevir/North-Holland Biomedical Press, pp. 249-258.

第23回大会パネルディスカッション  
 「環境変異原の複合作用とその評価」

## 細菌および培養細胞におけるヘテロサイクリックアミン類の変異原性増強効果とその作用機序

### Enhancing effect of heterocyclic amines on UV or chemically induced mutagenesis and their mode of action in *E. coli* and cultured mammalian cells

下位香代子, 宮村理恵子, 加藤智子, 木苗直秀

Kayoko Shimoi, Rieko Miyamura, Tomoko Katoh and Naohide Kinai

静岡県立大学食品栄養科学部  
 422 静岡市谷田 52-1

University of Shizuoka, School of Food and Nutritional Sciences,  
 52-1 Yada, Shizuoka 422, Japan

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年5月31日)

#### Summary

Most heterocyclic amines isolated from cooked foods enhanced the induction of mutations and chromosome aberrations by UV without microsomal activation in *E. coli* and CHO cells at the concentrations where they showed neither toxic nor mutagenic potencies by themselves. Of the ten heterocyclic amines, Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) was most effective. These co-mutagenic effects were not observed in DNA excision repair-deficient cells and in the cells treated with alkyl agents or  $\gamma$ -rays.

The ELISA using monoclonal antibodies against photolesions demonstrated that Trp-P-1 inhibited the removal of both cyclobutane dimers and (6-4)dimers in UV-irradiated *E. coli*. In addition, it was shown that Trp-P-1 inhibited the strand scission activity of T4 endonuclease V, which recognizes and cleaves thymine photodimers, and the binding activity of it to UV-damaged DNA in a concentration dependent manner in agarose gel electrophoresis and gel shift assay, respectively. Further, the DNA unwinding assay in the presence of DNA topoisomerase I demonstrated that Trp-P-1 intercalates into DNA molecules. Other intercalators, such as acriflavin and ethidium bromide, showed similar effects in these experiments.

These results suggest that Trp-P-1 changes DNA conformation by intercalation into DNA and then inhibits the binding of repair enzymes against UV-damaged DNA. Thus, Trp-P-1 seems to inhibit DNA excision repair and then the unrepaired lesions might cause the co-mutagenic effects.

**Keywords:** heterocyclic amines, Trp-P-1, co-mutagenic, DNA excision repair, intercalator

#### 1. はじめに

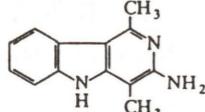
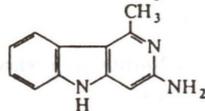
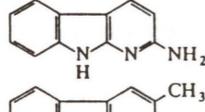
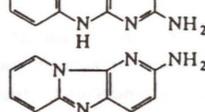
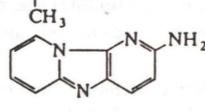
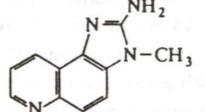
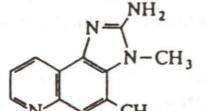
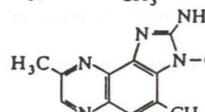
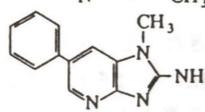
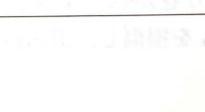
1962年, レイチェル・カーソンが「沈黙の春」の中で農業を含む合成化学物質による生態系への影響に警鐘をならして以来, 既に30余年の歲月

が過ぎた。しかし, 現在も合成化学物質は増え続け, 私たちはそれらをはじめ天然物や放射線などに取り巻かれて生活している。それらの中にはDNAを損傷し, 遺伝情報に変化をもたらす変異

原が存在しているが、いずれも単独で実質安全量を越えて存在することはほとんどない。しかし、最近、ヒト臓器より化学物質のDNA付加体が検出されており、微量であっても我々は常にそれらに暴露され複合的な影響を受けていると考えられる (Randerath *et al.*, 1989; Phillips *et al.*, 1988)。現在までに化学物質単独の毒性あるいは安全性に関する膨大な研究がなされてきたが、それらの複合

的な生体影響についてはまだ不明な点が多い。ところで、ハワイのカウアイ島における日系人の皮膚癌発生率は、わが国における日本人の発生率に比べ88倍も高いことが報告された。このような発生率の違いは緯度の差つまりUV照射量一だけでは説明できず、殺虫剤や家屋の染料に使われていたヒ素も関与しているものと推定されている (Leong *et al.*, 1987)。近年、わが国において

Table 1. Effect of various heterocyclic amines on UVC induced mutagenesis in *E. coli* B/r WP2

Sample	Structure	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Survival (%)	RMA (%)
Trp-P-1		1	83.5	251
		5	62.7	572
		10	42.4	890
Trp-P-2		1	77.7	222
		5	64.4	459
		10	56.2	605
AaC		10	94.6	125
		30	92.7	194
		100	78.3	418
MeAaC		10	101	120
		30	91.9	240
		100	84.8	396
Glu-P-1		10	90.2	202
		30	77.0	413
		100	61.9	651
Glu-P-2		10	89.6	143
		30	82.9	287
		100	61.9	512
IQ		10	94.3	144
		30	81.5	262
		100	64.3	522
MeIQ		10	79.1	259
		30	75.9	386
		100	61.6	625
4,8-DiMeIQx		10	98.4	111
		30	80.3	208
		100	71.3	322
PhIP		10	88.8	125
		30	92.9	134
		100	87.2	163

UVC: 20.4 J/m<sup>2</sup>.

も皮膚癌の増加が指摘され、その原因としてライフスタイルの変化や環境中の化学物質の関与が推定されている (市橋, 1993)。

我々は、環境変異原の複合作用を調べる目的で大腸菌や哺乳動物培養細胞を用いて紫外線 (UV) や既知発がん物質によって誘発される突然変異および染色体異常に対して増強作用を示す物質を検索した。その結果、芥子種子などに含まれるメチルシナペート (Shimoi *et al.*, 1985)、紫外線吸収剤のシノキサート (Shimoi *et al.*, 1988)、タバコタール抽出物のノルハルマン (下らら, 1989) が増強作用を示すことを明らかにした。そこで、ノルハルマンと類似の化学構造を有するヘテロサイクリックアミン (HCA) 類に注目して複合作用を検討した。HCA 類は、魚や肉類を加熱調理した時に生ずる黒こげより分離され、代謝活性化酵素存在下で強い変異原性を示し、ラットやマウスの肝臓、大腸等に癌を誘発する (Sugimura *et al.*, 1989)。Table 1 に示したように、代謝活性化酵素非存在下で、それ自身が突然変異を誘発しない濃度において、10種のHCA類のうちPhIPを除く9種のHCAに増強作用を認めた (Shimoi *et al.*, 1992)。

それ故、最も強い増強作用を示した Trp-P-1 と増強作用を示さなかった PhIP をモデル化合物として用いてその作用機構を検討した。

## 2. Trp-P-1 の大腸菌における作用機序

著者らは、*E. coli* B/r WP2N-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) や DNA 鎖切断を生じる放射線 ( $\gamma$ 線) によって誘発される突然変異に対しては増強作用を示さなかった (Table 2)。また、Trp-P-1 は野性株である WP2 に対して各線

Table 2. Effect of Trp-P-1 on mutagenesis induced by various mutagens in *E. coli* B/r WP2

Mutagen	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Survival (%)	RMA (%)
UVC <sup>a</sup> (20.4 J/m <sup>2</sup> )	1	83.5	251
	5	62.7	572
	10	42.4	890
UVA, B <sup>a</sup> (1080 J/m <sup>2</sup> )	1	83.2	445
	5	68.3	1484
	10	55.0	2408
$\gamma$ -Rays (20 kR)	1	97.0	125
	5	94.8	139
	10	89.7	159
4NQO (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 min)	1	99.2	151
	5	90.5	503
	10	84.0	601
AF2 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 min)	1	96.9	140
	5	93.1	214
	10	88.8	300
MNNG (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 min)	1	103	98.9
	5	97.3	107
	10	87.5	121

<sup>a</sup> Germicidal lamp (GL-15, Hitachi) and sunlamp (FS20-SE, Toshiba) were used for each irradiation.

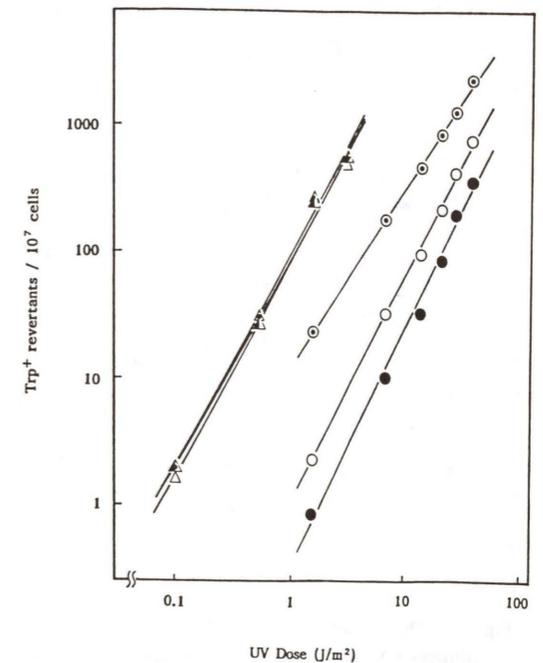


Fig. 1. UVC dose-response plots on mutation induction with or without Trp-P-1 in *E. coli* B/r WP2 and WP2suvrA. Trp-P-1: WP2, ● DMSO; ○ 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ; ◎ 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ; WP2s, ▲ DMSO; △ 1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ; ▲ 10  $\mu\text{g}/\text{plate}$ .

量で突然変異を増強したが、DNA 除去修復欠損株の WP2s に対しては全く増強作用を示さなかった (Fig. 1). さらに、DNA 除去修復能を有する株 (CM571recA) では UV に対する致死増感が見られたのに対し、DNA 除去修復欠損株 (WP2s) ではその作用が全く見られないことが明らかになった。

一方、UV 照射後、大腸菌を非増殖培地中で保持すると修復酵素による DNA 単鎖切断が生じるが、アルカリシヨ糖密度勾配遠心法により Trp-P-1 が単鎖切断を阻害することがわかった (Shimoi *et al.*, 1992). そこで、液体保持中の DNA 修復動態を、森らによって開発されたシクロブタン型ダイマーおよび (6-4) 型ダイマーに特異的なモノクローナル抗体 (TDM-2 および 64M-2, Mori *et al.*, 1988; 1991) を用いて ELISA 法により量論的に検討した。本実験で用いた UV 量は突然変異誘発試験を行った時と同じ線量である。Fig. 2 に示したように、シクロブタン型ダイマーは 60% が、(6-4) ダイマーは 90% が 30 分以内に除去されたが、Trp-P-1 は濃度依存的に両損傷の除去を阻害した。しかし、PhIP は同濃度において全く阻害作用を示さなかった。

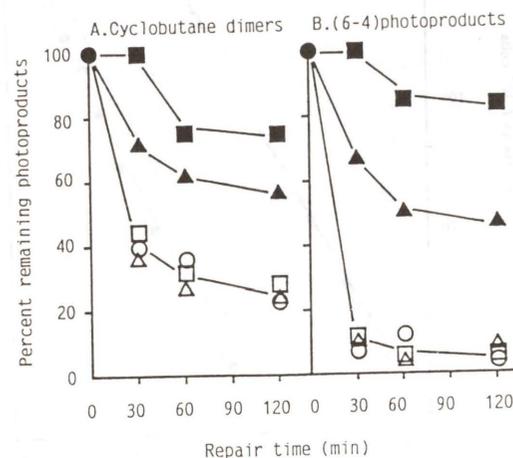


Fig. 2. The repair patterns of both cyclobutane dimers (A) and (6-4) photoproducts (B) in the DNA of *E. coli* irradiated with 20 J/m<sup>2</sup> during liquid holding with or without chemicals. ■ Trp-P-1 (2 μg/ml), ▲ Trp-P-1 (0.2 μg/ml), ○ control (DMSO), □ PhIP (2 μg/ml), △ PhIP (0.2 μg/ml).

以上の結果から Trp-P-1 は DNA 除去修復の最初のステップである incision の過程を阻害し、修復されずに残った DNA 損傷が原因となって突然変異が増強されたものと推察した。

### 3. Trp-P-1 の培養細胞における染色体異常増強作用

大腸菌で観察された突然変異増強作用が哺乳動物細胞でも見られるか否か、佐々木らにより CHO 細胞を用いて染色体異常を指標として検討された (Sasaki *et al.*, 1992). その結果、Trp-P-1 はそれ自身が染色体異常を誘発する濃度以下 (0.2 μg/ml) で UV, mitomycin C, cisplatin によって誘発される染色体異常を増強した。これら変異原はいずれも DNA 除去修復の対象となる DNA 損傷を生成する。しかし、actinomycin D や bleomycin による誘発に対しては効果が認められなかった。PhIP は大腸菌の場合と同様、増強作用を示さなかった。さらに、G1 期の細胞に UV を照射した後、araC 存在下で Trp-P-1 (0.2 μg/ml) を作用させ、アルカリ溶出法により修復に伴って生じる DNA 単鎖切断への影響を調べたところ、阻害作用が認められた。

一方、劣性遺伝病で皮膚癌が高率に発生する色素性乾皮症の患者由来の XP 細胞は UV に高感受性を示し、DNA 除去修復が欠損している (Cleaver, 1968; Mortelmans *et al.*, 1976). Trp-P-1 はこの XP 細胞において UV 誘発染色体異常を増強しなかった (Table 3).

以上の結果から、Trp-P-1 は大腸菌の場合と同様、培養細胞においても incision の過程に作用して DNA 除去修復を阻害する可能性が示唆された。

### 4. Trp-P-1 の T4 エンドヌクレアーゼ V に対する影響

DNA 除去修復 (ヌクレオチド除去修復) については、大腸菌を用いて詳細に検討されているが、酵母、CHO 細胞、ヒトに関してもゲノム DNA より修復遺伝子がクローニングされ、修復酵素の解析が進んでいる (Sancar *et al.*, 1983; Thomas *et al.*, 1985; Tanaka *et al.*, 1990; 朝比奈,

Table 3. Effects of Trp-P-1 on the induction of chromosome aberrations in CHO cells and excision repair-deficient XP2OSSV cells

Mutagen (cell)	Heterocyclic amines		Aberrant cells (%)	Number of aberrations/100 cells						
	S9	μg/ml		Total	ctb	cte	csb	cse		
UV 35 J/m <sup>2</sup> (CHO)	-	-	0	36	80	23	50	2	5	
		+	0	34	72	20	46	0	6	
		Trp-P-1	-	0.025	32	72	32	40	0	0
				0.05	46	125	60	62	0	3
				0.10	61***	172	80	75	9	8
	+		0.20	56**	151	72	70	2	7	
			0.025	37	75	28	42	2	3	
			0.05	47	129	58	63	1	7	
			0.10	53**	126	60	62	0	4	
			0.20	58***	153	85	65	2	1	
UV 8 J/m <sup>2</sup> (XP2OSSV)	-	-	0	49	81	58	14	1	8	
		+	0	48	76	60	12	1	3	
		Trp-P-1	-	0.025	43	76	61	15	0	0
				0.05	40	73	56	17	0	0
				0.10	49	84	53	29	1	1
	+		0.20	42	75	56	15	2	2	
			0.025	45	76	58	18	0	0	
			0.05	49	83	60	23	0	0	
			0.10	41	71	51	20	0	0	
			0.20	40	69	53	15	1	0	

\*0.01 < P < 0.05; \*\*0.001 < P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

1991). 大腸菌においては、UvrABC エンドヌクレアーゼによる損傷部分を含む DNA 鎖の切断 (incision), 切り出し (excision), DNA ポリメラーゼ I による DNA 合成, リガーゼによる DNA 鎖の連結の各反応が複数の酵素により段階的に行われる。incision の過程は UvrA<sub>2</sub>B 複合体が損傷 DNA を含む DNA に結合することにより開始され、UvrA がはなれると UvrB は損傷部位と安定な結合状態を形成し、UvrB-damaged DNA 複合体に UvrC が結合するとエンドヌクレアーゼ活性が発現してリン酸ジエステル結合が切れる。

一方、UV によって生じる DNA 損傷であるピリミジンダイマーに特異的に作用する修復酵素として分離精製された T4 エンドヌクレアーゼ V は、T4 ファージの denV 遺伝子がコードするアミノ酸 138 個、分子量 16,078 の塩基性タンパク質である。この修復酵素はピリミジンダイマーの 5' 側ピリミジンとデオキシリボースの間を切断するグリコシラーゼ活性とその結果生じた AP 部位の 3' 側に 1 本鎖切断を入れる AP エンドヌクレアーゼ活性と二段階の複合活性を有している。また、

T4 エンドヌクレアーゼ V は、DNA 分子に結合するとスキャンニングしながらピリミジンダイマーと遭遇するたびに酵素反応を行うと考えられている (Nakabeppu *et al.*, 1981; Valerie *et al.*, 1984; Gruskin and Lloyd, 1988; Inaoka *et al.*, 1989).

このように、大腸菌の UvrABC エンドヌクレアーゼと T4 エンドヌクレアーゼ V は、同一の DNA 損傷を認識し結合するが、その作用様式は異なる。UvrABC エンドヌクレアーゼの入手が困難だったので、まず、T4 エンドヌクレアーゼ V を用いて、Trp-P-1 が incision の過程をどのように阻害するのかを調べた。酵素活性に対する Trp-P-1 の影響を pBR322 DNA を用いてアガロースゲル電気泳動法により検討し、さらに酵素の損傷 DNA への認識・結合に対する影響を T8-3 EcoRI/HindIII DNA fragment を用いてゲルシフト法により検討した。なお、この fragment は 90 bp の塩基配列の中に T:A のくりかえし配列を有する (Todo and Ryo, 1992).

Fig. 3 に示したように、Trp-P-1 は T4 エンドヌクレアーゼ V による DNA 一本鎖切断を濃度依存

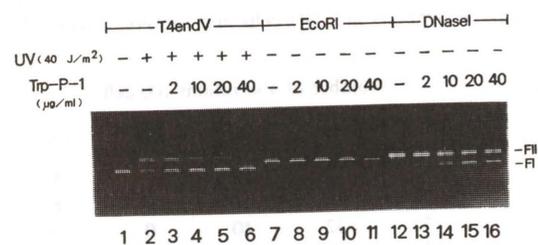


Fig. 3. Inhibitory effects of Trp-P-1 on the activity of T4 endonuclease V, EcoRI and DNaseI. UV-irradiated pBR322 DNA was treated with Trp-P-1 at various concentrations at 37°C for 10 min, and incubated with each enzyme for 10 min. After phenol extraction, the reacted DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis.

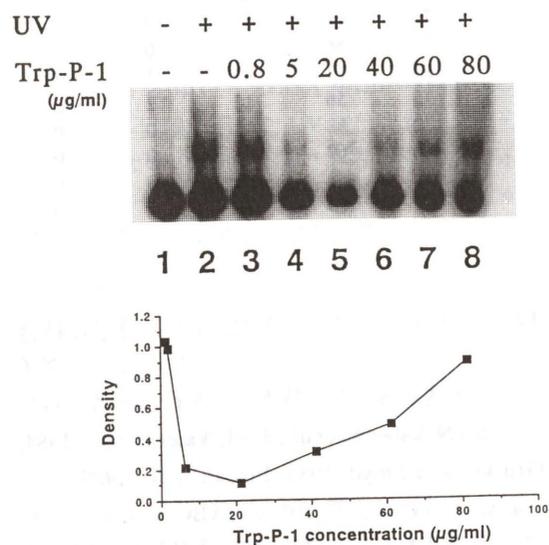


Fig. 4. Effects of Trp-P-1 on T4 endonuclease V binding activity against UV damaged DNA fragment. UV-irradiated T8-3 DNA probe was treated with Trp-P-1 at various concentrations at 37°C for 10 min. After T4 endonuclease V binding reaction at 0°C, the reaction mixtures were then subjected to a 5% polyacrylamide gel electrophoresis.

的に阻害した。また、制限酵素であり DNA 二本鎖を切断する EcoRI および任意に DNA 一本鎖を切断する DNaseI の酵素活性に対する Trp-P-1 の影響も検討したところ、同濃度において比較すると、T4 エンドヌクレアーゼ V > DNaseI > EcoRI の順に阻害活性が見られた。一方、ゲルシフト法において Trp-P-1 により T4 エンドヌクレ

アーゼ V の損傷 DNA への結合が阻害されたが、濃度の上昇に伴い再結合が見られた。しかし、再結合が見られた濃度において酵素の切断活性は賦活化されなかった (Fig. 4)。従って、Trp-P-1 は DNA の立体構造を変化させ、酵素の損傷 DNA に対する認識・結合に影響していると思われる。

### 5. Trp-P-1 と DNA との相互作用

Glu-P-1 (2-amino-6-methyldiprido[1,2-a:3',2'-d]-imidazole), Glu-P-2 (2-aminodiprido[1,2-a:3',2'-d]-imidazole), harman, norharman が DNA にインターカレートすることは既に報告されているが (Imamura *et al.*, 1980; Hayashi *et al.*, 1977), Trp-P-1 に関する報告はなかった。そこで、Trp-P-1 と DNA との相互作用を調べるために、トポイソメラーゼ I および pBR322 DNA を用いて DNA 巻戻し試験を行った。その結果、Trp-P-1 は濃度依存的に DNA を巻戻し、DNA にインターカレートすることがわかった。また、最近、CD スペクトルの解析によって Trp-P-1 が DNA にインターカレートすることが明らかにされた (Inohara *et al.*, 1993)。

ところで、ethidium bromide や acriflavine などの既知インターカレーターも、Trp-P-1 と同様、T4 エンドヌクレアーゼ V の酵素活性を阻害すること。しかし、インターカレート能が認められなかった PhIP には阻害作用が見られないことも判明した。

### 6. おわりに

以上の結果より、Trp-P-1 が DNA にインターカレートして DNA の立体構造を変化させ、修復酵素の損傷 DNA への結合を阻害し、DNA 除去修復の incision の過程に影響を与えることが明らかになった。修復されずに残った DNA 損傷が原因となって突然変異が増強されることが示唆された。

DNA にインターカレートする化学物質は、食品をはじめ環境中にも多く存在する。そこで、単独では無作用な濃度の数種の HCA を混合させて T4 エンドヌクレアーゼ V 阻害作用、DNA インターカレート能および UV 誘発突然変異増強作用

を検討したところ、HCA が複合的に DNA 除去修復を阻害することがわかった。

一方、現在までに、DNA 除去修復阻害因子として無機ヒ素化合物 (Rossman *et al.*, 1981; Okui *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1992), トポイソメラーゼ阻害剤である quinacrine, doxorubicin, novobiocin, coumermycin A (Dresler and Robinson-Hill, 1987; Thielmann *et al.*, 1991; Popanda and Thielmann, 1992), 核酸代謝拮抗剤で癌の化学療法剤として使用されている methotrexate (Borchers *et al.*, 1990) などが報告されている。また、Selby らは UvrABC エンドヌクレアーゼを用いて *in vitro* 系でカフェインや種々のインターカレーターが DNA にインターカレートすると疑似損傷となり、UvrA を結果的に減少に導き、DNA 修復を阻害することを報告している (Selby and Sancar, 1990; 1991)。我々が推定した作用機序とは異なるが、incision の過程を阻害することは確かである。

我々は、現在、ヒトリンパ球を用いて Trp-P-1 の DNA 修復動態への影響を検討している。Trp-P-1 および類似のインターカレーターが生体内でも DNA 除去修復を阻害し、発癌を増強する可能性があるのか、また、インターカレーターが DNA のトポロジーを変化させ、核内タンパクの DNA への結合を阻害することにより遺伝子発現調節に影響を与えることはないのか、今後、さらに検討する必要があると考えている。

### 謝 辞

本研究の一部は厚生省がん研究助成金により援助され、奈良県立医大・森 俊雄先生、国立八戸工業高等専門学校・佐々木 有先生、国立がんセンター研究所・若林敬二先生との共同研究により行われた。また、T4 エンドヌクレアーゼ V は北海道大学薬学部・大塚栄子先生より、T8-3 EcoRI/HindIII DNA fragment は大阪大学医学部・藤堂剛先生より分与して頂いた。各先生方に感謝致します。

### 参考文献

朝比奈 宏 (1991) 色素性乾皮症と DNA 修復遺伝子群, 代謝, 28, 1007-1014.

Borchers, A. H., K. A. Kennedy and J. A. Straw (1990) Inhibition of DNA excision repair by methotrexate in Chinese hamster ovary cells following exposure to ultraviolet irradiation or ethylmethanesulfonate, *Cancer Res.*, 50, 1786-1789.

Cleaver, J. E. (1968) Defective repair replication in xeroderma pigmentosum, *Nature (London)*, 218, 652-656.

Dresler, S. L. and R. M. Robinson-Hill (1987) Direct inhibition of u.v.-induced DNA excision repair in human cells by novobiocin, coumermycin and nalidixic acid, *Carcinogenesis*, 8, 813-817.

Gruskin, E. A. and R. S. Lloyd (1988) Molecular analysis of plasmid DNA repair within Ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 263, 12728-12737.

Hayashi, K., M. Nagao and T. Sugimura (1977) Interactions of norharman and harman with DNA, *Nucleic Acids Res.*, 4, 3679-3685.

市橋正光 (1993) 日本人の紫外線発癌一患者の増加とその対策一, 環境科学会誌, 6, 154-155.

Imamura, M., K. Shudo, T. Okamoto and T. Andoh (1980) Interaction of Mutagens isolated from L-glutamic acid pyrolysate with DNA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 97, 968-972.

Inaoka, T., M. Ishida and E. Ohtsuka (1989) Affinity of single or double stranded oligodeoxyribonucleotides containing a thymine photodimer for T4 endonuclease V, *J. Biol. Chem.*, 264, 2609-2614.

Inohara, T., M. Tarui, M. Doi, M. Inoue and T. Ishida (1993) Interaction of mutagenic tryptophan pyrolysate with DNA CD spectral study on the binding specificity, *FEBS*, 324, 301-304.

Leong, G. K. P., J. L. Stone, E. R. Farmer, J. Scotto, G. T. Reizner, T. S. Burnett and D. J. Elperin (1987) Non-melanoma skin cancer in Japanese residents of Kauai, Hawaii, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 17, 233-238.

Mori, T., T. Matsunaga, T. Hirose and O. Nikaido (1988) Establishment of a monoclonal antibody recognizing ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts, *Mutat. Res.*, 194, 263-270.

Mori, T., M. Nakane, T. Hattori, T. Matsunaga, M. Ihara and O. Nikaido (1991) Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA, *Photochem. Photobiol.*, 54, 225-232.

Mortelmans, K., E. C. Friedberg, H. Slor, G. Thomas and J. E. Cleaver (1976) Defective thymidine dimer excision by cell-free extracts of xeroderma pigmentosum cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 73, 2757-2761.

Nakabeppu, Y. and M. Sekiguchi (1981) Physical association of pyrimidine dimer DNA glycosylase and apurinic/aprimidinic DNA endonuclease essential for repair of ultraviolet-damaged DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2742-2746.

Okui, T. and Y. Fujiwara (1986) Inhibition of human

- excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells, *Mutat. Res.*, **172**, 69-76.
- Phillips, D. H., K. Hemminki, A. Alhonen, A. Hewer and P. L. Grover (1988) Monitoring occupational exposure to carcinogens: detection by  $^{32}\text{P}$ -postlabelling of aromatic DNA adducts in white blood cells from iron foundry workers, *Mutat. Res.*, **204**, 531-541.
- Popanda, O. and H. W. Thielmann (1992) The function of DNA topoisomerases in UV-induced DNA excision repair: studies with specific inhibitors in permeabilized human fibroblasts, *Carcinogenesis*, **13**, 2321-2328.
- Randerath, E., R. H. Miller, D. Mittal, T. A. Avitts, H. A. Dunsford and K. Randerath (1989) Covalent DNA damage in tissues of cigarette smokers as determined by  $^{32}\text{P}$ -postlabelling assay, *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 341-347.
- Rossmann, T. G. (1981) Enhancement of UV-mutagenesis by low concentrations of arsenite in *E. coli*, *Mutat. Res.*, **91**, 207-211.
- Sancar, A. and W. D. Rupp (1983) A novel repair enzyme: UvrABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region, *Cell*, **33**, 249-260.
- Sasaki, Y. F., H. Yamada, K. Shimoi, N. Kinoue, I. Tomita, H. Matsumura, T. Ohta and Y. Shirasu (1992) Enhancing effects of heterocyclic amines and  $\beta$ -carbolines on the induction of chromosome aberrations in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.*, **269**, 79-95.
- Selby, C. P. and A. Sancar (1990) Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3522-3525.
- Selby, C. P. and S. Sancar (1991) Noncovalent drug-DNA binding interactions that inhibit and stimulate (A)BC excinuclease, *Biochemistry*, **30**, 3841-3849.
- 下位香代子, 木苗直秀 (1993) 生活環境中の DNA 除去修復阻害因子, *放射線生物研究*, **28**, 60-79.
- Shimoi, K., H. Kawabata and I. Tomita (1992) Enhancing effect of heterocyclic amines and  $\beta$ -carbolines on UV or chemically induced mutagenesis in *E. coli*, *Mutat. Res.*, **268**, 287-295.
- 下位香代子, 森 直子, 佐々木 有, 白須泰彦, 富田 勲 (1989) 煙草タール中の突然変異誘発増強および DNA 修復阻害物質の検討, *環境変異原研究*, **11**, 159. (日本環境変異原学会第 18 回大会抄録集)
- 下位香代子, 中村好志, 富田 勲 (1988) *E. coli* B/r 株における紫外線吸収剤の UV 誘発突然変異に対する影響, *衛生化学*, **34**, 21-24.
- Shimoi, K., Y. Nakamura, T. Noro, I. Tomita, S. Fukushima, T. Inoue and T. Kada (1985) Methyl cinnamate derivatives enhance UV-induced mutagenesis due to the inhibition of DNA excision repair in *Escherichia coli* B/r, *Mutat. Res.*, **146**, 15-22.
- Sugimura, T., K. Wakabayashi, M. Nagao and H. Ohgaki (1989) Heterocyclic amines in cooked food, in: S. L. Taylor and R. A. Scanlan (Eds.), *Food Toxicology, A Perspective on the Relative Risks*, Dekker, New York, pp. 31-55.
- Tanaka, K., N. Miura, I. Satokata, I. Miyamoto, M. C. Yoshida, Y. Satoh, S. Kondo, A. Yasui, H. Okayama and Y. Okada (1990) Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain, *Nature*, **348**, 73-76.
- Thielmann, H. W., O. Popanda and L. Edler (1991) The effects of inhibitors of topoisomerase II and quinacrine on ultravioletlight-induced DNA incision in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **117**, 19-26.
- Todo, T. and H. Ryo (1992) Identification of cellular factors that recognize UV-damaged DNA in *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.*, **273**, 85-93.
- Valerie, K., E. E. Henderson and J. K. de Riel (1984) Identification, physical map location and sequence of the denV gene from bacteriophage T4, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8085-8096.
- Yang, J.-L., M.-F. Chen, C.-W. Wu and T.-C. Lee (1992) Posttreatment with sodium arsenite alters the mutational spectrum induced by ultraviolet light irradiation in chinese hamster ovary cells, *Environ. Mol. Mutagenesis*, **20**, 156-164.

*Environ. Mut. Res. Commun.*, **17**: 65-74 (1995)

特別企画

第 23 回大会パネルディスカッション  
「環境変異原の複合作用とその評価」

## 水質汚濁性物質の変異原性増強作用

### Co-clastogenic effects of water pollutants

佐々木 有<sup>1</sup>, 木苗直秀<sup>2</sup>

Yu F. Sasaki<sup>1</sup> and Naohide Kinoue<sup>2</sup>

<sup>1</sup>八戸工業高等専門学校物質工学科  
039-11 青森県八戸市田面木字上野平 16-1  
<sup>2</sup>静岡県立大学食品栄養科学部  
422 静岡県静岡市谷田 52-1

<sup>1</sup>Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology, Tamonoki Uwanitai 16-1, Hachinohe Aomori 039-11, Japan

<sup>2</sup>Laboratory of Food Hygiene, School of Food and Nutritional Science, University of Shizuoka, Yada 52-1, Shizuoka 422, Japan

(受付: 1995年3月23日; 受理: 1995年5月31日)

#### Summary

The co-clastogenic effect of water pollutants was studied in cultured mammalian cells and mice. Studied chemicals were categorized into organotin, organomercuries, cadmium, lead oxides, organohalogens, and carbonyls. When cells were post-treated with organotin (tributyltin and triphenyltin), organomercury (methyl mercury and ethyl mercury), and  $\text{Cd}^{2+}$  at the concentrations at which they were neither cytotoxic nor clastogenic, increased the number of chromatid aberrations induced by mitomycin C was observed. Our results suggest that organotin and ethyl mercury G2 effects cause potentiating effects.  $\text{Cd}^{2+}$  was considered to inhibit DNA pre-replicative repair, perhaps DNA excision repair. Co-clastogenic effects of three lead oxides ( $\text{PbO}$ ,  $\text{PbO}_2$ ,  $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ), 2 carbonyls (acetaldehyde and chloral anhydrate), and 13 kinds of organohalogens were also observed.

**Keywords:** co-clastogenic effect; chromosome aberrations; water pollutants; organotin

#### はじめに

化学物質の生体に対する影響は、一般的には、特定の化学物質が単独に作用することを前提に調べられてきた。しかし、我々を取り巻く環境が多様な化学物質によって複合的に汚染されてきていることを考えると、特定の環境物質の単独の作用のみならず、複数の環境物質が相互に作用することによる影響も考慮すべきであると考えられる。本小論では、水質汚濁物質と変異原性因子の間の複合作用について、染色体異常誘発性を指標

として増強作用を検討した結果を報告する。

水質汚濁物質としては様々なものが考えられるが、代表的なものとして、第一に有機金属物質である有機水銀(メチル水銀)と有機錫(トリブチル錫およびトリフェニル錫)が挙げられる。すなわち、メチル水銀による海水汚染はわが国でも古典的な水質汚染であり、近年ではアマゾン川の汚染が深刻な問題となっている。トリブチル錫やトリフェニル錫は1960年代から船底や漁網への甲殻類の付着を防ぐための防汚塗料や農薬として広

く用いられてきたものであり、近年、これらによる海水汚染が問題となっている。第二に、無機金属であるカドミウムと酸化鉛が挙げられよう。すなわち、カドミウムによる神通川の汚染はイタイイタイ病を引き起こしたものとされ、また、酸化鉛は有鉛ガソリンの燃焼によって大気中に飛散し、現在、極地域からも検出されているように地球規模で汚染しつつある。その他、水道水系の汚染物質として、トリハロメタンなどの有機ハロゲン、カルボニル化合物が挙げられる。湖沼などの閉鎖水域では生活排水等の流入による富栄養化現象が進行しているが、富栄養化した湖沼水を水道水の原水として利用するためには塩素処理やオゾン処理が行われている。しかし、塩素処理やオゾン処理によっては、それぞれ副生成物であるトリハロメタンなどの有機ハロゲンやグリオキサールなどのカルボニル化合物が生じ、水道水の水質管理上の問題をもたらしている。最近では、トリクロロエチレンなどの半導体産業に用いられる有機洗浄剤の漏洩による地下水の汚染、有機塩素系農薬である CNP による水道原水の汚染も問題になりつつある。そこで、本小論では上記の水質汚染物質のうち、金属化合物、有機ハロゲン、カルボニル化合物（有機ハロゲンとカルボニル化合物は水道水などから複数の検出例があるもの）の染色体異常増強作用をとりあげた。

## 実験方法

染色体異常誘発増強作用を検討した物質は Table 1 に示した。MX および水道水抽出物は静岡県立大学食品栄養科学部において調製したものであり、他はすべて試薬として市販されているものをそのまま用いた。用いた細胞はチャイニーズハムスター由来の CHO・K1 細胞 (ATCC より入手し、クローニングしたもの) および色素性乾皮症 A 群患者由来の SV40 形質転換細胞 XP2OSSV (JCRB より入手) であり、他に ICR 系マウス雄 (SLC, 7 週齢で購入し 8 週齢で供試) を用いた。

CHO 細胞を  $2.5 \times 10^5$  細胞/シャーレの割合で 60 mm シャーレに植え、約 24 時間後に染色体異常誘発原でパルス的に処理した。処理終了時には平衡塩類溶液で細胞を洗浄、直ちに新鮮な培地に

交換するとともに染色体異常増強作用を調べようとする化合物を培地に添加し、20 ないし 24 時間培養したのち、空気乾燥法によって染色体標本作製した。このときの被験物質の濃度は、それ自身で染色体異常を誘発せず、かつ著しい細胞周期の遅延をもたらさない濃度とした。なお、標本作製の 4 時間前から 50  $\mu\text{g/ml}$  のコルヒチンで処理した。染色体異常を切断型染色分体異常 (ctb, 染色分体切断・断片)、交換型染色分体異常 (cte, 染色分体交換)、切断型染色体異常 (csb, 染色体切断・断片)、交換型染色体異常 (cse, 多動原体、環) に分類し、プレートあたり 100 中期細胞についての染色体異常数および染色体異常を有する細胞の頻度を計測した。

被験物質の細胞周期上の作用時期を M 期同調培養系で検討した。すなわち、フラスコに植えた CHO 細胞を 10  $\mu\text{M}$  の TN16 (和光純薬工業株式会社) で約 24 時間処理したのち、フラスコを激しく振って M 期の細胞を集め、60 mm シャーレに再播種し、直ちに 0.7  $\mu\text{g/ml}$  の MMC で 1 時間処理した。MMC 処理直後から 6 時間 (G1 期)、MMC 処理 6 時間後から 10 時間 (S 期)、MMC 処理 16 時間後から 4 時間 (G2 期)、それぞれ被験物質で処理した。MMC 処理 20 時間後に染色体標本作製した。なお、コルヒチン処理は 1 時間とした。

有機錫および酸化鉛の染色体異常誘発増強作用については、マウス末梢血小核試験法によってマウス個体レベルで更に検討した。ICR マウス雄に MMC を 1 mg/kg の用量で腹腔内に、被験物質を MMC 投与と同時に、適当な間隔をおいて MMC 投与の前、あるいは後に経口投与した。林ら (Hayashi *et al.*, 1990) の方法に従い、MMC 投与の直前および投与の 28, 48, 72 時間後に経時的に標本作製し、被験物質投与群と非投与群の間で小核を有する網赤血球 (MNRET) の頻度を比較した。

## 結果

1. トリフェニル錫化合物の変異原性増強作用  
CHO 細胞を MMC で 1 時間処理した後、TBTO または TPTC で 20 時間処理した結果を Fig. 1 に示した。TBTO および TPTC には染色体

Table 1. Studied water pollutants and their analogues

Chemicals	Formula	Abbreviations
<b>Organometals</b>		
Bis(tri- <i>n</i> -butyltin)oxide	$[(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{Sn}]_2\text{O}$	TBTO
Triphenyltin chloride	$(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{SnCl}$	TPTC
Methylmercury chloride	$\text{CH}_3\text{HgCl}$	MeHgCl
Ethylmercury chloride	$\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$	EtHgCl
Dimethylmercury	$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$	Me <sub>2</sub> Hg
Diethylmercury	$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Hg}$	Et <sub>2</sub> Hg
<b>Inorganic metals</b>		
Cadmium dichloride	$\text{CdCl}_2$	
Lead monoxide	$\text{PbO}$	
Lead dioxide	$\text{PbO}_2$	
Trilead tetraoxide	$\text{Pb}_3\text{O}_4$	
Lead acetate	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$	PbAc <sub>2</sub>
Lead nitrate	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	
<b>Organohalogenes</b>		
Chloroform	$\text{CHCl}_3$	
Bromoform	$\text{CHBr}_3$	
Dichlorobromomethane	$\text{CHCl}_2\text{Br}$	
Dibromochloromethane	$\text{CHClBr}_2$	
Ethylendibromide	$\text{CH}_2\text{Br} : \text{CH}_2\text{Br}$	EDB
Ethylendichloride	$\text{CH}_2\text{Cl} : \text{CH}_2\text{Cl}$	EDC
1,1,1-Trichloroethane	$\text{Cl}_3\text{CCH}_3$	
1,2-Dibromo-3-chloropropane	$\text{CH}_2\text{BrCHBrCH}_2\text{Cl}$	DBCP
Trichloroethylene	$\text{ClCH} : \text{CCl}_2$	
Tetrachloroethylene	$\text{Cl}_2\text{C} : \text{CCl}_2$	
Monochloroacetic acid	$\text{CH}_2\text{ClCOOH}$	ClAc
Dichloroacetic acid	$\text{CHCl}_2\text{COOH}$	Cl <sub>2</sub> Ac
Trichloroacetic acid	$\text{CCl}_3\text{COOH}$	Cl <sub>3</sub> Ac
Dibromoacetic acid	$\text{CHBr}_2\text{COOH}$	Br <sub>2</sub> Ac
Dichloroacetone	$\text{Cl}_2\text{CHCN}$	Cl <sub>2</sub> CN
3-Chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(H)-furanone		MX
<b>Carbonyls</b>		
Acetaldehyde	$\text{CH}_3\text{CHO}$	
Chloral hydrate	$\text{CCl}_3\text{CHO} \cdot \text{H}_2\text{O}$	
Glyoxal	$(\text{CHO})_2$	
Methyl glyoxal	$(\text{CH}_3\text{CHO})_2$	
Glyoxylic acid	$\text{CHOCOOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$	
<b>Organohalogen pesticides</b>		
$\alpha$ -BHC	$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$	
$\beta$ -BHC	$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$	
$\gamma$ -BHC	$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$	
$\delta$ -BHC	$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$	
CNP	$\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_3\text{NO}_3$	
DDT	$(\text{ClC}_6\text{H}_4)_2\text{CHCCl}_3$	
<b>Others</b>		
Tap water extent		

異常誘発性が認められなかった。しかし、予め MMC で処理した細胞を TBTO および TPTC で後処理すると、MMC により誘発される染色体異常を有する細胞の頻度が有意に増加した。その増

加は切断型染色分体異常 (ctb) の増加によるものであり、交換型の異常の増加は認められなかった (Fig. 2)。TPTC について、細胞周期上の作用時期を検索した結果を Fig. 3 に示した。G2 期の細胞

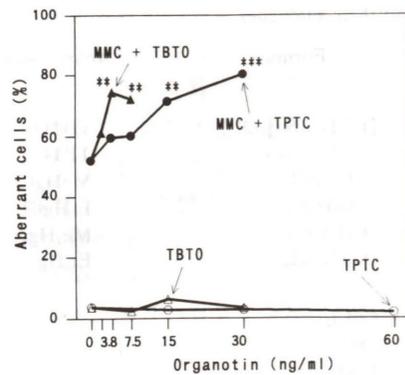


Fig. 1. Effects of post-treatment with organotins on the induction of chromosome aberrations in CHO cells. Cells were treated with MMC for 1 hour and then post-treated with an organotin for 20 hours.

Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

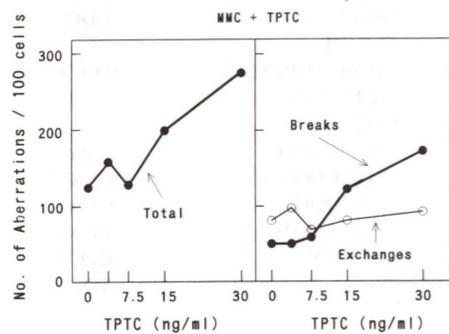


Fig. 2. Effects of post-treatment with organotins on the induction of chromosome aberrations in CHO cells. This shows a remarkably enhanced induction of ctb only.

を TPTC で処理したところ ctb の増強が認められたが、G1 期や S 期の細胞を TPTC で処理しても ctb は増加しなかった。このことから、トリ置換錫化合物は、G2 期の細胞に作用して ctb の誘発を増強することが示唆された。

G2 期において ctb を増加させる化合物として、caffeine, cytosine-1- $\beta$ -D-arabinofuranoside (araC), hydroxyurea が知られている。これらはいわゆる G2 repair を攪乱 (阻害) することで ctb の誘発を増強すると考えられている。しかし、その作用機序はそれぞれ異なっている。すなわち、caffeine が G2 block の解除作用による G2 repair の攪乱、

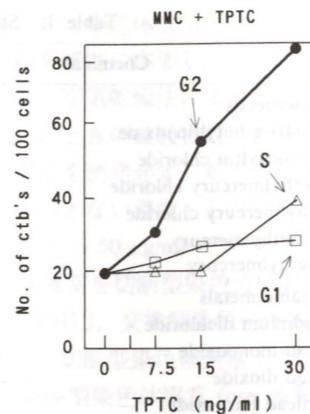


Fig. 3. Effects of post-treatment with organotins on the induction of chromosome aberrations in CHO cells during different cell phases. When cells were post-treated with each organotin during the G2 phase but not G1+S phase, ctb induction was enhanced.

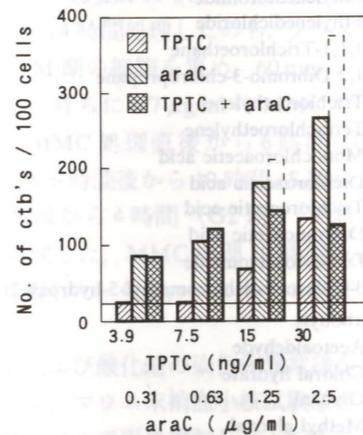


Fig. 4. Lack of the potentiating effect of araC in the presence of TPTC on MMC-induced chromosome aberrations. CHO K1 cells treated with MMC were post-treated with araC and/or TPTC for 4 h immediately before fixation.

araC が DNA polymerase  $\alpha$  阻害による修復阻害、hydroxyurea が Thymidine プールの攪乱による間接的 DNA 合成阻害による修復阻害によるものと考えられている。そこで、TPTC を上記 G2 repair 阻害剤と G2 期において共存させたときの作用を調べた。TPTC と araC を G2 期において共存させると (Fig. 4), araC による ctb の増加が TPTC の濃度に依存して抑制された。しかし、caffeine ま

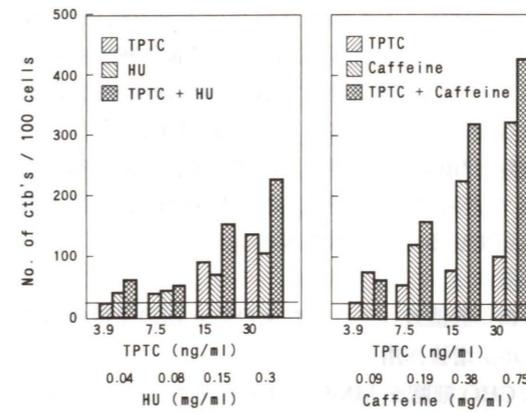


Fig. 5. The effect of hydroxyurea (left) and caffeine (right) G2 treatment in the presence of TPTC on MMC-induced chromosome aberrations. The effect of TPTC and hydroxyurea or caffeine combined approximated the sum of the effects of each given separately.

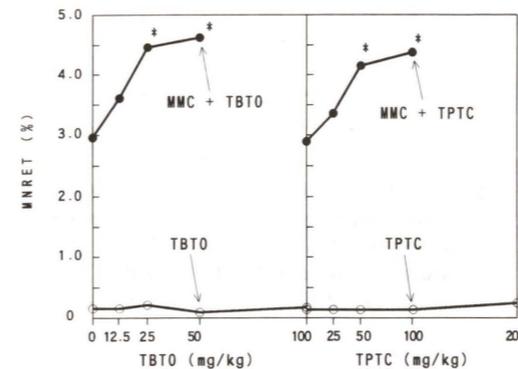


Fig. 6. MNRET frequency in the mouse peripheral blood micronucleus test following simultaneous administration of MMC and TBTO or TPTC. Mice treated simultaneously with oral TBTO or TPTC and intraperitoneal 1.0 mg/kg MMC. Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ .

たは Hydroxyurea を TPTC と共存させたときの ctb の増加は、それぞれ単独による場合の増加分を単純に加算したものにほぼ等しかった (Fig. 5)。これらの結果は、TPTC が araC と拮抗的に作用することを示唆するものである。

MMC による小核誘発に対する TPTC の作用を Figs. 6, 7 に示した。MMC により誘発された MNRET の頻度のピークは、既に報告されているように (CSGMT, 1992) MMC 投与 48 時間後に認

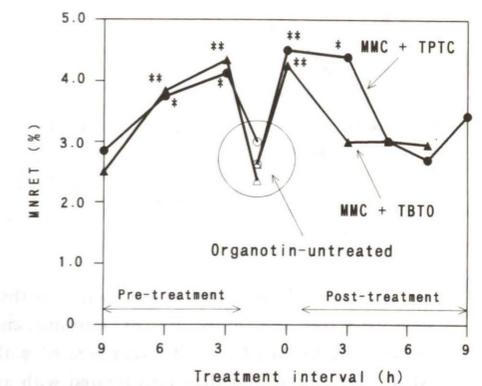


Fig. 7. MNRET frequency in the mouse peripheral blood micronucleus test after administration of TBTO or TPTC followed by or following to MMC.

Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ .

められた。MMC を腹腔内投与したマウスに TPTC を経口投与したが、MNRET の頻度のピークは同様に投与 48 時間後に認められた。しかし、その値は、MMC 投与と同時にまたは 3 時間後に TPTC を投与したときに増加した。MMC 投与 28 および 72 時間後においても、MNRET の頻度は TPTC を投与した群の方が高かった。このことは、投与 48 時間後に認められた増加はピーク値出現の時間的なずれに起因するものではなく、TPTC 投与によって MMC による小核の誘発が促進されていることを示唆するものと考えられた。

## 2. 有機水銀の変異原性増強作用

CHO 細胞を MMC で 1 時間処理した後、MeHgCl または EtHgCl で 20 時間処理した結果を Figs. 8, 9 に示した。MeHgCl および EtHgCl に染色体異常誘発性が認められない濃度で、これら有機水銀は MMC による染色体異常の誘発を増強した。一方、二置換水銀 (Me<sub>2</sub>Hg, Et<sub>2</sub>Hg) には染色体異常誘発増強作用は認められなかった。

MeHgCl による染色体異常の増強は ctb と cte の両方の増加によっていたが、EtHgCl は有機錫と同様に ctb だけを増強した (Fig. 10)。EtHgCl の作用は有機錫のそれと同様に G2 期の細胞にだけ認められるものであり、さらに araC と拮抗的

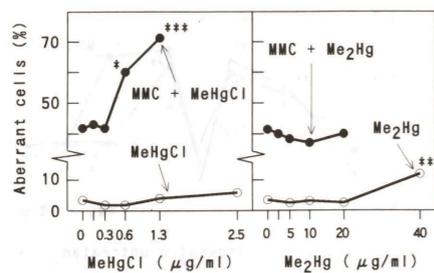


Fig. 8. Effects of post-treatment with methyl mercuries on the induction of chromosome aberrations by MMC. Cells were treated with MMC for 1 hour and then post-treated with an methyl mercury for 20 hours. Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

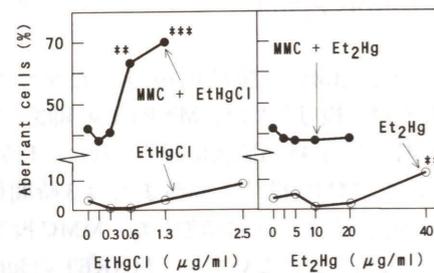


Fig. 9. Effects of post-treatment with ethyl mercuries on the induction of chromosome aberrations by MMC. Cells were treated with MMC for 1 hour and then post-treated with an ethyl mercury for 20 hours. Significant difference: \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

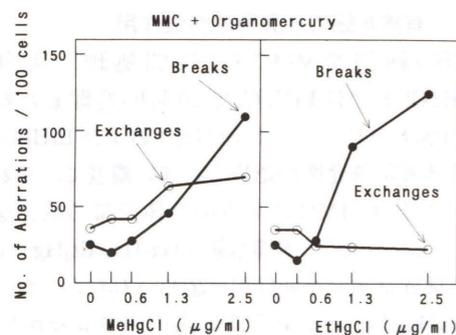


Fig. 10. Effects of post-treatment with organomercuries on the induction of chromosome aberrations in CHO cells. Methyl mercury enhanced both *ctb* and *cte*, however, ethyl mercury showed enhanced induction of *ctb* only.

に作用することも認めた（データは省略）。しかし、 $\text{MeHgCl}$ の作用はG1期とS期の細胞にも認められるものであり、*araC*との拮抗性も認められなかった。このことから、 $\text{EtHgCl}$ の作用は有機錫と類似した機序によっているが、同じ有機水銀であっても $\text{MeHgCl}$ の作用機序はかなり異なっていることが示唆された。

### 3. 無機カドミウムおよび酸化鉛の染色体異常増強作用

CHO細胞をMMCで1時間処理した後、染色体異常誘発性および細胞毒性の認められない濃度

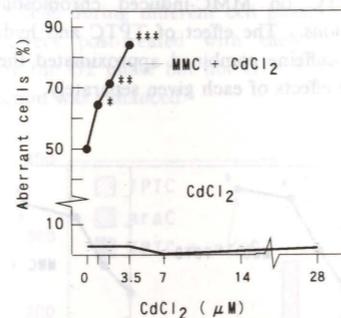


Fig. 11. Effects of post-treatment with cadmium on the frequency of chromosome aberrations induced by MMC in CHO K1 cells. Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

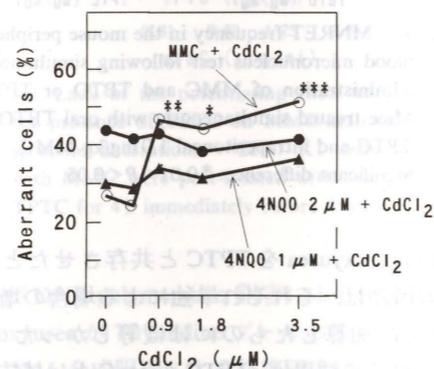


Fig. 12. Effects of post-treatment with cadmium on the frequency of chromosome aberrations induced by MMC or 4NQO in XP2OSSV cells. The induction of chromosome aberrations by MMC but not 4NQO was enhanced by  $\text{Cd}^{2+}$ . Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

の $\text{CdCl}_2$ で20時間処理したところ、MMCによる染色体異常の誘発が増強された（Fig. 11）。この増強は*ctb*と*cte*の両方の増加によっているものであった。 $\text{CdCl}_2$ はMMSと4NQOによる染色体異常の誘発も増強したが、actinomycin Dに対しては作用が認められなかった（データ省略）。

$\text{CdCl}_2$ はDNA除去修復を阻害することが既に報告されている。そこで、色素性乾皮症A群患者由来の培養細胞(XP2OSSV)を用いて同様の実験を行った。正常ヒト由来の培養細胞では、 $\text{CdCl}_2$ の後処理によってMMCおよび4NQOによる染色体異常が増加したが（データ省略）、XP2OSSV細胞ではMMCに対しては増強作用が認められ

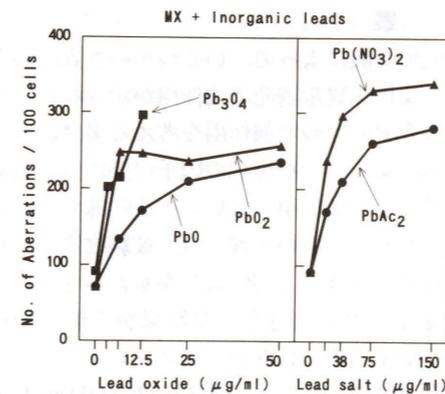


Fig. 13. Effects of post-treatment with inorganic leads on the frequency of chromosome aberrations induced by MX in CHO K1 cells.

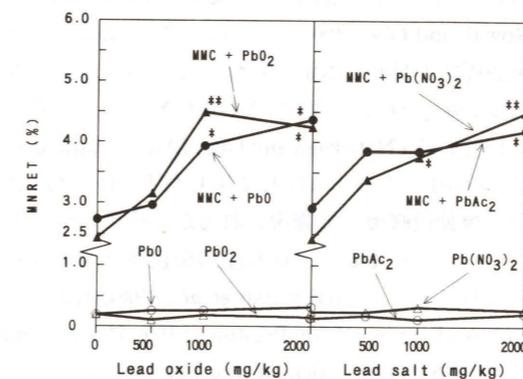


Fig. 14. MNRET frequency in the mouse peripheral blood micronucleus test after administration of inorganic leads followed by MMC. Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ .

るものの4NQOに対しては作用が認められなかった（Fig. 12）。このことは、 $\text{CdCl}_2$ の染色体異常誘発増強作用がDNA除去修復の阻害によっている可能性を示唆するものである。

CHO細胞を平衡塩類溶液中でMXで1時間処理し、直ちに細胞毒性、著しい沈殿の認められない濃度の $\text{PbO}$ 、 $\text{PbO}_2$ 、 $\text{Pb}_3\text{O}_4$ 、 $\text{PbAc}_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ で20時間処理したところ、それら自身には染色体異常誘発性は認められなかったが（データ省略）、MXによる染色体異常の誘発が増強された（Fig. 13）。この作用機序については、現在、検討中である。これらの鉛化合物の*in vivo*における小核誘発増強作用をFig. 14に示した。すなわち、これらの鉛化合物をマウスに経口投与し、その24時間後にMMCを腹腔内に投与すると、MMCによる

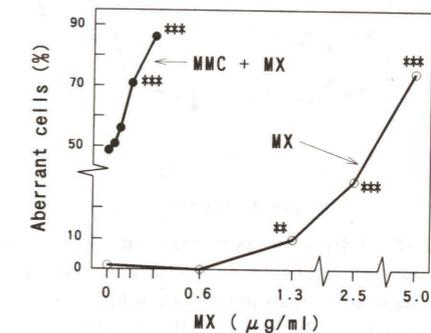


Fig. 15. Effects of post-treatment with MX on the frequency of chromosome aberrations induced by MMC. Significant difference: \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

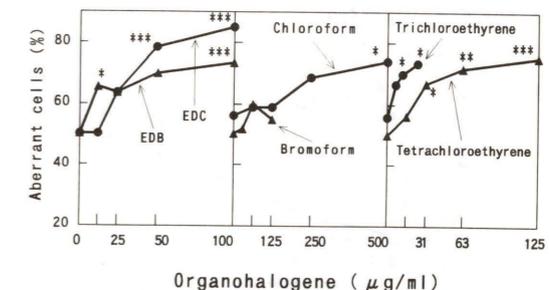


Fig. 16. Effects of post-treatment with organohalogenes on the frequency of chromosome aberrations induced by MMC. Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\* $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

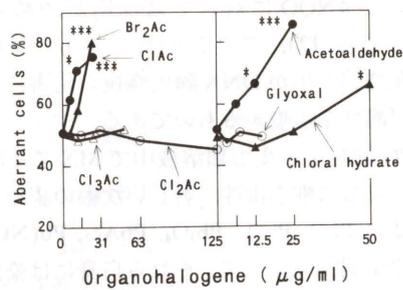


Fig. 17. Effects of post-treatment with organohalogens (left) and carbonyls (right) on the frequency of chromosome aberrations induced by MMC. Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

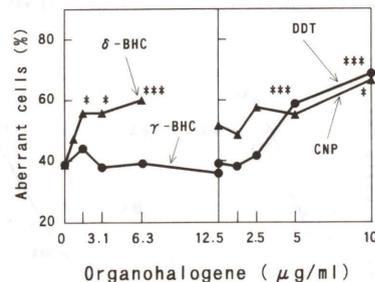


Fig. 18. Effects of post-treatment with organohalogen pesticides on the frequency of chromosome aberrations induced by MMC. Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

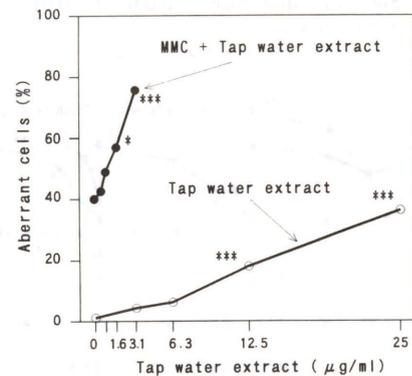


Fig. 19. Effects of post-treatment with tap water extract on the frequency of chromosome aberrations induced by MMC. Significant difference: \* $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

小核の誘発が増強された。

#### 4. 有機ハロゲンの染色体異常誘発増強作用

染色体異常誘発増強作用を検討した有機ハロゲン化合物およびカルボニル化合物のうち、MMCによる染色体異常の誘発を増強したものは、MX、クロロフォルム、EDC、EDB、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、DBCP、DDT、CNP、 $\beta$ -BHC、 $\delta$ -BHC、モノクロロ酢酸、ジプロモ酢酸、アセトアルデヒド、抱水クロラールの15種であった (Figs. 15-19)。また、塩素処理水道水からXAD2樹脂を用いて抽出した不純物についても、染色体異常誘発増強作用が認められた。

#### 考 察

今回の実験によって、いくつかの水質汚染物質について染色体異常誘発増強作用が示された。このような変異原性の増強作用を考える場合には、それを示唆する結果が複数の因子の染色体異常誘発性の単なる相加作用でないことを吟味する必要がある。我々の今回の実験では、被験物質がそれ自身では染色体異常と細胞毒性をもたらさない条件を設定したため、得られた結果が単純な加算によっているものではないと考えられる。

染色体異常はDNA二本鎖切断 (DDB) およびそれらの誤修復を反映したものと見える。本実験で用いたMMCはDNA鎖間クロスリンクなどの付加型の塩基損傷を作るが (Bender, 1979; Nowak and Obe, 1984), このような塩基損傷の修復過程でDNA一本鎖切断が生じ、これが修復されないか、修復の誤りでDDBに転換すると考えられている (Natarajan and Obe, 1978; Natarajan et al., 1980)。このようにして生じたDDBはG2修復 (複製後修復) で修復されるが、その一部が修復されずに残ることで切断型の染色体異常になるとされている (Hartley-Asp et al., 1980; Kihlman and Andersson, 1980; Preston, 1980; Hasson and Hartley-Asp, 1981; Bender and Preston, 1982)。以上のような染色体異常の生成の機構を考えると、染色体異常誘発増強の機構として、1) DDBに転換するDNA塩基損傷の増加、2) G2修復の阻害、が考えられる。今回見いだしたトリ置換錫による

染色体異常の増加は、切断型染色分体異常の増加に限られ、しかも明らかにG2期に依存するものであった。このことから、トリ置換錫はG2修復を攪乱することで染色体異常の誘発を増強している可能性が考えられる。G2期に依存して染色分体型の染色体異常の誘発を増強する化合物として、caffeine (Hartley-Asp, et al., 1980; Kihlman and Andersson, 1980), araC (Preston, 1980), hydroxyurea (Kihlman and Andersson, 1980; Hasson and Hartley-Asp, 1981), aphidicoline (Bender and Preston, 1982) が知られている。しかし、これらの作用機序はそれぞれ異なり、caffeineはG2 blockの解除により (Schlegel and Pardee, 1986), Hydroxyureaはチミジンプールの攪乱による間接的DNA合成阻害により (Adams and Lindsay, 1967; Timson, 1975; Ayusawa, 1983), araCはDNA polymerase  $\alpha$  の阻害による直接的DNA合成阻害 (Graham and Whitmore, 1970; Furlong and Gresham, 1971) によるものと考えられている。TPTCとEtHgClはこれらの化合物のうちCaffeineとHydroxyureaとは加算的に作用したが、araCとは拮抗的に作用した。このことから、TPTCのようなトリ置換錫とEtHgClの染色体異常誘発増強作用は、CaffeineやHydroxyureaのような間接的DNA合成阻害によっているよりは、むしろaraCのような直接的DNA合成阻害によっている可能性が考えられた。しかし、これらの具体的な作用機序については今後の研究課題である。MeHgClの作用は必ずしもG2期に依存せずaraCと拮抗的ではなかったが、このことから化学構造の類似した有機水銀ではあるが、MeHgClの作用機序はEtHgClのそれとは異なったものである可能性が考えられる。

一方、CdCl<sub>2</sub>による染色体異常誘発の増強は、CHO細胞においてはDNA複製の前のフェーズであるG1期に依存したものであった。DNA除去修復が欠損しているXP細胞においては4NQOによる染色体異常の誘発に対しては増強効果が認められなかったが、野生型ヒト細胞においては認められた。これらの結果から、CdCl<sub>2</sub>は除去修復を阻害して未修復のままDNA複製の鋳型となるDNA損傷を増加させることでDDBに転換する

DNA塩基損傷の増加させ、染色体異常誘発の増強をもたらすものではないかと考えられた。Cd<sup>2+</sup>が除去修復を阻害することは既に示されているが (Nocentini, 1987), 我々の今回の結果はそれを裏付けるものと言える。その他、酸化鉛、有機ハロゲン化合物、カルボニル化合物の染色体異常誘発増強作用については、現在までの研究では、未だ現象を見出したのみにとどまっており、その機序の解析は今後の課題である。

変異原性増強作用が知られている化合物は少ない。しかし、その多くはaraCのような実験室で用いる化合物についての知見である。本研究では、環境物質のうち、水環境を汚染しつつある物質について、染色体異常を指標として変異原性増強作用を初めて見いだした。中でも、トリブチル錫とトリフェニル錫は培養細胞に対してミリリットル当りナノグラムレベルという非常に低い濃度でその作用を示した。わが国の有機錫による海洋汚染は、平成2年度の環境庁の調査によれば (環境庁, 1991), トリフェニル錫として最高で0.048  $\mu\text{g/l}$  の濃度が検出されている。世界的にはトリブチル錫による海洋汚染の実態がよく知られ、地中海水域のマリーナでは最高で3.93  $\text{ng/ml}$  の高い濃度が報告されている (Alzieu et al., 1989; Gabrielides et al., 1990)。すなわち、有機錫のように実験的に染色体異常誘発増強作用を示した濃度と実測濃度の最高値との間にさほど大きな差がないこと、多種の汚染物質による環境の複合的な汚染が進みつつある現状を考えると (例えば、水道管の多くに鉛が用いられている事実は、MXと鉛化合物の相互作用が決して荒唐無稽な組み合わせではないことを示唆する)、変異原性増強作用も決して見過しにはできない環境問題になり得るものと考えられる。

#### 謝 辞

本研究にあたり、多大の御助力を賜りました八戸工業高等専門学校物質工学科の皆様、ファイザー製薬株式会社新薬開発センター特殊毒性研究室の皆様へ感謝申し上げます。また、研究資金の御援助を賜りました有限会社しらかば農園代表取締役社長・村木通良氏に深謝申し上げます。

## 参考文献

- Alzieu, C., J. Sanjuan, P. Michel, M. Borel and J. P. Dreno (1989) Monitoring and assessment of butyltins in Atlantic coastal waters, *Mar. Pollut. Bull.*, **20**, 22-26.
- Adams, R. L. P. and J. G. Lindsay (1967) Hydroxyurea: Reversal of inhibition and use as a cell-synchronizing agent, *J. Biol. Chem.*, **242**, 1314-1317.
- Ayusawa, D., K. Shimizu, H. Koyama, K. Takeishi and T. Seno (1983) Unusual aspects of human thymidylate synthetase in mouse cells introduced by DNA-mediated gene transfer, *J. Biol. Chem.*, **258**, 48-53.
- CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test) (1992) Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: The summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS, *Mutation Res.*, **278**, 83-98.
- Furlong, N. B. and C. Gresham (1971) Inhibition of DNA synthesis but not poly-dAT synthesis by the arabinose analogue of cytidine in vitro, *Nature (London)*, **233**, 212-214.
- Gabrielides, G. P., C. Alzieu, J. W. Readman, E. Bacci, O. Aboul Dahab and I. Salihoglu (1990) MED POL survey of organotins in the Mediterranean, *Mar. Pollut. Bull.*, **21**, 233-237.
- Graham, F. L. and G. F. Whitmore (1970) Studies in mouse L cells on the incorporation of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine into DNA polymerase by 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine-5'-triphosphate, *Cancer Res.*, **30**, 2636-2644.
- Hansson, K. and B. Hartley-Asp (1981) Potentiation by hydroxyurea in G2-prophase of thiotepa- and bleomycin-induced chromosomal aberrations in Chinese hamster cells, *Hereditas*, **94**, 21-27.
- Hartley-Asp, B., H. C. Andersson, S. Sturelid and B. A. Kihlman (1980) G2 repair and the formation of chromosomal aberrations. I. The effect of hydroxyurea and caffeine on maleic hydrazide-induced chromosome damage in *Vicia faba*, *Environ. Exp. Bot.*, **20**, 119-129.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Res.*, **245**, 245-249.
- 環境庁環境保健部保健調査室 (1991) 平成3年版化学物質と環境.
- Kihlman, B. A. and H. C. Andersson (1980) G2 repair and the formation of chromosomal aberrations. II. The effect of hydroxyurea, 5-fluorodeoxyuridine and caffeine on streptonigrin- and 8-ethoxycaffeine-induced chromosome damage in *Vicia faba*, *Environ. Exp. Bot.*, **20**, 271-286.
- Kihlman, B. A., K. Hansson and H. C. Andersson (1982) The effects of post-treatments with caffeine during S and G2 on the frequencies of chromosomal aberrations induced by thiotepa in root tips of *Vicia faba* and in human lymphocytes in vitro, *Mutation Res.*, **104**, 323-330.
- Kihlman, B. A. and A. T. Natarajan (1984) Potentiation of chromosomal aberrations by inhibitors of DNA repair, in: A. R. S. Collins, C. S. Downes and R. T. Johnson (Eds.), *DNA Repair and its Inhibition*, *Nucleic Acid Symposium Ser. 13*, IRL Press, Lancaster, pp. 319-339.
- Nocentini, S. (1987) Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc, *Nucleic Acid Res.*, **15**, 4211-4225.
- Nowak, C. and G. Obe (1984) On the origin of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro. I. Experiments with Neurospora endonuclease and polyethylene glycol, *Human Genet.*, **66**, 335-343.
- Preston, R. J. (1980) The effect of cytosine arabinoside on the frequency of X-ray-induced chromosome aberrations in normal human leukocytes, *Mutation Res.*, **69**, 71-79.
- Schlegel, R. and A. B. Pardee (1986) Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells, *Science*, **232**, 1264-1266.
- Timson, J. (1975) Hydroxyurea, *Mutation Res.*, **32**, 115-132.

*Environ. Mut. Res. Commun.*, **17**: 75-82 (1995)

特別企画

第23回大会パネルディスカッション  
「環境変異原の複合作用とその評価」

## 金属と発がん性有機化合物との相互作用による酸化的 DNA 損傷

### Oxidative DNA damage induced by interaction of metals and carcinogenic organic compounds

平工雄介, 及川伸二, 川西正祐

Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa and Shosuke Kawanishi

京都大学医学部公衆衛生学教室  
606 京都市左京区吉田近衛町

Department of Public Health, Faculty of Medicine, Kyoto University,  
Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年5月31日)

#### Summary

DNA damage by active oxygen species has drawn much interest in relation to carcinogenesis. We have already reported that heavy metal ions caused DNA damage by generating active oxygen species. Carcinogens as benzene, *o*-phenylphenol (OPP), pentachlorophenol (PCP), *p*-dichlorobenzene (DCB), caffeic acid and tryptophan metabolites have not been proved to be mutagenic in bacterial test systems. We investigated the mechanism of DNA damage induced by interaction of metal ions and "non-mutagenic" carcinogens. It was shown that all of the carcinogenic chemical compounds we investigated caused damage to isolated DNA in the presence of Cu(II) through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. Among these "non-mutagenic" carcinogens, benzene, OPP, PCP and DCB are metabolized into benzoquinone derivatives, which required the endogenous reductant NADH for metal-mediated DNA damage. Damage to isolated and cellular DNA induced by caffeic acid and tryptophan metabolites was enhanced by the treatment with Mn(II). It suggests that Mn(II) has an ability to mediate oxidative DNA damage. The results of our experiments revealed that "non-mutagenic" carcinogens interact with transitional metal ions to generate active oxygen species causing DNA damage with subsequent carcinogenesis.

**Keywords:** DNA damage, active oxygen species, metal ions, carcinogen, NADH

#### はじめに

我々は常に多種類の環境化学物質に曝露されており、その中には発がん性を有するものも多い。また食品に由来する発がん物質も存在する。発がん物質の生体への作用、とくに発がん機構については以前から研究されてきたが、それは主に単一物質についてであり、複数種の物質の複合作用についてはほとんど研究が進んでいない。しかし、

我々が多種類の発がん物質に長期間曝露されるといふ事実を考えれば、化学物質の複合作用による発がんリスクを評価するための基礎研究は非常に重要である。そこで、我々は特に化学物質と金属イオンとの複合作用によるDNA損傷機構の解明を、活性酸素の生成という観点から行ってきた。金属イオンが関与する発がん機構解明のため、我々は以前に発がん性のある6価クロムが過酸化

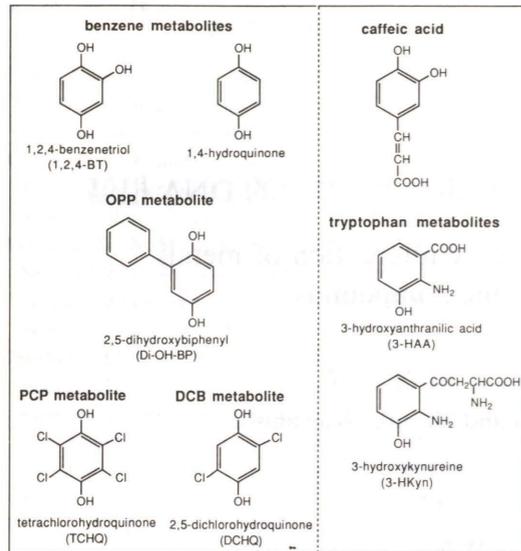


Fig. 1. Chemical structures of "non-mutagenic" carcinogens.

水素 ( $H_2O_2$ ) と反応してフリー OH ラジカル ( $\cdot OH$ ) と一重項酸素 ( $^1O_2$ ) を生成することにより DNA 損傷を起こすことを初めて報告し、活性酸素の金属発がんにおける役割を明らかにした (Kawanishi *et al.*, 1986). さらにその他の発がん性を有する金属として、ニトリロ三酢酸鉄キレート、ニッケル、コバルトなどについても活性酸素が DNA 損傷に関与していることを明らかにした (Kawanishi, 1995). 発がん性がまだ証明されていない銅についても前述の他の遷移金属と同様、 $H_2O_2$  の共存下における DNA 損傷機構を解明した (Yamamoto and Kawanishi, 1989). 最近、肝炎および肝癌の自然発生がみられる LEC ラットの肝臓に銅が高濃度に蓄積するという報告が目撃されており (Li *et al.*, 1991), 銅が発がんに関与する可能性がある。今回、我々は特に発がん性有機化合物のうちサルモネラ変異原性試験 (Ames 試験) で変異原性が証明されていない物質 (Fig. 1) に注目し、金属イオンとの複合作用による DNA 損傷機構について検討した。ベンゼン、オルトフェニルフェノール (OPP), ペンタクロロフェノール (PCP), パラジクロロベンゼン (DCB) の各代謝物については、それらがヒドロキノン誘導体に代謝される点を重視して DNA 損傷機構を解析し

た。また、カフェー酸、トリプトファン代謝物による DNA 損傷機構についても検討し、活性酸素の役割を総合的に考察した。

### 1. ベンゼン

ベンゼンは、ヒトや動物に造血系障害および悪性腫瘍を引き起こす。ベンゼンに曝露された労働者では白血病の発生率が高いことが報告されている (Paustenbach *et al.*, 1993). 動物ではベンゼン投与により白血病 (Cronkite *et al.*, 1984), リンパ腫および Zymbal 腺、乳腺、肝臓における悪性腫瘍の発生が観察された。しかしベンゼンおよびその代謝物による発がん機構は未だ解明されていないため、我々は単離した DNA (c-Ha-ras-1 oncogene) を用いて DNA 損傷に関する研究を行った。

ベンゼンおよびその代謝物の中では、1,2,4-ベンゼントリオール (1,2,4-BT) が微量の Cu(II) 存在下で強く DNA を損傷した (Kawanishi *et al.*, 1989). DNA 損傷の塩基特異性を Maxam-Gilbert 法 (Maxam and Gilbert, 1980) を応用して検討したところ、チミンとグアニン残基が強く損傷された。カタラーゼ、および Cu(I) に特異的なキレート剤であるバソキュプロインは DNA 損傷を抑制したが、 $\cdot OH$  スカベンジャーは DNA 損傷を抑制しなかった。一方、酸化的 DNA 損傷の指標として用いられる 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) の生成が DNA の誤複製をもたらす、変異や発がんにつながるということが報告されている (Shibutani *et al.*, 1991). そこで我々は、8-OH-dG の定量法を DNA 損傷機構解明の手段として用い、electrochemical detector (ECD) と連結させた HPLC (HPLC-ECD) を用いて 8-OH-dG を定量した。その結果、8-OH-dG の生成量は、Cu(II) 存在下で 1,2,4-BT の濃度に依存して増加し、また  $\cdot OH$  スカベンジャーによって生成が抑制されなかった。したがって、1,2,4-BT および Cu(II) による DNA 損傷には、 $H_2O_2$  および Cu(I) が関与するが、 $\cdot OH$  は主たる活性種ではないと考えられる。同様に Fe(III) 存在下でも 1,2,4-BT は DNA を損傷した (Kawanishi *et al.*, 1994). しかし Fe(III) 存在下での 8-OH-dG 生成は  $\cdot OH$  スカベンジャーに

よって抑制された。ベンゼン代謝物から生成される活性酸素種については、Electron spin resonance (ESR) スピントラッピング法を用いて検討した。その結果、Fe(III) 存在下で 1,2,4-BT による  $\cdot OH$  生成がみられたが、Cu(II) 存在下では  $\cdot OH$  生成がみられなかった。以上の結果から Fe(III) の関与する DNA 損傷における活性種は Fenton 反応による  $\cdot OH$  と考えられるが、Cu(II) による活性種は結合型のクリプト OH ラジカル (例えば Cu(I)OOH) であると推定される。

また、ベンゼンの代謝物の一つである *p*-ベンゾキノン (BQ) は、Cu(II) あるいは NADH のうち片方だけの存在下では DNA を損傷しなかったが、Cu(II) および NADH 両者の存在下ではじめて DNA 損傷が経時的に増加した (Fig. 2). この結果から、BQ は広く生体内に存在する還元剤 NADH によって非酵素的にセミキノラジカルに還元され、それが  $O_2$  と反応して  $O_2^{\cdot -}$  ができ、引き続いて  $H_2O_2$  が生成されると同時に、セミキノラジカルが再び BQ に酸化して、以後同様の

BQ(50μM)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cu(II)(20μM)	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
NADH(250μM)	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Time(min.)	60	60	60	60	60	60	60	5	10	20	30	60	

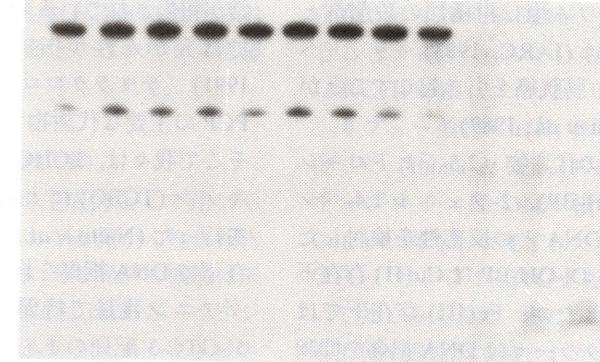


Fig. 2. Autoradiogram of 5'- $^{32}P$ -labeled DNA fragment incubated with *p*-benzoquinone in the presence of Cu(II) and NADH.

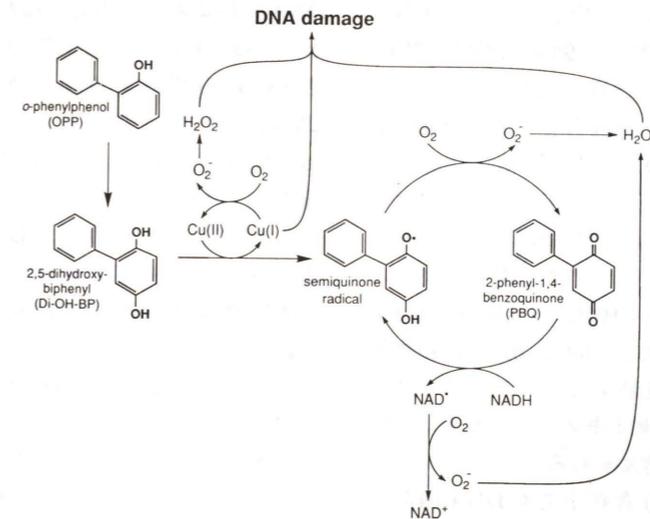


Fig. 3. Possible mechanism of DNA damage by OPP metabolites.

反応を繰り返しながら  $H_2O_2$  を生成する。

その  $H_2O_2$  が金属イオンと反応して DNA 損傷を起こすと考えられる。この機構は、次の OPP の代謝物における DNA 損傷機構 (Fig. 3) と同様である。以上の結果から、ベンゼン代謝物のうち 1,2,4-BT および BQ はいずれも活性酸素生成を介して DNA 損傷を引き起こすことが明らかになった。

近年、ベンゼン代謝物による酸化的 DNA 損傷が HL60 細胞 (*in vitro*) およびマウス骨髄 (*in vivo*) で観察されたという報告があり (Kolachana *et al.*, 1993), 我々の仮説は培養細胞および実験動物でも実証されている。

## 2. オルトフェニルフェノール (OPP)

OPP とそのナトリウム塩は柑橘類の殺菌剤として使用されているが (IARC, 1983), ラットへの大量長期投与により膀胱癌を引き起こすことが報告されている (Fujii *et al.*, 1987)。

我々は、OPP とその代謝物 (2,5-ジヒドロキシビフェニル (Di-OH-BP), 2-フェニル-1,4-ベンゾキノン (PBQ)) の DNA との反応性を検討した (Inoue *et al.*, 1990)。Di-OH-BP は Cu(II) 存在下で単離 DNA を損傷したが、Fe(III) 存在下では損傷しなかった。カタラーゼは DNA 損傷を抑制したが、 $\cdot OH$  スカベンジャーは抑制しなかった。Di-OH-BP は Cu(II) 存在下で、チミンとグアニン残基で特異的に DNA を損傷した。また、DNA 損傷における Di-OH-BP の自動酸化機構を解析するために、ESR および UV-可視分光光度計を用いた。ESR では Fe(III) 存在下で Di-OH-BP の自動酸化に伴って  $\cdot OH$  生成が認められたが、Cu(II) 存在下ではほとんど認められなかった。しかし、Cu(II) 存在下で自動酸化に伴ったセミキノラジカル生成の促進がみられた。UV-可視光スペクトル測定では、Di-OH-BP の自動酸化が Cu(II) によって促進された。Di-OH-BP の自動酸化における Cu(II) の促進効果はカタラーゼで抑制されなかった。従ってセミキノラジカルは直接 DNA と反応しないと考えられる。

また、PBQ は Cu(II) 存在下でも DNA 損傷を起こさなかったが、生体内還元物質 NADH の添

加により DNA 損傷が観察された (Kawanishi *et al.*, 1995)。この結果から、PBQ は NADH によってセミキノラジカルに還元され、再度 PBQ に酸化される過程で  $O_2^-$  および  $H_2O_2$  の生成を繰り返すことが示唆された (Fig. 3)。この反応機構は先に述べた BQ の場合に類似する。DNA 損傷が PBQ で処理された雄ラットの膀胱上皮で誘発されたという報告 (Morimoto *et al.*, 1987) があるが、この場合、細胞内の NADH などによって PBQ が還元され、活性酸素の生成によって DNA 損傷が起こると考えれば合理的に説明できる。

## 3. ペンタクロロフェノール (PCP)

ヒトでは PCP 曝露によるリンパ球の染色体異常が報告されている (Seiler, 1991)。また、マウスでは発がん性が指摘された (McConnel *et al.*, 1991)。テトラクロロヒドロキノン (TCHQ) は PCP の主要な代謝物であることが知られている。そこで我々は、TCHQ およびテトラクロロベンゾキノン (TCBQ) による DNA 損傷について検討を行った (Naito *et al.*, 1994)。TCHQ は Cu(II) 存在下で DNA 損傷を起こした。TCHQ はチミンとグアニン残基で特異的に DNA を損傷し、特に 5'-GTC-3' 配列のチミン残基が最も強く損傷された。 $\cdot OH$  スカベンジャー、パソキプロイン、カタラーゼを用いた実験から、Cu(I) と  $H_2O_2$  が DNA 損傷において重要な役割を果たしていることが示唆された。また TCHQ は Cu(II) の存在下で 8-OH-dG 生成量を増加させた。ESR および UV-可視分光光度法により、TCHQ は Di-OH-BP の場合と異なり、金属イオン非存在下でも急速にセミキノラジカルに自動酸化されることが明らかになった。しかし、DNA 損傷には金属イオンが必要であることから、セミキノラジカル自体は DNA 損傷における活性種ではないと考えられる。

我々は TCBQ による DNA 損傷についても検討を行った。TCBQ は Cu(II) のみでは DNA 損傷が認められなかったが、NADH を添加すると強い DNA 損傷が認められ、BQ, PBQ の実験と同様の結果が得られた。以上の結果から推定される

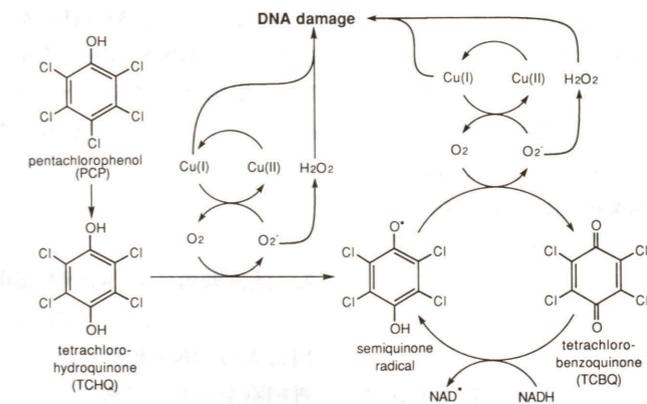


Fig. 4. Possible mechanism of DNA damage by PCP metabolites.

TCHQ および TCBQ による DNA 損傷機構を Fig. 4 に示す。TCBQ は NADH によりセミキノラジカルに還元され、再度 TCBQ に酸化される過程で活性酸素を生成するというサイクルを繰り返して DNA を損傷すると考えられる。

## 4. パラジクロロベンゼン (DCB)

DCB は防虫剤や消臭剤の主成分として用いられ、マウスおよびラットにおける発がん性が報告されているが (NIH, 1987), その発がん機構は未だ明らかではない。生体内では DCB から 2,5-ジクロロフェノールを経て 2,5-ジクロロヒドロキノン (DCHQ), 2,5-ジクロロベンゾキノン (DCBQ) へ代謝されると考えられている。我々は DCHQ および DCBQ について DNA 損傷に関する実験を行った。DCHQ は Cu(II) 存在下で DNA 損傷を起こした。DCBQ では、BQ, PBQ, TCBQ と同様、NADH 添加により DNA 損傷が認められた。DCHQ および NADH 存在下の DCBQ は、ともにチミンに特異的な DNA 損傷を起こした。また DNA 損傷はカタラーゼ、パソキプロインで抑制され、Cu(I) と  $H_2O_2$  が関与することが判明した。以上から DCBQ も細胞内では BQ, PBQ, TCBQ などのベンゾキノン誘導体と同様、DCBQ の還元および酸化の繰り返しの伴う活性酸素生成によって DNA 損傷を起こすと推定される。

## 5. カフェー酸

カフェー酸は植物に広く分布するフェノール化合物であり (Stich, 1991), ラットの胃癌を誘発することが報告されている (Hirose *et al.*, 1990; IARC, 1993)。

カフェー酸は Cu(II) 存在下で単離 DNA を損傷した (Inoue *et al.*, 1992)。カタラーゼとパソキプロインは DNA 損傷を抑制し、 $H_2O_2$  と Cu(I) の関与が示唆された。DNA 損傷は特に 5'-GTC-3' および 5'-CTG-3' 配列のチミン残基において強くみられた。また、Mn(II) で前処理をすると DNA 損傷が増強された。しかし、Mn(II) 存在下でも Cu(II) 非存在下では DNA 損傷が起らなかった。

培養細胞の実験では、培地にカフェー酸を加え細胞を培養した後、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) で DNA 鎖切断について検討した。

PFGE では、以前は分離できなかった 0.1-5Mb (10<sup>6</sup>塩基対) の巨大 DNA 断片を検出できる。培養細胞をカフェー酸と Mn(II) で処理すると、DNA 鎖切断を起こした。DNA 損傷は、3-アミノトリアゾール (カタラーゼ阻害剤) によって増強され、カタラーゼによって抑制されたことから、 $H_2O_2$  の DNA 損傷への関与が示された。また、 $\alpha$ -フェナンスロリン (金属イオンキレート剤) の抑制効果から細胞内遷移金属イオンが DNA 損傷に関与することが示された。したがって、カフェー酸は Mn(II) によって触媒された自動酸化を通して  $H_2O_2$  を生成し、その  $H_2O_2$  が遷移金属イオン

と反応し、細胞内 DNA に損傷を起こすことが推定される。カフェー酸がチャイニーズハムスター卵巣細胞で染色体を切断し、またラット胎児肺細胞および HeLa 細胞における DNA 二重鎖切断を起こした (Yamada *et al.*, 1985) という報告がある。これらの細胞内 DNA 損傷は以上に述べたようなカフェー酸と金属イオンとの相互作用による機構で起こると考えられる。

## 6. トリプトファン代謝物

トリプトファン代謝物である 3-ヒドロキシアントラニル酸 (3-HAA) および 3-ヒドロキシキノレニン (3-HKyn) のマウスにおける発がん性が報告された (Boyland and Watson, 1956)。3-HAA と 3-HKyn は、Cu(II) 存在下でチミンおよびグアニン残基で特異的に DNA 損傷を起こした (Hiraku *et al.*, 1995)。また、3-HAA を Mn(II) で前処理すると Cu(II) 存在下での DNA 損傷は増強された。

UV-可視分光光度法では、Mn(II) が 3-HAA の自動酸化を促進することが示唆された。

さらに、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 添加では、Mn(II) 存在下の場合と非常に類似したスペクトルが得られたことから、Mn(II) は 3-HAA の自動酸化に関連する反応において SOD と同様の挙動をとることが解明された。

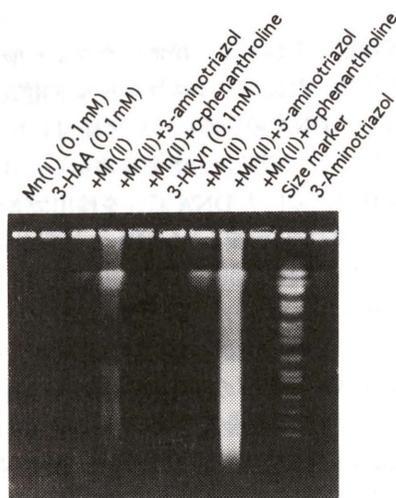


Fig. 5. Detection of tryptophan metabolites plus Mn(II)-induced DNA damage by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

培養細胞では、Mn(II) 存在下で 3-HAA および 3-HKyn が DNA 損傷を誘発した (Fig. 5)。また DNA 損傷は 3-アミノトリアゾールで増強され、*o*-フェナンスロリンで抑制されたことから、DNA 損傷への H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と金属イオンの関与が示唆された。

## 7. 活性酸素による DNA 損傷

これまで我々は化学物質と金属イオンの複合作用による DNA 損傷について単離 DNA および培養細胞をもちいて解析を行ってきた。以上に述べた物質以外にも、実験動物で発がん性が指摘されているヒドラジン化合物 (Toth, 1991) について DNA 損傷の検討を行った。ヒドラジンおよびその誘導体は金属イオン存在下で DNA を損傷し (Kawanishi and Yamamoto, 1991; Yamamoto and Kawanishi, 1991, 1992)、さらに Mn(II) で処理された培養細胞においても DNA 損傷を誘発した (Ito *et al.*, 1992)。ヒドラジン化合物、カフェー酸やトリプトファン代謝物は、Mn(II) との相互作用により活性酸素を生成して DNA 損傷を起こすと考えられる。また、我々は Mn(II) の役割に加えて生体内還元物質 NADH について注目すべき知見を得た。Fig. 6 に Ames 試験陰性の発がん物

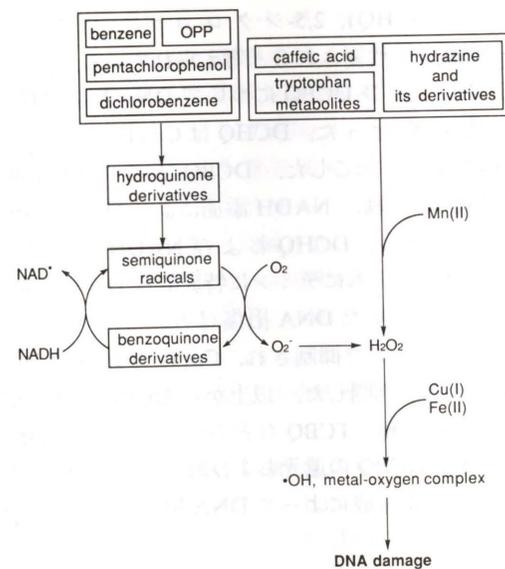


Fig. 6. Possible mechanisms of DNA damage by "non-mutagenic" carcinogens.

質の DNA 損傷機構の概略を示す。BQ, PBQ, TCBQ, DCBQ のベンゾキノロン類が非酵素的に NADH のみでセミキノンラジカルに還元され、再度酸化されて活性酸素を生成する。この過程を繰り返して DNA を損傷する機構は非常に興味深い。

我々が注目した環境化学物質は Ames 試験陰性の "non-mutagenic" の発がん物質である。これらの物質の一部は、金属イオンが共存することにより活性酸素種を生成し酸化的 DNA 損傷を誘発することが示唆された。また DNA 損傷を直接引き起こす活性種は、大部分の場合・OH よりもむしろ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と Cu(I) が反応してできた Cu(I)OOH のような・OH に類似したクリプト OH ラジカルであると考えられる。しかしながら、鉄イオンによる Fenton 反応を介した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成によって *in vivo* で DNA 損傷を起こすという報告もあり (Imlay *et al.*, 1988)、その可能性は否定できない。また、クロフィブレートやフタル酸エステルは Ames 試験陰性の発がん物質であるが、ペルオキシゾームを増殖させて脂肪酸の β-酸化を促進し、間接的に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成が増加され金属イオンを介して DNA 損傷を引き起こすことが指摘されている (Rao and Reddy, 1991; Bentley *et al.*, 1993)。ペルオキシゾーム増殖剤は、間接的に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成するという点で我々がこれまで述べてきた Ames 試験陰性の発がん物質とは異なるけれども、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成を介して酸化的 DNA 損傷をもたらすという点では共通である。以上のように、Ames 試験陰性の発がん物質は酸化的 DNA 損傷をもたらす場合が多いと結論づけられる。

## おわりに

我々は、多くの環境化学物質が金属イオンおよび生体内還元物質との相互作用で DNA 損傷を起こしうる、という興味ある知見を得た。複合作用を考慮した化学物質のリスク評価法を確立する上で我々が得た知見が重要な役割を果たすものと期待される。またこのような化学物質の複合作用による DNA 損傷の研究は、Ames 試験より多くの発がん物質が検出できる短期試験法の開発にむけて必要不可欠な課題のひとつであると思われる。

る。

## 参考文献

- Bentley, P., I. Calder, C. Elcombe, P. Grasso, D. Stringer and H. J. Wiegand (1993) Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans, *Food Chem. Toxicol.*, **31**, 857-907.
- Boyland, E. and G. Watson (1956) 3-Hydroxyanthranilic acid, a carcinogen produced by endogenous metabolism, *Nature*, **177**, 837-838.
- Cronkite, E. P., J. E. Bullis, T. Inoue and R. T. Drew (1984) Benzene inhalation produces leukemia in mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **75**, 358-361.
- Fujii, T., H. Mikuriya, N. Kamiya and K. Hiraga (1987) Enhancing effect of thiabendazole on urinary bladder carcinogenesis induced by sodium *o*-phenylphenate in F344 rats, *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 207-211.
- Hiraku, Y., S. Inoue, S. Oikawa, K. Yamamoto, S. Tada, K. Nishino and S. Kawanishi (1995) Metal-mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by certain tryptophan metabolites, *Carcinogenesis*, **16**, 349-356.
- Hirose, M., S. Fukushima, T. Shirai, R. Hasegawa, T. Kato, H. Tanaka, E. Asakawa and N. Ito (1990) Stomach carcinogenicity of caffeic acid, sesamol and catechol in rats and mice, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 207-212.
- IARC Working Group (1983) *ortho*-Phenylphenol and its sodium salt, In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, IARC, Lyon, **30**, pp. 329-344.
- IARC Working Group (1993) Caffeic acid, In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, IARC, Lyon, **56**, pp. 115-134.
- Imlay, J. A., S. M. Chin and S. Linn (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*, *Science*, **240**, 640-642.
- Inoue, S., K. Yamamoto and S. Kawanishi (1990) DNA damage induced by metabolites of *o*-phenylphenol in the presence of copper (II) ion, *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 144-149.
- Inoue, S., K. Ito, K. Yamamoto and S. Kawanishi (1992) Caffeic acid causes metal-dependent damage to cellular and isolated DNA through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation, *Carcinogenesis*, **13**, 1497-1502.
- Ito, K., K. Yamamoto and S. Kawanishi (1992) Manganese-mediated oxidative damage of cellular and isolated DNA by isoniazid and related hydrazines: Non-Fenton-type hydroxyl radical formation, *Biochemistry*, **31**, 11606-11613.
- Kawanishi, S., S. Inoue and S. Sano (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5952-5958.
- Kawanishi, S., S. Inoue and M. Kawanishi (1989) Human DNA damage induced by 1,2,4-benzenetriol, a benzene

- metabolite, *Cancer Res.*, **49**, 164-168.
- Kawanishi, S. and K. Yamamoto (1991) Mechanism of site-specific DNA damage induced by methylhydrazines in the presence of copper (II) or manganese (III), *Biochemistry*, **30**, 3069-3075.
- Kawanishi, S., K. Ito, S. Oikawa, K. Yamamoto and S. Inoue (1994) Oxygen radical formation and site-specific DNA damage by metal and carcinogen, In: K. Asada and T. Yoshikawa (Eds.), *Frontiers of reactive oxygen species in biology and medicine*, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 153-156.
- Kawanishi, S. (1995) Role of active oxygen species in metal-induced DNA damage, In: R. A. Goyer and M. G. Cherian (Eds.), *Toxicology of Metals*, Handb. Exp. Pharm., Springer, Berlin, **115**, pp. 349-371.
- Kawanishi, S., S. Oikawa and S. Inoue (1995) Role of metal in oxidative DNA damage by non-mutagenic carcinogen, In: B. Sarkar (Eds.), *Genetic response to metal*, Marcel Dekker, New York, pp. 131-151.
- Kolachana, P., V. V. Subrahmanyam, K. B. Meyer, L. Zhang and M. T. Smith (1993) Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells *in vitro* and in the bone marrow *in vivo*, *Cancer Res.*, **53**, 1023-1026.
- Li, Y., Y. Togashi, S. Sato, T. Emoto, J. H. Kang, N. Takeichi, H. Kobayashi, Y. Kojima, Y. Une and J. Uchino (1991) Abnormal copper accumulation in non-cancerous and cancerous liver tissues of LEC rats developing hereditary hepatitis and spontaneous hepatoma, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 490-492.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages, *Methods Enzymol.*, **65**, 499-560.
- McConnell, E. E., J. E. Huff, M. Hejtmancik, A. C. Peters and R. Persing (1991) Toxicology and carcinogenesis studies of two grades of pentachlorophenol in B6C3F1 mice, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **17**, 519-532.
- Morimoto, K., M. Fukuoka, R. Hasegawa, A. Tanaka, A. Takahashi and Y. Hayashi (1987) DNA damage in urinary bladder epithelium of male F344 rats treated with 2-phenyl-1,4-benzoquinone, one of the non-conjugated urinary metabolites of sodium *o*-phenylphenate, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 1027-1030.
- Naito, S., Y. Ono, I. Somiya, S. Inoue, K. Ito, K. Yamamoto and S. Kawanishi (1994) Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites, *Mutat. Res.*, **310**, 79-88.
- NIH (1987) Toxicology and carcinogenesis studies of 1,4-dichlorobenzene in F344/N rats and B6C3F1 mice, *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, No. 319.
- Paustenbach, D. J., R. D. Bass and P. Price (1993) Benzene toxicity and risk assessment, 1972-1992: Implications for future regulation, *Environ. Health Perspect.*, **101**, Suppl. 6, 177-200.
- Rao, M. S. and J. K. Reddy (1991) An overview of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, **93**, 205-209.
- Seiler, J. P. (1991) Pentachlorophenol, *Mutat. Res.*, **257**, 27-47.
- Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431-434.
- Stich, H. F. (1991) The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds, *Mutat. Res.*, **259**, 307-324.
- Toth, B. (1991) Carcinogenic fungal hydrazines, *In Vivo*, **5**, 95-100.
- Yamada, K., S. Shirahata, H. Murakami, K. Nishiyama, K. Shinohara and H. Omura (1985) DNA breakage by phenyl compounds, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1423-1428.
- Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1989) Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper (II) ion and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, **264**, 15435-15440.
- Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1991) Site-specific DNA damage induced by hydrazine in the presence of manganese and copper ions: The role of hydroxyl radical and hydrogen atom, *J. Biol. Chem.*, **266**, 1509-1515.
- Yamamoto, K. and S. Kawanishi (1992) Site-specific DNA damage by phenylhydrazine and phenelzine in the presence of Cu(II) ion or Fe(III) complexes: Roles of active oxygen species and carbon radicals, *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 440-446.

*Environ. Mut. Res. Commun.*, **17**: 83-91 (1995)

特別企画

第23回大会パネルディスカッション  
「環境変異原の複合作用とその評価」

## ヘテロサイクリックアミンの複合によるラット肝発癌の促進 Enhancement of liver carcinogenesis by combined treatment of rats with heterocyclic amines

長谷川良平, 白井智之, 伊東信行

Ryohei Hasegawa, Tomoyuki Shirai and Nobuyuki Ito

名古屋市立大学医学部第一病理  
467 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1

First Department of Pathology, Nagoya City University Medical School,  
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年5月31日)

### Summary

Effects of simultaneous administration of 5 or 10 heterocyclic amines at low dose levels on rat liver carcinogenesis were investigated using our medium-term bioassay protocol. Male F344 rats were initially given diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg, ip) and beginning 2 weeks later received heterocyclic amines for 6 weeks. All animals were subjected to partial hepatectomy at week 3 and killed at week 8. Five carcinogenic heterocyclic amines in each experiment 1 (Trp-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx) and experiment 2 (Trp-P-2, Glu-P-1, MeAαC, AαC, PhIP) were administered together or individually in the diet at levels of 1/1, 1/5, or 1/25 carcinogenic doses, and all 10 chemicals at 1/10 or 1/100 levels in the experiment 3. Induction of immunohistochemically-demonstrated glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive foci was generally increased in the combination groups over the sum of effects for the individual groups and an apparent synergism analyzed by the simple additive model was observed in some combinations. The apparent synergism was most obvious in the group given all 10 chemicals at the 1/10 dose levels. However, the values in the combined groups were generally very close to the averages of 5 or 10 individual data in their corresponding higher dose groups. Based on the present findings, we may be able to expect that the combined effects of *n* chemicals of similar biological and pharmacological properties will be very close to the average of *n* individual data at *n* times higher dose levels, which can be termed as an isoadditive effect. Possible true synergism was observed in the experiment 2, and the findings could be explained by their metabolic enzyme induction potentials in the liver and different organotropism in carcinogenicity.

**Keywords:** heterocyclic amines, chemical mixture, synergism, liver carcinogenesis, GST-P positive foci, rats

### 1. はじめに

職業癌など特殊なケースを除いて、ヒト癌の多くが環境中の発癌物質により発生することが明らかにされている (Doll, 1988). とくに食品の加熱処理によって生成されるヘテロサイクリックアミ

ンに強い変異原性が確認され、動物実験によってそれらのいくつかに発癌性が証明されて以来、食生活と発癌の関係が益々注目されている (Felton and Knize, 1991; Wakabayashi *et al.*, 1992). しかし、このような環境中の発癌物質の濃度はきわめ

Table 1. Results for 250 substances in the medium-term liver bioassay

Category in carcinogenicity	Ames test			Total
	+	-	?	
Hepatocarcinogen	30/31 (97)	25/30 (83)	1/1 (100)	56/62 (90)
Non-hepatocarcinogen	7/25 (28)	3/14 (21)	0/2 (0)	10/41 (24)
Non-carcinogen	0/6 (0)	2/37 (5)	0/2 (0)	2/45 (5)
Unknown	3/13 (23)	22/61 (36)	9/28 (32)	34/102 (33)
Total	40/75 (53)	52/142 (37)	10/33 (30)	102/250 (41)

Positive/examined (%).

て低いヒトへの危険性を軽視しがちであるが、現実にはヒトは個々の物質に個別に曝露されているわけではない。例えばヘテロサイクリックアミンは調理により多種類が同時に生成され、ヒトはそれらを一緒に摂取しているのが現状と考えられる (Felton *et al.*, 1992)。そこでリスクアセスメントの観点から化学発癌物質の低濃度複合効果の影響を検討することは、個々の物質の発癌性評価とともに重要な課題であるといえる (Mumtaz *et al.*, 1993; Vainio *et al.*, 1990)。

我々は変異原性試験と長期発癌試験の中間に位置するラットを用いた発癌物質検索のための肝中期発癌性試験法を開発している (Ito *et al.*, 1992)。本法はラット肝二段階発癌説に基づいており、動物飼育期間は8週間、評価に要する時間も数週間と早期に判定を下すことが可能である。この試験法の信頼性は約250化合物の検索 (Table 1) や用量作用試験、長期試験との比較などにより確立さ

れている (Hasegawa and Ito, 1992; Ito *et al.*, 1988)。また、この試験法は簡便に肝発癌性を検出できることから多群を必要とする実験にきわめて有用である。そこで今回、この試験法を用いて10種類のヘテロサイクリックアミンの多種類同時投与の実験を組み、肝発癌に対する複合効果について検討し考察を加えた。

## 2. ラット肝中期発癌性試験

Fig. 1 にラット肝中期発癌性試験法の実験デザインを示す。雄 F344 (6 週齢) に肝発癌物質である diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg) を1回腹腔内投与し、2週間の回復期間の後、6週間試験物質を飼料に添加して自由に摂取させる。第3週に2/3肝部分切除を施行し、8週にて全動物を屠殺剖検する。免疫組織化学的に染色した肝の前癌病変である胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST-P) 陽性細胞巣を画像解析装置を用いて

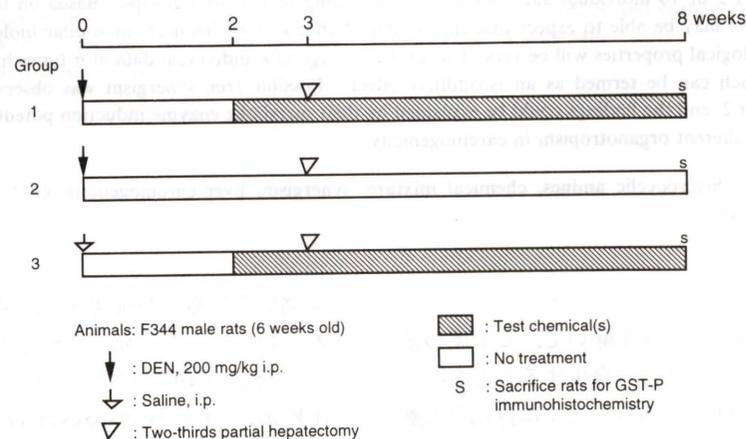


Fig. 1. The medium-term liver bioassay protocol.

Table 2. Combinations and doses of heterocyclic amines

Experiment	Chemical	Main targets (rat)	Full dose (%)	Concentration in the diet*	
				Separately	Mixtures
(1)	Trp-P-1	Liver	0.015	1/1, 1/5, 1/25	1/5, 1/25
	Glu-P-2	Liver, Colon, Small intestine	0.05	1/1, 1/5, 1/25	
	IQ	Liver, Colon, Small intestine	0.03	1/1, 1/5, 1/25	
	MeIQ	Colon, Oral cavity	0.03	1/1, 1/5, 1/25	
	MeIQx	Liver	0.04	1/1, 1/5, 1/25	
(2)	Trp-P-2	Urinary bladder	0.05	1/1, 1/5, 1/25	1/5, 1/25
	Glu-P-2	Liver, Colon, Small intestine	0.05	1/1, 1/5, 1/25	
	MeAaC	Liver, Pancreas	0.08	1/1, 1/5, 1/25	
	AaC	—	0.08	1/1, 1/5, 1/25	
	PhIP	Colon, Mammary gland	0.04	1/1, 1/5, 1/25	
(3)	All of chemicals			1/10	1/10, 1/100

\* Ratio to the full dose.

測定し、発癌効果を単位肝面積当たりの陽性細胞巣の数および総面積を用いて定量的に解析する。

今回使用したヘテロサイクリックアミンとその最高用量 (発癌試験に用いられた最高用量を基本としている) は 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1, 0.015%), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2, 0.05%), 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1, 0.05%), 2-amino-dipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-2, 0.05%), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ, 0.03%), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ, 0.03%), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx, 0.04%), 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeAaC, 0.08%), 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AaC, 0.08%), および 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP, 0.04%) である。それらの発癌標的臓器と今回用いた複合投与の組み合わせおよび濃度を Table 2 に示す。[実験1] Trp-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx の5種類で、発癌試験用量の1/5および1/25の複合と各物質単独群 (1/1, 1/5, 1/25) (Ito *et al.*, 1991b), [実験2] Trp-P-2, Glu-P-1, MeAaC, AaC, PhIP の5種類で、発癌試験用量の1/5および1/25の複合と各物質単独群 (1/1, 1/5, 1/25) (Hasegawa *et al.*, 1991), [実験3] 10種類すべてを1/10および1/100で複合投与、および1/10の単独投与 (Hasegawa *et al.*, 1994a) である。複合投与に

よる加算効果の検定は、便宜的に単純な加法性に基づく吉村の検定法 (Hasegawa *et al.*, 1994c) でいい、相乗効果を判定した。なお、今回は直径0.1 mm以上の陽性細胞巣を有効とした。

その結果、実験1と実験2では、PhIPを除く9種類に少なくとも最高用量群でGST-P陽性細胞巣の発生 (単位面積当たりの数、面積) の促進がみられ肝に発癌性のあることが示された。ここでは数の結果のみを Fig. 2 に提示している。最高用量群の値は発癌性の強度 (Wakabayashi *et al.*, 1992 を参照) とよく相関している。また、概ね下に凸の用量作用曲線を描くことが認められ、複合投与群にも同様の相関関係が認められた (Fig. 2)。実験毎の各単独投与群、複合投与群のGST-P陽性細胞巣の測定値を棒グラフで示した (Figs. 3-5)。実験1では、1/5投与群において複合投与群の値は対照群の値を差し引いた「効果」の加算値とほぼ同じ数値になり単純加算の結果になったが、1/25では加法性に基づく検定でわずかながら ( $P < 0.097\%$ ) 相乗効果が認められた。実験2では、比較的肝発癌性が低いか肝発癌性の認められていない物質の組み合わせであり、Glu-P-1群で他に比べて大きな数値となった。複合効果の影響はいずれの濃度でも認められたが、実験1とは逆に1/5複合群でより明らかな加法性に基づく相乗効果が認められた ( $P < 0.05$ )。実験3では、低用量の各単独群では多少効果に相違があるもののほぼ対照群と同じ値を示し、それらの平均値は対照群

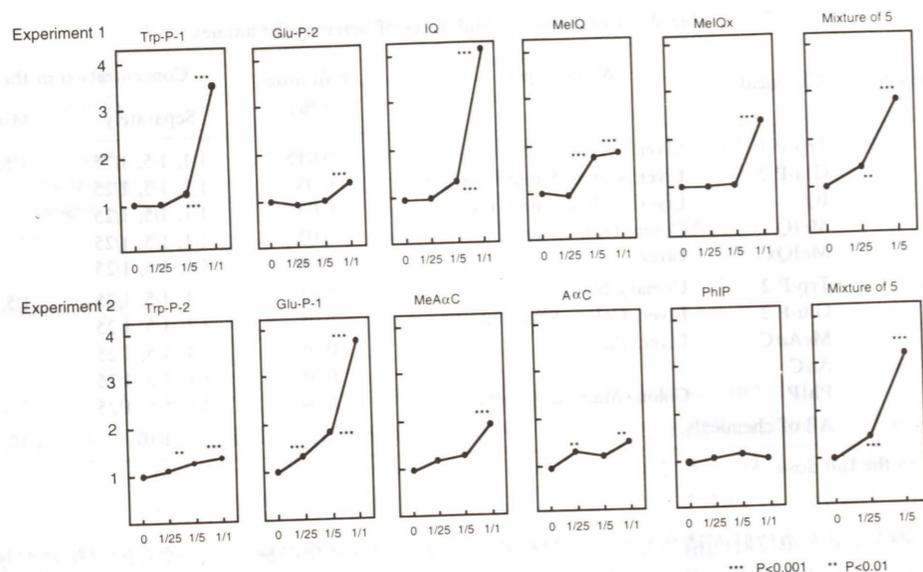


Fig. 2. Dose-response curves for number of GST-P positive liver cell foci (ratio to the control value).

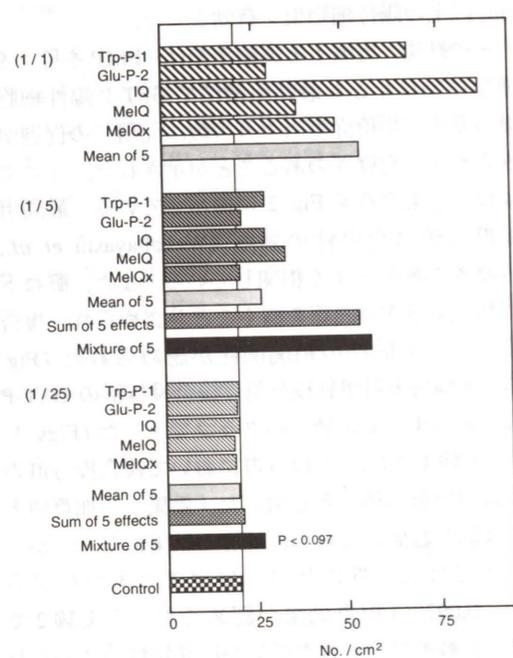


Fig. 3. Numbers of GST-P positive liver cell foci (Experiment 1; Ito *et al.*, 1991b).

と差がなかった。しかし、10種類の複合でははるかに高い値を示し、明らかな相乗効果がみられた ( $P < 0.001$ )。このように、複合投与の影響は、組み合わせの種類や濃度により多少異なることが示さ

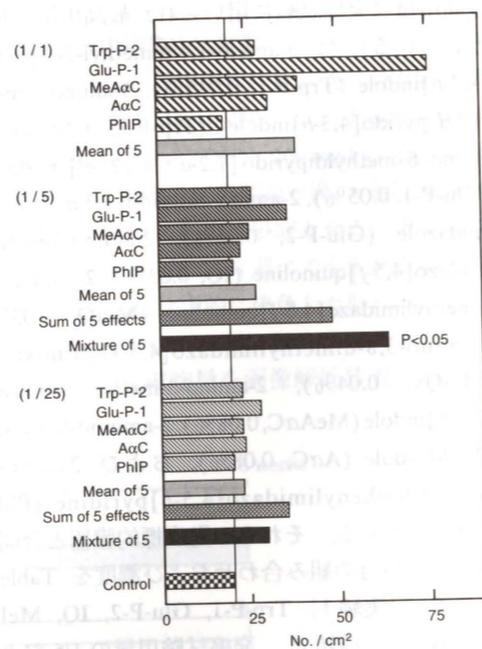


Fig. 4. Numbers of GST-P positive liver cell foci (Experiment 2; Hasegawa *et al.*, 1991).

れたが、一般に同じ用量の単独群の単純加算値よりも大きい数値を示し、加法性の検定により相乗効果を示す場合もみられた。

ところが見方を変えて、1/1の単独群5群の平

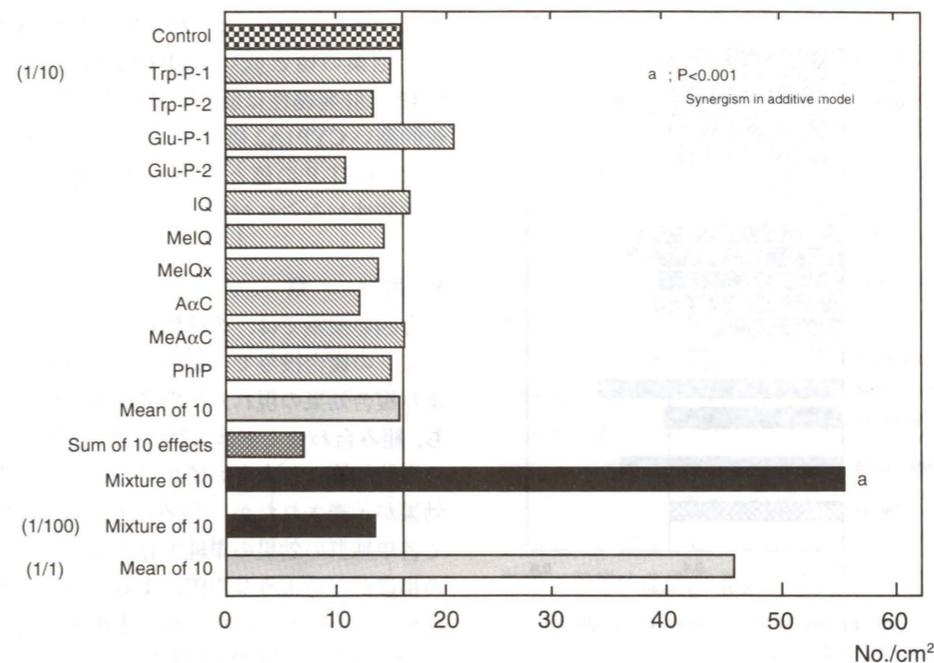


Fig. 5. Numbers of GST-P positive liver cell foci (Experiment 3; Hasegawa *et al.*, 1994a).

均値と1/5の5種複合群 および1/1単独群10群の平均値と1/10の10種複合群、1/5の単独群5群の平均値と1/25の5種複合群、1/10の単独群の平均値と1/100の10種複合群の値を比べると、それらの値は実験2では当てはまらないところがあるのを除いてほぼ同程度になった。なお、実験2では以下に述べるように代謝酵素は誘導するがそのものの肝発癌性が弱い化合物が含まれていることが関係しているものと考えられる。

### 3. DNA 付加体形成

実験1の組み合わせで $^{32}\text{P}$ -ポストラベル法によりDNAの付加体形成を検索した (Takahashi *et al.*, 1994)。DENを投与しない対照群(第3群)の中から1/5および1/25での複合投与群、最高用量の単独投与群および肝部分切除のみをした対照群から無作為に1匹ずつ選び、nuclease P1増感法を用いて検索しオートラジオグラム上検出されたすべてのスポットについて付加体量を測定した。対照群でも一つのスポットがみられたが、各投与群ではこのスポットに加えて独自の付加体が観察され、複合投与ではそれらの総和としてスポットが

Table 3. Total amount of DNA adducts (Experiment 1)

Dose	Group	DNA adducts (No./ $10^7$ nucleotides)
(1/1)	Trp-P-1	258.6
	Glu-P-2	4.7
	IQ	45.4
	MeIQ	0.8
	MeIQx	74.3
(1/5)	Mixture of 5	51.8
(1/25)	Mixture of 5	12.6
	Control	0.4

(Takahashi *et al.*, 1994).

確認できた。DNA付加体形成量 (Table 3) は Trp-P-1で最も高く、MeIQで最も低値であった。1/1の測定値の総値は、1/5複合群の値の約7倍、1/25複合群の約30倍で、単純な加算性が示唆された。

### 4. チトクローム P450

実験2の組み合わせを用い、Fig. 6に示した群について2週間の混餌投与による肝チトクローム P450の誘導について検討した。チトクローム

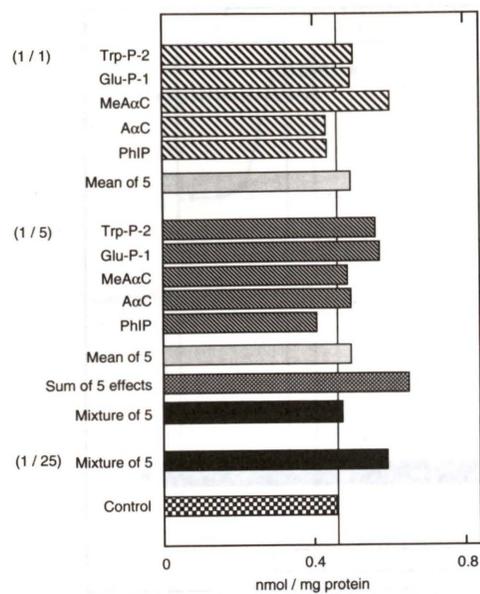


Fig. 6. Cytochrome P450 contents in the liver (Experiment 2).

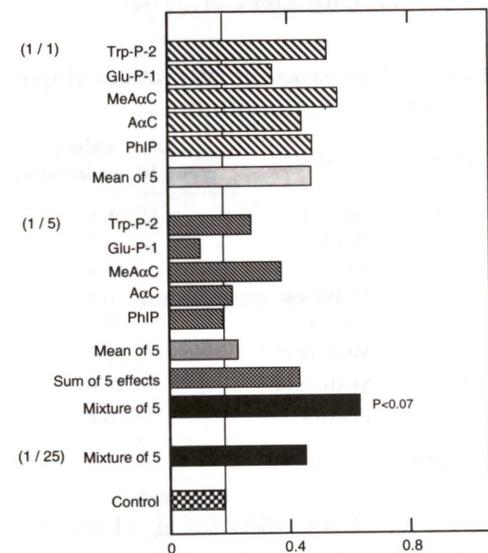


Fig. 7. Reactivity of microsomes with monoclonal antibody for CYP1A2 (Experiment 2).

P450の全体量には用量相関性や複合投与による加算性は明らかではなく、むしろ逆相関の傾向がみられたが (Fig. 6), その分子種のうち CYP1A2 に関しては用量相関性がみられ、PhIP にもその誘導が認められた (Fig. 7)。しかし、酵素誘導と GST-P 陽性細胞巢の測定値の間に常に正の相関

性みられるとは限らず、Glu-P-1 は高い GST-P 陽性細胞巢の値と低い CYP1A2 値を、Trp-P-2 や PhIP は肝発癌性は弱いか認められないものの比較的高い CYP1A2 値を示した。一方、複合投与群では、GST-P の値と CYP1A2 の誘導に比較的高い相関性がみられた。

### 5. 考 察

今回の検索では、5種類のヘテロサイクリックアミンの複合投与では組み合わせの仕方や濃度により複合効果の現れ方に相違がみられた。すなわち、組み合わせ1では1/25用量で各単独群の効果の単純加算より大きい値が得られ、いわゆる相乗効果が示唆されたが、組み合わせ2では1/5用量で各単独群の効果の単純加算より大きかった。この相違がどのような原因によるものか、また再現性があるかはわからないが、実験1の組み合わせではすべてが肝発癌物質であるのに対して (Wakabayashi *et al.*, 1992), 実験2では Trp-P-2 と PhIP にラット肝の発癌性が認められていない点が異なる (Hasegawa *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1991a; Takahashi *et al.*, 1993)。

いわゆる相乗効果は1/10用量で10種類を組み合わせた実験3で顕著に認められた。すなわち、各単独群ではほぼ対照群に等しい値しか得られなかったのに対して (効果なし), それらを複合投与すると明らかに高い値を示した。しかし、見方を変えて考察してみると、1/5用量で5種類を複合投与した場合、その結果はそれぞれを1/1 (最高) 用量の濃度で単独投与した値の平均値に近似し、1/10用量で10種類を複合投与すると同様にそれぞれを1/1 (最高) 用量の濃度で単独投与した値の平均値に近くなっている。すなわち、 $n$ 個のヘテロサイクリックアミンを複合投与すると、組み合わせに用いた個々の物質の濃度をそれぞれ  $n$  倍にして単独投与した場合の平均値に近い値になることが認められた。

相乗効果の定義は、複合の効果 (対照群の値を差し引いた値) が各単独群の効果 (対照群の値を差し引いたもの) の単純な加算より有意に大きい場合とされている (Reif, 1984)。Fig. 8Cにあるように、物質 A と物質 B をそれぞれ  $a, b$  の濃度で

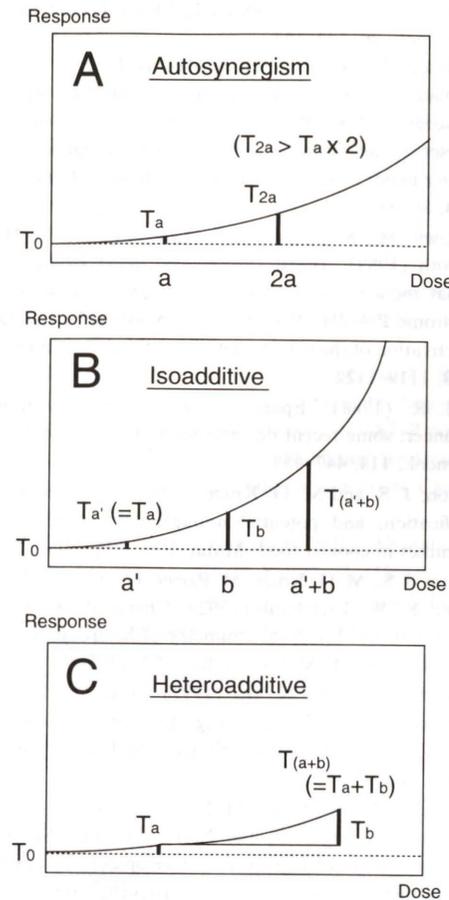


Fig. 8. Isoadditive and heteroadditive in combined treatments (See Reif, 1984).

複合投与した場合、単純に効果を加算した値 ( $T_a + T_b$ ) より複合群の効果  $T(a+b)$  が有意に大きい場合に相乗効果ありとする。用量作用反応のデータがない場合にはそれ以上追究できないので、その結果から相乗効果ありとすることになり、今回使用した検定法 (Hasegawa *et al.*, 1994c) も含め一般にこの立場に基づいて評価している。しかし、Reif (1984) は相乗効果の検定には用量作用曲線を考慮することの重要性を提示し、単純な加算の原理で相乗効果が認められても、次に述べる真の相乗効果 (true or strict synergism) と区別するために apparent synergism (見かけ上の、あるいは目に見える相乗作用) と呼ぶことを提案している。

真の相乗効果は、各物質の用量作用曲線を考慮

したうえで判定されなければならない。そのひとつの方法を Fig. 8 に簡単に図示した。A は物質 A の用量作用曲線、B は物質 B の用量作用曲線を表す。物質 A の濃度  $a$  における効果 (対照群の値を差し引いた値) を  $T_a$  とすると、下に凸の曲線を描いているのでその2倍の量での効果  $T_{2a}$  は  $T_a$  の2倍よりも大きくなる。従って、仮に物質 A を濃度  $a$  で与える2群の複合効果を考えた場合、相乗効果ありと判定することになる。しかし、これは用量作用曲線に従った当然の結果であり、autosynergism という。次に物質 A と物質 B をそれぞれ  $a, b$  の濃度で複合投与した場合を考えてみる。物質 A の濃度  $a$  における効果  $T_a$  に相当する効果  $T_{a'}$  を得るための濃度を物質 B の用量作用曲線から求めその濃度を  $a'$  とする。すなわち、物質 A の効果に相当する物質 B の濃度が  $a'$  である。この場合の複合投与の期待値は物質 B の用量曲線を利用した場合、 $T(a'+b)$  となる。これは物質 A の曲線を利用して求めることができる。下に凸の用量作用曲線であるので、この  $T(a'+b)$  は  $T_a$  と  $T_b$  の単純な和より大きくなり、C の場合と異なった期待値が得られる。このような複合作用の考え方を isoadditive といい、autosynergism の概念に基づいている。したがって、複合した物質の性質が互いに類似しているほど isoadditive な加算性を示すことになる。これに対して用量曲線を考慮しない C の場合を heteroadditive な加算性という。

今回の結果は、(とくに実験3で) いわゆる相乗効果 (apparent synergism) がみられたが、その複合投与の結果は  $n$  個を複合投与すると個々の物質の濃度をそれぞれ  $n$  倍にして単独投与した結果の平均値に近似するという法則性を示すことから isoadditive に作用していることが推察される。これは各ヘテロサイクリックアミンが構造、代謝、発癌機構の上で相互に類似していることを示唆した結果と考えられる (Alexander and Wallin, 1990; Kato, 1986)。すなわち、実験3でみられた顕著な相乗効果も isoadditive の観点からみれば予測された結果と言うことができる。実際、これらのヘテロサイクリックアミンは主に CYP1A2 で代謝活性化されるが (Boobis *et al.*, 1994;

Degawa *et al.*, 1989; Kato, 1986), PhIP も含めこれらのヘテロサイクリックアミンは CYP1A2 などの代謝酵素を誘導することも知られている (Kato, 1986). すなわち, Trp-P-2 や PhIP はそれ自身肝発癌を促進しないが, CYP1A2 を誘導することによって他の発癌物質の効果を増幅することが考えられ, 実験 2 の結果は真の相乗効果が現れている可能性が高い. この結果の統計学的検索は実施していない. 一方, 複合による DNA 付加体形成は比較的単純な加算性を示し, DNA 付加体は発癌標的臓器の検索よりは曝露量評価に有用であると思われた (Hasegawa *et al.*, 1992).

## 6. おわりに

これらヘテロサイクリックアミンは, 食品中に多種含有されていることは明らかで (Felton and Knize, 1991), そのほかの発癌性物質も混在していることが推察される (Sugimura *et al.*, 1988). このようにヒトは低用量であっても複数の発癌物質に同時あるいは経時的に曝露されているのが現状であり, 各物質の単独での発癌性評価のほかに複合作用についても考慮することが重要と考えられる (Hasegawa *et al.*, 1994b; Mumtaz *et al.*, 1993; Vainio *et al.*, 1990). その場合, 相乗効果の判定に際して見かけ上の相乗効果 (apparent synergism) と真の相乗効果 (true synergism) を区別して検討する必要がある. 複合した物質の性質が類似していれば isoadditive な結果を予測できるものであり, この考え方を考慮しなければ複合効果の危険性を過度に強調しすぎる結果にもなる.

## 謝 辞

検体の供与や分子生物学的検索に際しご協力いただいた国立がんセンター名誉総長の杉村隆先生, 同センター研究所の長尾美奈子先生, 若林敬二先生, 東北大学薬学部の山添康先生, 出川雅邦先生に深謝いたします. なお, 本研究は厚生省がん研究助成金および文部省科学研究費補助金からの研究費によって実施された.

## 参考文献

Alexander, J. and H. Wallin (1990) Metabolic fate of

heterocyclic amines from cooked food, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **20**, 143-153.

Boobis, A. R., A. M. Lynch, S. Murray, R. de la Torre, A. Solans, M. Farre, J. Segura, N. J. Gooderham and D. S. Davies (1994) CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their proximate carcinogens is their major route of metabolism in human, *Cancer Res.*, **54**, 89-94.

Degawa, M., S. Tanimura, T. Agatsuma and Y. Hashimoto (1989) Hepatocarcinogenic heterocyclic amines that induce cytochrome P-448 isozymes, mainly cytochrome P-448H (P-450IA2), responsible for mutagenic activation of the carcinogens in rat liver, *Carcinogenesis*, **10**, 1119-1122.

Doll, R. (1988) Epidemiology and the prevention of cancer: some recent developments, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **114**, 447-458.

Felton, J. S. and M. G. Knize (1991) Occurrence, identification, and potential mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food, *Mutat. Res.*, **259**, 205-217.

Felton, J. S., M. G. Knize, M. Roper, E. Fultz, N. H. Shen and K. W. Turteltaub (1992) Chemical analysis, prevention, and low-level dosimetry of heterocyclic amines from cooked food, *Cancer Res.*, **52**, 2103s-2107s.

Hasegawa, R. and N. Ito (1992) Liver medium-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis, *Food Chem. Toxicol.*, **11**, 979-992.

Hasegawa, R., E. Miyata, M. Futakuchi, A. Hagiwara, M. Nagao, T. Sugimura and N. Ito (1994a) Synergistic enhancement of hepatic foci development by combined treatment of rats with 10 heterocyclic amines at low doses, *Carcinogenesis*, **15**, 1037-1041.

Hasegawa, R., M. Sano, S. Tamano, K. Imaida, T. Shirai, M. Nagao, T. Sugimura and N. Ito (1993) Dose-dependence of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, **14**, 2553-2557.

Hasegawa, R., T. Shirai, K. Hakoi, K. Takaba, S. Iwasaki, T. Hoshiya, N. Ito, M. Nagao and T. Sugimura (1991) Synergistic enhancement of glutathione S-transferase placental form positive hepatic foci development in diethylnitrosamine-treated rats by combined administration of five heterocyclic amines at low doses, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1378-1384.

Hasegawa, R., S. Takahashi, T. Shirai, S. Iwasaki, D. J. Kim, M. Ochiai, M. Nagao, T. Sugimura and N. Ito (1992) Dose-dependent formation of preneoplastic foci and DNA adducts in rat liver with 2-amino-3-methyl-*pH*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA $\alpha$ C) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis*, **13**, 1427-1431.

Hasegawa, R., S. Takayama and N. Ito (1994b) Effects of low level exposure to multiple carcinogens in combination. In: Yang, R. S. H. (ed), Risk Assessment of

Chemical Mixtures, Academic Press, San Diego, CA, pp. 361-382.

Hasegawa, R., H. Tanaka, S. Tamano, T. Shirai, M. Nagao, T. Sugimura and N. Ito (1994c) Synergistic enhancement of small and large intestinal carcinogenesis by combined treatment of rats with five heterocyclic amines in a medium-term multi-organ bioassay, *Carcinogenesis*, **15**, 2567-2573.

Ito, N., R. Hasegawa, M. Sano, S. Tamano, H. Esumi, S. Takayama and T. Sugimura (1991a) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis*, **12**, 1503-1506.

Ito, N., R. Hasegawa, T. Shirai, S. Fukushima, K. Hakoi, K. Takaba, S. Iwasaki, K. Wakabayashi, M. Nagao and T. Sugimura (1991b) Enhancement of GST-P positive liver cell foci development by combined treatment of rats with five heterocyclic amines at low doses, *Carcinogenesis*, **12**, 767-772.

Ito, N., T. Shirai and R. Hasegawa (1992) Medium-term bioassay for carcinogens, In Vainio, H., Magee, P. N. McGregor, D. B. and McMichael, A. J. (eds), Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Assessment, IARC, Lyon, pp. 345-380.

Ito, N., H. Tsuda, M. Tatematsu, T. Inoue, Y. Tagawa, T. Aoki, S. Uwagawa, M. Kagawa, T. Ogiso, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima and M. Asamoto (1988) Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats—an approach for a new medium-term bioassay system, *Carcinogenesis*, **9**, 387-394.

Kato, R. (1986) Metabolic activation of mutagenic heterocyclic aromatic amines from protein pyrolysates, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **16**, 307-348.

rocyelic aromatic amines from protein pyrolysates, *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **16**, 307-348.

Mumtaz, M. M., I. G. Sipes, H. J. Clewell and R. S. H. Yang (1993) Risk assessment of chemical mixtures: biologic and toxicologic issues, *Fund. Appl. Toxicol.*, **21**, 258-269.

Sugimura, T., S. Sato and K. Wakabayashi (1988) Mutagens/carcinogens in pyrolysates of amino acids and proteins and in cooked foods: heterocyclic amines. In Woo, Y.-T., Lai, D. Y., Arcos, J. C. and Argus, M. F. (eds), Chemical Induction of Cancer, Structural Basis and Biological Mechanisms, Vol. 3C, Academic Press, San Diego, CA, pp. 681-710.

Reif, A. E. (1984) Synergism in carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 25-39.

Takahashi, M., K. Toyoda, Y. Aze, K. Furuta, K. Mitsumori and Y. Hayashi (1993) The rat urinary bladder as a new target of heterocyclic amine carcinogenicity: tumor induction by 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole acetate, *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 852-858.

Takahashi, S., R. Hasegawa, M. Mutai, N. Ito, M. Ochiai, M. Nagao and T. Sugimura (1994) Additive action of five heterocyclic amines in terms of induction of GST-P positive single cells and foci in rat liver and DNA adduct formation, *J. Toxicol. Pathol.*, **7**, 423-428.

Vainio, H., M. Sorsa and A. J. McMichael (1990) Complex Mixtures and Cancer Risk. IARC Scientific Publications, No. 104. IARC, Lyon, France.

Wakabayashi, K., M. Nagao, H. Esumi and T. Sugimura (1992) Food-derived mutagens and carcinogens, *Cancer Res.*, **52**, 2092s-2098s.

第23回大会パネルディスカッション  
「環境変異原の複合作用とその評価」

複合効果の理論的考察  
—*In vivo* 小核誘発性について—

Theoretical consideration of combination effects of clastogens  
—In the case of *in vivo* micronucleus induction—

林 真, 鈴木孝昌, 祖父尼俊雄  
Makoto Hayashi, Takayoshi Suzuki and Toshio Sofuni

国立衛生試験所変異遺伝部  
158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年3月31日)

Summary

In a study of how two clastogens induce micronuclei when administered together, ethylating agents [ethyl methanesulfonate (EMS), ethyl ethanesulfonate (EES) and *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)], spindle poisons [vincristine sulfate (VINC) and colchicine (COL)], and an oxidizing agent [potassium bromate (KBrO<sub>3</sub>)] were used as model chemicals. We evaluated the effect of combinations of these clastogens by the mouse peripheral blood micronucleus assay using the acridine orange supravital staining.

When two clastogens with different modes of action were combined, e.g., EMS+VINC or EMS+KBrO<sub>3</sub>, MNRET frequencies could be predicted by sum of the MNRET frequencies induced by each clastogen individually. This can be explained by the independent lesion and heteroaddition model.

The MNRET frequency induced by the combination of alkylating agents, EMS+EES, was greater than the sum of the frequencies induced by the individual chemicals. The combination of two spindle poisons, VINC+COL, yielded higher frequencies than the sum of the frequencies individually induced as well as the combination of alkylating agents. These findings can be explained by the equivalent lesion and isoaddition model.

This "apparent" synergism greatly depends on the shape of the dose-response curve of each chemical. If the dose-response curves of two chemicals are linear, then their effect in combination is likely to be additive, regardless of their modes of action. On the other hand, if the dose-response curves of two chemicals are non-linear (exponential), their effect in combination is likely to be greater than the sum of each individual effect, even when identical chemicals are combined (autosynergism).

The effect of clastogen combinations in micronucleus induction cannot be simply predicted, because responses can be affected by many factors, e.g., the toxico-kinetics of each chemical, DNA lesions and their repair, and chemical interactions. It is important, however, to understand the shape of the dose-response curve for each chemical in order to predict the effect of the chemicals in combination.

Keywords: micronucleus; combination effect; synergism; additivity

## 1. はじめに

化学物質の遺伝毒性について、これまでは主として単独の影響が評価されてきた。しかし、人への暴露状況を考えると、2種類以上の化学物質の複合効果を考慮して総合的に評価する必要がある。複数の化学物質で処理されたときの反応が、それぞれの物質単独での反応の和にならない場合がある。単純な和（加算効果, additive）より高くなる場合と低くなる場合があり、それぞれ相乗効果 (synergism), 拮抗作用 (antagonism) と呼ばれる。物質によって反応機序は様々であり、それらを組み合わせたときにどのような現象が起こるかを予測することは困難である。さらに、作用機序が類似したもののどうしが組み合わせられた場合、見かけの相乗効果が観察される場合がある (Kawazoe *et al.*, 1986; Suzuki *et al.*, 1995)。本稿では, *in vivo* における小核の誘発性に関してこの見かけの相乗効果について述べる。がん原性における複合効果に関しては Reif (1984) による優れた報告があるので参照されたい。

系を単純にするため、作用機序が類似したものの、および異なるもの2種類の化学物質を組み合わせる場合を考える。代表的なアルキル化剤として ethyl methanesulfonate (EMS, 62-50-0), ethyl ethanesulfonate (EES, 1912-30-7), 紡錘体阻害剤として vincristine sulfate (VINC, 143-67-9) と colchicine (COL, 64-86-8), また酸化剤として臭素酸カリ (KBrO<sub>3</sub>, 7758-01-2) を用いた。これらの化学物質単独, または2種類を組合せて, ddY 系マウスに投与し, 尾部より微量の末梢血を採取し, 小核を有する網赤血球 (MNRET) の出現頻度をアクリジンオレンジ超生体染色法を用いて検討した (Hayashi *et al.*, 1990)。

## 2. 用量反応関係

単純な加算効果よりはずれたものをどのように説明すればよいのであろうか。用量反応関係は化学物質によって異なる。代表的な例を Fig. 1 に示す。直線を示すものが MMC (Hara *et al.*, 1992), 下に凸のグラフが EMS (Suzuki *et al.*, 1995), 上に凸のものが Ara-C (Iwakura *et al.*, 1992) 単独によって誘発された小核細胞の出現頻度と用量の関

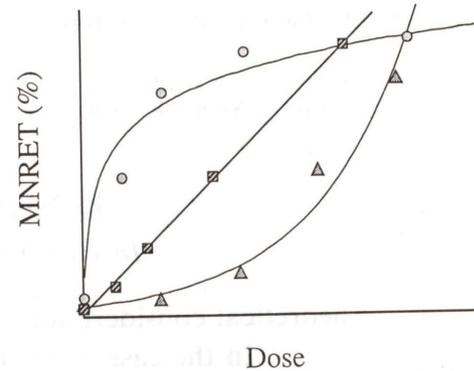


Fig. 1. Representative dose-response relationship in induction of micronuclei. Linear (□): MMC; non-linear (△): EMS; non-linear (○): Ara-C.

係である。

複合効果を考える場合, 最も単純な組み合わせは, 同じ物質の組み合わせである。その物質の用量反応関係が直線の場合には, それぞれの用量での小核誘発頻度の和と, それぞれの用量を足し合わせた用量での小核誘発頻度が一致する。しかし, 用量反応関係が下に凸を示すような化学物質の場合には, それぞれの用量での小核誘発頻度の和と, それぞれの用量を足し合わせた用量での小核誘発頻度を比較すると, 後者の方がずっと高くなる (autosynergism, Reif, 1984)。

上の例からも明らかのように, 化学物質の組み合わせによる効果を考える場合, それぞれの化学物質単独での, 用量反応関係を充分把握しておく必要がある。さらに, それぞれの化学物質がどのような機序で小核を誘発するかを理解しておくことも必要で, 同一物質を用いた場合の, 「用量の和での反応」を仮定できるか否かの評価において重要な要素となる。

## 3. 単純加算モデル

単純な加算モデルが成り立つ条件として以下のような場合が考えられる。まず, 小核を誘発する作用機序が同じで, それぞれ単独では一次式で回復できる直線を示す場合, または, 作用点, 標的が全く異なり, 化学的にも反応しない場合である。それらの場合の複合作用は加算的となることが期待できる。

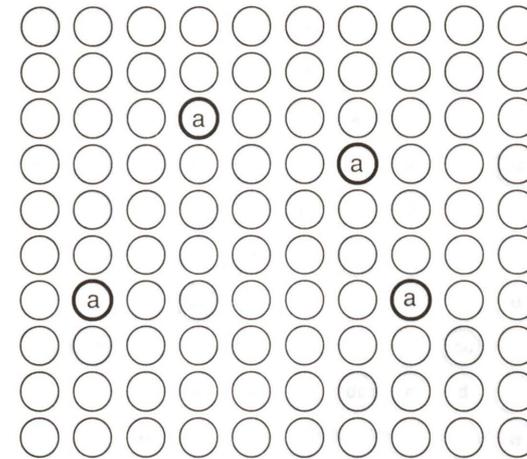


Fig. 2. Model for heteroaddition.

Treatment with chemical A alone (left): "a" induces micronucleus (4/100). Treatment with chemical A and B (right): "a" or "b" induces micronucleus (8/100). The effect in combination of chemical A and B can be explained by the sum of the effect of A alone and that of B alone.

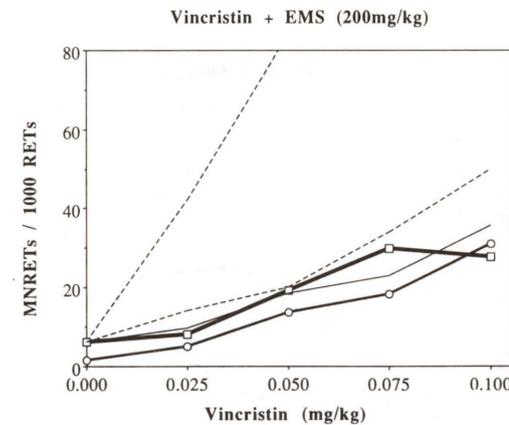


Fig. 3. The micronucleus induction by the combination of EMS and VINC. Thick-line shows the observed values and the thin-line shows the expected values by simple addition. Broken-lines indicates the predicted values by isoaddition (see text).

Fig. 2 に単純な加算効果を説明するためのモデルを示す。この図の a と b はそれぞれ化学物質 A および B で処理した時のヒットで, それぞれ独立に細胞に働きかけ, 小核を生成すると仮定する。また, a または b を 1 つ以上持つものが小核細胞となる。左図は一方の化学物質 A で単独処理した場合で, 4 つの小核細胞が観察されることを示している。A と全く異なった作用機序により小核

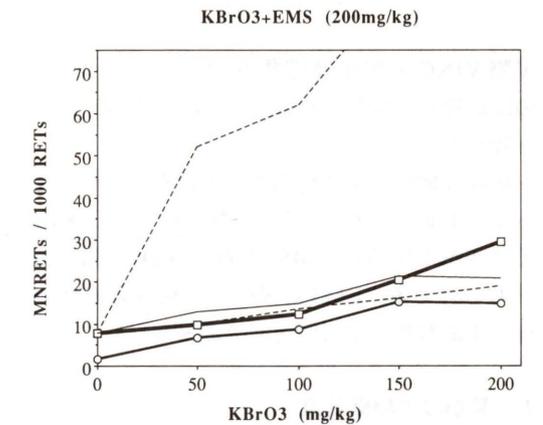
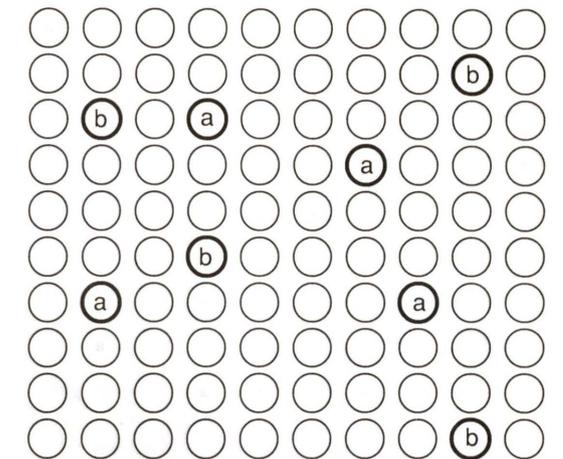


Fig. 4. The micronucleus induction by the combination of EMS and KBrO<sub>3</sub>. See legend to Fig. 3.

を誘発するもう一方の化学物質 B を同時に処理することにより, 8 つの小核細胞が観察され, 単純な加算効果が成立する (heteroaddition, Reif, 1984)。

EMS (200 mg/kg) と vincristine (VINC) を組み合わせた場合の実例を Fig. 3 に示す。EMS は DNA をエチル化するアルキル化剤で, VINC は細胞質中のタンパク質であるチューブリンを標的とする紡錘体阻害剤であり, 標的, 作用機序が全く異なる。従って, 単純な加算効果が期待できる。

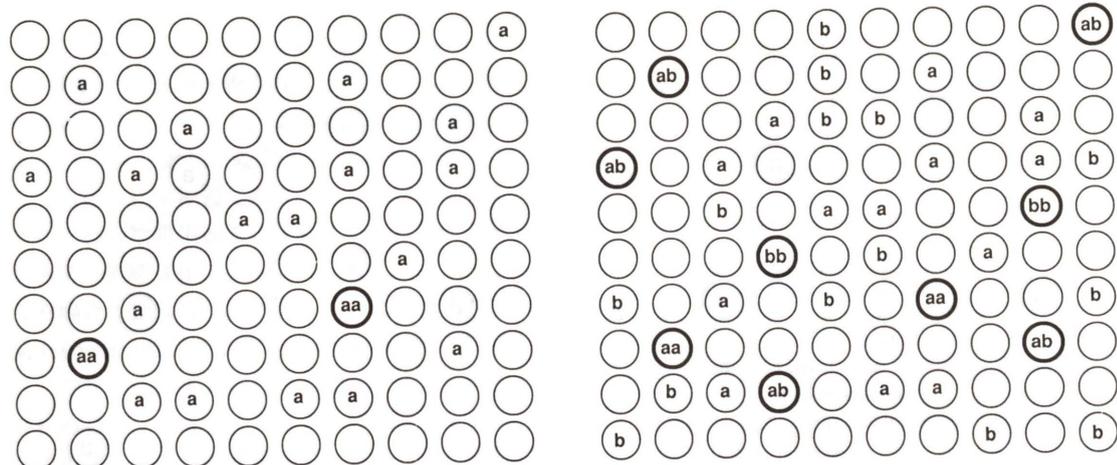


Fig. 5. A model to explain an apparent synergism. Treatment with chemical A alone (left): "aa" induces micronucleus (2/100). Treatment with chemical A and B (right): "aa", "bb" or "ab" induces micronucleus (9/100). The effect in combination of chemical A and B are more than that expected by the sum of the effect of A alone and that of B alone (see text for more detail explanation).

実際 VINC の用量反応曲線に 200 mg/kg の EMS の反応量を上乘せした推定値 (細い実線) と良く一致した。

単純な加算効果で説明できる組み合わせ例をもう 1 つ Fig. 4 に示す。これは酸化剤である  $\text{KBrO}_3$  とアルキル化剤の EMS (200 mg/kg) を組み合わせたものである。EMS と VINC の組み合わせと同様、単純な加算で説明可能であった。

#### 4. 見かけの相乗効果

次に単純な加算では説明できないような (相乗) 効果について述べる。この現象の 1 つの説明として、細胞あたり 2 つ以上のヒットを受けた場合に初めて小核を生ずる、と仮定した単純なモデルで考えることができる。Fig. 5 にモデルを示す。この図には 100 個の細胞と 22 のヒットが示されており、2 項分布を想定した場合には、確率的に 2 個の小核細胞が生じることになる (左図、化学物質 A)。これに、ほぼ同じ作用機序によって小核を誘発する化学物質 B との組み合わせを考える。すなわち、A の 2 ヒット (aa) および B の 2 ヒット (bb) の他に A の 1 ヒットと B の 1 ヒット (ab) で小核を生ずると仮定する。化学物質 B も A と同じ 22 ヒットを生ずる用量を用いた場合、単純

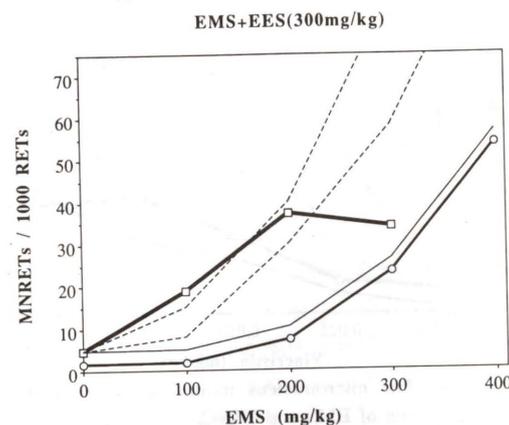


Fig. 6. The micronucleus induction by the combination of EMS and EES. See legend to Fig. 3.

な加算が成立するならば 4 個の小核細胞が期待される。しかし、確率論的には 9 個の小核細胞が生じ (右図)、単純な加算効果によって期待されるより多くの小核細胞が誘発されることになる (iso-addition, Reif, 1984)。全体としてのヒット数が多くなればなるほど、1 つの細胞に 2 つ以上のヒットを持つ細胞、すなわち小核を有する細胞の出現頻度が飛躍的に増加することがうかがえる。

Isoaddition の実例として、反応機構もほぼ同じ

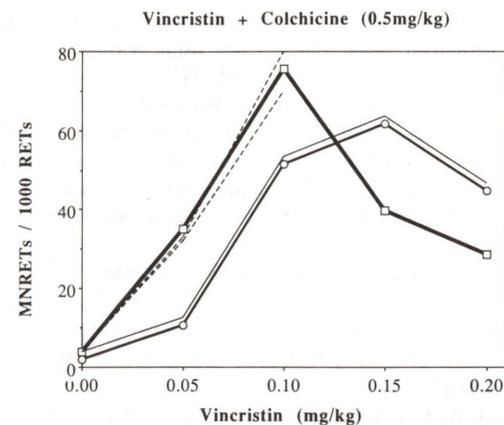


Fig. 7. The micronucleus induction by the combination of VINC and COL. See legend to Fig. 3.

であるアルキル化剤、EMS と EES の組み合わせについて示す (Fig. 6)。100, 200, 300, 400 mg/kg の EMS に 300 mg/kg の EES を組み合わせたもので、単純な加算 (細い実線) では説明できない強い反応が観察された。これは、EMS と EES の作用点が全く同じであるとして 300 mg/kg の EES に相当する EMS の用量に換算し (約 150 mg/kg)、EMS どうしを組み合わせたものとみなすことにより、EMS の用量反応曲線より推定した反応と良く一致した。すなわち、100 mg/kg の EMS と 300 mg/kg の EES の組み合わせは、100 + 150 = 250 mg/kg の EMS 単独投与に相当する。Fig. 6 の細い破線は、一方の化学物質を他方の化学物質の量に換算したときに想定される反応曲線を示してある。

他の isoaddition の例として、紡錘体阻害剤どうしの組み合わせを Fig. 7 に示す。この組み合わせも単純な加算効果 (細い実線) では説明できない程強い反応が観察された。ここでも、COL 0.5 mg/kg の反応を VINC で同じ強さの反応に要する用量 (約 0.025 mg/kg) を求め、VINC どうしの組み合わせと考え、VINC の用量反応曲線より推定した値 (細い破線) で説明可能であった。

#### 5. おわりに

同じ作用機序を持つ化学物質どうしの組み合わせでは Fig. 8 に示すように、一方の用量を、同じ作用を示す他方の用量で置き換え、単一物質の用

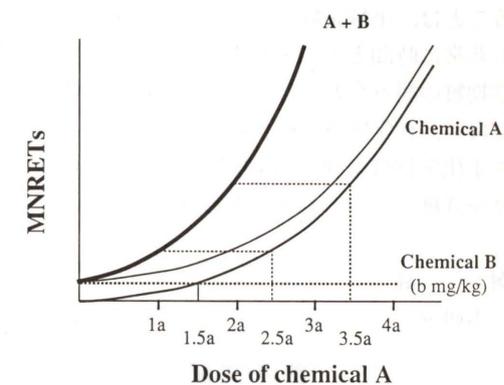


Fig. 8. An apparent synergism.

The effect of chemical B at b mg/kg in induction of micronuclei is equivalent to that of chemical A at 1.5a mg/kg. Therefore, the effect of co-treatment with 1a mg/kg of A and b mg/kg of B equals the effect of (1a + 1.5a) mg/kg of A. Similarly, the effect of combination of 2a mg/kg of A and b mg/kg of B is equivalent to that of 3.5a mg/kg of A. When the dose-response curve is linear then the combination effect can be explained by a simple addition. If the dose-response of A is not linear, then the "apparent" synergism (or antagonism) can be observed. The thin-line in this figure showed the expected values by simple addition.

量の足し算として、その化学物質の用量反応曲線より推定可能である (Kawazoe et al., 1986; Suzuki et al., 1995)。用量反応関係が直線の場合には効果も単純な加算で説明できるが、下に凸の反応曲線を示す化学物質群については、加算以上の効果が観察されることになる。この場合に加算以上の効果を「相乗効果」と呼んで良いかどうか? これは、あくまで「見かけの相乗効果」であって、「真の相乗効果」とは区別されるべきものとする。「真の相乗効果」とは、この見かけの相乗効果以上の効果を示すものと定義すべきである。

小核細胞の出現頻度は、代謝、DNA 修復、細胞毒性をはじめとする非常に多くの要因によって影響を受ける。また、詳細な用量反応関係が不明な場合も多く、総てこれらのモデルで説明することは無理である。しかし、多くの「見かけの相乗効果」を示す組み合わせがあり、「真の相乗効果」と混同されている可能性が高い。

実際に 2 種類の化学物質を組み合わせで試験す

ることは、小核試験のような短期試験法であっても非常に時間と労力を要する。さらに、多数の化学物質の組み合わせになると、ほぼ不可能と言って良い。化学物質の複合効果を予測するために、まず化学物質単独の用量反応関係と、その作用機序を詳細に調べる必要がある。

#### 謝 辞

本研究の一部は厚生省がん研究助成金による。

#### 参考文献

- Hara, M., S. Nakagawa, E. Fujioka, E. Ayukawa and T. Izuchi (1992) Detection of micronuclei in peripheral blood of mitomycin C-treated mice using supravital staining with acridine orange, *Mutat. Res.*, **278**, 175-179.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M.

Ishidate, Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.*, **245**, 245-249.

Iwakura, K., H. Tamura, A. Matsumoto, S. Ajimi, S. Ogura, K. Kakimoto, T. Matsumoto and M. Hayashi (1992) The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes by acridine orange supravital staining with 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine, *Mutat. Res.*, **278**, 131-137.

Kawazoe, Y., A. Hakura and K. Kohda (1986) Studies on chemical carcinogens and mutagens. XXXIII; Mutation frequencies induced by combinations of methylating and/or ethylating mutagens, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 250-255.

Reif, A. E. (1984) Synergism in carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 25-39.

Suzuki, T., M. Hayashi, A. Hakura, A. O. Asita, Y. Kodama, M. Honma and T. Sofuni (1995) Combination effects of clastogens in the mouse peripheral blood micronucleus assay, *Mutagenesis*, **10**, 31-36.

第23回大会シンポジウム

「植物成分によるがん予防とそのメカニズム」

## 香辛料 caraway のアルキル化剤に対する抑制効果

### Inhibitory effect of caraway seeds on mutation by alkylating agents

木内武美<sup>1</sup>, 片岡佳子<sup>1</sup>, 東元 稔<sup>2</sup>, Juntipa Purintrapiban<sup>1</sup>, 有持秀喜<sup>1</sup>,  
Syed M. Shaheduzzaman<sup>1</sup>, 秋本 茂<sup>1</sup>, 松本久男<sup>2</sup>,  
Usanee Vinitketkumnuen<sup>3</sup>, 大西克成<sup>1</sup>  
Takemi Kinouchi<sup>1</sup>, Keiko Kataoka<sup>1</sup>, Minoru Higashimoto<sup>2</sup>, Juntipa Purintrapiban<sup>1</sup>,  
Hideki Arimochi<sup>1</sup>, Syed M. Shaheduzzaman<sup>1</sup>, Shigeru Akimoto<sup>1</sup>,  
Hisao Matsumoto<sup>2</sup>, Usanee Vinitketkumnuen<sup>3</sup>  
and Yoshinari Ohnishi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>徳島大学医学部  
770 徳島市蔵本町 3-18-15

<sup>2</sup>徳島文理大学薬学部  
770 徳島市山城町西浜傍 180

<sup>3</sup>チェンマイ大学医学部  
チェンマイ 50002, タイ

<sup>1</sup>Department of Bacteriology, School of Medicine, The University of Tokushima,  
Kuramoto-cho, Tokushima 770, Japan

<sup>2</sup>Department of Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Tokushima Bunri University, Yamashiro-cho, Tokushima 770, Japan

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,  
Chiang Mai 50002, Thailand

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年5月31日)

#### Summary

A hot water extract of caraway seeds (*Carum carvi* L.), a kind of spices, inhibited the mutagenicity induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) in the Ames *Salmonella* mutation test using the preincubation procedure. The antimutagenic activity was detected in a supernatant fraction (S-100) obtained by centrifugation of the extract at 100,000  $\times g$  for 2 hr. The activity was stable for treatment of heat, acid and alkali. The S-100 fraction was antimutagenic for the *ogt*<sup>+</sup> strains of *S. typhimurium* TA100 (*ada*<sup>+</sup>) and YG7100 (*ada*<sup>-</sup>), but not antimutagenic for the *ogt*<sup>-</sup> strains YG7104 (*ada*<sup>+</sup>) and YG7108 (*ada*<sup>-</sup>). High pressure liquid chromatography analysis showed that the amount of *O*<sup>6</sup>-methylguanine in the strain YG7100 treated with MNNG was decreased in the presence of the caraway extract. These results suggest that antimutagenic activity of caraway extract is influenced by *Ogt* *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. The caraway extract also inhibited methylazoxymethanol (MAM) acetate-induced mutagenesis in the Ames test and inhibited the formation of aberrant crypts in the colons of rats administered 1,2-dimethylhydrazine which is metabolized in the liver and changed into MAM in the colon. The caraway extract did not inhibit the intestinal  $\beta$ -glucuronidase activity. These results suggest that the caraway extract inhibits the methylation, mutation and tumor formation induced by the alkylating agents, MNNG and MAM.

**Keywords:** spice, antimutagenic activity, alkylating agents, *O*<sup>6</sup>-methylguanine, aberrant crypt foci

## 1. はじめに

癌発生の要因は種々存在するが、その大部分は環境因子によるものであり、なかでもライフスタイルが重要であるといわれ、癌発生の35%は食生活に由来すると考えられている (Doll and Peto, 1981). しかし、一方においては逆に食品中から、癌を抑制する物質も次第に明らかにされつつある (Wattenberg, 1992b). 従って、これらの食品中の発癌抑制物質を用いて癌の予防を積極的に行なおうとする chemoprevention が最近注目されている. アメリカ合衆国では、癌予防のためのデザイナーフーズ計画が米国国立がん研究所を中心に進行中で植物成分が着目されている. これまでは癌予防の1つの方法として、環境中の変異原性・発癌性を有する物質を検索して、その物質との接触を避けるということが考えられていたが、chemoprevention は発癌抑制に有用な物質を検索し、より積極的に癌を予防していこうという考え方である.

発癌抑制物質を分類すると、発癌物質の形成を阻害する物質および発癌のイニシエーションに作用する blocking agent とイニシエーション後 (プロモーション/プログレッション) に作用する suppressing agent に大別される (Ramel *et al.*, 1986; Wattenberg, 1992a; Morse and Stoner, 1993). もちろん両方の活性を有する物質も存在する. また、作用機序として代謝活性化の阻害、解毒酵素活性の亢進、DNA 修復の誘導、癌遺伝子の発現

Table 1. Classes of chemopreventative agents (Morse and Stoner 1993)

1. Inhibitors of carcinogen formation
2. Blocking (anti-initiating) agents
  - (1) Inhibition of cytochrome P450
  - (2) Induction of cytochrome P450
  - (3) Induction of phase II enzymes
  - (4) Scavenging electrophiles
  - (5) Induction of DNA repair
3. Suppressing (antipromotion/antiprogession) agents
  - (1) Inhibition of polyamine metabolism
  - (2) Inhibition of arachidonic acid metabolism
  - (3) Protease inhibition
  - (4) Induction of differentiation
  - (5) Inhibition of oncogene expression
  - (6) Inhibition of protein kinase C
  - (7) Inhibition of oxidative DNA damage

阻害、DNA の酸化的傷害の阻害などが知られている (Table 1).

## 2. 香辛料について

タイ王国における1989年の消化器系および腹膜の悪性腫瘍による死亡率は人口10万人当たり、9.2人と推定されており (Division of Health Statics, 1989)、日本の1/5以下である. その違いの理由の1つは、経口摂取する物質の違いにあると考え、香辛料に注目した. もちろん香辛料のみでこれだけの差が説明できるものではなく、他の要因も考えなければならない. もう1つ香辛料に注目して選んだ理由として、イタリアでの胃癌患者についての case-control study がある (Buiatti *et al.*, 1989). その研究結果の中に、胃癌リスクを下げる食物として、生野菜、果物の摂取と共に香辛料も含まれている (Table 2).

香辛料の分類を Table 3 に示した. そのうちの1つであるセリ科の caraway (*Carum carvi* L. ヒメウイキョウ) について blocking agent として働くかどうか、また、そのメカニズムについて検討した. caraway の種は薬味として使用される他にライ麦製の黒パン、ビスケット、クッキー、チーズ

Table 2. Relative risks of gastric cancer according to level of consumption of groups of foods (Buiatti *et al.*, 1989)

Food group	Tertile			Trend p-value
	1 (low)	2	3	
Bread and pasta	1.0	1.1	1.0	0.99
Traditional soups	1.0	1.6	2.4	<0.001
Meats	1.0	1.3	1.8	<0.001
Cold cuts	1.0	1.1	1.2	0.07
Salted and dried fish	1.0	1.1	1.4	0.001
Other fish	1.0	1.0	1.2	0.14
Milk and dairy products	1.0	1.0	1.1	0.49
Seasoned cheeses	1.0	1.0	1.2	0.10
Raw vegetables	1.0	0.8	0.6	<0.001
Cooked vegetables	1.0	0.9	1.1	0.58
Beans	1.0	0.8	0.8	0.10
Spices	1.0	0.7	0.7	<0.001
Onion/garlic	1.0	1.0	0.8	0.04
Citrus fruit	1.0	0.7	0.6	<0.001
Other fresh fruit	1.0	0.6	0.4	<0.001
Dried and preserved fruit	1.0	0.8	1.0	0.87
Desserts	1.0	0.7	0.8	0.02

Table 3. Taxonomical classification of spices (Nakatani, 1992)

Angiospermae	
1. Dicotyledoneae	
(1) Sympetalae	
1) Tubiflorae	
Labiatae...basil, marjoram, mint, oregano, rosemary, sage, savory, thyme	
Solanaceae...chili, paprika, red pepper	
Pedaliaceae...sesame	
2) Campanulatae	
Compositae...chamomile, chicory, tarragon	
(2) Archichlamydeae	
1) Piperales	
Piperaceae...cubeba, long pepper, pepper	
2) Ranales	
Myristicaceae...mace, nutmeg	
Lauraceae...bay leaf, cassia, cinnamon	
Magnoliaceae...star-anise	
3) Rhoadales	
Cruciferae...mastard, wasabi	
4) Myrtiflorae	
Myrtaceae...allspice, clove	
5) Umbelliflorae	
Umbelliferae...anise, caraway, celery, chervil, coriander, cumin, dill, fennel, parsley	
2. Monocotyledoneae	
1) Liliiflorae	
Liliaceae...garlic, onion	
Iridaceae...saffron	
2) Scitamineae	
Zingiberaceae...cardamom, ginger, turmeric	
3) Orchidales	
Orchidaceae...vanilla	

などに原形のまま使用されている.

他の香辛料については、シソ科の rosemary が banzo(a)pyrene (BaP) や 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) および azoxymethane による腫瘍形成を抑制 (Huang *et al.*, 1994) することや、ユリ科の garlic による DMBA 誘発腫瘍形成の抑制や glutathione S-transferase の活性上昇が報告されている (Liu *et al.*, 1992). また、よく研究されているものの1つとして、しょうが科の turmeric の脂溶性成分である curcumin がある. この物質は、カレー粉の黄色素として有名であるが、タバコの煙、BaP, DMBA の変異原性を低下させること (Nagabhushan *et al.*, 1987), BaP や DMBA での発癌を抑制すること (Nagabhushan and Bhide, 1987; Huang *et al.*, 1989), BaP の DNA 付加体形

成を阻害すること (Mukundan *et al.*, 1993), arachidonic acid カスケードを阻害すること (Huang *et al.*, 1991), protein kinase C を阻害すること (Liu *et al.*, 1993), azoxymethane で誘発される aberrant crypt foci (ACF) の形成を阻害すること (Rao *et al.*, 1993a) などが報告されている. その他の香辛料中の有効成分としては、organosulfides, phenols, aromatic isothiocyanates, flavons, terpens などの blocking agents としての作用が知られている (Wattenberg, L. W. 1992a). また、香辛料には、強い抗酸化活性が存在する (Nakatani, 1992).

## 3. 各種変異原に対する caraway 熱水抽出物の抗変異原性

caraway を熱水、メタノール、ヘキサンで順次抽出し (Fig. 1), それぞれの抽出物についてネズミチフス菌を用いて各種変異原物質に対する抗変異原性を Ames 法で調べると、熱水抽出物に N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) に対する強い抗変異原性が観察された (Higashimoto *et al.*, 1993). この画分は MNNG 以外に、N-nitrosodimethylamine, ICR-170, methylazoxymethanol (MAM) acetate の変異原性を抑制した. しかし、1-nitropyrene, 3-nitrofluoranthene, AF-2, 2-aminoanthracene, 2-acetylaminofluorene, methyl

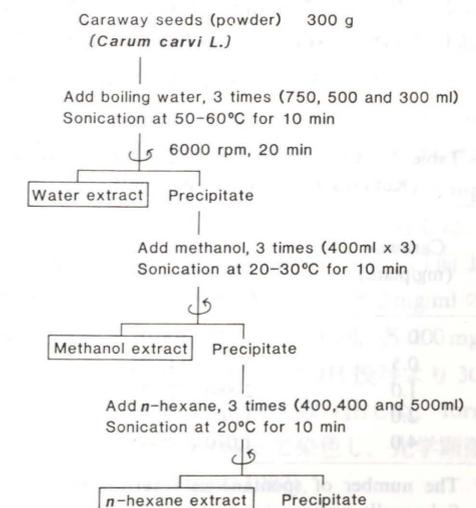


Fig. 1. Fractionation of caraway sample (Higashimoto *et al.*, 1993).

methanesulfonate, ethyl methanesulfonate, *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, *N*-methyl-*N*-nitrosourea, *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, IQ, Trp-P-1 などの変異原性は抑制しなかった (Higashimoto *et al.*, 1993; Kataoka *et al.*, unpublished data). この結果は, *caraway* の抗変異原作用には基質特異性があることを示したものである.

*caraway* の熱水抽出物を分別遠心すると, 抗変異原活性は, 100,000 × *g* 遠心上清 (S-100) 画分に観察された. この S-100 画分の抗変異原活性は, 100°C で 60 分加熱しても安定であり, 塩酸で pH 1 まで下げて 60 分間処理しても, 水酸化ナトリウムで pH 13 まで上げて 60 分間処理しても安定であった. また, 抗変異原活性は, 熱水抽出液をブタノールで抽出しても水層に残存しており, この物質は水溶性であることを示している. *caraway* 中の抗発癌物質として D-carvon が知られている (Wattenberg *et al.*, 1989) が, D-carvon は脂溶性物質であることから今回抽出した抗変異原性を有する物質は, 未知物質である可能性が高い. 以下, この S-100 画分を用いて実験を行った.

#### 4. MNNG に対する *caraway* の抗変異原性の機序

MNNG はチオール化合物によって, methyl diazonium ion に分解され (Fig. 2), DNA 塩基をメチル化し, 生じた *O*<sup>6</sup>-methylguanine が, DNA 複製を通じて G<sup>m</sup>·C → G<sup>m</sup>·T → A·T という変化を起こす. その結果, GC 塩基対が AT 塩基対に変化する

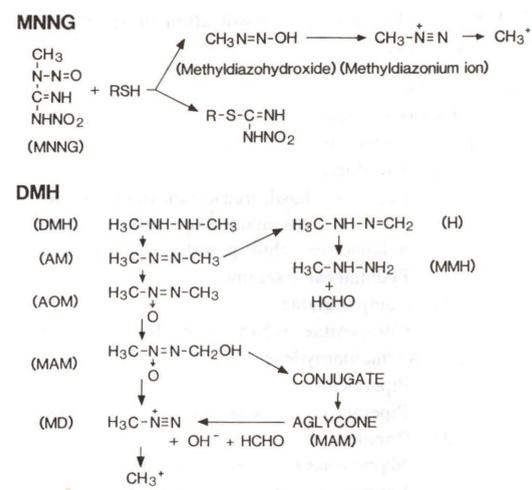


Fig. 2. Formation of methyl diazonium ion from *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and 1,2-dimethylhydrazine. MNNG, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine; DMH, 1,2-dimethylhydrazine; AM, azomethane; AOM, azoxymethane; MAM methylazoxymethanol; MD, methyl diazonium ion; MMH, monomethylhydrazine; H, hydrazone.

る (transition 変異). 一方, 細菌からヒトに至るまでほとんど全ての生物は, *O*<sup>6</sup>-methylguanine を修復する酵素を持っている (Lindahl *et al.*, 1988). この酵素は *O*<sup>6</sup>-methylguanine に作用してメチル基を取り除き, それを酵素蛋白自体に移す. それにより, DNA は修復されるが, 酵素は活性を失う. 大腸菌は, 2つの型の *O*<sup>6</sup>-methylguanine DNA-methyltransferase を持っている. 1つは, *ogt* 遺伝子でコードされる酵素で細胞内に構成的に存在す

Table 4. Effect of S-100 fraction of *caraway* seeds on the mutagenicity of MNNG for various strains (Kataoka *et al.*, unpublished data)

Caraway (mg/plate)	Revertants/plate (%) <sup>a</sup>			
	TA100 ( <i>ada</i> <sup>+</sup> , <i>ogt</i> <sup>+</sup> ) (0.5 μg/plate) <sup>b</sup>	YG7108 ( <i>ada</i> <sup>-</sup> , <i>ogt</i> <sup>-</sup> ) (0.02 μg/plate) <sup>b</sup>	YG7104 ( <i>ada</i> <sup>+</sup> , <i>ogt</i> <sup>-</sup> ) (0.05 μg/plate) <sup>b</sup>	YG7100 ( <i>ada</i> <sup>-</sup> , <i>ogt</i> <sup>+</sup> ) (0.5 μg/plate) <sup>b</sup>
0	2,220 (100.0)	1,610 (100.0)	1,140 (100.0)	2,810 (100.0)
0.5	3,170 (142.7)	1,620 (100.7)	1,200 (104.7)	2,770 (98.4)
1.0	2,880 (129.4)	1,670 (103.6)	1,050 (92.1)	1,640 (58.3)
2.0	1,760 (79.3)	1,690 (105.1)	970 (84.8)	787 (28.0)
4.0	1,070 (48.3)	1,660 (103.2)	811 (70.9)	417 (14.8)

<sup>a</sup> The number of spontaneous revertants was subtracted in all data. The number of spontaneous revertants of *Salmonella typhimurium* strains TA100, YG7108, YG7104 and YG7100 were 122, 18, 13 and 10 His<sup>+</sup> revertants/plate, respectively.

<sup>b</sup> MNNG concentration/plate.

Table 5. Effects of *caraway* seeds on MNNG-induced mutagenicity and *in vivo* formation of *O*<sup>6</sup>-methylguanine in *Salmonella typhimurium* strain YG7100 (Kataoka, *et al.*, unpublished data)

MNNG	Caraway	Revertants/plate	<i>O</i> <sup>6</sup> -methylguanine (pmol/100 μg DNA) (%)	
-	-	0	0.0031	(0.005)
+	-	21,000	59.0	(100)
+	+	8,730	17.4	(29.5)

る. もう1つは, *ada* 遺伝子の産物でアルキル化剤処理によって適応的に合成される. そこで, ネズミチフス菌のこれら修復酵素の欠損変異株 (Yamada *et al.*, 1993, 1995) を用いて, MNNG に対する *caraway* 熱水抽出液の抗変異原性を調べた. その結果, *caraway* の抗変異原性は, TA100 株 (*ada*<sup>+</sup>, *ogt*<sup>+</sup>) および YG7100 株 (*ada*<sup>-</sup>, *ogt*<sup>+</sup>) に対して観察された. しかし, YG7104 株 (*ada*<sup>+</sup>, *ogt*<sup>-</sup>) および YG7108 株 (*ada*<sup>-</sup>, *ogt*<sup>-</sup>) に対しては観察されなかった (Table 4). このことは, *caraway* の抗変異原性の発現には *ogt*<sup>+</sup> 遺伝子産物が重要な役割を果たしていることを示唆している.

さらに, *caraway* 存在下で MNNG の変異原性が抑制された YG7100 株を用いて, *caraway* 存在下および非存在下に MNNG で処理した菌から DNA を抽出し, 菌体 DNA 中の *O*<sup>6</sup>-methylguanine 量を高速液体クロマトグラフィーを用い蛍光検出器で測定した. その結果, *caraway* 存在下に MNNG 処理した菌体では, DNA 100 μg 当たり, *O*<sup>6</sup>-methylguanine 量は 17.4 pmol で, *caraway* 非存在下での 59.0 pmol に比べて 29.5% に減少していた (Table 5).

#### 5. *caraway* 処理ラットにおける 1,2-dimethylhydrazine 誘発大腸アベラントクリプトの形成阻害

1,2-dimethylhydrazine (DMH) は, ラット, マウス, ハムスターなどの齧歯類に投与すると, その投与部位にかかわらず選択的に大腸癌を誘発する化学物質である (LaMont and O'Gronman, 1978). DMH は, 生体内で主に肝臓で代謝され azomethane, azoxymethane, さらに活性体である MAM に変換され, MAM がグルクロン酸抱合され, 胆汁中へ排泄される. 排泄された抱合体は腸内菌の持

つ  $\beta$ -glucuronidase で脱抱合され, MAM が遊離し, その MAM から methyl diazonium ion が生成され, この物質が, 大腸粘膜細胞の DNA をメチル化することで大腸癌を誘発すると考えられている (Fiala, 1975, Fig. 2). *caraway* が DMH の生体内活性化体である MAM の変異原性を抑制したので, DMH により引き起こされる aberrant crypt foci (ACF) の形成を抑制するかどうかを検討した. ACF は, 大腸の前癌症状で chemoprevention の biomarker としてよく使われている (Rao *et al.*, 1993a, b; Takahashi *et al.*, 1993). 大腸の ACF 数で initiation の強さがわかり, focus 当たりの crypt 数で promotion の強さがわかると言われている (McLellan and Bird 1988; Pretlow *et al.*, 1991). *caraway* 投与群の他に抗生物質投与群を実験群に加え, 抗生物質を投与して腸内菌数を減少させることによって腸内菌の持つ  $\beta$ -glucuronidase 活性を抑制した場合に, DMH により誘発される ACF 形成が影響されるかどうかについても検討した.

DMH は, 5 週齢雄の SD ラットに 1 週間に 3 回, 20 mg/kg 体重を 1 週間皮下投与した. DMH 投与群は, 実験期間中水で飼育した. *caraway* 処理群では, DMH 投与 3 日前より *caraway* 2 mg/ml を飲料水として与え, さらに 1 日 1 回 100 mg/kg 体重の *caraway* を胃ゾンデで胃内に投与した. また, 抗生物質処理群も, DMH 投与 3 日前より bacitracin, neomycin, streptomycin 各 2 mg/ml の混合液を飲料水として与え, 1 日 1 回, 各 200 mg/kg を胃内に投与した. 最初の DMH 投与より 30 日後にラットを屠殺し, 大腸を取り出した. formalin 固定後, methylene blue で染色し, 光学顕微鏡で ACF を数えた (Bird, 1987).

DMH 非投与群では, ほとんど ACF の形成は観察されなかった. しかし, DMH 投与群では結

Table 6. Inhibitory effect of caraway or antibiotics on formation of 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci in the colon of rats (Kinouchi *et al.*, unpublished data)

DMH	Treatment	Foci	Crypts/foci
+	Water	198.0±40.4 <sup>a</sup>	1.22±0.04
-	Water	10.7± 0.6 <sup>**b</sup>	1.00±0.00 <sup>**b</sup>
+	Antibiotics	44.8± 4.0 <sup>**</sup>	1.08±0.03 <sup>*</sup>
+	Caraway	79.8±21.8 <sup>**</sup>	1.09±0.04 <sup>*</sup>

<sup>a</sup> Means±S.D.

<sup>b</sup> Significant difference from the positive control (DMH and water) group shows \* ( $p < 0.05$ ) or \*\* ( $p < 0.01$ ).

腸粘膜に198個と多くACFが観察され、非投与群との間に有意な差が観察された (Table 6). caraway 処理ラットでは、DMH 投与群に比べて誘発される ACF が結腸において40.3%と有意に減少した。抗生物質処理群においても、DMH 投与群に比べて ACF 形成 (22.6%) は有意に減少した (Table 6)。さらに、focus 当たりの crypt 数を比較すると、caraway 処理群および抗生物質処理群ともに DMH 投与群よりも有意な減少が観察された (Table 6)。この caraway 処理は、腸管内の  $\beta$ -glucuronidase 活性に影響を与えなかった。これらの結果は、caraway 処理によって、DMH による大腸癌発生の initiation および promotion が抑制される可能性を示唆している。また、caraway 抽出物には、ウサギ赤血球膜に対する *t*-butylhydroperoxide による酸化に対する抗酸化活性があった (Kinouchi *et al.*, unpublished data)。現在、DMH による大腸癌に対する caraway および抗生物質処理の影響を検討中である。

## 6. おわりに

香辛料 caraway の熱水抽出物が大腸癌の発生を抑制することが証明されれば、その抑制物質を分離・精製して、構造を決定するとともに大腸癌抑制のメカニズムについて明らかにしたい。また、抑制物質は食物中から検出されたものであるから、安全性を確認した上で癌の化学予防に使える可能性が高いと思われる。最近多くの食品中に存在する抗変異・抗癌性物質が明らかにされつつある。しかし、ある物質がよいからとそればかり大量摂取すると、思わぬ副作用が起こる危険性が考えられる。従って、幅広く多くの食品をバランス良くとることが重要だと思われる。今後も食

品中の抗発癌物質による chemoprevention は医食同源という考え方からも益々活発な研究が行われるものと予測される。

## 謝 辞

本研究の一部は、文部省科学研究費、厚生省がん研究助成金、日米医学協力研究会の援助を受けた。Salmonella typhimurium YG7100 株、YG7104 株および YG7108 株は国立衛生試験所の能美健彦博士・山田雅巳博士より分与された。また、O<sup>6</sup>-methylguanine は京都大学放射線生物研究センターの池永満生博士・石崎寛治博士より分与された。ここに記して感謝申し上げる。

## 参考文献

- Bird, R. P. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings, *Cancer Lett.*, **37**, 147-151.
- Buiatti, E., D. Palli, A. Decarli, D. Amadori, C. Avellini, S. Bianchi, R. Biserni, F. Cipriani, P. Cocco, A. Giacosa, E. Marubini, R. Puntoni, C. Vindigni, J. Fraumeni, Jr. and W. Blot (1989) A case-control study of gastric cancer and diet in Italy, *Int. J. Cancer*, **44**, 611-616.
- Division of Health Statics, Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health (1989) Public Health Statics 1989, Thailand.
- Doll, R. and R. Peto (1981) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 1191-1308.
- Fiala, E. S. (1975) Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine, *Cancer*, **36**, 2407-2412.
- Higashimoto, M., J. Purintrapiban, K. Kataoka, T. Kinouchi, U. Vinitketkumnuen, S. Akimoto, H. Matsumoto and Y. Ohnishi (1993) Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal

- plant in Thailand, *Mutation Res.*, **303**, 135-142.
- Huang, M-T., C-T. Ho, Z. Y. Wang, T. Ferraro, Y-R. Lou, K. Stauber, W. Ma, C. Georgiadis, J. D. Laskin and A. H. Conney (1994) Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and urosolic acid, *Cancer Res.*, **54**, 701-708.
- Huang, M-T., C. R. Smart, C. O. Wong and A. H. Conney (1989) Inhibitory effect of curcumin, chorogenic acid and felulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Res.*, **48**, 5941-5945.
- Huang, M-T., T. Lysz, T. Ferraro, T. A. Abidi, J. D. Laskin and A. H. Conney (1991) Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis, *Cancer Res.*, **51**, 813-819.
- LaMont, J. T. and T. A. O'Gorman (1978) Experimental colon cancer, *Gastroenterology*, **75**, 1157-1167.
- Lindahl, T., B. Sedgwick, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (1988) Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents, *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 133-157.
- Liu, J., R. I. Lin and J. A. Milner (1992) Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors and DNA adducts by garlic powder, *Carcinogenesis*, **13**, 1847-1851.
- Liu, J-Y., S-J. Lin and J-K. Lin (1993) Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells, *Carcinogenesis*, **14**, 857-861.
- McLellan, E. A. and P. R. Bird (1988) Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murine colons, *Cancer Res.*, **48**, 6183-6186.
- Morse, M. A. and G. D. Stoner (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects, *Carcinogenesis*, **14**, 1737-1746.
- Mukundan, M. A., M. C. Chacko, V. V. Annapurna and K. Krishnaswamy (1993) Effect of turmeric and curcumin on BP-DNA adducts, *Carcinogenesis*, **14**, 493-496.
- Nagabhusan, M. and S. V. Bhide (1987) Antimutagenicity and anticarcinogenicity of turmeric (*Curcuma longa*), *J. Nutr. Growth Cancer*, **4**, 83-88.
- Nagabhusan, M., A. J. Amonkar and S. V. Bhide (1987) *In vitro* antimutagenicity of curcumin against environmental mutagens, *Fd. Chem. Toxic.*, **25**, 545-547.
- Nakatani, N. (1992) Natural antioxidants from spices, In: M-T. Huang, C-L. Ho and C. Y. Lee (Eds.), *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention*, Chapter 6, pp. 72-

- 86, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Pretlow, T. P., B. J. Barrow, W. S. Ashton, M. A. O'Riordan, T. G. Pretlow, J. A. Jurcisek and T. A. Stellato (1991) Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa, *Cancer Res.*, **51**, 1564-1567.
- Ramel, C., U. K. Alekperov, B. N. Ames, T. Kada, and L. W. Wattenberg (1986) Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis, reported by ICPEMC Expert Group on Antimutagens and Desmutagens, *Mutation Res.*, **168**, 47-65.
- Rao, C. V., B. Simi and B. S. Reddy (1993a) Inhibition by dietary curcumin of azoxymethane-induced ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase, arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in the rat colon, *Carcinogenesis*, **14**, 2219-2225.
- Rao, C. V., D. Desai, B. Simi, N. Kulkarni, S. Amin and B. S. Reddy (1993b) Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon, *Cancer Res.*, **53**, 4182-4188.
- Takahashi, M., T. Minamoto, N. Yamashita, K. Yazawa, T. Sugimura and H. Esumi (1993) Reduction in formation and growth of 1,2-dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci in rat colon by docosahexanoic acid, *Cancer Res.*, **53**, 2786-2789.
- Wattenberg, L. W. (1992a) Chemoprevention of cancer by naturally occurring and synthetic compounds. In: L. Wattenberg, M. Lipkin, C. W. Boone and G. J. Kelloff (Eds.), *Cancer chemoprevention*, pp. 19-39, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Wattenberg, L. W. (1992b) Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents, *Cancer Res.*, **52**, 2085s-2091s.
- Wattenberg, L. W., V. L. Sporn and G. Barany (1989) Inhibition of *N*-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes, *Cancer Res.*, **49**, 2689-2692.
- Yamada, M., A. Hakura, T. Sofuni and T. Nohmi (1993) New method for gene disruption in *Salmonella typhimurium*: construction and characterization of an *ada*-deletion derivative of *Salmonella typhimurium* TA1535, *J. Bacteriol.*, **175**, 5539-5547.
- Yamada, M., B. Sedgwick, T. Sofuni and T. Nohmi (1995) Construction and characterization of mutants of *Salmonella typhimurium* deficient in DNA repair of O<sup>6</sup>-methylguanine, *J. Bacteriol.*, **177**, 1511-1519.

第23回大会シンポジウム  
「植物成分によるがん予防とそのメカニズム」

植物中の抗変異原, 抗発がんプロモーターとその作用機作:  
ジスルフィッド化合物と茶葉成分

Antimutagens/Antipromoters in edible plants and the modes of actions:  
Disulfides and tea components

中村好志, 富田 勲  
Yoshiyuki Nakamura and Isao Tomita

静岡県立大学薬学部衛生化学教室  
422 静岡市谷田 52-1

Laboratory of Health Science, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka,  
52-1 Yada, Shizuoka-shi, Shizuoka-ken 422, Japan

(受付: 1995年3月9日; 受理: 1995年5月31日)

Summary

Recently, our attention is taken on the primary prevention of cancer, using functional ingredients of edible plants. In this paper, we introduce a new type of antimutagens, *S*-methyl methane thiosulfonate (MMTS) and an antitumor promoter, tea aqueous non-dialysates (TNDs), and discuss the modes of actions of them.

MMTS was isolated and identified from cauliflower. It demonstrates the bioantimutagenic activity against UV-induced mutation at the ID<sub>50</sub> of 1.9 ng (15 n moles)/plate, depending on the UV-excision repair system of *E. coli* B/r WP2 strain. The suppressing effect of MMTS was seen against the mutagenesis by 4-nitroquinoline-1-oxide, but not another type of mutagens. MMTS is known as a temporarily blocking agent for enzyme-SH. Several blocking agents for enzyme-SH, such as diphenyl disulfide and *N*-ethyl maleimide, showed the suppressing effect, too. It was suggested the existent of some cellular mechanisms such as the blocking of enzyme-SH results enhancement of excision repair system, consequently.

TNDs were prepared from the hot water infusion of green- and black tea leaves, followed by the extraction with CHCl<sub>3</sub>, ethyl acetate, and *n*-butanol and by the dialysis. The TND fractions were more than 12,000 MW and were consist of mixed complex tannins with hydrolyzable- and condensed-one, containing sugar(s), quinic acid and polyphenolic compounds such as gallates and catechins. TNDs inhibit the soft agar colony induction without particular cytotoxicity and the morphological changes induced by TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) in the mouse epidermal JB6 cell lines. The chemical structure with sugar(s) and polyphenols in the TNDs were required for the expressing activities, because the modifications of TNDs by  $\beta$ -glucosidase, polyphenoloxidase, or tannase caused the loss of its activities. Reversion of TPA-induced morphological alternations were associated with increasing the fibers of sytoskeletal actin microfilament and extra-cellular matrix, fibronectin. The antitumor promoting effects of TNDs was characterized by the above 2 points, different from that of green tea catechins.

**Keywords:** antimutagens, antipromoters, *S*-methyl methane thiosulfonate, temporarily blocking enzyme sulfhydryl groups, tea aqueous nondialysates

## 1. はじめに

がんはわが国の死亡原因の第1位であり、その予防対策が切望されている。発がんは遺伝子上の損傷が出发点となって、イニシエーション、プロモーション、プログレッションなどの過程を経て進行するもので、細胞が何度かの遺伝子突然変異と“clonal expansion”を繰り返して無限増殖性を獲得することと理解されている (Marx, 1989)。がん予防はこのがん化のいずれかの過程で、その誘導や進行を抑えたり、“戻す”ことができれば可能となろう。その一つの戦略として「がんの化学予防 (chemoprevention)」があり (小林, 1994)、具体的な候補として、ビタミンや植物性ポリフェノールが現在最も注目されている (Begley, 1994; Nash, 1994)。

我々の研究室では、かねてより化学予防剤の検索とその作用様式に関する研究を行ってきた。抗変異原に関しては細菌の復帰変異試験を、抗発がんプロモーターについてはプロモーションの特異な研究系であるマウス表皮由来の JB6 細胞を用いて、スクリーニングと作用機作の検討を行っている。最近、植物中の抗変異原、抗発がんプロモーターの検索から従来、知られているものとは異なるタイプの物質を見出した。本稿では、野菜の破碎物中から単離した *S*-methyl methane thiosulfonate (MMTS) とその類縁体の抗変異作用と茶葉中の水溶性非透析性画分の抗プロモーション作用に関する研究の一端を紹介させていただく。

## 2. 植物中の含硫化合物の抗変異原作用

米国の Wattenberg, LW (1985; 1992) らの研究から始まった植物中の含硫化合物の研究は「がんの化学予防」の先駆けで、Isothiocyanate 類はその代表的なものである。抗住血吸虫薬の anethole から発展した合成品の Oltipraz は環状の含硫化合物で、ヒトの臨床実験の段階まで研究が進んでいる (Helzlsouer and Kensler, 1993)。これらの含硫化合物の抗変異・抗発がん作用は主に薬物代謝酵素系の第二相酵素系を誘導することによって発揮されるものと理解されている (Yuesheng and Talalay, 1994)。

## 2.1 カリフラワー花蕾部破碎物から見つかった MMTS

著者の研究室で、最近、カリフラワー花蕾部の破碎物から単離・同定した含硫化合物の *S*-methyl methane thiosulfonate (MMTS) (化学構造, 図2参照) (Nakamura *et al.*, 1993) は、Isothiocyanate 類では知られていなかった作用機作を持つことが明らかにされつつある。MMTS は十字花科 (*Cruciferae*) やユリ科 (*Liliaceae*) の野菜類の組織を破碎する際に生成される一種のフィトアレキシン様物質と考えられ、それぞれから  $\sim 0.88 \mu\text{g/g}$ ,  $\sim 19.2 \mu\text{g/g}$  程度が検出される。野菜に見いだされる disulfide 化合物は *S*-alk(en)yl cystein sulfoxide に始めに allinase が働いて、抗菌性で知られる thiosulfinate 類を生成し、このものの不均化反応により、thiosulfonate と disulfide が生成する (西村, 1986) ので、調理などの際に、いわゆる硫化物臭を放つ野菜類には広範囲に分布すると思われる。MMTS は分子量 126.2 の常温で液体で水と有機溶剤に溶解する物質である。

## 2.2 MMTS の抗変異活性と作用機作

MMTS は *E. coli* B/r WP2 株で紫外線誘発突然変異を抑制する物質として検出された。Fig. 1 に示すように WP2 株 (wild) の紫外線突然変異を  $10 \mu\text{g/plate}$  の濃度で顕著に抑制し、 $\text{ID}_{50}$  は  $1.9 \mu\text{g}$  ( $15 \text{ n mole}$ )/plate である。従来、報告されている抗変異原性物質の  $1/100 \sim 1/1000$  の低濃度で有効である。この抑制作用は WP2s (*uvrA*<sup>-</sup>) 株では全く認められない。また、MMTS は紫外線による細胞致死に対し、WP2 株と CM571 (*RecA*<sup>-</sup>) 株では回復効果が認められたのに対し、WP2s 株では認められなかった。さらに、MMTS は WP2 株の増殖を遅延させることもなかった。以上のことは MMTS の抑制作用が *E. coli* B/r WP2 株の除去修復能に依存したものであることを示しているが、Shimoi ら (1986) が報告している (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) の場合とは異なるようである。

MMTS は 1970 年代始めから、酵素類を修飾する作用があることが報告されており (Smith and Kenyon, 1974)、酵素 SH 基の一過的なブロックが

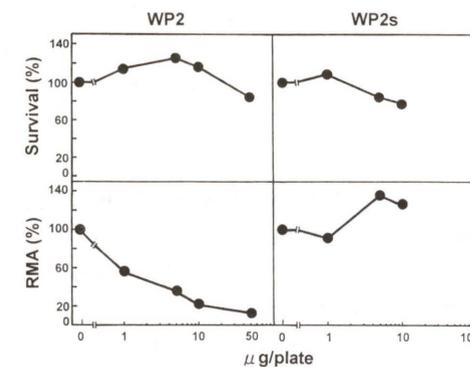


Fig. 1. Antimutagenic activity of *S*-methyl methane thiosulfonate (MMTS) on UV-induced mutation in *E. coli* B/r WP2 and WP2s.

Overnight cultured cell suspension in a Petri dish was irradiated with a germicidal lamp at a dose of  $20.4 \text{ J/m}^2$ . The *Trp*<sup>+</sup> revertant colonies and the colonies of surviving cells in UV-control were 165 and 143 for WP2, 305 and 119 for WP2s, respectively. Each point represents the average of two independent experiments with duplicate plates.

作用機作として提示されている (Miller and Simons, 1988)。著者等は酵素 SH 修飾剤に同様な作用があるのではないかと考えて、関連化合物の *E. coli* B/r WP2 株の紫外線突然変異抑制作用を調べた。検討の対象を市販の酵素 SH ブロック剤と MMTS 類の生合成系の中継体、および代謝産物にまで広げて、スルフィド、スルホン酸、スルフィン酸、チオスルホン酸および環状ジスルフィド類の約 20 種について調べた。その結果、スルフィド、スルホン酸類には全く活性が認められなかったが、置換基の種類によって顕著な活性を示すもの (試験菌株の生存率が 90% 以上の濃度で、50% 以上の抑制) は MMTS を含めて下記の 8 種であった (Fig. 2 参照)。すなわち、*S*-アルキルアルカンチオスルホン酸 (*methyl, ethyl, n-propyl*), ジスルフィド (*diphenyl, 4,4'-dipyridyl, 2,2'-dipyridyl, 2,2'-diaminoethyl*), およびスルフィン酸 (*methyl methylthiomethyl*) である。また、抑制作用の強さは各化合物の SR 基の解離エネルギーに比例する、言い換えれば、酵素 SH 基との反応性に比例すると思われるデータが得られた。Diphenyl disulfide (DPDS) がその代表的なもの

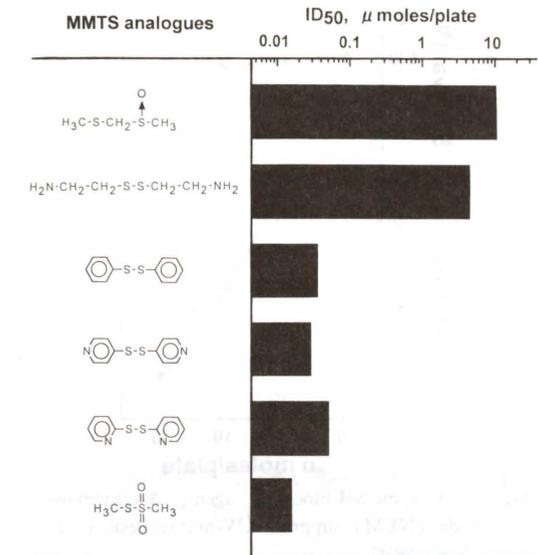


Fig. 2. MMTS analogues suppress UV-mutagenesis in *E. coli* B/r WP2.

UV-mutagenized cell suspensions were exposed with the indicated compounds of sulfinate and disulfides in this Figure, as described in Figure 1 in detail.

で、この場合にも、抑制作用は WP2 株の除去修復系に特異的であることが確認された。さらに、SH 基枯渇剤として生化学研究で用いられる *N*-ethyl maleimide (NEM) も *E. coli* B/r WP2 株の紫外線突然変異を  $10 \sim 30 \text{ n mole/plate}$  で顕著に抑制し (Fig. 3)、チオール基のブロックが抗変異活性と関連することを強く示唆した。MMTS はまた、紫外線型と言われる 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) による突然変異を  $66 \text{ n mole/plate}$  で陽性対照の 47% にまで抑制した。しかし、バクテリアの系では今のところ UV や 4-NQO 以外の変異原に対して MMTS が有効である例は見つかっていない。サルモネラ TA98, 100, 102 株においては除去修復能の有無にかかわらず、MMTS は紫外線の突然変異を抑制しなかった。引き続き、MMTS の抗変異作用が認められる範囲を菌種と変異原の両面から検討中である。

一方、*in vivo* の系でも MMTS の変異抑制作用がショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の翅毛試験 ( $300 \sim 1000 \mu\text{g/vial}$ ) と ICR マウスの末梢血の小核形成試験 ( $15 \sim 40 \mu\text{g/kg}$ , 経口) におい

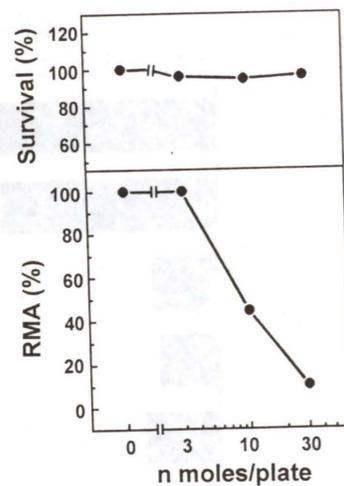


Fig. 3. Enzyme-SH-blocking agent, *N*-ethylmaleimide (NEM) suppress UV-mutagenesis in *E. coli* B/r WP2. UV-mutagenized cell suspensions were exposed with NEM as described in Figure 1 in detail.

て認められた。いずれの場合も、mitomycin C の突然変異を濃度依存的に、有意に抑制した。また、発がん抑制作用もラットの肝臓 (大西ら, 1994) と大腸の発がんモデルで確認され (森, 1994), この場合には、プロモーションレベルでの作用が推定されている。これらの *in vivo* の結果を大腸菌で見られた除去修復系と関連させて議論できる十分なデータはまだ得られていない。

以上の結果はいずれにしても、酵素 SH 基の修飾が突然変異や、ひいては発がんの抑制に結びつくメカニズムが存在することを強く示唆するものと考えている。現在、この接点の解明に取り組んでいる。

### 3. 茶葉水溶性非透析性画分の発がんプロモーション抑制作用

緑茶カテキンはイニシエーションだけでなく、プロモーションも抑制する植物成分として注目されている (菅沼, 藤木, 1993; Yang and Wang, 1993)。最近はさらに、がん化した細胞の退縮 (Wang *et al.*, 1994) やがん細胞の転移を抑制する作用 (Taniguchi *et al.*, 1992) も報告されている。当研究室では、緑茶の発がん抑制作用がいわゆる緑茶カテキン以外の成分にも認められることに着

目して、茶葉水溶性非透析性画分 (TNDs) を分画し、主に、その発がんプロモーション抑制作用に関する検討を加えてきた (Nakamura *et al.*, 1991; 中村, 富田, 1991)。

#### 3.1 茶葉水溶性非透析性画分 (TNDs) の性質

TNDs は茶葉の熱湯抽出物を  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, *n*-BuOH で順次分画した残りの水溶性画分を透析して得られる非透析性の部分 (分子量 12,000 以上) である。緑茶からは、乾燥茶葉の 0.42% (GTND), 紅茶からは 2.0% (BTND) の収量で淡褐色~褐色の粉末として得られる。これをエタノール沈殿やゲルろ過で粗分画を行うと、最初にほとんど純粋な多糖成分が分画される。これには抗変異活性や発がんプロモーション抑制活性はなく、残りの部分に活性が認められる。TNDs にはポリフェノール化合物 (カテキン, 没食子酸), キナ酸および糖類 (glucose, galactose など) が構成成分として含有されることが確認されている。化学的には、それらが組み合わさった加水分解型タンニンと縮合型タンニンからなる複合タンニンの混合物と推定されている。糖成分の含有量は 20~30% である。TNDs は *E. coli* B/r WP2 株で, MNNG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) の変異活性を抑制し、また, JB6 細胞の TPA 誘導発がんプロモーションを抑制する。いずれにおいても、紅茶 (BTND) は緑茶 (GTND) と同等かやや強い活性を示すので、以後は主に BTND を例にとって述べる。

#### 3.2 JB6 細胞系の TPA 誘導発がんプロモーションの抑制

TNDs は、EGCG と同じように JB6 細胞の phorbol ester による軟寒天コロニー形成 (悪性腫瘍化) を減少させる (Fig. 4a)。EGCG の場合, JB6 variants を用いた検討から, 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上で細胞の増殖抑制が現れるようになり, 10~30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では正常細胞よりも腫瘍化細胞 (transformants) に対してより増殖抑制が強い (Fig. 4b) ことから, 高濃度での作用は "chemotherapeutic" な物質であると考えられる。実際に, ギルコーマ 180 やエールリッヒ腹水がん等の移植がんに対して EGCG

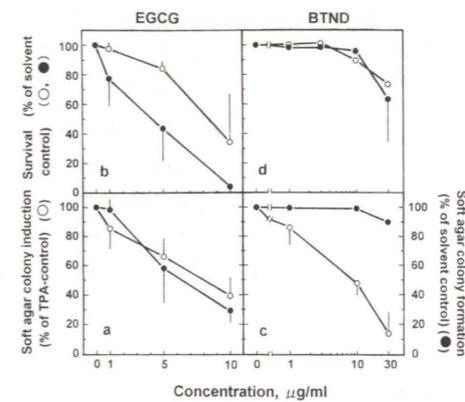


Fig. 4. Effects of BTND and EGCG on the induction/formation of soft agar colonies (a and c of the lower) and the monolayer cell growth (b and d of the upper) in mouse epidermal JB6 cell lines.

Anchorage independent colony induction in the presence of test compound is expressed as a % of TPA-control. Each point is the mean of two/three independent experiments. TPA: 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, BTND; black tea aqueous non-dialysate, EGCG; (-) epigallocatechin gallate.

は抗腫瘍効果を持つ (Oguni *et al.*, 1986; Hara *et al.*, 1989)。これに対して, BTND は糖成分を含むためか細胞毒性は EGCG の約 1/10 程度と弱く, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でも毒性は微弱で, また transformants に選択的な増殖抑制を示すこともなく (Fig. 4d),

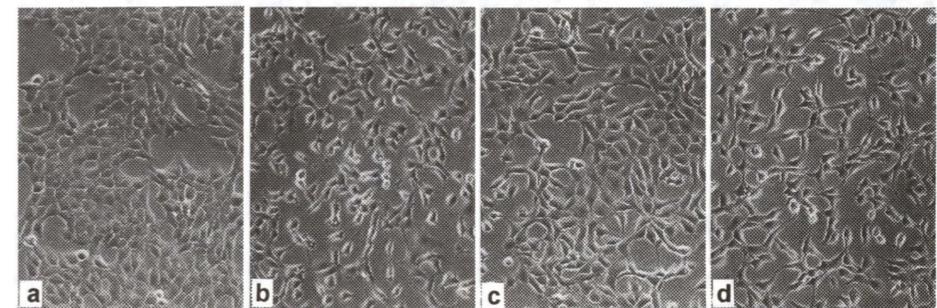


Fig. 5. Effects of BTND and EGCG on the TPA-induced morphological changes in mouse epidermal JB6 promotion sensitive clone 41 in monolayer culture.

All cultures ( $1.5 \times 10^4$  cells/60 mm Petri dishes) were grown at 36.5°C for 24 h with the following conditions of (a) untreated control, (b) TPA (1 ng/ml), (c) TPA+BTND (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), (d) TPA+EGCG (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), respectively. Figures were taken on the phase-contrast microscopy at the same final magnification ( $\times 100$ ).

TPA: 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, BTND; black tea aqueous non-dialysate, EGCG; (-) epigallocatechin gallate.

いわゆるプロモーション過程を主に抑制すると考えられる。いわば, "chemopreventive" な物質であると言えよう。GTND は ENNG (*N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) 誘発マウス十二指腸発がんモデルで 0.005~0.05% を飲水投与した場合, がんの発生が ENNG 対照の 46% に抑制された。対照として用いたポリフェノン 100 (三井農林製, EGCG 53.9%, 総カテキン量 91.2%) と比べ, 発がん抑制率, 病理組織学的検索のいずれにおいても優れた効果が認められた。TNDs はがんの一次予防剤として期待できるかもしれない。

#### 3.3 JB6 細胞の TPA 誘導形態変化の抑制作用

TNDs には, EGCG と異なる作用がもう一つある。それは, TNDs が JB6 細胞の発がんプロモーターによる特異的な形態変化を "正常化" することである (Fig. 5)。

JB6 培養細胞のプロモーション感受性株 ( $P^+$ ) は正常培養において, 培養器壁面に扁平に接着し, 一定数以上の細胞が存在すると, 細胞同士が接着して一層のシートを形成して増殖する (Fig. 5a)。これに, TPA のようなプロモーターを加えると, 特異的な細胞の形態変化が誘起され, トランスホームする。TPA 添加後, 数分後から細胞の形態が変化しはじめ, 細胞が丸みを帯び立体感を持つようになる (rounding)。また, 細胞同士の接

着性が弱まり、それにつれて細胞間に神経突起様の尾状構造が発達してくる (tailing) (Fig. 5b). BTND を TPA と同時に処理した場合、TPA 誘導の形態変化 (rounding, tailing) は抑制され、扁平な状態の細胞数が増え (扁平度、伸展度の増大)、細胞同士の接着が回復して集団が再形成されるようになる (Fig. 5c). この作用は GTND よりも BTND の方に顕著であるが、EGCG には見られない (Fig. 5d). この細胞形態変化に対する作用は TPA との同時処理、あるいは TPA 処理後 6 時間以内に TNDs で処理した場合に観察され、6 時間以上経過後に添加しても認められない。また、transformants に TNDs を加えても、細胞の形態に変化を与えることはない。これらのことから、TPA によって誘起される細胞の形態変化はプロモーションの初期の段階で TNDs を加えることにより、その進行が中断され、正常な形態が復元されるものと考えられる。TNDs のこの作用は  $\beta$ -glucosidase による糖の加水分解や polyphenol-oxidase によるフェノール性水酸基の酸化を行うことにより消失することから、両者の構造が活性の発現に必要と考えられる (Nakamura *et al.*, 1991).

さらに、培養細胞の形態を制御、規定している細胞骨格と細胞外マトリックスの構造物について

TNDs の影響を検討した。細胞骨格を形成する主要構造物である F-actin は収縮性タンパク質で、接着斑を介して fibronectin などの細胞外マトリックスに結合している。細胞の形態、運動性だけでなく、細胞分裂、あるいは細胞増殖に関わる情報伝達系の制御などにも関連していると言われる (Takahashi *et al.*, 1986). がん化との関係も、細胞の transformation に伴って actin の分布に変化が起こることが Pollack ら (1975) によって最初に指摘された。

正常培養した JB6 P<sup>+</sup> 細胞において F-actin の蛍光染色を行うと、stress fiber とよばれる microfilament の長い束が観察される (Fig. 6a). これに TPA などの発がんプロモーターを作用させると、細胞の stress fiber は数時間ですみやかに消失し、actin microfilament が細胞膜や核膜の周辺部に局在するようになる (Fig. 6b). 正常細胞を TPA と BTND と同時に処理した場合には、細胞はやや接着面が減少し丸くなり (rounding), 細胞同士の接着が弱まる変化を起こすが、数時間後には再び正常に近い形態を呈し、stress fiber が観察されるようになる (Fig. 6c). TNDs のこの作用は GTND よりも BTND でより顕著であったが、EGCG にはこのような作用は認められなかった (Fig. 6d), 糖タンパク質からなり細胞外マトリックス (ECM) の

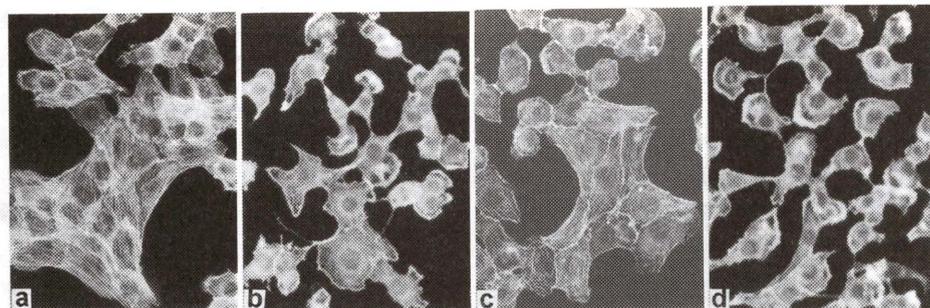


Fig. 6. Effects of tea aqueous non-dialysate on the distribution of actin microfilament in mouse epidermal JB6 cells.

All coverslip cultures ( $1.5 \times 10^5$  cells/60 mm Petri dishes) were grown at  $36.5^\circ\text{C}$  for 24 h with the following conditions of (a) untreated control, (b) TPA (1 ng/ml), (c) TPA + BTND (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and (d) TPA + EGCG (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), respectively. The cells grown on the coverslips were fixed in 10% formaldehyde, extracted in acetone at  $-15^\circ\text{C}$  for 10 min, stained with rhodamine-phalloidin, and processed for fluorescence microscopy ( $\times 300$ ).

TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, BTND; black tea aqueous non-dialysate, EGCG; (-)-epigallocatechin gallate.

構成成分である fibronectin (FN) の消長に対しても、TNDs は F-actin に対するのと同様な影響を示した (写真は省略). FN-fiber は細胞膜を介して間接的に actin fiber と連結しており、actin fiber の分布と完全にオーバーラップすると言われ、その通りの現象が見られた。Zerlauth と Wolf (1985) は JB6 細胞のプロモーション感受性株 (Cl 22) を TPA で処理すると悪性転換し、細胞表面から細胞性 FN が培地中に遊離してほとんど消失するのに対し、プロモーション非感受性株 (Cl 25) ではこの現象が見られないことから、FN の消長がプロモーションと密接に関係していること報告している。逆に、がん化細胞に FN を添加すると一過性にかん細胞の形態が正常化することも報告されている (Yamada and Olden, 1978).

以上のことから、著者等は、TNDs が細胞外マトリックスの FN に直接何らかの影響を及ぼして発現を高め、接着斑を介しシグナルを F-actin に送り、発がんプロモーション抑制的に働く可能性を考え、現在これを検証中である。

いずれにせよ、GTND および BTND には F-actin や FN 量を増加させる作用があり、これが TNDs のプロモーション抑制作用の特徴の要因をなしていると考えられる。

#### 4. おわりに

以上、著者等の研究途上の仕事の一部を紹介させていただいたが、いずれも、作用機作の詳細はこれからの進展を待たなければならない。諸氏のご批判とご教示を願うものである。

#### 謝 辞

本研究の MMTS に関する部分は鹿児島大学農学部松尾友明先生、静岡県立大学薬学部衛生化学教室の中村考志君をはじめとする共同研究者、茶葉水溶性高分子画分に関する部分は科研製薬 (株)、本学大学院生活健康科学研究科・野呂忠敬先生、同薬学部衛生化学教室の原田晴司君をはじめとする共同研究者の協力による成果であり、深甚なる謝意を表します。また、茶試料を提供して頂いた三井農林 (株) 原 征彦博士に御礼申し上げます。本研究は (財) 静岡県学術教育振興財団

研究助成金、(財) 千代田生命健康開発事業団社会厚生事業助成金の援助を受けました。

#### 参考文献

- Begley, S. (1994) Beyond vitamins, Newsweek, Apr. 25, pp. 42-47.
- 原 征彦, 松崎 敏, 中村耕造 (1989) 茶カテキンの抗腫瘍作用, 日本栄養食糧学会誌, **42**, 39-45.
- Helzlsouer, K. J. and T. W. Kensler (1993) Cancer chemoprevention by Oltipraz: Experimental and clinical considerations, Prevent. Med., **22**, 783-795.
- 小林 博 (1994) がん予防研究, 日本医事新報, No. 3662, 43-45.
- Marx, J. (1989) Many gene changes found in cancer, Science, **246**, 1386-1389.
- Miller, N. R. and S. S. Simons Jr. (1988) Steroid binding to hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors involves at least two sulfhydryl groups, J. Biol. Chem., **263**, 15217-15225.
- 森 秀樹 (1994) 私信 (一部, 第 53 回癌学会総会・ワークショップおよび本学会第 23 回大会・シンポジウムにおいて発表).
- Nakamura, Y., S. Harada, I. Kawase, M. Matsuda and I. Tomita (1991) Inhibitory effect of tea ingredients on the in vitro tumor promotion of mouse epidermal JB6 cells, In: T. Yamanishi ed., Proc. Int. Symp. Tea Sci., Shizuoka, Japan, Kurofune Printing Co., Ltd., pp. 205-209.
- 中村好志, 富田 勲 (1991) 茶の抗突然変異・抗癌作用, 茶の科学 (松村敬一郎編), 朝倉書店, pp. 131-144.
- 中村好志 (1992) 化学物質によるトランスホメーションとプロモーション: JB6, 動物細胞マニュアル (瀬野稔二, 小山秀機, 黒木登志夫編), 共立出版, pp. 167-169.
- Nakamura, Y., T. Matsuo, K. Shimoi, Y. Nakamura and I. Tomita (1993) S-Methyl methane thiosulfonate, a new antimutagenic compound isolated from *Brassica oleracea* L. Var. *botrytis*, Biol. Pharm. Bull., **16**, 207-209.
- Nash, J. M. (1994) Stopping cancer in its tracks—New discoveries about wayward genes and misbehaving proteins show how cells become malignant—and perhaps how to bring them under control—, Time, Apr. 25, pp. 36-42.
- 西村弘行 (1986) 植物フレーバーの化学ならびに生物活性に関する研究, 農化, **60**, 19-29.
- Oguni, I., K. Nasu, S. Yamamoto and T. Nomura (1988) On the antitumor activity of fresh green tea leaf, Agric. Biol. Chem., **52**, 1879-1880.
- 大西将美, 岡本清尚, 牧田浩樹, 杉江茂幸, 田中卓二, 森 秀樹, 渡辺知幸, 中村好志 (1994) N-diethylnitrosamine (DEN) 誘発ラット肝発癌モデルにおける S-methyl methanethiosulfonate の修飾効果, 第 53 回日本癌学会総会記事, p. 123.
- Pollack, R., M. Osborn and K. Weber (1975) Patterns of

organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 994-998.

Smith, D. J. and G. L. Kenyon (1974) Nonessentiality of the active sulfhydryl group of rabbit muscle creatine kinase, J. Biol. Chem., **249**, 3317-3318.

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 WP2, Mutat. Res., **173**, 239-244.

菅沼雅美, 藤木博太 (1993) EGCG によるヒト癌の化学予防, 農化, **67**, 35-38.

Takahashi K, U. I. Heine, J. L. Junker, N. H. Colburn and J. M. Rice (1986) Role of cytoskeleton changes and expression of H-ras oncogene during promotion of neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cells, Cancer Res., **46**, 5923-5932.

Taniguchi, S., H. Fujiki, H. Kobayashi, H. Go, K. Miyado, H. Sadano and R. Shimokawa (1992) Effect of (-)-epigallocatechin gallate the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanoma cell lines, Cancer Lett., **65**, 51-54.

Wang, Z. Y., M. T. Huang, C. T. Ho, R. Chang, W. Ma, T. Ferraro, K. R. Reuhl, C. S. Yang and A. H. Conney (1994) Inhibitory effects of green tea on the growth of established skin papillomas in mice, Cancer Res., **52**, 6657-6667.

Wattenberg, L. W. (1985) Chemoprevention of cancer, Cancer Res., **45**, 1-8.

Wattenberg, L. W. (1992) Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents, Cancer Res. (Suppl.), **52**, 2085s-2091s.

Yamada, K. M. and K. Olden (1978) Fibronectin-adhesive glycoproteins of cell surface and blood, Nature, **275**, 179-184.

Yang, C. S. and Z. Y. Wang (1993) Tea and cancer, J. Natl. Cancer Inst., **85**, 1038-1049.

Yuesheng, Z. and P. Talalay (1994) Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanisms, Cancer Res. (Suppl.), **54**, 1976s-1981s.

Zerlauth, G. and G. Wolf (1985) Release of fibronectin is linked to tumor promotion: response of promotable and non-promotable clones of a mouse epidermal cell line, Carcinogenesis, **6**, 73-78.

Environ. Mut. Res. Commun., **17**: 115-122 (1995)

特別企画

第23回大会シンポジウム  
「植物成分によるがん予防とそのメカニズム」

## フラボノイドの食事発がん物質 Trp-P-2 に対する脱変異原活性 Strong desmutagenicity of flavonoids against dietary carcinogen, Trp-P-2

金沢和樹

Kazuki Kanazawa

神戸大学農学部  
657 神戸市灘区六甲台町1

Kobe University, Department of Biofunctional Chemistry, Rokkodai, Nada-ku, Kobe 657, Japan

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年5月31日)

### Summary

Carcinogens in the diet cause 35% of human cancer. Trp-P-2 is one of the typical precursors of carcinogens and appreciable amounts are formed during cooking. In the body, hepatic P450c or P450d metabolize Trp-P-2 to the 3-hydroxyamino form, the ultimate carcinogenic metabolite. The N-hydroxy form easily generates its radical, thereby causing a frame-shift mutation (initiation of carcinogenesis) and injury of biomembrane (promotion). The toxicity of Trp-P-2 can be evaluated with mutagenicity as an indicator for carcinogenesis, using *Salmonella typhimurium* TA98 strain in the presence of S9 mix. Extracts from various edible plants suppressed the mutagenicity of Trp-P-2. In particular herbs strongly inhibit the mutagenicity of Trp-P-2 in a dose-dependent manner. These active compounds were identified to be flavonoids such as galangin, quercetin, and luteolin. The strong suppressing activity of flavonoids against the mutagenicity of Trp-P-2 was referred to a desmutagenicity which neutralized Trp-P-2 during or before the activation. Then, the inhibitory mechanism of flavonoids on the mutagenicity of Trp-P-2 was examined with a recombinant yeast strain expressing both rat P450c and yeast reductase simultaneously. Flavonoids acted against the mutagenicity of Trp-P-2 in three ways: the adsorption of Trp-P-2, regardless of the number and position of OH groups; inhibited the activation of Trp-P-2 to the ultimate carcinogenic metabolite in the P450 monooxygenase system, regardless of the OH groups; possessing antioxidative potency, they trapped endogenous free radicals generating from the metabolites. It was considered that flavonoids in edible plants intervened by eliminating dietary carcinogens before they absorbed into the body, and by interfering with the processes of carcinogenesis.

Keywords: desmutagen; flavonoid; Trp-P-2; cancer prevention; antimutagen

### 1. はじめに

ヒトのがんの35%が食生活に起因すると考えられている(Doll and Peto, 1981). 脂質や食塩の取り過ぎも原因の一つであるが、直接相関があるのは食品に含まれる化学発がん物質と考えられる。アミノ酸やタンパク質の加熱分解物、アフラトキシンなどのかび毒、加工肉のニトロソアミン

類、ある種の植物に含まれるピロリジジナルカロイド類であるが、これらのほとんどは注意をすれば避けることができる。しかし、私達が食物を調理する文明人であるかぎり、加熱分解物は避けることができない。発がん性のある加熱分解物のheterocyclic amineが10種同定されている(Sugimura, 1985; Nagao and Sugimura, 1993).

一方、私達は毎日食品を調理して食べるがそう容易にはがんにならない。このことは私達の日常の食物に、同時に、heterocyclic amineの発がん性を抑制する成分が含まれていることを予測させる。ここでは、焼魚などに含まれ (Yamaizumi *et al.*, 1980), 日本人の食生活に関係の深い 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) に焦点を絞り、その変異原性を抑える食用植物成分のフラボノイドの活性についてまとめた。

## 2. 食用植物成分の Trp-P-2 に対する変異原性抑制作用

Trp-P-2 の毒性は、その発がんイニシエーター活性としての変異原性で、サルモネラ TA98 株を用い S9 mix の存在下で評価できる (Kato and Yamazoe, 1987)。そこで、様々な食用植物や菓草の Trp-P-2 の変異原性に対する抑制効果を調べた。いずれの植物抽出物も抑制活性を示したが、特に野生種に近いミントなどのハーブ類の活性が

強く、50 mg の葉からの 90% メタノール抽出物は、細胞毒性を示すことなく、20 ng の Trp-P-2 の変異原性をほぼ完全に抑えた (Natake *et al.*, 1989) (Table 1)。日常野菜類の活性はハーブ類の約 1/5 であった。Yamaizumi らは (1980), 焼きメザシ 1 g には 13.1 ng の Trp-P-2 と 13.3 ng の Trp-P-1, そして他の変異原物質が少量含まれると述べている。これらの変異原性の総活性は約 20 ng の Trp-P-2 の変異原性に換算できる (Sugimura, 1979)。焼魚を 100 g 食べるならば、5 g のハーブか 25 g の野菜を同時に食べれば、その変異原性をほぼ完全に防げるかもしれない。

これらの変異原性抑制成分はいずれも植物に広範に存在するフラボノイドであった。例えば、オレガノの最も強い抑制成分は galangin と quercetin であり (Kanazawa *et al.*, 1995), ペパーミント、セイジ及びタイムでは luteolin であった (Samejima *et al.*, 1995)。

Table 1. Suppressing effects of 90% methanol extract from 50 mg of edible plants against the mutagenicity of 20 ng Trp-P-2

Common name	Inhibition (%)	Survival ( $\times 10^6$ cells)	Common name	Inhibition (%)	Survival ( $\times 10^6$ cells)
<b>HERBS</b>			Rosemary	83	233
Bay	83	185	Sage	82	257
Bergamot	82	266	Sanshou	75	233
Chervil	30	—	Scented geranium	83	134
Chive	20	—	Spearmint	91	213
Coriander	59	187	Stevia	73	243
Corn salad	34	—	Sweet basil	82	225
Curry plant	100	178	Sweet marjoram	100	273
Dill	76	69	Thyme	100	312
English lavender	93	287	Water cress	62	95
Florence fennel	100	298			
French tarragon	81	298	<b>VEGETABLES</b>		
Ginger	69	303	Broccoli	39	189
Mitsuba	62	191	Burdock	17	298
Lavendermint	100	117	Carrot	17	265
Lemon balm	91	96	Cabbage	11	—
Lemon grass	76	92	Egg plant	21	233
Lemon verbena	87	244	Green pepper	38	201
Linden	36	—	Leek	79	155
Oregano	100	220	Lettuce	20	275
Peppermint	79	245	Parsley	21	—
Perilla	64	266	Pea	18	221
Roman chamomile	82	277	Tomato	4	243

Trp-P-2 gives 2852 revertants and  $219 \times 10^6$  survival of TA98 cell.

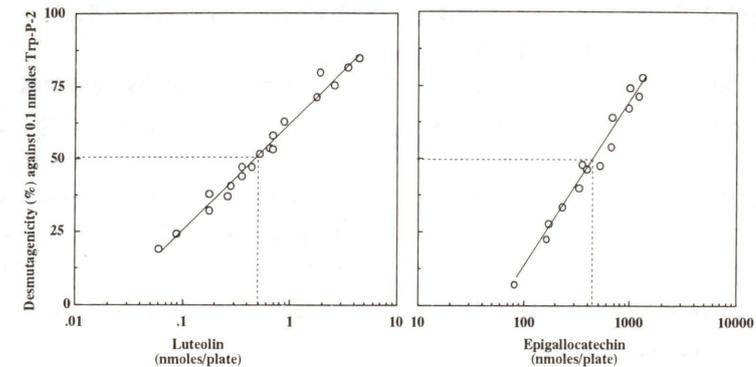


Fig. 1. Determination of the amount of flavonoid ( $IC_{50}$ ) required to inhibit the mutagenicity of 0.1 nmoles Trp-P-2 by 50%.

## 3. フラボノイドの heterocyclic amines に特異的な強い脱変異原性

フラボノイドは Trp-P-2 に対して強い変異原性抑制活性を示す。その活性を種々の植物成分の活性と定量的に比較するために、20 ng (0.1 mol) の Trp-P-2 の変異原性を 50% 抑制するのに必要な量 ( $IC_{50}$ ) を求めた。横軸にフラボノイド量を対数で、縦軸にその量での抑制活性をプロットすると、活性と与えた量の関係は直線になる (Fig. 1)。

Table 2.  $IC_{50}$  of flavonoids to inhibit the mutagenicity of 0.1 nmoles Trp-P-2

Flavone	$IC_{50}$ (nmole)
Flavone	0.23
Luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	0.49
Galangin (3,5,7-trihydroxyflavone)	0.44
Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone)	2.4
Flavanone (2,3-dihydroflavone)	1.6
All-methoxyluteolin	2.5
All-methoxyquercetin	3.2
<b>CATECHINS</b>	
Epigallocatechin	460
Epicatechingallate	760
<b>CHLOROPHYLL</b>	
Chlorophyll	258



これらの直線から  $IC_{50}$  を求めると、フラボノイド類は 2.5 nmoles 以下の値であった (Table 2)。ビタミン類はわずかな活性を示したが、濃度依存性がなかった (Table 3)。カテキン類は活性がないか、あるいはフラボノイドより 2 桁高い  $IC_{50}$  を与えた。クロロフィルは植物に多量に含まれ、変異原抑制活性を有すると報告されている (Negishi *et al.*, 1990; Arimoto *et al.*, 1993)。しかし、その  $IC_{50}$  はフラボノイドよりも百倍以上高い 258 nmoles であった (Samejima *et al.*, 1995) (Table 2)。このように、フラボノイドの活性は他の植物成分に比べて著しく強かった。従って、食用植物の Trp-P-2 に対する変異原性抑制活性は主としてフラボノイドによるものと考えられる。

変異原抑制活性はその作用機序から、変異原物質が DNA を損傷する過程あるいはそれ以前に変異原物質を不活性化する脱変異原性と、DNA の損傷が固定化されるのを阻止する抗変異原性に分類される (Kada and Shimoi, 1987)。抗変異原性を

Table 3. Suppressing effects of common phytochemicals against the mutagenicity of 20 ng Trp-P-2

Partly suppressive against the mutagenicity but not in a dose-dependent manner; Ascorbic acid, $\alpha$ -Tocopherol, Astaxanthin, Zeaxanthin, Canthaxanthin, Lutein, Stigmasterol
Nonactive on the mutagenicity with the concentration between 10 ng/plate and 1 mg/plate; Catechin, Epicatechin, $\alpha$ -Carotene, $\beta$ -Carotene, Campesterol, $\beta$ -Sitosterol, Chromosaponin I, Soyasaponin I

調べるために、Trp-P-2 で変異させた TA98 株に、Table 2 の IC<sub>50</sub> 量あるいはその 10 倍量のフラボノイドを与えても、復帰突然変異株数に変化はなかった。また、Trp-P-2 の活性化体である *N*-hydroxy-Trp-P-2 をフラボノイドとインキュベートした後 TA98 株に作用させても、その復帰突然変異株数は減少しなかった。従って、フラボノイドは、Trp-P-2 が活性化される過程を阻害するかあるいはそれ以前に Trp-P-2 を不活性化する脱変異原物質と考えられる (Kanazawa *et al.*, 1995)。

フラボノイドは 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline (IQ) や 2-amino-6-methyl-dipyrido[1,2-a:3',2'-d']imidazole (Glu-P-1) など他の heterocyclic amines の変異原性も強く抑制する (Edenharder *et al.*, 1993)。ところが、heterocyclic amines 以外の変異原物質に対しては効果がない (Kanazawa *et al.*, 1995)。他の変異原物質は、Trp-P-2 と同様にフレームシフト型で代謝活性化が必要なもの (例えば benzo[a]pyrene)、塩基置換型で活性化が必要なもの (2-acetylaminofluorene)、不要なもの (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) の 4 つに大別できる。フラボノイドはこれらのいづれに対しても変異原性抑制効果を示さなかった。

従って、フラボノイドは heterocyclic amines に

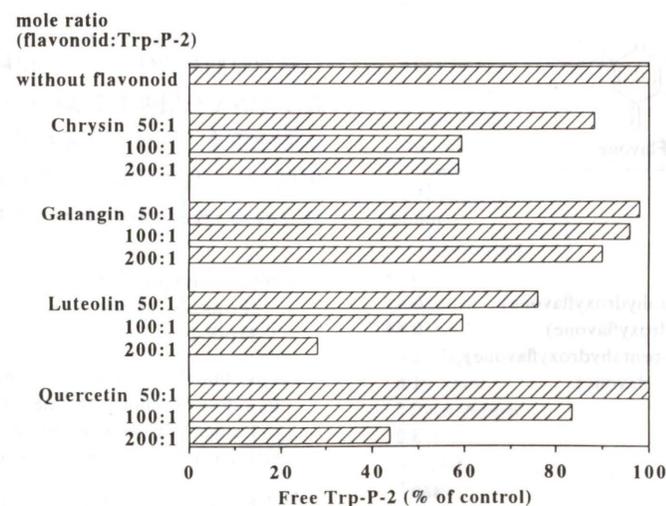


Fig. 2. Adsorption of Trp-P-2 by flavonoid. Flavonoid in methanol solution (200  $\mu$ l) was mixed with Trp-P-2 in water (8 nmoles/ml) and immediately centrifuged at 3500 rpm for 5 min, and then the remaining Trp-P-2 in water was determined with HPLC.

特異的な強い脱変異原と考えられる。

#### 4. フラボノイドの脱変異原機構

フラボノイドの Trp-P-2 に対する脱変異原作用について 3 つの機構が考えられる。Trp-P-2 は cytochrome P450 (P450) monooxygenases で *N*-hydroxy-Trp-P-2 に活性化され、その活性化体から生じたラジカルが DNA を損傷する (Hashimoto *et al.*, 1980; Kato and Yamazoe, 1987)。フラボノイドは、(1) Trp-P-2 が活性化される前に吸着などによって系外に除去する、(2) P450 酵素による活性化を阻害する、(3) ラジカルが DNA に損傷を与える前に抗酸化的にトラップする、と考えられる。

##### (1) フラボノイドの Trp-P-2 吸着作用

Trp-P-2 の水溶液に、モル比で 50 から 200 倍のフラボノイドのメタノール溶液を添加混合して、すぐに遠心すると、一部のフラボノイドは水溶液中の Trp-P-2 を沈殿させる (Fig. 2)。Chrysin は 40% ほど沈殿させ、galangin にこの効果はなく、luteolin と quercetin は濃度依存的に沈殿させる。機構は不明だが、おそらく吸着などの作用によるのだろうと推測している。

モル比の 100 倍以上は Table 2 の IC<sub>50</sub> より大き

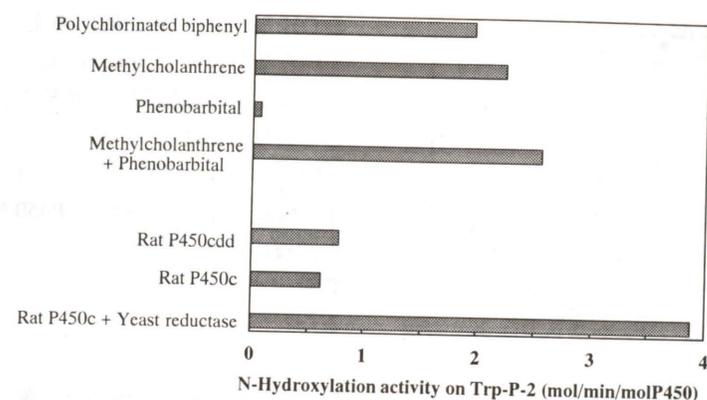


Fig. 3. *N*-Hydroxylation activity of P450 enzymes toward Trp-P-2. The *N*-hydroxylation activity of hepatic microsomes from rats treated with drugs was determined by the method of Minamoto and Kanazawa (1995). The activity of microsomes from transformed *Saccharomyces cerevisiae* AH22 cells; pACDD2, pAMC1 and pAMR2, was also determined.

い。例えば quercetin の 0.1 nmoles Trp-P-2 に対する IC<sub>50</sub> は 2.4 nmoles であり、24 倍である。しかし、ヒトの食生活を考えるとこの作用は有意と思われる。Hertog ら (1993a; 1993b) は、ヒトの一日のフラボノイド摂取量はマイクロモルオーダーであると述べている。一方、Yamaizumi ら (1980) の焼魚に含まれる量から換算すると、我々の Trp-P-2 の摂取量はナノモルオーダーと考えられる。千倍の比である。フラボノイドは私達の消化管中で Trp-P-2 を吸着し、その体内吸収を妨げるかもしれない。

##### (2) フラボノイドの P450 酵素に対する阻害活性

フラボノイドの Trp-P-2 代謝活性化に対する阻害効果を調べるためには、不安定で微量しか生産されないその活性化産物の *N*-hydroxy-Trp-P-2 の定量法を確立し、代謝活性化する P450 種を同定しなければならない。電気化学的検出器を備えた HPLC を用いれば、*N*-hydroxy-Trp-P-2 の敏感な高感度の定量が可能である (Minamoto and Kanazawa, 1995)。Fig. 3 は Trp-P-2 を代謝活性化する P450 種を示している。Polychlorinated biphenyl (PCB) または methylcholanthrene (MC) で P450 酵素を誘導したラットの肝臓のマイクロソームは Trp-P-2 に対して明確な *N*-ヒドロキシ活性を示したが、phenobarbital (PB) は示さなかった。PCB

は P450c, d と e の 3 種を、MC は P450c と d を、PB は P450b と e を誘導する (Ishii *et al.*, 1980; Mita *et al.*, 1981)。つまり、Trp-P-2 は P450c あるいは P450d で活性化されると考えられる。そこで、ラットの P450cdd (P450d と同) あるいは P450c を発現させた酵母 AH22 株のマイクロソームの活性を測定すると、いずれも活性を示した。Trp-P-2 は P450c でも d でも活性化されると考えられる。一方、P450 酵素はその産物の安定化のためにレダクターゼを要求する。ラットの P450c と酵母のレダクターゼを同時発現させた AH22 株は高い活性を示した。

そこで、ラットの P450c と酵母レダクターゼを同時発現させた酵母のマイクロソームを用い、その *N*-ヒドロキシ活性に対するフラボノイドの阻害効果を測定した (Kanazawa *et al.*, 投稿中) (Fig. 4)。Luteolin, quercetin, galangin, flavanone の順で酵素活性を阻害した。その IC<sub>50</sub> を算出すると、それぞれ 99, 190, 300, 3100 pmoles であった。これらの値は Table 2 に示したそれぞれの脱変異原活性の IC<sub>50</sub> より低い。フラボノイドの Trp-P-2 に対する脱変異原性は、主に Trp-P-2 の P450 酵素による活性化を阻害することによると考えられる。

最近、Tsyrllov ら (1994) は、フラボノイドの阻害活性をヒトとマウスの P450 酵素で比較し、活性の強さは異なるが、フラボノイドはヒトの P450 活性も阻害すると述べている。上の結果は

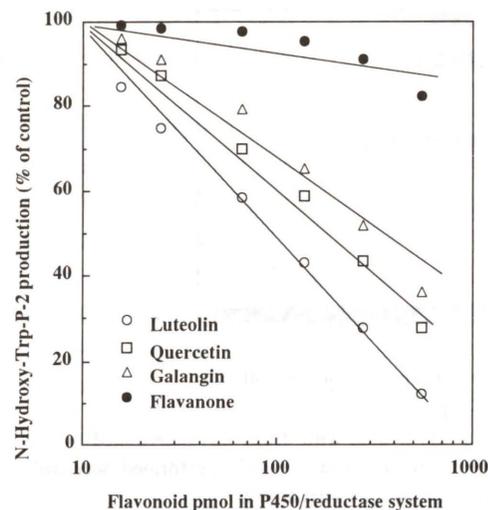


Fig. 4. Inhibitory effect of flavonoid on the *N*-hydroxy-Trp-P-2 production by P450c and reductase.

Microsomes were prepared from the recombinant yeast strain expressing both rat P450c and yeast reductase simultaneously. *N*-hydroxylation activity of the microsomes toward Trp-p-2 was determined with flavonoid by the method of Minamoto and Kanazawa (1995) and compared to the activity without flavonoid.

ヒトにも当てはめることができると考える。

### (3) フラボノイドの抗酸化能

フラボノイドが強い抗酸化能を有することはよく知られている (Cholbi *et al.*, 1991; Jovanovic *et al.*, 1994). 抗酸化能はその OH 基に依存するので (Jovanovic *et al.*, 1994), フラボノイドの脱変異原性が主として *N*-hydroxy-Trp-P-2 から生じるラジカルをトラップして DNA の損傷を防ぐことによるなら、その脱変異原性は OH 基の数や位置に相関するはずである。Cholbi ら (1991) は, luteolin は quercetin より抗酸化能が強く、3' と 4' 位の OH は抗酸化能に関係ないと述べている。Table 2 の結果でも, luteolin の脱変異原性は, quercetin より強く、3' と 4' 位に OH 基を持たない galangin の活性と同じであった。この点では、フラボノイドの脱変異原性と抗酸化能は一致する。しかし、OH 基を有しない flavone や flavanone も強い脱変異原性を有し、luteolin と quercetin のすべて

の OH 基をメトキシ基に換えても活性はあまり下がらなかった (Table 2). 従って、フラボノイドの抗酸化能は部分的にしかその脱変異原性に関与していないと考えられる。

以上のことから、フラボノイドの Trp-P-2 に対する脱変異原性は、吸着、P450 酵素阻害、ラジカル捕獲の 3 つの作用の総合によるが、特に P450 酵素阻害活性が大きく寄与していると考えられる。

### 5. フラボノイドの体内存在量

フラボノイドは Trp-P-2 のような調理食品に含まれる発がん物質の変異原性を強く抑えたが、もし摂取したフラボノイドが体内に吸収されず、生体内に存在しないのなら、これらは机上のデータに終わる。フラボノイドは食用植物に広範に多量に含まれ (Herrmann, 1976; Pierpoint, 1986), 私達はフラボノイドを総量として一日に少ない人で 15  $\mu$ moles, 多い人では 300  $\mu$ moles ほど食べていると考えられる (Hertog *et al.*, 1993b). フラボノイドがヒトの尿から検出されたという報告があるので (Bannwart *et al.*, 1984), 一部は体内吸収されるのだろうが、食べた量に匹敵するほど多量のフラボノイドを体内から検出したという報告は見当たらない。Wakui *et al.* (1992) は baicalein をラットに経口投与して血漿から検出を試みている。体重 260–290 g のラットに 200 mg/kg 投与し、20 ng/ml を検出している。血液 ml 当たり投与した baicalein の約  $3 \times 10^{-6}$  が取り込まれたことになる。このデータから概算すると、ヒトの血中には 5–100 pmoles/ml のフラボノイドが存在し、肝臓濃度もほぼ同じと推測できる。この濃度で Trp-P-2 の P450 酵素による活性化は部分的に阻害されるだろう (Fig. 4).

一部のフラボノイド、例えば quercetin は変異原性あるいは発がん性を有すると言われている (Macgregor and Jurd, 1978). しかし、これは濃度による。Fig. 5 に quercetin の TA98 株に対する変異原性と Trp-P-2 に対する脱変異原性を比較した (Kanazawa *et al.*, 1995). Quercetin は S9 mix で活性化すると 33 nmoles/plate 以上の濃度では変異原性を示す。それ以下の濃度では、Trp-P-2 に対し

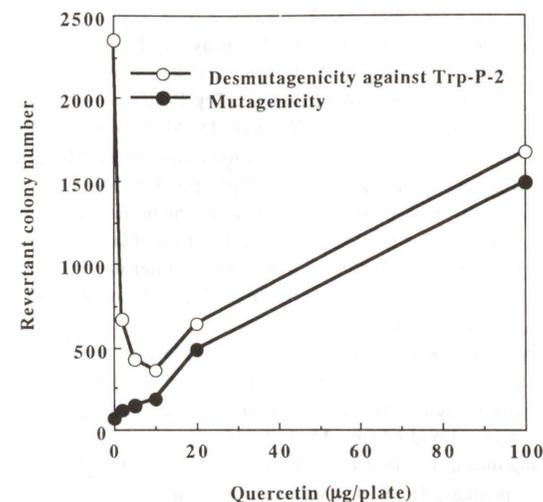


Fig. 5. Mutagenicity of quercetin in the presence of S9 mix on TA98 cell and its desmutagenicity against Trp-P-2.

て強い脱変異原性を示した。

Quercetin は消化管内では高濃度で存在するが、活性化されず、体内に吸収されて活性化される。吸収率が著しく低いことは上で述べたが、仮に多量の quercetin を摂取して変異原性を示すほど高濃度が肝臓に取り込まれたとしても、その 97% は *O*-メトキシ化される (Zhu *et al.*, 1994), あるいはグルクロン酸抱合される (Boutin *et al.*, 1993) と報告されている。従って、quercetin はこれらの代謝を免れた微量しか体内に存在せず、私達の体内では脱変異原として働くと考えられる。

### 6. おわりに

私達の調理食品には発がん性のある heterocyclic amines が含まれるが、同時に私達はその変異原性を抑えるフラボノイドを食べている。フラボノイドは野菜、果物、お茶、ワインなど様々な日常食品に多量に含まれている。フラボノイドは消化管内で heterocyclic amines を吸着してその体内吸収を妨げる。さらに、フラボノイドはごく一部しか体内に吸収されないが、その微量で heterocyclic amines の P450 酵素による発がん物質への活性化を阻害する。また、その抗酸化能で DNA の損傷を防ぐ。フラボノイドはこれらの 3 つの作用、特に P450 酵素を阻害することで heterocyclic

amines の発がん性を強く抑えると考えられる。

ヒトは草食動物から進化した。肉食動物からではない。フラボノイドは植物にしか含まれない。草食動物は多量のフラボノイドを食べる。多量のフラボノイドは変異原性を有するが、草食動物はそれをあまり体内には吸収しないように進化したと思える。そして、肉の味を覚え、ヒトは肉を調理することを学んだ。フラボノイドを食べる草食動物から進化したゆえに、調理肉からの発がんリスクを軽減し、存続できた。

フラボノイドの heterocyclic amines に特有の強い脱変異原性を考えると、動物から人類への進化の妙を感じる。

### 参考文献

- Arimoto, S., S. Fukuoka, C. Itome, H. Nakano, H. Rai and H. Hayatsu (1993) Binding of polycyclic planer mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity, *Mutation Res.*, **287**, 293–305.
- Bannwart, C., T. Fotsis, R. Heikkinen and H. Adlercreutz (1984) Identification of the isoflavonic phytoestrogen daidzein in human urine, *Clin. Chim. Acta*, **136**, 165–172.
- Boutin, J. A., F. Meunier, P.-H. Lambert, P. Hennig, D. Bertin, B. Serkiz and J.-P. Volland (1993) *In vivo* and *in vitro* glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats, *Drug Metab. Dispos.*, **21**, 1157–1166.
- Cholbi, M. R., M. Paya, and M. J. Alcaraz (1991) Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub>-induced microsomal lipid peroxidation, *Experientia*, **47**, 195–199.
- Doll, R. and R. Peto (1981) *The Cause of Cancer*, Oxford University Press, Oxford.
- Edenharder, R., I. von Petersdorff and R. Rauscher (1993) Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food, *Mutat. Res.*, **287**, 261–274.
- Hashimoto, Y., K. Shudo and T. Okamoto (1980) Activation of mutagen, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole. Identification of 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 355–362.
- Herrmann, K. (1976) Flavonols and flavones in food plants: a review, *J. Food Technol.*, **11**, 433–448.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman and B. van de Putte (1993a) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1242–1246.
- Hertog, M. G. L., P. C. H. Hollman, M. B. Katan and D. Kromhout (1993b) Intake of potentially anticar-

- cinogenic flavonoids and their determinations in adults in the Netherlands, *Nutr. Cancer*, **20**, 21-29.
- Ishii, K., M. Ando, T. Kamataki, R. Kato and M. Nagao (1980) Metabolic activation of mutagenic tryptophan pyrolysis products (Trp-P-1 and Trp-P-2) by a purified cytochrome P-450-dependent monooxygenase system, *Cancer Lett.*, **9**, 271-276.
- Jovanovic, S. V., S. Steenken, M. Tomic, B. Marjanovic and M. G. Simic (1994) Flavonoids as antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4846-4851.
- Kada, T. and K. Shimoi (1987) Desmutagens and bioantimutagens—their modes of action, *BioEssays*, **7**, 113-116.
- Kanazawa, K., H. Kawasaki, K. Samejima, H. Ashida and G. Danno (1995) Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against a dietary carcinogen, Trp-P-2, are galangin and quercetin, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 404-409.
- Kanazawa, K., S. Minamoto, T. Yagi, K. Samejima, H. Ohkawa and G. Danno (投稿中) Antimutagenicity of flavonoids against dietary carcinogen, Trp-p-2, *J. Agric. Food Chem.*, Submitting.
- Kato, T. and Y. Yamazoe (1987) Metabolic activation and covalent binding to nucleic acids of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrolysates, *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 297-311.
- Macgregor, J. T. and L. Jurd (1978) Mutagenicity of plant flavonoids: Structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, **54**, 297-310.
- Minamoto, S. and K. Kanazawa (1995) Electrochemical determination for enzymic production of ultimate carcinogen from tryptophan pyrolysate by rat hepatic microsomes, *Anal. Biochem.*, **225**, 143-148.
- Mita, S., K. Ishii, Y. Yamazoe, T. Kamataki, R. Kato and T. Sugimura (1981) Evidence for the involvement of *N*-hydroxylation of 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole by cytochrome P-450 in the covalent binding to DNA, *Cancer Res.*, **41**, 3610-3614.
- Nagao, M. and T. Sugimura (1993) Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development, *Mutat. Res.*, **290**, 43-51.
- Negishi, T., S. Arimoto, C. Nishizaki and H. Hayatsu (1990) Inhibition of the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2) in *Drosophila* by chlorophyll. In: Y. Kuroda, D. M. Shankel *et al.* (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanism II*, Plenum Press: New York, pp. 341-344.
- Pierpoint, W. S. (1986) Flavonoids in the human diet, In: V. Cody, E. Middleton *et al.* (Eds.), *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 125-140.
- Samejima, K., K. Kanazawa, H. Ashida and G. Danno (1995) Luteolin: A strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2 in peppermint, sage, and thyme, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 410-414.
- Sugimura, T. (1979) Naturally occurring genotoxic carcinogens, In: E. C. Miller, J. A. Miller *et al.* (Eds.), *Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis*, Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo, pp. 241-261.
- Sugimura, T. (1985) Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process, *Mutat. Res.*, **150**, 33-41.
- Tsyrllov, H. B., V. M. Mikhailenko and H. V. Gelboin (1994) Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1205**, 325-335.
- Wakui, Y., E. Yanagisawa, E. Ishibashi, Y. Mitsuzaki, S. Takeda, H. Sasaki, M. Aburada and T. Oyama (1992) Determination of baicalin and baicalein in rat plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatog.*, **575**, 131-136.
- Yamaizumi, Z., T. Shiomi, H. Kasai, S. Nishimura, Y. Takahashi, M. Nagao and T. Sugimura (1980) Detection of potent mutagens, Trp-P-1 and Trp-P-2, in broiled fish, *Cancer Lett.*, **9**, 75-83.
- Zhu, B. T., E. L. Ezell and J. G. Liehr (1994) Catechol-*O*-methyltransferase-catalyzed rapid *O*-methylation of mutagenic flavonoids, *J. Biol. Chem.*, **269**, 292-299.

*Environ. Mut. Res. Commun.*, **17**: 123-126 (1995)

第23回大会シンポジウム  
「植物成分によるがん予防とそのメカニズム」

## Cancer Chemoprevention by Natural Carotenoids

Hoyoku Nishino

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

(Received: March 3, 1995; Accepted: May 31, 1995)

### Summary

As one of the most promising cancer chemopreventive agents,  $\beta$ -carotene has been studied extensively. However, other natural carotenoids have also suppressed tumorigenesis, and some are more potent than  $\beta$ -carotene. For example,  $\alpha$ -carotene shows higher potency than  $\beta$ -carotene in suppressing tumorigenesis in lung. In the two-stage mouse lung carcinogenesis model (initiator, 4-nitroquinoline 1-oxide; promoter, glycerol), oral administration of  $\alpha$ -carotene (0.05% in drinking water) significantly decrease the mean number of lung tumors per mouse. In contrast,  $\beta$ -carotene did not show any suppression of lung tumor formation under the same experimental conditions. Lutein, which is dihydroxyl derivative of  $\alpha$ -carotene, was proven to have potent suppressive effect on 1st-stage promotion of skin tumor formation. Further, fucoxanthin, a carotenoid as abundant in nature as  $\beta$ -carotene, was also found to have anti-tumorigenic activity in mouse skin and duodenum models. Thus, more extensive studies on various natural carotenoids, other than  $\beta$ -carotene, should be carried out in the field of cancer chemoprevention.

**Keywords:** carotenoids,  $\alpha$ -carotene, fucoxanthin, cancer chemoprevention

### Introduction

Epidemiological investigations have shown that cancer risk is inversely related to the consumption of green and yellow vegetables (1-2). Since  $\beta$ -carotene is present in abundance in these vegetables, it has been proposed as an important factor for cancer prevention. However, it was recently reported that supplements of  $\beta$ -carotene increased the incidence of lung cancer among heavy smokers in Finland (3). One possible explanation is that in the epidemiologic studies,  $\beta$ -carotene merely acts as a marker for cancer preventive agents which co-exist with  $\beta$ -carotene in green and yellow vegetables. In fact, various kinds of cancer preventive substances have been identified in green and yellow vegetables. In the case of carotenoids,  $\beta$ -carotene is usually associated with other natural carotenoids, such as  $\alpha$ -carotene, lutein, zeaxanthin, lycopene and  $\beta$ -cryptoxanthin. And these carotenoids are also detectable in human serum and tissues. These natural

carotenoids, but not  $\beta$ -carotene, may actually reduce the incidence of human cancer. In this context, we evaluated the cancer chemopreventive potency of various natural carotenoids other than  $\beta$ -carotene.

### Materials and Methods

Palm carotene was prepared by a previous reported method (4).  $\alpha$ -Carotene was purified from palm carotene by high-performance liquid chromatography with lime-packed column.  $\beta$ -Carotene was purchased from Sigma. These carotenoids were prepared as emulsion as described previously (5). Other carotenoids, which were supplied by Dr. Tanaka or Dr. Tsushima, were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and then dispersed into water or medium. Male ddY mice, male C3H/He mice, female ICR mice, and male C57Bl/6 mice were used as experimental animals for carcinogenesis models in lung, liver, skin, and duodenum, respectively (Table 1-4).

Table 1. Anti-tumorigenic activity of palm carotene

Group	(n)	Percentage of tumor-bearing mice	Mean number of tumors/mouse
<i>Lung carcinogenesis</i> <sup>1)</sup>			
Control	(14)	100 <sup>a</sup>	3.06 <sup>b</sup>
+ Palm carotene	(12)	33.3 <sup>a</sup>	0.58 <sup>b</sup>
<i>Liver carcinogenesis</i> <sup>2)</sup>			
Control	(16)	100	6.31 <sup>c</sup>
+ Palm carotene	(15)	100	3.60 <sup>c</sup>
<i>Duodenal carcinogenesis</i> <sup>3)</sup>			
Control	(27)	66.7 <sup>d</sup>	0.93
+ Palm carotene	(28)	39.3 <sup>d</sup>	0.64

<sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.001$ , <sup>c</sup> $p < 0.01$ , <sup>d</sup> $p < 0.05$ .

<sup>1)</sup> Tumor initiator, 4NQO (10 mg/kg body weight), dissolved in a mixture of olive oil and cholesterol (20:1), was given by a single s.c. injection on the first experimental day. Glycerol (tumor promoter) was dissolved in drinking water at a concentration of 10%, and given *ad libitum* from experimental week 5 to week 30. Palm carotene (at concentration of 0.005%) or vehicle was mixed as an emulsion into drinking water during tumor promotion.

<sup>2)</sup> Mice received palm carotene (at a concentration of 0.005%) or vehicle as emulsion in drinking water for 40 weeks.

<sup>3)</sup> ENNG (0.1% in drinking water) was given *ad libitum* for the first 4 weeks. Then, palm carotene (at concentration of 0.05%) or vehicle dissolved as an emulsion in drinking water was given *ad libitum* for 16 weeks.

Table 2. Effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene on lung tumorigenesis

Group	(n)	Percentage of tumor-bearing mice	Mean number of tumors/mouse
Control	(16)	93.8	4.06 <sup>a</sup>
+ $\alpha$ -Carotene	(15)	73.3	1.33 <sup>a</sup>
+ $\beta$ -Carotene	(15)	93.3	4.93

<sup>a</sup> $p < 0.001$ .

Two-stage lung carcinogenesis experiments were carried out as described in Table 1, with some modification. The concentration of carotenes in drinking water was 0.05%.

Table 3. Anti-tumorigenic activity of lutein

Group	(n)	Percentage of tumor-bearing mice	Mean number of tumors/mouse
Control	(16)	93.8	5.50 <sup>a</sup>
+ Lutein	(11)	54.5	1.91 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $p < 0.01$ .

Initiation of skin carcinogenesis was carried out by a single application of 100  $\mu$ g of DMBA on the back of 8-week old female ICR mice. For promotion, TPA (1st-stage promoter, applied once after the initiation, 10 nmol) and mezerein (2nd-stage promoter, applied twice weekly from 3 days after the TPA treatment, 3 nmol for 15 weeks and 6 nmol for subsequent 15 weeks), were used. Lutein (1  $\mu$ mol) was applied topically twice; i.e., 40 min before and 16 h after TPA treatment. The number and incidence of tumors were determined at the end of the experiment.

## Results

### Effect of Palm Carotene on Carcinogenesis of Lung and Duodenum.

Palm carotene showed potent anti-tumor promoting activity in a two-stage carcinogenesis experiment in lung, initiated with 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) and promoted with glycerol. Oral admin-

istration of 0.005% palm carotene dissolved in drinking water decreased the mean number of tumors per mouse to about 19% of the number in the control group ( $p < 0.001$ ). Palm carotene also significantly decreased the percentage of tumor-bearing mice.

In spontaneous liver carcinogenesis in C3H/He male mice, the mean number of hepatomas was

Table 4. Anti-tumorigenic activity of fucoxanthin

Group	(n)	Percentage of tumor-bearing mice	Mean number of tumors/mouse
<i>Skin carcinogenesis</i> <sup>1)</sup>			
Control	(15)	53.3	2.20
+ Fucoxanthin	(15)	0	0
<i>Duodenal carcinogenesis</i> <sup>2)</sup>			
Control	(18)	77.8 <sup>a</sup>	1.28 <sup>b</sup>
+ Fucoxanthin	(20)	30.0 <sup>a</sup>	0.55 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $p < 0.005$ , <sup>b</sup> $p < 0.05$ .

<sup>1)</sup> Tumor initiation was accomplished by a single application of DMBA (100  $\mu$ g) on the back of 8-week old female ICR mice. As tumor promoter, TPA at a dose of 1.62 nmol/painting was applied twice a week starting 1 week after the initiation. Fucoxanthin (0.6  $\mu$ mol, mixed in 100  $\mu$ l of acetone) was applied simultaneously with each application of TPA. Control were treated with DMSO (vehicle for fucoxanthin) in the same amount of acetone. The experiment continued to week 20 of promotion.

<sup>2)</sup> Experiment was carried out as described in Table 1, with some modification. The concentration of fucoxanthin was 0.005%.

significantly decreased by oral administration of 0.005% palm carotene dissolved in drinking water as compared with that in the control group; the control group developed 6.31 tumors/mouse, whereas the palm carotene-treated group had 3.60 tumors/mouse ( $p < 0.01$ ). Palm carotene also suppressed *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG)-induced duodenal tumorigenesis. The percentage of tumor-bearing mice was significantly decreased by oral administration of 0.05% palm carotene as compared with the control group; 66.7% of mice in the control group developed tumors, whereas 39.3% of mice developed tumors in the palm carotene-treated group ( $p < 0.05$ ).

### Effect of $\alpha$ - and $\beta$ -Carotene on Lung Carcinogenesis

Since palm carotene, which consists of 60%  $\beta$ -carotene, 30%  $\alpha$ -carotene and 10% others ( $\gamma$ -carotene, lycopene *et al.*) showed significant anti-tumorigenic effects, we further examined the effect of  $\alpha$ -carotene, one of the major constituents, in comparison with that of  $\beta$ -carotene. As shown in Table 2,  $\alpha$ -carotene showed higher potency than  $\beta$ -carotene in suppressing tumorigenesis in lung. We examined the effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene on the promotion of lung tumor formation in 4NQO-initiated mice. Oral administration of  $\alpha$ -carotene significantly decreased the mean number of tumors per mouse; the control group developed 4.06 tumors/mouse, whereas  $\alpha$ -carotene-treated group had 1.33 tumors/mouse ( $p < 0.001$ ).  $\alpha$ -Carotene also showed a tendency to decrease the percentage of tumor-bearing mice, although the difference was not statis-

tically significant. On the contrary,  $\beta$ -carotene showed no suppression under the same experimental conditions as  $\alpha$ -carotene.

### Effect of Lutein on Skin Carcinogenesis

These results indicate that we should pay more attention to anti-tumorigenic activities of natural carotenoids other than  $\beta$ -carotene. In this context, we examined the effect of lutein, dihydroxyl derivative of  $\alpha$ -carotene, on skin tumorigenesis (initiator, DMBA; promoter, TPA plus mezerein). Treatment with lutein [applied topically 40 min before and 16 h after TPA treatment, at a dose of 1  $\mu$ mol per painting (molar ratio to TPA, 100:1)] resulted in significant suppression of skin tumor formation. The mean number of tumors per mouse in lutein-treated group was 1.91, whereas that in the control group was 5.50 ( $p < 0.01$ ). The percentage of tumor-bearing mice was also suppressed by the treatment with lutein, although the difference from the control group was not statistically significant.

### Effect of Fucoxanthin on Carcinogenesis of Skin and Duodenum

We further examined the effect of fucoxanthin on tumorigenesis in skin and duodenum. Fucoxanthin, as well as  $\beta$ -carotene, is one of the most abundant carotenoids in nature; it is widely distributed in marine organism, including seaweeds. Fucoxanthin used in this experiment was prepared from brown algae *Hidikia fusiforme*, a common edible seaweed in Japan. As shown in Table 4, fucoxanthin (at a dose of 0.6  $\mu$ mol per painting) completely suppress-

ed skin tumor formation during the whole period of experiment, up to 20 weeks of promotion. Fucoxanthin also suppressed ENNG-induced mouse duodenal carcinogenesis. The percentage of tumor-bearing mice in control group and in fucoxanthin-treated group was 77.8% and 30.0%, respectively, the difference of which was statistically significant ( $p < 0.005$ ). The mean number of tumors per mouse in the control group was 1.28 tumors/mouse, whereas fucoxanthin-treated mice had 0.55 tumors/mouse ( $p < 0.05$ ).

#### Discussion

Since  $\alpha$ -carotene, lutein and fucoxanthin were proven to suppress tumorigenesis, we expanded the study to test the anti-carcinogenic activity of various natural carotenoids and their related compounds. For example, peridinin was found to have potent anti-tumor promoting activity in mouse skin carcinogenesis. It is of interest to examine whether lutein and peridinin also suppress carcinogenesis in other organs than skin. Peridinin has a butenolide ring in its structure, which may have specific biological activity. Therefore, we synthesized various kinds of butenolide compounds and evaluated their anti-carcinogenic activity. Some of them, such as 5-hydroxy-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrienyl)-2(5H)-furanone, were proven to have anti-tumor-promoting activity (6). In conclusion, various kinds of natural carotenoids and their related compounds other than  $\beta$ -carotene seem to be promising chemopreventive agents. Thus, further studies on these agents should be carried out.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Ministry of Health and Welfare (Grant for

Scientific Research Expenses for Health and Welfare Programs), the Ministry of Education, Science and Culture, the Smoking Research Foundation, and the Plant Science Research Foundation, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Japan. The work was carried out in collaboration with research groups of Kyoto Prefectural University of Medicine, Kagoshima University, Kyoto Pharmaceutical University, Kobe Women's College of Pharmacy, Lion Co., and Kuraray Co., Japan.

#### References

- Hirayama, T. (1979) Diet and cancer, *Nutr. Cancer*, **1**, 67-81.
- Murakoshi, M., H. Nishino, Y. Satomi, J. Takayasu, T. Hasegawa, H. Tokuda, A. Iwashima, J. Okuzumi, H. Okabe, H. Kitano and R. Iwasaki (1992) Potent preventive action of  $\alpha$ -carotene against carcinogenesis: Spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by  $\alpha$ -carotene than by  $\beta$ -carotene, *Cancer Res.*, **52**, 6583-6587.
- Nakamura, M., R. Iwasaki and T. Ohgoshi (1988) Natural carotene from palm oil, In: Proceedings of the 79th American Oil Chemists' Society Annual Meeting, p. 17.
- Nishino, H., Y. Satomi, H. Tokuda, A. Nishino, A. Iwashima, Y. Tanaka, Y. Yamano, Y. Shibata, M. Torihara, Y. Tamai and M. Ito (1991) Anti-tumor activity of peridinin and its structurally related butenolide compounds, *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, **100**, 831-835.
- Peto, R., R. Doll, J. D. Buckley and M. B. Sporn (1981) Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*, **290**, 201-208.
- The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group (1994) The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers, *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1029-1035.

第23回大会シンポジウム  
「植物成分によるがん予防とそのメカニズム」

## Chemopreventive Effects of Plant Derived Phenolic, Organosulfur and Other Compounds on Carcinogenesis in Digestive Organs

Hideki Mori, Takuji Tanaka, Shigeyuki Sugie and Naoki Yoshimi

Department of Pathology, Gifu University School of Medicine, 40 Tsukasa-machi, Gifu 500, Japan

(Received: March 3, 1995; Accepted: May 31, 1995)

#### Summary

Chemopreventive actions of a number of plant derived chemicals were confirmed in the animal models for digestive organs carcinogenesis. Phenolic compounds such as chlorogenic acid, ellagic acid or protocatechuic acid exerted chemopreventive effects in the liver, tongue or large bowel. Organosulfur compounds including indoles such as indole-3-carbinol or sinigrin and thiocyanates like benzyl isothiocyanate or benzyl thiocyanate showed similar protective properties in these organs. Other chemicals including constituents contained in oriental drugs such as costunolide or shikonin and trace elements like magnesium were also effective in the animal models. Assay of biomarkers for cell proliferation suggested that the control of carcinogen-induced hyperproliferation appears to be important for the mode of actions of chemopreventive chemicals in either case of blocking agents or suppressive agents.

**Keywords:** chemoprevention, phenols, organosulfur compounds, cell proliferation

#### Introduction

Chemoprevention embraces the concept that non-carcinogenic naturally occurring products or synthetic compounds can inhibit the process of carcinogenesis. The ideal strategy would be possible if initiating and promoting agents and processes were understood and countervailing agents were shown to be efficacious with no or low toxicity and side effects. A number of agents have proved effective against chemical carcinogenesis in different organs and classified into two major categories of compounds, i.e., blocking agents and suppressive agents (Wattenberg, 1985). Epidemiological and laboratory studies have suggested that plant derived chemicals including dietary factors are a major source of chemopreventive agents (Bertram *et al.*, 1987; Boon *et al.*, 1990; Hayatsu *et al.*, 1988; Morse *et al.*, 1993). Our group has demonstrated the intervening effects with a number of naturally-occurring agents using animal models for carcinogenesis in digestive organs.

#### Phenolic Compounds

Chlorogenic acid is a phenolic compound and is widely distributed as a plant constituent. We have examined the modifying effect of this compound in a hamster model with methylazoxymethanol (MAM) acetate. In this study, Syrian golden hamsters given MAM acetate and chlorogenic acid (0.025% in diet) developed significantly smaller numbers of altered hepatocellular foci and large intestinal tumors than the hamsters given MAM acetate alone (Mori *et al.*, 1986). The preventive effect of chlorogenic acid is suggested to relate to the antioxidative properties. Recently, Kasai *et al.* (1993) reported that this phenylpropanoid is a potent inhibitor of formation of 8-hydroxydeoxyguanosine which is generated by oxidative DNA damage. Ellagic acid is also a representative phenolic compound contained popularly in edible plants. The effect of ellagic acid on *N*-2-fluorenylacetamide-induced hepatocarcinogenesis was examined in rats. In this experiment, rats given ellagic acid (400 ppm in diet) in the initiation

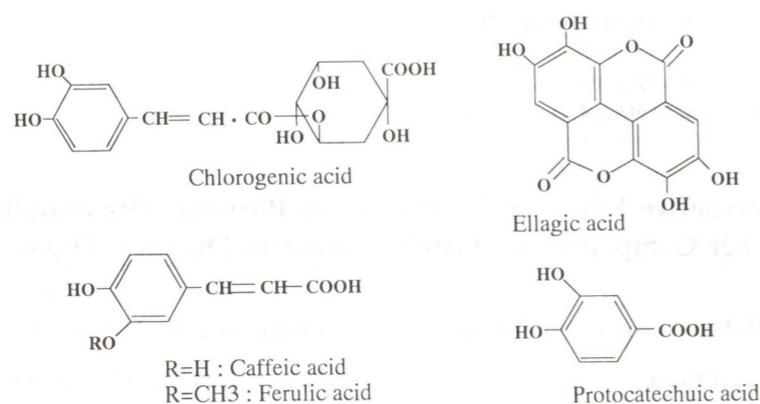


Fig. 1. Phenolic compounds.

phase had significantly lower incidence of altered hepatocellular foci and hepatocellular neoplasms (Tanaka *et al.*, 1988). The results show a blocking effect of this phenolic compound. Inhibitory effects of this phenolic chemical on carcinogenesis in other organs are also known (Mandal *et al.*, 1990). Other plant phenols such as caffeic acid or ferulic acid are also known to act as electrophilic trapping agents (Newmark, 1984) and are inhibitors of TPA (Gali *et al.*, 1991). Four plant phenols of caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids were investigated for the possible chemopreventive properties using a rat model for tongue carcinogenesis with 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO), being useful for detecting modifying effects of a variety of xenobiotics. Feeding of 4 compounds (caffeic acid, 500 ppm; ellagic acid, 400 ppm; chlorogenic acid, 250 ppm; ferulic acid, 500 ppm) significantly reduced the incidences of tongue neoplasms and the number of the silver-stained nuclear organizer protein (AgNORs), a biomarker for cell proliferation (Tanaka *et al.*, 1993a). Such data suggest that these naturally-occurring substances are applicable for prevention of human oral neoplasia. A simple phenolic acid, protocatechuic acid (PCA) is one of the constituents in edible plants, fruits, and vegetables (Fig. 1). This phenolic compound is also known to possess a strong antioxidative property. Modifying effect of PCA on hepatocarcinogenesis was examined in a rat model with use of diethylnitrosamine (DEN). Dietary PCA exposure (500 ppm or 1000 ppm) during the initiation phase or post-initiation phase significantly reduced the incidence of altered hepatocellular foci and liver cell neoplasms. Hepatic ornithine decarboxylase (ODC) activity was reduced in DEN-treated animals fed the PCA diets

compared to those given DEN alone (Tanaka *et al.*, 1993b). Chemopreventive potential of PCA on colon carcinogenesis was confirmed in another rat model. In this experiment, dietary administration of PCA at 500 ppm or 1000 ppm during the initiation or post-initiation phase inhibited azoxymethane (AOM)-induced intestinal carcinogenesis. Data of colonic ODC activity, bromodeoxyuridine (BrdU) or number of AgNORs were also in agreement with the protective effects of this phenolic compound (Tanaka *et al.*, 1993c). In our newly established short-term assay, PCA suppressed the occurrence of colonic aberrant crypt foci (ACF) which are regarded as the putative preneoplastic lesions in the colonic mucosa of humans and rodents (Kawamori *et al.*, 1994). Furthermore, chemoprevention of this phenol on the oral carcinogenesis was also demonstrated in the rat model with 4-NQO. Feeding of PCA at any dose (500 ppm, 1000 ppm or 2000 ppm) during the initiation or post-initiation phase suppressed the development of tongue neoplasms. Results of the assays of biomarkers for cell proliferation also supported the tumorigenesis data (Tanaka *et al.*, 1994a). Very recently, similar protective effects of the monophenol on the gastric carcinogenesis was confirmed by us in a rat model with use of methyl nitrosourea (Tanaka *et al.*, 1995).

#### Organosulfur Compounds

Glucosinolates and indoles are regarded as promising naturally occurring chemopreventive agents. Indole-3-carbinol (I3C), sinigrin, the corresponding glucosinolate of allyl isothiocyanate are present most abundantly in cruciferous vegetables like cabbage or broccoli. Potential protective effects of both chemicals on hepatocarcinogenesis was examined in

rats. Dietary exposure of I3C (1000 ppm) or sinigrin (1200 ppm) during the initiation phase of DEN-induced carcinogenesis significantly decreased the number of altered hepatocellular foci and liver cell neoplasms (Tanaka *et al.*, 1990). Both chemicals also protected 4-NQO-induced oral carcinogenesis by exposure of the initiation or post-initiation phase in rats (Tanaka *et al.*, 1992). In this study, I3C and sinigrin exerted significant decrease in the number and area of AgNORs in the tongue squamous epithelium. These suppressing effects are considered to relate partly to the alteration of drug-metabolizing enzymes including P-450 and detoxifying enzymes. Indole chemicals, especially, I3C is known to induce hepatic estradiol 2-hydroxylase in both humans and rats (Michnovicz *et al.*, 1990) and I3C is reported to reduce the incidence of spontaneous mammary tumors in C3H mice (Bradlow *et al.*, 1991). Thus, investigation to examine possible chemopreventive effect of I3C on spontaneous occurrence of endometrial carcinoma in female Donryu rats was conducted. In this experiment, dietary exposure of I3C (100 ppm) for 660 days significantly decreased the incidence of uterine endometrial carcinoma as well as preneoplastic endometrial lesions. Biochemical assay revealed the significant increase of estradiol 2-hydroxylation by I3C (Kojima *et al.*, 1994).

Benzyl isothiocyanate (BITC) and benzyl thiocyanate (BTC) are also constituents of cruciferous vegetables, being present as their glucosinolate precursors. In our previous study, *in vivo* administration of BITC or BTC reduced the induction of unscheduled DNA synthesis and replicative DNA synthesis responding to hepatocarcinogens in the primary culture of rat hepatocytes (Sugie *et al.*, 1993b). The modifying effects of BITC or BTC was examined in the DEN-induced rat hepatocarcinogenesis. Animals given BITC in diet (100 ppm) after a single exposure of DEN developed significantly lower incidence of liver cell neoplasms, and the incidences of altered hepatocellular foci in the animal groups with BITC or BTC were significantly lower than those of the group with the carcinogen alone (Sugie *et al.*, 1993a). The results suggest that both chemicals are promising chemopreventive agents for liver cell neoplasia. Subsequent experiments for possible protective effects of these thiocyanate compounds were done using a rat model for intestinal carcinogenesis. BTC (400 ppm) at the initiation phase or post-initiation phase of MAM

acetate-induced intestinal carcinogenesis significantly reduced the incidence and multiplicity of tumors in the small intestine, and BITC (400 ppm) at the initiation phase significantly decreased the incidence and multiplicity of tumors in the small intestine and the incidence of colonic tumors. The BrdU labelling indices in the epithelium of small intestine or colon were decreased by BTC and BITC exposure at the initiation phase (Sugie *et al.*, 1994). These data also suggest that BTC and BITC could be chemopreventive agents for intestinal neoplasia. Very recently, modifying effects of methyl methanethiosulfonate (MMTS), one of constituents of cruciferous vegetables, on the hepatocarcinogenesis or intestinal carcinogenesis in rodents were studied by us. This chemical was recently reported to have antimutagenic activity to *Escherichia coli* B/r WP2 (Nakamura *et al.*, 1995). Modifying effects of MMTS on hepatocarcinogenesis was done in a rat model with use of combination of DEN and phenobarbital. Protective effect of dietary exposure of MMTS (100 ppm) was apparent when the agent was applied during the promotional phase (unpublished results). Furthermore, effects of MMTS on intestinal carcinogenesis was done in the rat model with AOM. Also in this study, clear suppressive effect of MMTS (100 ppm in diet) was confirmed when the chemical was administered during the promotion phase (unpublished data) (Fig. 2).

#### Miscellaneous Compounds

A variety of other types of chemopreventive agents derived from plant constituents such as chrolophyn (Hayatsu *et al.*, 1988) or fibers (Reddy *et al.*, 1981) are well known. Flavoglucin is the major pigment formed by a rice mold. This quinol fungal metabolite is produced by some *Aspergillus* which has been used in the manufacture of "katsuobushi", one of the most popular flavorings for Japanese food. Shikonin is a naphthoquinone and has been used as a Japanese-Chinese medicine. It has been reported that the naphthoquinone derivatives exert anti-inflammatory and anti-tumor effects. Ginger is believed to possess anti-ulcer, anti-inflammatory and anti-emetic actions in Japanese-Chinese medicine. These naturally occurring compounds including active constituents in the oriental drugs have been tested for the modifying effects on intestinal carcinogenesis and found to have chemopreventive properties (Yoshimi *et al.*, 1992). In this study, dietary exposure of flavoglucin, shikonin or ginger (200

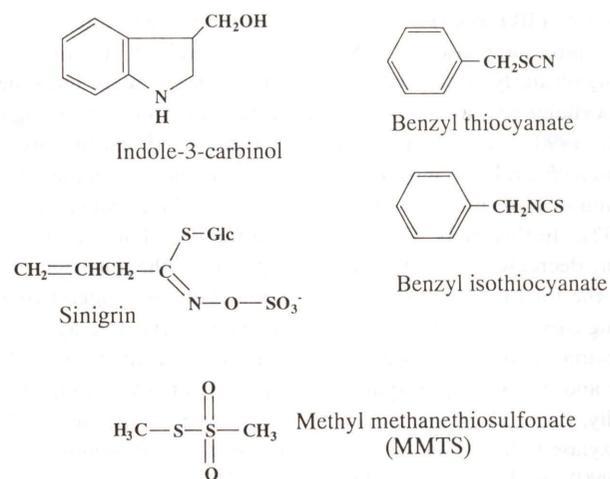


Fig. 2. Organosulfur compounds.

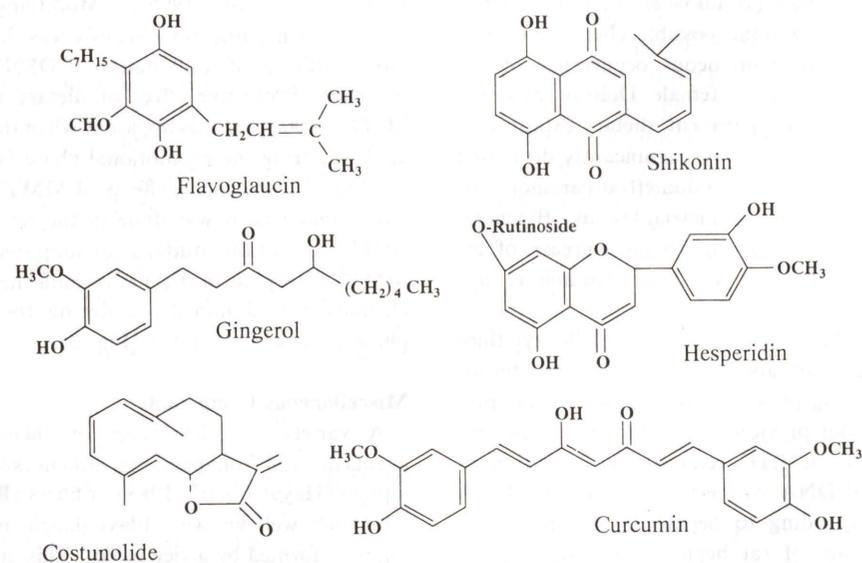


Fig. 3. Miscellaneous compounds.

ppm each) during the initiation phase inhibited AOM-induced intestinal carcinogenesis. Costunolide is a sesquiterpene compound and is known as a constituent of *Saussureae Radix* ("Mokko" in Japanese) which has been used as an oriental drug. Chemopreventive effect of this chemical was also confirmed by us. This agent protected AOM-induced intestinal carcinogenesis in rats by its exposure at the initiation phase (200 ppm). Data of aberrant crypt foci and BrdU labelling indices of S phase cells in this experiment, were also agreement with the tumorigenesis results (Mori *et al.*, 1994). Curcumin, a major pigment of turmeric being

widely used as a spice or others are regarded as a promising chemopreventive agent. Hesperidine, a major citrus flavonoid is reported to exert some anti-mutagenic or anti-promoting activities. Recently, chemopreventive effect of these agents on 4-NQO-induced oral carcinogenesis was investigated and the result was compared with that of  $\beta$ -carotene. Both agents of curcumin and hesperidine were effective in this model and the mode of action was similar to that of  $\beta$ -carotene (Tanaka *et al.*, 1994b) (Fig. 3).

Micronutrient is one of constituents of plants. Some trace elements and metals such as selenium or calcium have been reported to have anti-

carcinogenic properties (Boone *et al.*, 1990; Hayatsu *et al.*, 1988; Morse *et al.*, 1993; Wattenberg, 1985). There have been available limited information suggesting chemopreventive action of magnesium, one of the major essential metals (Bazikan *et al.*, 1968). We demonstrated an inhibitory effect of magnesium hydroxide on MAM acetate-induced large bowel carcinogenesis in rats (Tanaka *et al.*, 1989). Subsequent study in another rat model with 1,2-dimethylhydrazine showed a similar protective effect in rats (Morishita *et al.*, 1991). The results of analysis of BrdU or proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labelling index and expression of c-myc proto-oncogen in the mucosal epithelium suggested that the inhibitory effects of the trace element is related to the control of carcinogen-induced hyperproliferation of the mucosal cells in the large bowel (Mori *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993). It has been speculated that the preventive effect of calcium is a result of the formation of calcium soaps with bile acids, which reduces the potential toxicity of bile acids (Newmark *et al.*, 1984). Thus, the modulating effects of magnesium hydroxide on the epithelial cell proliferation in the rat colon caused by exposure of cholic acid were examined by measuring BrdU, and the results were compared with those of calcium lactate. The results suggested that magnesium hydroxide exhibits anticarcinogenic effects as does calcium by reducing increased cell proliferation of colonic epithelium induced by toxic effects of the bile acids which are regarded as colon tumor promoters or cocarcinogens (Wang *et al.*, 1994).

#### Possible Mode of Actions of Chemopreventive Agents

Cancer chemoprevention basically refers to the prevention of cancer prior to the malignant stage of carcinogenesis. Since, the mechanisms for the occurrence of cancers are considered to originate in multiple factors including multistep genetic alteration, prevention of cancers should relate to different stages of carcinogenesis, i.e., process of formation of carcinogens, process of activation or detoxification of carcinogens, process of DNA adduction, process of oncogene activation, process of preneoplastic lesions, and stage of cancer progression (Fig. 4). In general, the mode of actions of each chemopreventive agent has not been well understood. There are a number of carcinogen precursors in the environment. Agents such as ascorbic acid or tocopherols

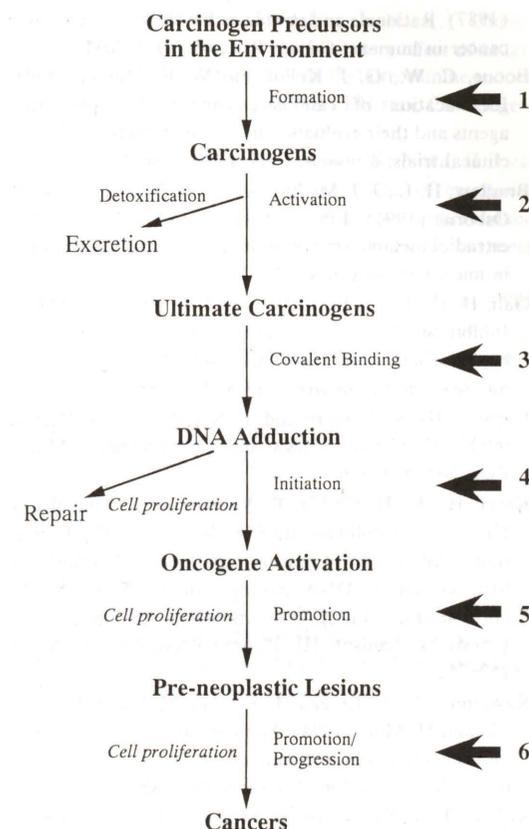


Fig. 4. Possible mode of actions of chemopreventive agents (1-6).

are reported correlate to the process of formation of carcinogens. Phenols, indoles, flavones, coumarines, terpenes or sulfur compounds may be related to activation or detoxification of carcinogens. Some agents like selenium, indoles or phenols could relate to covalent binding of DNA or DNA adduction. Agents such as protease inhibitors, retinols, sulfur compounds, phenols may also be involved in the process of oncogene activation. Sulfur compounds, phenols or terpenes might be related to the promotion or progression. So far as our results concern, the control of carcinogen-induced hyperproliferation of the cells in the target organs appears to be important for the mode of actions of chemopreventive agents in either case of blocking agents or suppressing agents.

#### References

- Bazikan, K. A. and A. A. Akimov (1968) Anticarcinogenic effect of magnesium, *Vop. Onkol.*, **14**, 57-61.
- Bertram, J. S., L. N. Kolonel and Meyskens, Jr. F. L.

- (1987) Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans, *Cancer Res.*, **47**, 3012-3031.
- Boone, C. W., G. J. Kelloff and W. E. Malone (1991) Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials; a review, *Cancer Res.*, **50**, 2-9.
- Bradlow, H. L., J. J. Michnovicz, N. T. Telang and M. P. Osborne (1991) Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice, *Carcinogenesis*, **12**, 1571-1574.
- Gali, H. U., E. M. Perchellet and J. P. Perchellet (1991) Inhibition of tumor promoter-induced ornithine decarboxylase activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis *in vivo*, *Cancer Res.*, **51**, 2820-2825.
- Hayatsu, H., S. Arimoto and T. Negishi (1988) Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutat. Res.*, **202**, 429-446.
- Kasai, H., M.-H. Chung, F. Yamamoto, E. Ohtsuka, J. Laval, A. P. Grollman and S. Nishimura (1993) Formation, inhibition of formation, and repair of oxidative 8-hydroxyguanine DNA damage, In: G. Bronzetti, H. Hayatsu *et al.* (Eds), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*, Plenum Press, New York, pp. 257-262.
- Kawamori, T., T. Tanaka, T. Kojima, M. Suzui, M. Ohnishi and H. Mori (1994) Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protococatechuic acid, *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 686-691.
- Kojima, T., T. Tanaka and H. Mori (1994) Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donrhu rats by dietary indole-3-carbinol, *Cancer Res.*, **54**, 1446-1449.
- Mandal, S. and G. D. Stoner (1990) Inhibition of N-nitrosobenzylmethylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by ellagic acid, *Carcinogenesis*, **11**, 55-61.
- Michnovicz, J. J. and H. L. Bradlow (1990) Induction of estradiol metabolism by dietary indole-3-carbinol in humans, *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 947-949.
- Mori, H., T. Kawamori, T. Tanaka, M. Ohnishi and J. Yamahara (1994) Chemopreventive effect of costunolide, a constituent of oriental medicine, on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats, *Cancer Lett.*, **83**, 171-175.
- Mori, H., Y. Morishita, Y. Mori, N. Yoshimi, S. Sugie and T. Tanaka (1992) Effect of magnesium hydroxide on methylazoxymethanol acetate-induced epithelial proliferation in the large bowels of rats, *Cancer Lett.*, **62**, 43-48.
- Mori, H., Y. Morishita, T. Shinoda and T. Tanaka (1993) Preventive effect of magnesium hydroxide on carcinogen-induced large bowel carcinogenesis in rats, In: G. Bronzetti, H. Hayatsu *et al.*, (Eds.) *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*, Plenum Press, New York, pp. 111-118.
- Mori, H., T. Tanaka, H. Shima, T. Kuniyasu and M. Takahashi (1986) Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters, *Cancer Lett.*, **30**, 49-54.
- Morishita, Y., T. Tanaka, T. Kojima, A. Okumura, S. Sugie and H. Mori (1991) Effect of magnesium hydroxide on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in rats, *J. Toxicol. Pathol.*, **4**, 29-33.
- Morse, M. A. and G. Stoner (1993) Cancer chemoprevention: principles and prospects, *Carcinogenesis*, **14**, 1737-1746.
- Nakamura, Y., T. Matsuo, K. Shimoi, Y. Nakamura and I. Tomita (1995) S-methyl methane thiosulfonate, a new antimutagenic compound isolated from Brassica Oleracea L. Var Botrytis, *Chem. Pharm. Bull.*, in press.
- Newmark, H. L. (1984) A hypothesis for dietary compounds as blocking agents of chemical carcinogenesis: plant phenolics and pyrrole pigments, *Nutr. Cancer*, **6**, 58-70.
- Newmark, H. L., M. J. Wargovich and W. R. Bruce (1984) Colon cancer and dietary fat, phosphate and calcium: a hypothesis, *J. Natl. Cancer Inst.*, **72**, 1323-1325.
- Reddy, B. S., H. Mori and M. Nicolis (1981) Effect of dietary wheat bran and dehydrated citrus fiber on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in Fischer 344 rats, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 553-557.
- Sugie, S., K. Okamoto, A. Okumura, T. Tanaka and H. Mori (1994) Inhibitory effects of benzyl thiocyanate and benzyl isothiocyanate on methylazoxymethanol acetate-induced intestinal carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, **15**, 1555-1560.
- Sugie, S., A. Okumura, T. Tanaka and H. Mori (1993) Inhibitory effects of benzyl isothiocyanate and benzyl thiocyanate on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 865-870.
- Sugie, S., N. Yoshimi, A. Okumura, T. Tanaka and H. Mori (1993) Modifying effects of benzyl isothiocyanate and benzyl thiocyanate on DNA synthesis in primary culture of rat hepatocytes, *Carcinogenesis*, **14**, 281-283.
- Tanaka, T., H. Iwata, K. Niwa, Y. Mori and H. Mori (1988) Inhibitory effect of ellagic acid on N-2-fluorenylacetylamine-induced liver carcinogenesis in male ACI/N rats, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 1297-1303.
- Tanaka, T., T. Kawamori, M. Ohnishi, K. Okamoto, H. Mori and A. Hara (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protococatechuic acid during initiation and post-initiation phases, *Cancer Res.*, **54**, 2359-2365.
- Tanaka, T., T. Kojima, T. Kawamori and H. Mori (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protococatechuic acid, *Cancer* **75**, 1433-1439.
- Tanaka, T., T. Kojima, T. Kawamori, A. Wang, M. Suzui, K. Okamoto and H. Mori (1993) Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids, *Carcinogenesis*, **14**, 1321-1325.
- Tanaka, T., T. Kojima, T. Kawamori, N. Yoshimi and H. Mori (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protococatechuic acid in rats, *Cancer Res.*, **53**, 2775-2779.
- Tanaka, T., T. Kojima, Y. Mori and H. Mori (1992) Inhibitory effects of the natural products indole-3-carbinol and sinigrin during initiation and promotion phases of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 835-842.
- Tanaka, T., T. Kojima, M. Suzui and H. Mori (1993) Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protococatechuic acid: suppressing effects on tumor development and biomarkers expression of colon carcinogenesis, *Cancer Res.*, **53**, 3908-3913.
- Tanaka, T., H. Makita, M. Ohnishi, Y. Hirose, A. Wang, H. Mori, K. Satoh, A. Hara and H. Ogawa (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: Comparison with the protective effect of  $\beta$ -carotene, *Cancer Res.*, **54**, 4653-4659.
- Tanaka, T., Y. Mori, Y. Morishita, A. Hara, T. Ohno, T. Kojima and H. Mori (1990) Inhibitory effect of sinigrin and indole-3-carbinol on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats, *Carcinogenesis*, **11**, 1403-1406.
- Tanaka, T., T. Shinoda, N. Yoshimi, K. Niwa, H. Iwata and H. Mori (1989) Inhibitory effect of magnesium hydroxide on methylazoxymethanol acetate-induced large bowel carcinogenesis in F344 rats, *Carcinogenesis*, **10**, 613-616.
- Wang, A., N. Yoshimi, T. Tanaka and H. Mori (1993) Inhibitory effects of magnesium hydroxide on c-myc expression and cell proliferation induced by methylazoxymethanol acetate in rat colon, *Cancer Lett.*, **75**, 73-78.
- Wang, A., N. Yoshimi, T. Tanaka (1994) The inhibitory effect of magnesium hydroxide on the bile acid-induced cell proliferation of colon epithelium in rats with comparison to the actions of calcium lactate, *Carcinogenesis*, **15**, 2661-2663.
- Wattenberg, L. W. (1985) Chemoprevention of cancer, *Cancer Res.*, **45**, 1-8.
- Yoshimi, N., A. Wang, Y. Morishita, T. Tanaka, S. Sugie, K. Kawai, J. Yamahara and H. Mori (1992) Modifying effects of fungal and herb metabolites on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1273-1278.

第23回大会シンポジウム  
「植物成分によるがん予防とそのメカニズム」

緑茶成分による消化器がんの予防

Chemoprevention of gastrointestinal carcinogenesis  
with green tea components

山根哲郎, 松本浩彦, 菊岡範一, 中谷浩久,  
大矢和彦, 高橋俊雄

Tetsuro Yamane, Hirohiko Matsumoto, Norikazu Kikuoka, Hirohisa Nakatani,  
Kazuhiko Oya and Toshio Takahashi

京都府立医科大学・第1外科  
〒602 京都市上京区河原町広小路梶井町 465

First Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine,  
465, Kajii-cyo, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(受付: 1995年3月3日; 受理: 1995年5月31日)

Summary

Polyphenol compounds are present in many plants, especially green tea leaves contain them in large amounts. An experiment on two-stage skin carcinogenesis in mice revealed that (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), one of the main constituents of green tea extract (GTE), inhibited tumor promotion. Furthermore, an epidemiological study showed a lower risk of gastrointestinal cancer among people who consume a large amount of green tea. We assessed the inhibitory effects of green tea polyphenol compounds in the process of gastrointestinal carcinogenesis. GTE or EGCG inhibited ENNG-induced duodenal carcinogenesis, MNNG-induced gastric carcinogenesis and AOM-induced colon carcinogenesis. These differences in the tumor incidence between the control group and GTE or EGCG treatment groups were significant. These inhibitory effects on the carcinogenesis strongly suggest that EGCG and GTE may be useful and effective for preventing experimental gastrointestinal carcinogenesis. We examined the recovery effect of DNA damage with GTE. SD rats were injected DMH subcutaneously, and simultaneous GTE administration decreased the production of 8-hydroxyguanosine. The clinical trials of chemoprevention with GTE are on going. We applied them to 10 patients with esophageal dysplasia and familial adenomatous polyposis (FAP) after subtotal colectomy. In a case of FAP, the endoscopic follow up showed the disappearance of polyps and the decrease of rectal mucosal ODC activity. Green tea is a popular beverage in Japan and this green tea extract is already being used as a food additive. The advantages for cancer chemoprevention with green tea components are as follows, safe with no harmful effect, cheaper and easier for mass production, effective in numerous experimental studies, clear correlation to the epidemiological studies.

Keywords: EGCG, green tea extract, chemoprevention, gastrointestinal cancer, ornithine decarboxylase

1. はじめに

緑茶の成分であるポリフェノール化合物は抗酸

化作用 (Khan *et al.*, 1992), 抗変異原性 (Okuda *et al.*, 1984), 抗腫瘍活性, 抗プロモーション活性な

Table 1. Components of Green Tea Extract

(+)catechin	3.4%
(-)epicatechin	7.0%
(+)gallocatechin	14.8%
(-)epigallocatechin	15.0%
(-)epicatechin gallate	4.6%
(-)gallocatechin gallate	11.6%
(-)epigallocatechin gallate	18.0%
caffeine, sugars, amino acid, minerals and moisture	

どの種々の生理活性を有することが報告されている。また、疫学的に緑茶の愛飲家や緑茶の産地の人々には消化器癌の発生が少ないとの報告 (Kono *et al.*, 1988) がある。ポリフェノール化合物の成分である (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) は DMBA マウス皮膚二段階発癌過程において抗プロモーター作用を有することが報告 (Yoshizawa *et al.*, 1987) されている。一方、緑茶抽出物 (Green tea extract; GTE) はこの EGCG を約 18% 含んでいる。そこでこの GTE や EGCG を用いて、消化器癌に対する発癌抑制実験を行い、さらにこれらの緑茶抽出ポリフェノール化合物による消化器発癌予防の臨床応用の可能性とその問題点について検討した。

## 2. 実験方法と対象

ポリフェノール化合物は多くの植物に含まれているが、とりわけ緑茶の茶葉 (*Camellia sinensis*) には多量に含まれていることが知られている。われわれが今回使用した緑茶抽出物の成分は Table 1 に示すごとくであり、ポリフェノール化合物の

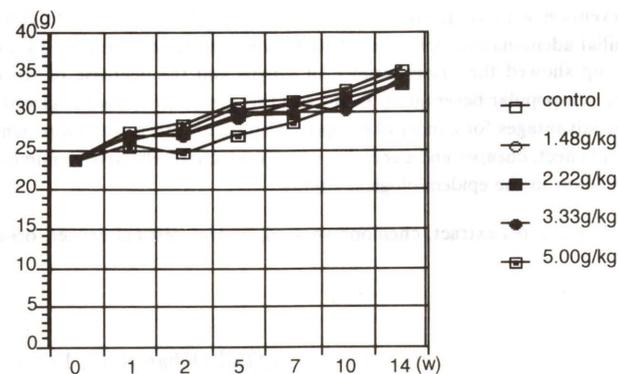


Fig. 1. Weight changes in toxicity test of Green Tea Extract.

他に、カフェイン、アミノ酸などを含む粗抽出物である。この緑茶抽出物は緑茶茶葉より 90°C の熱湯で熱抽出したもので、太陽化学株式会社 (四日市市, 三重県) より供与された。その急性毒性試験において LD50 は 3-5 g/kg と極めて安全であり、変異原性試験 (Ames test) においても S-9 存在下では 0-5000  $\mu$ g/plate の濃度で変異原性を認めず、SD ラットを用いた亜急性試験でも問題なく、毒性試験による体重変化も Fig. 1 に示すごとくであった。また、EGCG は純度 85% で埼玉県立がんセンター研究所の藤木博太先生より供与された。

### (1) 動物実験

ポリフェノール化合物の一種である EGCG や緑茶抽出物を用いて種々の発癌抑制動物実験を行い、その効果を検討し、EGCG や緑茶抽出物の発癌抑制効果の差異について検討した。これらの実験はすべて化学発癌剤の投与終了後に緑茶ポリフェノール化合物や EGCG を投与してその抑制効果を検討し、発癌の抗プロモーション効果を検討した。

**1) EGCG による ENNG マウス十二指腸発癌抑制実験:** C57Bl/6 マウスに *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) を 100 mg/L の濃度で 4 週間経口投与し (Matsuyama *et al.*, 1975), その後、0.005% の濃度で EGCG を経口投与し、実験 16 週目にマウスを犠牲死させ剖検し、十二指腸を実体顕微鏡下に観察し、腫瘍発生率を比較検討した。

### 2) 緑茶抽出物による ENNG マウス十二指腸

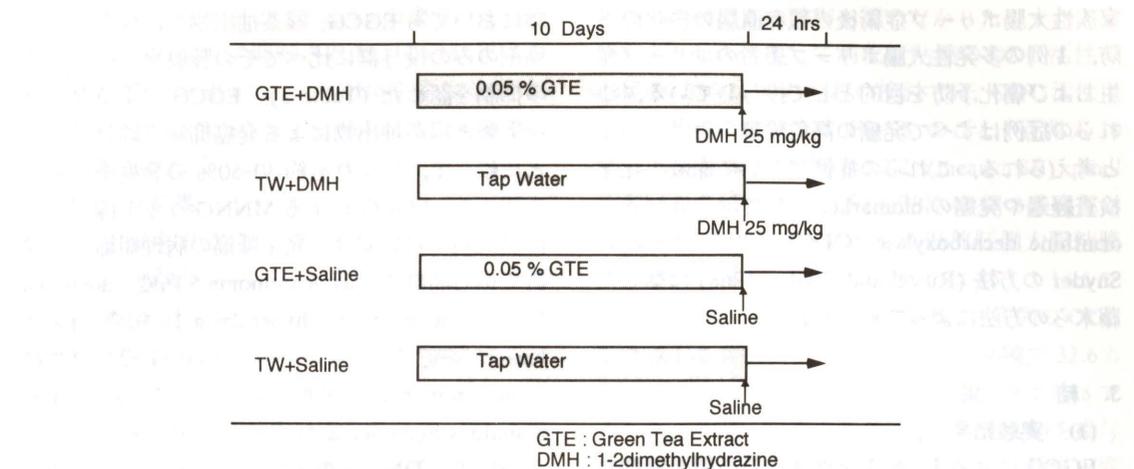


Fig. 2. Experimental schedule of 8-OHdG measurement.

**発癌抑制実験:** 前述と同様の実験系において、C57Bl/6 マウスに *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) を 100 mg/L の濃度で 4 週間経口投与し、その後、0.025% または 0.1% の濃度で緑茶抽出物を経口投与し、実験 16 週目にマウスを犠牲死させ剖検し、十二指腸を実体顕微鏡下に腫瘍発生率を比較検討した。

**3) EGCG による MNNG ラット腺胃発癌抑制実験:** Wistar ラットに *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) を 80 mg/L の濃度で 28 週間経口投与し、その後、0.05% の濃度で EGCG を経口投与し、実験 44 週目にラットを犠牲死させ剖検し、腺胃を観察し、腫瘍発生率を比較検討した。

**4) 緑茶抽出物による AOM ラット大腸発癌抑制実験:** F344 ラットに Azoxymethane (AOM) を 7.4 mg/kg の濃度で週 1 回 10 週間、皮下注射し、11 週目より 0.01% または 0.1% の濃度で緑茶抽出物を経口投与し、実験 26 週目にラットを犠牲死させ剖検し、大腸を観察し、腫瘍発生率を検討した。

**5) DMH ラット大腸発癌における 8-OHdG 産生について:** 緑茶ポリフェノール化合物が抗酸化作用を有することは良く知られている。そこでこの緑茶ポリフェノール化合物が発癌イニシエーションの過程にいかなる影響を示すかについて、DNA 損傷の指標として、大腸粘膜の 8-OHdG の

産生について検討した。SD ラットに 1,2-dimethylhydrazine (DMH) を 25 mg/kg の濃度で皮下注射投与し、24 時間後に大腸を摘出し Marmur の方法 (Marmur, 1961) によって DNA を抽出し、葛西の方法 (Kasai *et al.*, 1986) にて 8-OHdG を測定した (Fig. 2)。また、GTE 群には DMH の投与前 10 日間 0.05% の濃度で自由飲水投与した。

### (2) 臨床対象

この様な多くの動物実験での緑茶抽出ポリフェノール化合物の有効性により、その臨床応用の可能性について検討した。そこでこの緑茶抽出ポリフェノール化合物のカプセルを作成し、これを 1 日 1 g の投与量で、現在までに 10 例に臨床投与している。投与症例は Table 2 に示すごとく 2 例の食道 dysplasia 患者の食道粘膜の癌化予防、7 例の

Table 2. Clinical cases of chemoprevention with GTE

Case	Sex	Age	Disease	Time
1	M	67	Esophageal dysplasia	2Y8M
2	F	30	FAP with colon cancer	1Y5M
3	M	65	Esophageal dysplasia	1Y3M
4	F	35	FAP with colon cancer	10M
5	F	55	multiple colon polyps	10M
6	F	23	FAP without colon cancer	7M
7	M	20	FAP without colon cancer	7M
8	F	32	FAP with colon cancer	5M
9	M	35	FAP with colon cancer	5M
10	M	31	FAP without colon cancer	2M

FAP: Familial Adenomatous Polyposis.

家族性大腸ポリープ症術後の残存直腸の癌化の予防, 1例の多発性大腸ポリープ患者のポリープ発生および癌化予防を目的として投与している。これらの症例はすべて発癌の高危険群の患者であると考えられる。これらの症例において血液生化学検査経過や発癌の biomarker として消化管粘膜の ornithine decarboxylase (ODC) 活性を Russel & Snyder の方法 (Russel and Snyder, 1968) に準じた藤木らの方法によって検討した。

### 3. 結果

#### (1) 実験結果

EGCG による ENNG マウス十二指腸発癌抑制実験 (Fujita *et al.*, 1989), 緑茶抽出物による ENNG マウス十二指腸発癌抑制実験, EGCG による MNNG ラット腺胃発癌抑制実験 (Yamane *et al.*, 1995), 緑茶抽出物による AOM ラット大腸発癌抑制実験 (Yamane *et al.*, 1991) のいずれの実験

においても EGCG, 緑茶抽出物の投与群では発癌剤のみの投与群に比べてその腫瘍発生率に有意の抑制を認めた (Table 3)。EGCG による発癌抑制実験と緑茶抽出物による発癌抑制実験は対照群と比較して, いずれも約 30-50% の発癌率の減少を認めた。EGCG による MNNG ラット腺胃発癌抑制実験においては, 発生腫瘍の病理組織学的検討では対照群で adenocarcinoma 5 病変, adenoma 5 病変, adenomatous hyperplasia 18 病変, papilloma 2 病変であったに比べて EGCG 投与群では adenocarcinoma 2 病変, adenoma 2 病変, adenomatous hyperplasia 11 病変と抑制された。

ついで, DNA 損傷の指標として, 大腸粘膜の 8-OHdG の産生について検討し, 緑茶ポリフェノール化合物投与の影響について検討した (Fig. 3)。DMH (25 mg/kg) 単独投与群では  $3.08 \pm 0.53$  8-OHdG/dG  $\times 10^{-5}$  であったが, GTE 投与群に DMH を投与すると  $2.02 \pm 0.53$  と 8-OHdG の産

Table 3. Summary of experimental studies with EGCG and GTE

Carcinogen	Experiment		Concentration EGCG or GTE	Tumor incidence	
	Animal	Organ		Control	Exp.
ENNG	Mouse	Duodenum	0.025%GTE	85%	58%
ENNG	Mouse	Duodenum	0.1%GTE	85%	42%
ENNG	Mouse	Duodenum	0.005%EGCG	63%	20%
MNNG	Rat	Stomach	0.05%EGCG	62%	31%
AOM	Rat	Colon	0.01%GTE	69%	38%
AOM	Rat	Colon	0.1%GTE	69%	48%

GTE: Green Tea Extract, EGCG: Epigallocatechin gallate.

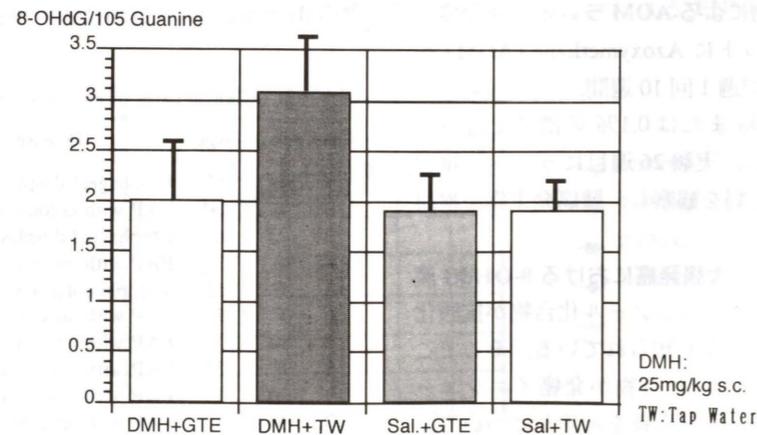


Fig. 3. 8-OHdG levels in colonic mucosa after DMH and GTE administration.

生が抑制され, DMH が 50 mg/kg の濃度においても 8-OHdG の産生は抑制された。この結果より GTE は DNA 損傷による 8-OHdG 産生を抑制し, 発癌イニシエーションの抑制作用を有することが示唆された。

#### (2) 臨床結果

10例の緑茶ポリフェノール化合物の臨床投与症例の投与観察期間は2ヵ月~2年8ヵ月であり, 観察期間中には癌の発生は認めていない。投与期間中の血液生化学検査では血液ヘモグロビン値, 尿素窒素値, 血清コレステロール値, AST (GOT), ALT (GPT) 値の経過をみたが, Fig. 4 のごとく, 鉄の吸収障害による貧血の発生もなく,

肝機能, 腎機能の障害も認めなかった。また, 発癌の biomarker として消化管粘膜の ODC 活性の測定を行った。われわれの検討では, ODC 活性は大腸癌組織においては Fig. 5 のごとく正常人10例の大腸粘膜では  $10.8 \pm 2.2$  (mean  $\pm$  SE) pmol  $\text{CO}_2/\text{hr}/\text{mg}$  protein, 大腸癌患者42例の非癌部口側大腸粘膜では  $20.7 \pm 5.6$ , 非癌部肛側大腸粘膜では  $31.9 \pm 5.1$ , 大腸癌組織では  $85.1 \pm 14.5$  であった。また, 家族性大腸腺腫症9症例の ODC 活性は Fig. 6 のごとく非腫瘍部大腸粘膜で  $32.6 \pm 9.5$ , ポリープ部  $68.5 \pm 13.8$ , 癌部  $67.9 \pm 32.8$  であった。今回, 緑茶ポリフェノール化合物を投与した家族性大腸腺腫症の症例2の ODC 活性の変

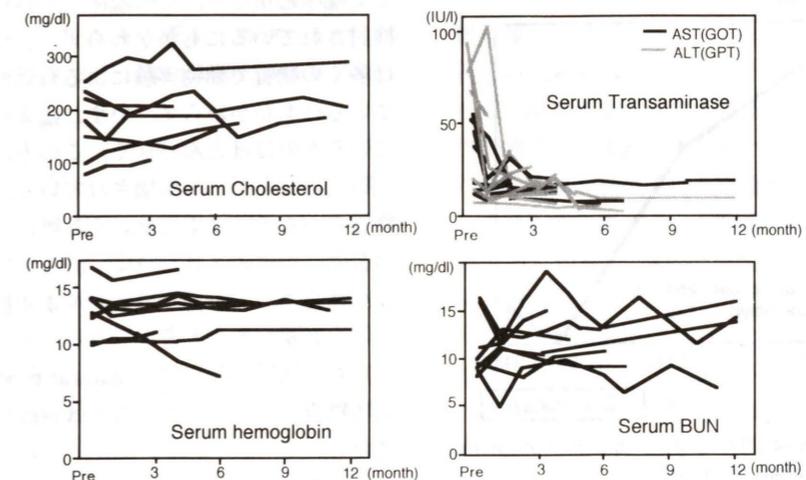


Fig. 4. Laboratory data after GTE administration.

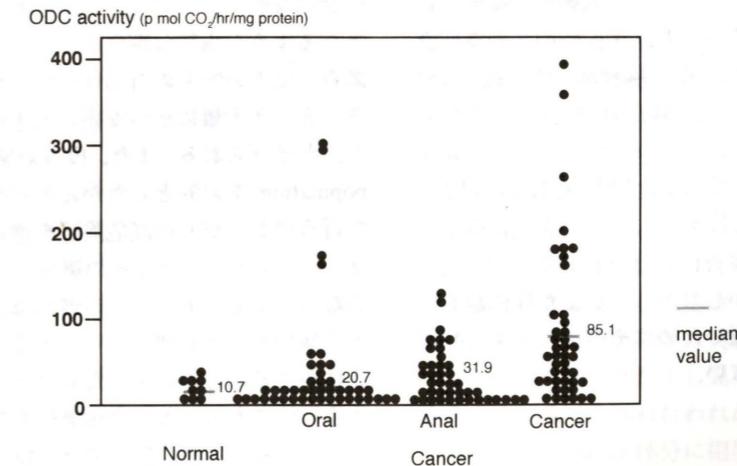


Fig. 5. ODC activity in colorectal cancer.

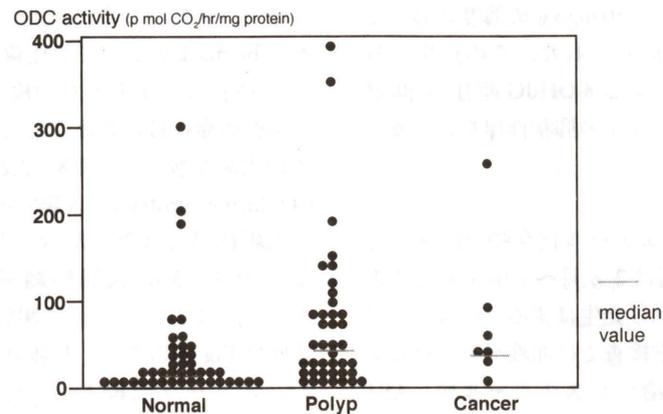


Fig. 6. ODC activity in familial adenomatous polyposis.

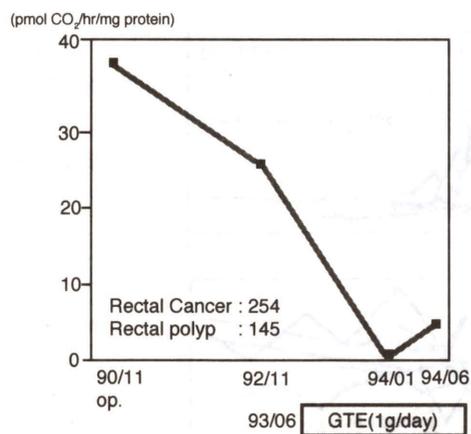


Fig. 7. Change of ODC activity in a case of familial adenomatous polyposis.

動を検討した (Fig. 7). 手術は大腸全摘術を行い、回腸直腸吻合を行った。手術時の非腫瘍部直腸粘膜の ODC 活性は 37、腺腫部 145、癌部 254 であった。術後一年目の残存直腸粘膜の ODC 活性値は 24.4 であった。そこでポリフェノール化合物を 1 g/day にて投与し、投与後 7 ヶ月目と 1 年目の ODC 活性は各々 0.1, 4.3 と著明に低下した。さらに内視鏡検査においてもポリープの完全消失を認めた。しかしながら、いまだ症例数も少なく、投与期間も短いためにその投与効果を判定するには至っていない。

#### 4. 考 察

欧米ではすでに多くの物質が、がんの予防薬と

して臨床応用され、その臨床上的有効性の有無が検討されているにもかかわらず、我が国においては多くの物質で動物実験による有効性が報告されているにもかかわらず、いまだ臨床応用まで至っているものはほとんどなく、この方面における臨床研究の立ち遅れが指摘されている。また、ある物質のがん予防効果を検討する際には、その物質の有効性が確認された時に、直ちに臨床応用が可能な物質であるか否かの検討をまず最初から行う必要があると考えられる。そのような観点からも自然界に存在する natural products をがん予防物質として選定することは意義のあることと考えられる。

これらのがん予防物質を臨床応用する上での問題点を列挙すると次に示すごとくである。①多くの動物実験にて有効性が証明されること、②問題となるような重篤な副作用がないこと、③疫学的調査にてその物質の有効性や関与が証明されていること、④大量にかつ安価に入手可能であるなどの点が挙げられる。また、投与対象として general population を目的としたがんの一次予防を主として行うのか、がんの高危険群を選定してがんの予防を行うかによって、その選択する方法や物質は異なってくるであろう。前者の場合には副作用が全く無いものが必要であり、多くの人々がその恩恵に浴することが出来るためには、大量に安価に入手可能であることが必須条件となるであろう。これらの投与方法に関しては、将来的には機能性食品としての投与方法が考えられる。また近年、欧

米において盛んになっている designer food の概念をがん予防に応用していくことも一つの方法と考えられる。また、後者の高危険群に対しては、いかにして、いかなる高危険群を選定するかが問題となる。

現在では、高危険群を選定したり、その効果を検討し、経過を追って行くための有用な biomarker がほとんどない。われわれは現在がん化学予防の biomarker として ODC 活性の測定を行っているが、これらの結果は大腸癌患者の癌部以外の非腫瘍部においても活性が高く、また、家族性大腸腺腫症患者の非腫瘍部やポリープにおいても高値を示したことより、これらの粘膜が発癌の高危険粘膜であるとも考えられた。さらに ODC 活性は内視鏡検査の際の生検材料より測定することが可能であり有用な biomarker と考えている。

欧米ではすでに、消化器癌に対しては大腸ポリープ、食道粘膜の異型上皮などが発癌の高危険群として、その対象疾患に挙げられ、 $\alpha$  および  $\beta$  カロチン、ビタミン A, B, C, E, 抗炎症剤の Piroxicam, Sulindac などによる発癌予防の臨床応用試験が数多くなされている。これらの一部の物質は他疾患の治療薬として用いられているものもあるが、これらの高危険群に対するがん予防物質においては少しの副作用は許されるべきではないとも考えられる。

われわれが検討したポリフェノール化合物は緑茶より抽出したもので、この緑茶は古来より嗜好飲料として広く東南アジア地域において飲用されてきたものである。がんの臨床予防を行う上では、自然界に存在する物質を応用することはその長期使用による安全性を考えると必須のことである。さらに消化器癌の予防に対するポリフェノール化合物の有用性を見ると、疫学的調査研究にて緑茶の愛飲家に消化器癌の発生が少ないこと、最近ではマウス皮膚発癌 (Mukhtar *et al.*, 1988 and Wang *et al.*, 1992)、マウス大腸発癌 (Narisawa *et al.*, 1993)、マウス肝発癌、マウス自然発症乳癌などの多くの発癌動物実験モデルで、多施設よりポリフェノール化合物の有効性が報告されるようになってきた。また、副作用がほとんど無いこと、

大量に安価に入手可能であることなど、すべての点においてその臨床応用の必要十分条件を満たしている物質である。

緑茶抽出物中には約 85% のポリフェノール化合物が含まれその約 15-18% が EGCG である。しかし、これらの EGCG を純化するためには煩雑で費用がかかる。その臨床応用に際しては、動物実験において用いた緑茶抽出物中の EGCG 濃度が約 15-18% であることより、0.025-0.1% の緑茶抽出物中の EGCG 濃度は約 0.004-0.02% であり、前述の EGCG 投与による抑制実験の 0.005% の EGCG 投与濃度とほぼ一致する濃度であったことより、緑茶の粗抽出物でも同様の効果がみられることが証明された。また、緑茶抽出物は種々のポリフェノール化合物を含んでおりこれらの combination が有効である可能性も示唆される。現在ではこれらの緑茶抽出ポリフェノール化合物を 1 日 1g の投与量で、食道異型上皮患者の食道粘膜の癌化予防や常染色体優性遺伝疾患である家族性大腸ポリープ症術後の残存直腸の癌化の予防に投与し、ODC 活性などの biomarker による検討を行っているが、いまだ症例数も少なく、投与期間も短いためにその効果を判定するには至っていない。

緑茶抽出ポリフェノールは現在、虫歯予防のための食品添加物としてすでに使用されており、毒性実験によってもその安全性が確立されたものである。ポリフェノール化合物は実験的に腸内の嫌気性最近の増殖を抑制し、血清脂質を低下させる働きを有することが報告されている。この作用によって口腔内の虫歯菌を減少させることにより機能性食品として現在、食品中に添加されているものである。また、その投与量については、疫学的調査による緑茶愛飲家が一日約 10 杯以上を飲用することより、0.05-0.1% のポリフェノール投与量がこれに相当する濃度であると考えられ、われわれもこの濃度に準じて実験してきた。しかしながら、これらの抑制効果は実験動物種や標的臓器などにより有効濃度が少し異なるのではないかと考えられる。今回われわれが臨床例に投与している量は緑茶 10-15 杯分に相当する量であり、疫学的調査結果や動物実験結果にもよく相関すると

考えた。しかし、最近では比較的低濃度でもラット大腸発癌を抑制したとの報告 (Narisawa *et al.*, 1993) もあり、さらに詳細にその至適投与量の検討を行う必要があると推察した。これらの緑茶抽出ポリフェノール化合物による発癌抑制の作用機序や代謝経路に関しては、いまだ十分な知見が得られていないことよりさらなる検討が必要と考えられる。また、今後は臨床研究においても、その効果を明確にするために randomized control study が必要と考えた。

### 5. まとめ

以上の結果よりポリフェノール化合物は、①疫学的検討より緑茶愛飲家は癌の低リスク群である、②動物実験による有効性、③副作用がない、④安価で量産が可能である、などのがん予防物質としての必要条件を満している。現在、臨床的に家族性大腸ポリープ症例や食道 dysplasia 症例に対して、がん予防の目的で緑茶抽出物を投与しているが、今後の消化器がん予防の臨床応用についてさらに詳細な臨床検討を加えていく必要があると考えた。

### 謝 辞

本研究は厚生省がん研究助成金ならびに文部省がん重点研究助成金によった。

### 参考文献

Fujita, Y., T. Yamane, M. Tanaka, K. Kuwata, J. Okuzumi, T. Takahashi, H. Fujiki and T. Okuda (1989) Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in mouse duodenum, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 503-505.  
 Kasai, H., P. F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair, *Carcinogenesis*, **7**, 1849-1851.  
 Khan, S. G., S. K. Katiyar, R. Agarwal and H. Mukhtar (1992) Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer

chemoprevention, *Cancer Res.*, **52**, 4050-4052.  
 Kono, S., M. Ikeda, S. Tokudome and M. Kuratsune (1988) A case control study of gastric cancer and diet in northern Kyushu, Japan, *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 1067-1074.  
 Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms, *J. Mol. Biol.*, **3**, 208-218.  
 Matsuyama, M., T. Nakamura, H. Suzuki and T. Nagayo (1975) Morphogenesis of duodenal adenocarcinomas induced by *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in mice and rats, *Gann Monogr. Cancer Res.*, **17**, 269-281.  
 Mukhtar, H., M. Das, W. A. Kahn, Z. Y. Wang, D. P. Bik and D. R. Bickers (1988) Exceptional activities of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene-, benz(*a*)pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice, *Cancer Res.*, **48**, 2361-2365.  
 Narisawa, T. and Y. Fukuura (1993) A very low dose of green tea polyphenols in drinking water prevents *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 1007-1009.  
 Okuda, T., K. Mori and H. Hayatsu (1984) Inhibitory effect of tannins on direct acting mutagens, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3755-3758.  
 Russel, D. H. and S. H. Snyder (1968) Amine synthesis in rapidly growing tissue: Ornithine decarboxylase activity in regenerative rat liver, chick embryo, and various tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 1420-1427.  
 Wang, Z.-Y., M.-T. Huang, T. Ferraro, C.-Q. Wong Y.-R. Lou, K. Reuhl, M. Iatropoulos, C. S. Yang and A. H. Coney (1992) Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice, *Cancer Res.*, **52**, 1162-1170.  
 Yamane, T., N. Hagiwara, M. Tateishi, S. Akachi, M. Kim, J. Okuzumi, Y. Kitao, M. Inagake, K. Kuwata and T. Takahashi (1991) Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats by green tea polyphenol fraction, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1336-1339.  
 Yamane, T., T. Takahashi, K. Kuwata, K. Oya, M. Inagake, Y. Kitao, M. Suganuma and H. Fujiki (1995) Inhibition of MNNG-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach, *Cancer Res.*, **55**, 2081-2084.  
 Yoshizawa, S., T. Horiuchi, H. Fujiki, T. Yoshida, T. Okuda and T. Sugimura (1987) Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of "tannin" in green tea, *Phytotherapy Res.*, **1**, 44-47.

## 第2回アジア学術会議開催される

平成7年3月 日本学術会議広報委員会

今回の日本学術会議だよりでは、新規に学術研究総合調査費などを計上した平成7年度予算及び2月に開催された第2回アジア学術会議の概要についてお知らせします。

### 平成7年度日本学術会議予算

平成7年度政府予算(案)は、平成6年12月25日に閣議決定されましたが、日本学術会議関係の予算決定額は、11億2,339万4千円でした。その概要については次のとおりです。

#### 【主な経費の概要】

##### (1) 学術研究総合調査

15百万円(平成7年度新規)  
 科学研究者の研究環境の改善と研究意欲の向上に関して、国内において意識調査及び実情調査を行う

とともに、外国においても実情調査を行い、結果を整理・分析し、日本学術会議において問題解決のための有効な方策について提言するもの。

##### (2) アジア学術会議の開催

22百万円(昨年度同額)  
 アジア学術会議は、アジア地域の各国を代表する科学者が一堂に会し、アジア地域において学術の果たす役割、学術交流の在り方等について討議することにより、相互理解を深め信頼関係を築くとともに、アジア地域ひいては世界の学術の発展に資するために実施するもの。

平成7年度日本学術会議関係予算決定額表

(単位:千円)

事 項	予算決定額	備 考
日本学術会議の運営に必要な経費	1,123,394	対前年度比 93.5%
1 審 議 関 係 費	292,820	重要課題の特別検討、移転準備委員会、IGBPシンポジウム、公開講演会、学術研究総合調査(新規)等
2 国際学術交流関係費	208,750	
(1) 国際分担金	69,505	
(2) 国際会議国内開催	66,211	7年度開催(神経生理学、健康教育、ロボット、憲法、真空物理学、獣医学の6会議) 8年度開催(理論・応用力学、国際関係、熱帯医学、地域学会、化学熱力学、畜産学の6会議)
(3) 代表派遣	44,006	
(4) 二 国 間 交 流	6,823	
(5) アジア学術会議の開催	22,205	
3 会 員 推 薦 関 係 費	20,000	
4 その他事務費等	601,824	一般事務処理費等

### 第2回アジア学術会議～科学者フォーラム～の概要について

日本学術会議は、アジア地域の各国科学者の代表を東京に招き、本年2月6日(月)から9日(木)までの4日間、三田共用会議所(東京都港区)において第2回アジア学術会議～科学者フォーラム～を開催しました。

会議には、中国、インド、インドネシア、日本、大

韓民国、マレーシア、フィリピン、シンガポール、タイ、ベトナムの10か国の学術推進機関(アカデミー等)から推薦された人文・社会科学系及び自然科学系の科学者20名が出席し(日本からは伊藤正男日本学術会議会長及び利谷信義副会長が出席)、「アジアにおける学術交流のための方策」をメインテーマとして活発な討議を行いました。

初日の6日には、タイのチュラポン王女殿下、イン

ドのメノン博士による特別講演が行われたほか、高岡総理府次長(内閣総理大臣あいさつ代読)、藤田学士院院長をはじめ、国会議員、関係学協会の方々約200名をお迎えし、開会式及び歓迎レセプションが開催されました。

翌7日からは、それぞれの国籍や専門分野を超えて、アジア地域における学術の振興という共通の目的の下、熱心な討議が行われました。

その結果は、次項議長サマリーとして取りまとめられ、9日に無事閉会しました。

開催に当たり御支援、御協力いただきました方々に厚くお礼申し上げます。

### 議長サマリー (要約・仮訳)

#### 第2回アジア学術会議～科学者フォーラム～ 1995年2月6日～9日、東京

1. 第1回アジア学術会議(1993年11月、ACSC)の提案に基づき、第2回アジア学術会議が日本学術会議の主催により、アジアの10カ国から20名の科学者を集めて開催された。参加国として新たにベトナムが加わり、暖かく迎えられた。開会式において、タイ王国のチュラボン王女殿下及びインドのメノン博士による「アジアにおける学術交流のための方策」をテーマとした講演が行われた。また、村山総理大臣及び藤田学士院院長から祝辞が送られた。
2. 前回の議長サマリーの諸原則を議論の出発点とし、最近の科学の動向、21世紀に向けた世界の状況を踏まえ、アジアの科学者の継続的かつ効率的な学術交流のためのテーマを巡って総合的な検討がなされた。
3. 討議の中で、参加者は、経験に基づくユニークで示唆に富むアイデアを紹介し、幅広い観点から意見を交換した。要点は次のとおりである。
  - (1) 科学分野における協力は、人々の「生活の質」の向上だけでなく、アジア地域における「持続可能な発展」も目的としなければならない。
  - (2) 環境破壊、人口爆発等の地球的課題への取組みに際し、人文・社会科学者と自然科学者が密接に協力していくことが重要である。
  - (3) アジア地域においてとりわけ重要な「持続可能な発展」を確保し、国際的な共同研究を促進するために、人材育成が重要である。このための国際協力は、平等互恵の原則の下に推進されなければならない。
  - (4) 化学、農学、医学等の特定の分野において現在行われている、また、将来行われるであろういくつかの試み(「アジア化学推進機構」、「アジア応用システム分析研究所」、「アジア伝統医学推進機構」、「自然災害の緩和のための科学協力」)が地球的課題を解決するための方策として紹介された。また、「共生」という概念に関して議論があった。

4. 参加者はACSCにおける中長期的な研究目標として「持続可能な発展」を取り上げた。このテーマは、さらなる検討を通じて、より扱いやすいサブテーマへと細分化される必要がある。また、21世紀を見据えつつ、アジアの知の伝統を生かし、人文・社会科学及び自然科学の融合を図るという、新たな観点から研究を行っていくことも将来の目標である。

5. これらの問題を議論する場として、ACSCのあり方は大きな関心を集めた。

将来の展開としてACSCを恒久的な組織にすることの可能性についても議論があった。参加者は別紙に示された基本理念、目的及び活動に概ね同意し、各自、持ち帰って関係方面とさらに議論することとなった。

6. ACSCの目標を達成するため、参加者は努力を続けることに同意し、少なくとも新組織が確立するまでの間は日本学術会議によりACSCが毎年開催されること、また、将来的には日本以外でも開催されることが望まれた。なお、日本学術会議が新組織の事務局となり、また、各国は各々の窓口となる機関を決めるべきであるとされた。

#### 新組織について

1. 基本理念
  - a. アジア共通の課題について審議、建議する組織
  - b. アジアの知の伝統を踏まえ、人文・社会・自然科学の融合を図る組織
  - c. アジア域内各国各地域に広く開かれ、他の国際学術団体とも連携を図る組織
2. 目的  
「持続可能な発展」と「生活の質」の向上を目指して国際学術協力を推進するため、人文・社会・自然各分野の科学者が国籍や専門を超えて意見、情報の交換を行う場となること。
3. 活動
  - a. 科学者に関する提案とそのフォローアップ
  - b. 学術情報の収集・解析・普及
  - c. アジアの学術界の連携強化
  - d. 進行中の研究活動の評価・調整
  - e. 総会の開催、シンポジウム・ワークショップの支援

#### 日学双書の刊行案内

日本学術会議主催公開講演会の記録をもとに編集された次の日学双書が刊行されました。

#### 日学双書No.22「尊厳死の在り方」

〔定価〕1,000円(消費税込み、送料240円)

#### ※問い合わせ先

財団法人日本学術協力財団(〒106 港区西麻布3-24-2  
交通安全教育センタービル内 ☎03-3403-9788)

### 戦略研究と高度研究体制の構築を

平成7年5月 日本学術会議広報委員会

今回の日本学術会議だよりでは、4月に開催された第121回日本学術会議総会の概要と総会第二日に行われた会長基調報告の内容に自由討議の議論を踏まえて修正した「我が国の学術体制を巡って」の一部を紹介します。

#### 日本学術会議第121回総会報告

日本学術会議第121回総会は、平成7年4月19日から3日間にわたって開催されました。

総会初日の午前中は、①「阪神・淡路大震災調査特別委員会の設置」、②「国際農業工学会(Commission Internationale de Genie Rural: CIGR)への加入」の2件が提案され、いずれも賛成多数で可決されました。

阪神・淡路大震災調査特別委員会は、平成7年1月17日に発生した阪神・淡路大震災が、日本学術会議として緊急に対応すべき課題であるとの結論に達したため、3月27日の第843回運営審議会において新たな臨時(特別)委員会として設置され、総会で承認することとしたものです。審議事項は、阪神・淡路大震災が提起した問題点について、地震学、災害工学等自然科学分野のみならず、人文・社会科学分野を含め総合的に検討することとしています。

また、国際農業工学会への加入は、従来、日本学術会議が日本の科学者の代表機関として、国際学術連合ICSUを始めとする46の国際学術団体に分担金を支払って加入していますが、今回の新規加入の承認によ

り、その数が47となり、国際農業工学会に対応する国内委員会は、農業土木学研究連絡委員会となります。

総会2日目は、伊藤正男日本学術会議会長から、「日本学術会議の課題～高度研究体制を目指して～」と題した基調報告が行われ、会長が提起したさまざまな課題について、会員間の自由討議が繰り上げられました。

この報告は、昨年(第120回総会)において第16期活動計画を定めてから既に半年を経過しており、この間の多彩な活動を通じて伊藤会長が考えてきた問題、特に、我が国の学術体制の問題を中心に適宜取捨選択したいいくつかの課題について、伊藤会長自身の見解を述べ、人文・社会科学分野から自然科学分野わたる幅広い会員各位の意見を聞き、会員に共通の基本認識を深めることを目的として行われたものです。

なお、伊藤会長が、基調報告の内容に、自由討議の議論を踏まえて修正した「我が国の学術体制を巡って」は、序文の他7項目から構成されていますが、そのうち2項目について紹介します。

#### 我が国の学術体制を巡って(抄)

—戦略研究と高度研究体制—

日本学術会議会長 伊藤 正男

#### 〈「戦略研究」とその意義〉

大学では知的興味に基づく基礎研究を、企業では実用上の重要性を持つ応用研究を、という古典的な役割分担はもはや成り立たなくなっている。最近英米両国で基礎研究と応用研究の間に設けられた「戦略研究」のカテゴリーは、工学、農学、医歯薬学系の研究室では意識しないまま基礎研究として行われてきたものを多く含み、また企業において「目的基礎研究」と呼ばれるカテゴリーとほぼ対応している。研究者の知的興味と実用価値とは一般的に反するが、そのいずれかに限定せず、両方の要素を両立させるカテゴリーである。研究費を受ける側にとっても、出す側にとっても受容しやすい論理を提供し、科学政策上甚だ有効

な整理概念である。(中略)

我が国においては、応用研究に優れる一方、基礎研究は一般に貧弱であり、我が国の応用研究はむしろ国外の基礎研究を基盤とすることが少なくなかった。この点は英国とはちょうど事情が逆であるが、解離した基礎研究と応用研究の間を埋める必要があるのは同様である。この解離の社会的背景にはやはり我が国独自のものがある。我が国の大学においては、研究の自由の主張と産学協同の弊害に対する危惧が強かった一方、企業の方では、我が国の大学の基礎研究にあまり大きな利用価値を見い出さなかったといっは言い過ぎであろうか。率直に言って、今日でも多くの企業家は、大学等で行われる基礎研究に利用価値を認めるのでは

なくて、基礎研究に対する精神的な共感ないし慈善（チャリティ）の気持ちから、人材供給のパイプをつなぐ目的のため、あるいは基礎研究只乗りの非難をかわすために、これを支援する必要があると考えておられるように見受けられるといえは誤解であろうか。企業等から大学への奨学寄付金が平成4年度501億円に及んだのはまことに喜ばしいことであるが、受託研究費が53億円に止まっているのは、依然として企業にそのような潜在意識のあることを示唆するように思えてならない。「戦略研究」の概念は、大学等でこれまで基礎研究として一括されてきたカテゴリーの中で、近い将来に应用される可能性を持つものに特別な照明を当て、その企業との近縁性を意識させる効果がある。また、会社等で使われる基礎研究費は、年間6千50億円にのぼるが、これは実際には大部分が「戦略研究」に向けられていと推測され、ここに大学等の研究者との協力の大きな素地が十分にあることが示唆される。（中略）

「脳の科学と心の問題」特別委員会が4月18日の連合部会で中間報告された問題を例にとると、脳がいかに働いて心を生み出すのかの謎を解くことは、基礎科学の最終問題といってよほど根源的な人間の知的興味の的である。140億といわれる膨大な数の神経細胞の働きがいかにして一つの意識というまとまった働きに統合されるのかは、それ自体極めて深遠な基礎科学の問題である。しかし、脳の研究はその物質的なメカニズムの解明により、脳神経系の病気を根絶し、脳の老化を防ぐといった医療上の大きな「戦略性」を孕んでいる。また、将来脳の情報処理の仕組みが解明されれば、ニューロコンピュータのような新たな原理を持つ情報機械を生み出す工学上の「戦略性」も極めて大きい。さらに、心のレベルについても、育児や教育の参考になり、産業心理学を助け、災害時の特異な心理状態への適切な対処を示唆するなど、人文・社会科学の広い分野での「戦略性」がある。米国の研究者がいち早く議会で働きかけ、1990年に始まる脳の10年Decade of the Brainが決議され、ブッシュ大統領が行政機関に対して脳の研究への支援を要請したのも、これらの戦略性に着目してのことに他ならない。

このように、「戦略性」に注目して強力な研究支援を行うことは、基礎科学としての脳研究にとっても、助けになりこそすれ妨げになるとは思われない。一般的にも「戦略研究」への支援からその基盤である純粋基礎研究への波及効果が期待できるが、ただ、必ずしもそれが望めない分野も少なくない点は注意を要する。研究者の中には、「戦略研究」を重視すると純粋基礎研究が圧迫され、置き去りにされる恐れがあるとして警戒する向きも少なくない。基礎科学の源は人間本来の知的興味にあり、応用とは無縁のところから始まることは確かな事実である。このような知的興味に基づく基礎研究を重視し、支援することが知的な文化的社会にとって有意義であることはもちろんである。あるいは、レーザーの発見のように純粋基礎研究の成果が長い時間の間に周辺技術の進歩により大きな戦略価値を持つようになった事例は数多くあり、基礎研究に潜在

する戦略性を予見することの困難さも指摘される。最近漸く基礎研究への理解を深めてきた我が国の社会に「戦略研究」の概念を持ち込んで、逆効果を招くことは私の本意ではない。私が強調したいのは、我が国においては本来基礎研究が弱体であったのに加えて、「戦略研究」もまた明確に意識されず、大学と企業の間が空白のままに置かれてきたことである。この空白を埋めるために、基本的なコンセプトにまで遡って大学と企業との関係を再構築することの必要性である。

#### 〈我が国に「高度研究体制」を〉

歴史的な変化の時に当たり、学術の格段の推進が待望される今日、世界と我が国の学術体制にまつわる多くの問題を指摘した。我々は、多くの現実的な制約の下、先行きの不透明さに悩みながらも、次の世紀に向けての見通しを明らかにしようと努力しているが、ここにおいて、特に研究者の立場からの発想を基に「高度研究体制」とも呼ぶべき我が国の将来の学術体制を構想することが重要と考える。

この体制を実施するためには、まずともかく大きな研究資金が必要である。ゆっくりながら堅実に改善を図っていく我が国得意のグレードアップ方式では、この競争的な世界の中で生き残ることは難しい。すでにすっかり体制を整え直し、急速に進みだした世界の進度に遅れないようにするだけでも容易ではない。激しい先取権争いから脱落すれば、すぐ遠く置き去りにされてしまう。これまでのように、他国が多大の犠牲を払って開拓した路を安全に辿っていくことはもはやできない。誰にとっても始めてのフロンティアで、世界と互角に公正に競争していかなければならない。これまでのように、最小の投資で最大の効果を挙げることは望むべくもない。最大の効果は最大の投資をするものにしか保証されない。（中略）

このような「高度研究体制」は、前期において日本学術会議が提案した国際貢献のための新システムの構想を包含し、昨年9月我々が採択した第16期活動計画の精神を凝縮して現するものである。恐らくは我が国の研究者の多くが抱えている強い願望の表現であるが、ただの願望ではなく、このようなものがなければ、我々研究者の未来はありえないという厳しく強い要請を含んだものである。研究者本来の自由で創造的な学問的興味を追求しながら、国や社会の強力な要請に応え、深刻な地球規模問題の解決に尽力することを可能にするためには、なくてはならない体制である。

戦後50年間、営々として築いてきた我が国の学術の現状が、このような要請にどのようにに接近し、あるいはどのようににまだ遠いのか、今こそ冷静に分析すべき時である。日本学術会議の審議の中から、この「高度研究体制」のあるべき姿をより具体的に現せば、それは今日我が国の学術体制の現状を映し出し、それがいかに高度とはいいがたい状態にあり、むしろ至る所に危機的な状況が伏在していることを示すだろう。そして今後、我々が努力を結集すべき明確な目標を与えてくれるであろう。

（全文は、日本学術会議月報平成7年5月号参照）

## 日本環境変異原学会会則

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

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

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

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

第5条 会員は毎年会費を納入しなればならない。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)開発研究所
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

「環境変異原研究」に掲載する原著論文を随時受け付けています。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、昨年より原著論文掲載誌の刊行を開始しました。編集委員会では、「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、会員の皆様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・原著は、写真・図表を含めて刷り上がり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。

##### 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 八王子市久保山町2-3  
オリンパス光学工業(株)  
染色体研究センター  
石館 基  
TEL 0426-91-7115  
FAX 0426-91-7662

##### 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、本学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、承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。

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。原稿は著者で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3cm、右5cm、上3cm、下6cm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	㊦
ローマ字つづり	
生年月日、性別	年 月 日 男 女

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

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

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

入会申込書の送付先: 〒158 東京都世田谷区上用賀 1-18-1  
 国立衛生試験所 変異遺伝部 祖父尼俊雄

## 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	④
旧所属	

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

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

## 学物質毒性試験報告 Vol.2

### 賛助会員名簿 (五十音順)

下記の皆様に日本環境変異原学会の賛助会員となって頂き、  
学会活動にご協力頂いております。

- 家田貿易株式会社
- エスピー食品株式会社 中央研究所
- 大塚製薬株式会社 PMS 部
- 株式会社化合物安全性研究所
- 株式会社新日化環境エンジニアリング
- 株式会社ツムラ ツムラ中央研究所
- 株式会社ナード研究所
- 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
- 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 製品総合研究所

※入会費を記入の

〒105 ニュービル3F

TEL 03-3503-0729

FAX 03-3503-0729

# 化学物質毒性試験報告 Vol.2

監修：厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室

化学物質の安全対策については、近年国際的にも急速に関心が高まっており、1992年にリオデジャネイロで開催された国連環境開発会議(地球サミット)においても21世紀に向けての行動計画(アジェンダ21)の中に有害化学物質対策が盛り込まれています。さらに、1994年4月には、ストックホルムにおいて化学物質の安全性に関する国際会議が開催され、行動計画の国際的な推進体制が整備されたところです。我が国は、化学物質の主要な生産・消費国の一つとして、こうした国際的な取り組みに対して積極的に貢献しており、その一環として平成3年度から高生産量既存化学物質の安全性点検を各国と分担・協力して進めています。

本書は、我が国が実施した既存化学物質の毒性試験の報告を各年度ごとにまとめたもので、Vol.1(18物質収載)、Vol.2(20物質収載)に引き続き、Vol.10まで順次刊行の予定です。

- 掲載試験** a. 単回投与毒性試験 c. 簡易生殖毒性試験 e. 復帰変異試験  
b. 28日間反復投与毒性試験 d. 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 f. 染色体異常試験

○は掲載されている試験

CAS No.	物質名	a	b	c	d	e	f	主な用途
105-05-5	1,4-ジエチルベンゼン	○			○	○	○	溶 剤
107-66-4	リン酸ジブチル	○			○	○	○	可 塑 剤
108-44-1	m-トルイジン				○		○	農薬・染料中間体
109-69-3	1-クロロブタン				○	○	○	溶 剤
623-91-6	フマル酸ジエチル	○			○	○	○	可 塑 剤
2581-34-2	3-メチル-4-ニトロフェノール				○	○	○	農薬中間体
4461-52-3	メキシメタノール	○			○	○	○	コーティング溶剤
5281-04-9	D & C Red No.7					○	○	食用色素
6846-50-0	2,2,4-トリメチル-1,3-ペンタンジオールジイソブチレート					○	○	樹脂添加剤
24800-44-0	トリプロピレングリコール	○				○	○	溶 剤
26444-49-5	リン酸ジフェニルクレジル					○	○	難燃剤
86-87-3	1-ナフチル酢酸			○			○	植物成長調整剤
99-71-8	4-(1-メチルプロピル)フェノール			○			○	樹脂中間体
106-37-6	1,4-ジプロモベンゼン			○			○	薫蒸剤
121-47-1	3-アミノベンゼンスルホン酸	○	○			○	○	染色中間体
526-78-3	2,3-ジプロモコハク酸	○	○				○	薬品原料
1806-54-8	リン酸トリス(2-エチルヘキシル)	○	○				○	難燃剤
7756-94-7	トリイソブチレン	○	○			○	○	酸化防止剤原料
14832-14-5	ピグメントグリーン No.7	○	○			○	○	塗料用顔料
26967-76-0	リン酸トリス(p-クメニル)	○	○			○	○	難燃性可塑剤

- 特 徴** ■厚生省監修による初の本格的毒性試験報告書  
■OECD試験法等による試験  
■英文要約付き

- 資 料** A. 報告の中で使用した試験方法  
B. 化審法体系図  
C. 化審法規制化学物質一覧(第一種、第二種特定化学物質、指定化学物質)  
D. The International Conference on Chemical Safety (Final Report) (1994年4月、ストックホルム)  
E. OECD高生産量既存化学物質点検による点検実施物質一覧

**価 格** 20,000円(送料別)

◆ご購入、お問い合わせ、お申し込みは、郵便かFAXで会社名・ご住所・TEL・担当者氏名・購入部数を記入の上、下記へお送りください。

**化学物質点検推進委員会**

〒105 東京都港区西新橋1丁目7番14号 ニュービル3F  
TEL. 03-3503-9277 FAX. 03-3503-0729  
事務局長：西村 昭二

新製品

オリエンタルの変異原性試験用試薬

# S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に！ より手頃な価格に！

特  
徴

- エームテスト用と染色体異常試験用の2種類の試薬セットです。
- コファクターが無菌凍結品になり、解凍後S-9と混合するだけで使用できます。
- S-9とコファクターは実用的な分注量比ですから、混合が容易です。
- S-9とコファクターは未混合ですから、混合条件を変更しての試験が可能です。また、保存中にS-9とコファクターの未知の反応が起こりません。
- セット販売ですから、購入と在庫管理が便利です。
- 包装単位を少量化し、より手頃な価格に致しました。

製品名	包装単位		備考
エームテスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 コファクターA	1ml×10本 9ml×10本	エームテストでのデータを添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 コファクターC	2ml×3本 4.7ml×3本	染色体異常試験でのデータを添付します

(保存は-80℃でお願い致します)

- エームテスト用コファクターA(注分量100ml以上)および染色体異常試験用コファクターC(注分量30ml以上)の単品注文もお受け致します。
- 従来品は引き続き取扱いしております。

変異原性試験用 S-9 (無菌凍結品)	2ml×10本
エームテスト用 コファクターI (凍結乾燥品)	9ml用粉末×10本

誘導法の変更や、サル、イヌなどラット以外のS-9またはマイクロソームの調製、その他、技術的なお問合わせは、弊社バイオ部までお願い致します。

製造元

 **オリエンタル酵母工業株式会社**

バイオ部

〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目8番3号  
(日本橋東硝ビル)

Tel.(03)3663-8210

Fax.(03)3663-8230

販売元

 **和光純薬工業株式会社**

本社 〒541 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
電話 (06)203-3741(代表)

東京支店 〒103 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号  
電話 (03)3270-8571(代表)

 Wako

凍結コファクター誕生！S-9とセット販売  
溶解いらず、ろ過いらず

## S-9/コファクターセット

特長

- 解凍後、すぐ使用可
- 混合が容易
- エームテスト用、染色体異常試験用  
2種類用意

組成

(1バイアル中)

エームス試験用コファクター		染色体異常試験用コファクター	
MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	16.3mg	MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	4.8mg
KCl	24.6mg	KCl	11.6mg
G-6-P	17.0mg	G-6-P	8.0mg
NADPH	36.2mg	NADP	15.7mg
NADH	30.5mg	HEPES	4.5mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	119.6mg		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	24.7mg		

308-51301	-80℃	S-9/コファクターAセット(エームテスト用)	S-9 コファクターA	1ml×10 9ml×10
305-51311	-80℃	S-9/コファクターCセット(染色体異常試験用)	S-9 コファクターC	2ml×3 4.7ml×3

【関連試薬・器材】

636-00221	-70℃	S-9(無菌凍結品)	2ml×10
309-50611	②	コファクターI(凍結乾燥品)	10ml用粉末×10
301-02681		テスメディア® AN	10枚×10
297-03251		ペトリ皿(γ線照射滅菌済) 内径86mm 高さ15mm	10枚×20
291-03651		" 内径86mm 高さ20mm	10枚×20

ポジティブコントロール、変異原性化合物各種取り揃えております。

\* 資料をご請求下さい。

**和光純薬工業株式会社**

本社 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
〒541 電話 大阪(06)203-3741(代表)  
東京支店 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号  
〒103 電話 東京(03)3270-8571(代表)  
出張所 福岡・広島・名古屋・横浜・大宮・筑波・仙台・札幌

# エームテストシステム 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。

被験物質の名称：TEST

代謝活性 化系の 有無	被験物質濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	復帰変異数 (コロニ-)		
		塩基対置換型		
		TA100	TA1535	WP2uvrA
S9Mix (-)	150	158	149	147
	155	155	153	152
	162	162		
	170	170		
	182	182		
	188	188		
	193	193		
	197	197		
	208	208		
	225	225		
S9Mix (+)	156	35 36 (36)	112	1
	28	28		
	313	29 (29)		
	29	29 (29)		
	625	30 31 (31)		
	1250	31 31 ( )		
	2500	31 31 ( )		
	5000	9*		
	9*	9*		
	9*	9*		
陽性を必要とするもの	名称	AF-2		
	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	0.0		
	コロニ-数/プレート	43		
	コロニ-数/プレート	43		
対S9Mixを必要とするもの	名称	2AA		
	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	1.0		
	コロニ-数/プレート	15		
	コロニ-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。数値の右の#印は、菌の沈澱が認められたものです。

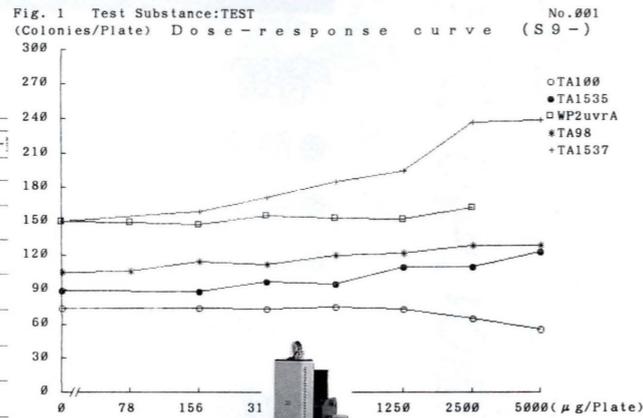
- 不透明な培地、色のついた培地上のコロニー計測
- 粉・異物・トナー・インク・カーボン等混在コロニー計測
- 自由に倍率を変えての拡大計測
- 計測データの自動補正
- 豊富なソフトウェア
- 背景データの検索プログラム
- 生育阻害編集機能
- 一太郎、ロータス1-2-3対応

\* 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

**SSS** 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 1 2 5 3 - 1 6  
TEL 0 4 2 5 (52) 5 9 5 6 (代表)



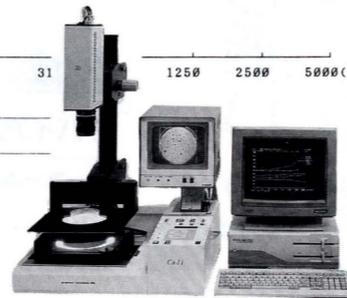
CA-7AII

- 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・正式法のカ値計算



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



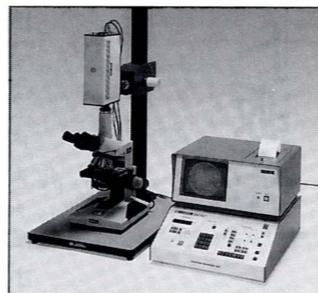
CA-11S

- 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-7MI グレイン計測システム



CA-7MI

# 96穴マイクロタイター方式による 遺伝毒性解析システム

〈研究用〉



# GEN-TOX

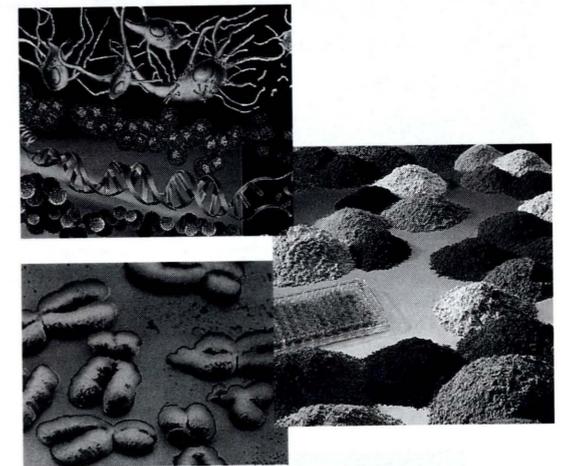
## Ames II Assay

従来のAmes試験を改良したもので、塩基対置換型の突然変異原性物質を検出

シーケンシングをせずに、置換した塩基の種類も同定できます。

## E.coli Trp Assay

サルモネラ菌を用いるAmes試験では、検出できない突然変異原性物質を、このE.coli 菌を用いたシステムでさらにチェック



## Yeast Del Assay

Saccharomyces cerevisiaeを用いたゲノム再配列を誘起する物質の検出

遺伝毒性物質の検出が、  
広範囲、簡便、高感度に!!

\* 付属のソフトにより、データ解析も総合的に行えます。

フナコシのライフサイエンス研究用試薬と機器

日本総代理店

**フナコシ株式会社**

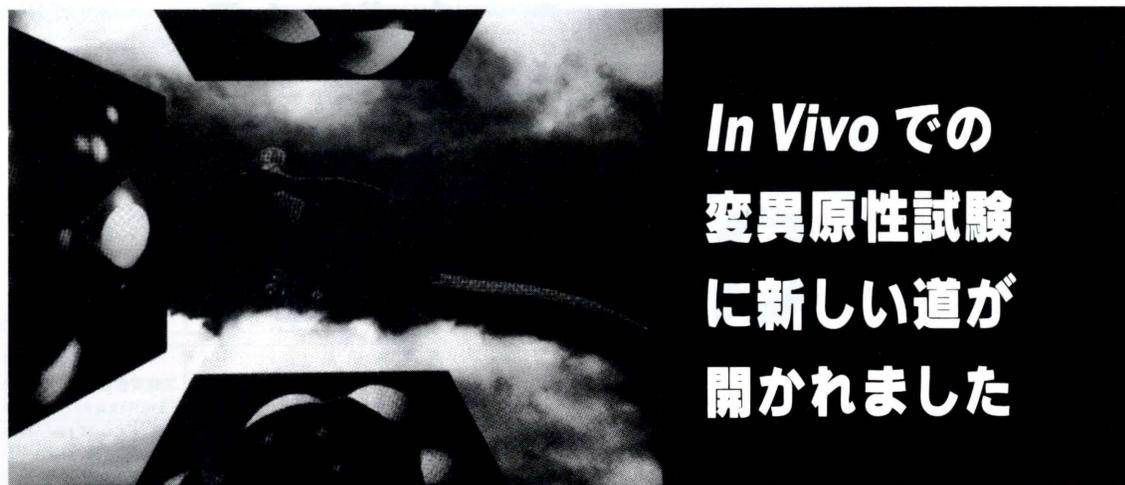
〒113 東京都文京区本郷2丁目9番7号 ユピテル・ユニビルディング

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



## In Vivo での 変異原性試験 に新しい道が 開かれました

**Big Blue™ : 遺伝子導入  
マウス変異原性試験\***

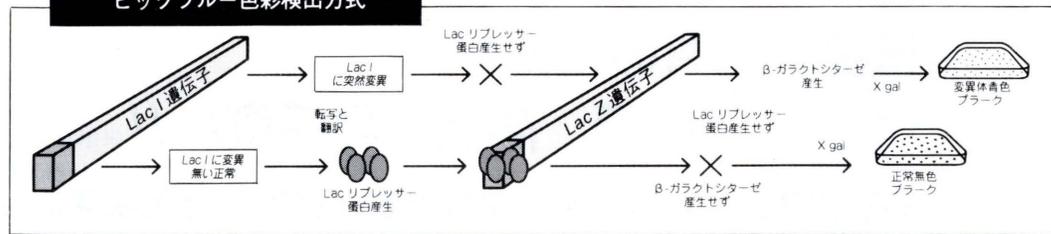
**世界で唯一 In Vivo 内で  
完全かつ短期間又、特定の  
組織を対象とする事が  
できる変異原性試験です**

- ・ビッグブルー：遺伝子導入マウス  
近交系 C57BL/6 及びハイブリッド B6C3F1
- ・Sequence 分析によって、容易な変異解析
- ・簡便な変異体検出
- ・アメリカ、ヨーロッパにおける無料ワークショップ
- ・強力な技術サポート
- ・現在米国政府監督機関が評価を実施中
- ・生殖細胞を含むすべての組織の変異が同定可能
- ・経済効率が良い

以前は、In Vivo 内で測定できなかった特定の組織における突然変異の貴重で重要なデータが測定可能になりました。ビッグブルーマウスの全細胞内には、Lac I 標的遺伝子を含むラムダシャトルベクターが多数組み込まれています。どの様な経路によって投与されたテストコンパウンドでもこれらの標的遺伝子を含むシャトルベクターは Lambda phage particle にパッケージングする事により、容易にすばやくゲノム DNA から回収する事ができます。大腸菌に感染させると、Lac I 遺伝子内における突然変異は、下記の様にして

検出できます。変異体頻度は、正常な無色ブランクと変異体の青色ブランクの数の比率により確定できます。Lac I を標的遺伝子として選んだのは、多くの変異 end-point に対し高い感受性、簡単な検出方法、そして In Vitro の変異原性のデータと比較ができるということです。弊社 (STRATAGENE) 製品の完全なシステム、使用についての御案内、無料ワークショップの日程また御社に代わり研究を実施することが出来る提携受託試験機関を紹介することもできますので併せてお問い合わせ下さい。

### ビッグブルー色彩検出方式



\*特許出願中

## STRATAGENE (ストラタジーン)

本社、米国：  
電話オーダー：(800) 424-5444  
ファックス：(619) 535-0034  
テレックス：9103809841  
技術サービス：(800) 424-5444

ドイツ：  
電話：(06221) 400634  
ファックス：(06221) 400639

イギリス：  
電話：(0223) 420955  
ファックス：(0223) 420234  
テレックス：81417 INNCENG

フランス：  
電話：(0590) 7236  
ファックス：(1) 44281900

スイス：  
電話：(01) 3641106  
ファックス：(01) 3657707

お問合せ先：加商 (株) ライフサイエンスグループ 電話：東京 03-3276-7696・ファックス：03-3276-7626

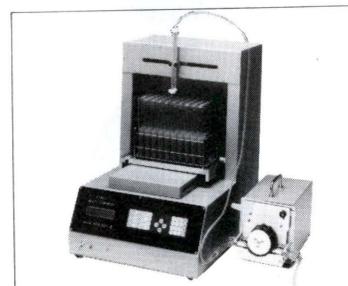
# 全自動培地作成システム

FULLY AUTOMATED MEDIA PREPARATION SYSTEM



**新製品全自動培地作成システムは、自動培地分注装置APS450と  
新型培地滅菌保温器S9000で構成され、いかなる要求にも十分に適  
用できるシステムを初めて市場に出ました。**

※従来のようにユニット別の機種もあります!!



マルチ試験管自動分注装置



ピペットボーイアキュ



コロニーカウンタ MC-707P



フランス・AES Laboratoire 総代理店

株式会社 東京エム・アイ商会

〒104 東京都中央区新川2-7-1  
TEL.(03)3551-7873(代) FAX.(03)3551-7318

# 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。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本詰 ●特注品、S-9に関して詰容量は4.5mlまでお受けいたします。

### ●活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

分画	測定データ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
ミクロソーム (105,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量

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入りしており、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入りしており、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

## BIOSCOOP<sup>®</sup> DNA損傷画像解析システム

**測定内容**

- Tail Length
- Shape Factor
- Nuclear Diameter
- Tail Intensity
- DNA Migration
- Ratio
- Tail Moment
- 統計データ

**システム構成**

高感度カメラ  
蛍光顕微鏡  
画像処理装置  
専用ソフトウェア  
ホストPC PC-98シリーズ  
TVモニタ

《画像解析装置》と《SCG ASSAY専用ソフトウェア》により各種測定が同時に行えるシステムです。

---

## NEW VISION COLOR フルカラー画像解析装置

**特徴**

- フルカラー対応
- ルックアップテーブル内蔵
- PLL回路内蔵

**応用**

- 染色細胞解析
- 脳細胞解析
- 各種特徴値計測

開発製造元  
(社)日本システムハウス協会会員

**ImageTech<sup>®</sup>**

ケイオー電子工業株式会社  
〒567 大阪府茨木市舟木町5番12号 TEL 0726-34-1022  
FAX 0726-34-1018

《NEW VISION COLOR》は、ホストコンピュータにPC-98シリーズを使用し、低価格でカラー画像解析が行えます。

### 複写される方に

本誌(書)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委託をう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  
〒107 東京都港区赤坂 9-6-41  
社団法人 日本工学会内  
Phone: 03-3475-4621  
Fax : 03-3403-1738

---

### 編集委員

---

委員長	石館 基
委員	菊川 清見 太田 敏博 後藤 純雄 澁谷 徹 鈴木 潤三 下位香代子

---

環境変異原研究 第17巻 第1号 1995年

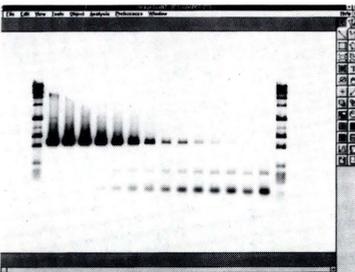
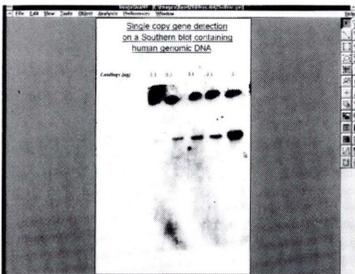
平成7年7月15日 印刷  
平成7年7月20日 発行

発行者 日本環境変異原学会  
発行責任者 祖父尼俊雄  
印刷所 三造写真工業株式会社



Non-RI! 新世代蛍光イメージアナライザー

# FluorImager™



アクリルアミドゲル、アガロースゲル、メンブレン、TLCプレート、マイクロタイプレート等を用いて、蛍光標識及び蛍光染色されたタンパク質や核酸の検出をRIと同程度の感度で簡単に解析できます。

## 試薬キット

### Random Prime Labelling and Signal Amplification Kit

Southern Blotting/Northern Blotting/Dot and Slot Blots/  
DNA Fingerprinting/Colony and plaque lifts

### 3'-Oligolabelling and Signal Amplification Kit

Southern and Northern Blots/Colony and plaque Screening/Dot Blots

### 5'-Oligolabelling Kit

In-gel PCR Product Analysis/Gel Shift Assays

### Western Blotting Kit

Western Blots/Quantification of Western Blots

## 解析ソフトウェア

- ImageQuaNT (定量解析ソフト)
- Fragment Analysis (定性解析ソフト)
- DNA Scan (オートマッチングDNAシーケンスソフト)
- Phoretix 2-D (2-D マッチングソフト)
- DNA Quantitation Software
- Kinase Assay Software
- CAT Assay Software
- Genetic Typing Software

※デモンストレーションご希望の方はご連絡下さい。

日本総発売元

**モレキュラー ダイナミクス ジャパン 株式会社**

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