

# 環境変異原研究

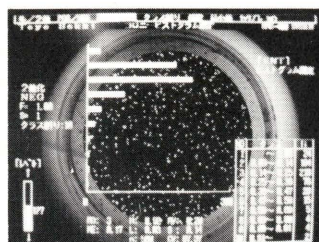
Environmental  
Mutagen  
Research  
Communications

Vol.17 No.2 1995

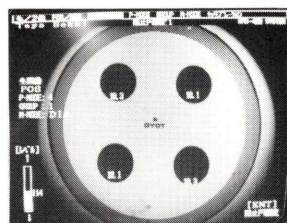
# バイオ・マルチスキャナー BMS-400

- 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)

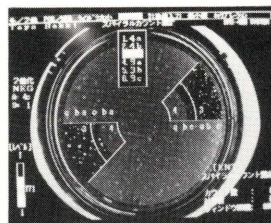
東洋測器のこの1台がすべてを瞬時測定



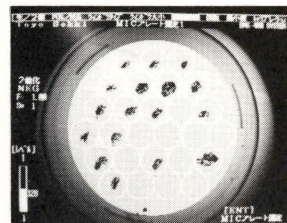
コロニーサイズ別ヒストグラム表示



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。

## 環境変異原研究

## Environmental Mutagen Research Communications

Volume 17, Number 2 1995

## 目次

### 総説

- 薬用人参の抗腫瘍活性 朱 錦華, 竹下達也, 森本兼曇…… 143
- T細胞抗原受容体遺伝子を指標とするヒト体細胞突然変異アッセイ系と  
そのバイオドシメトリーへの応用 京泉誠之, 梅本繁子, 秋山實利…… 151

### 一般論文

- 水道水中有機塩素化合物のヒト細胞に対するDNA損傷性の評価  
川西優喜, 松田知成, 八木孝司, 武部 啓, 松井三郎…… 161
- 屋内プール水の変異原性 斎藤治子, 磯田信一, 加藤美津子, 長岡 登…… 169
- 「ヒトし尿の生物処理水中に存在する Trp-P-2 の同定と評価」  
小野芳朗, 毛利紫乃, 宗宮 功, 小田美光…… 179

### 短報

- 5-Diazouracil および 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium 塩のマウス末梢血における  
小核誘発作用の vitamin E 欠乏による増強 加藤哲太, 日景しをり, 菊川清見…… 187

### 論説

- 都市ごみ焼却排ガスの変異原性 吉野秀吉, 浦野紘平…… 191
- エリスロポエチンによる小核赤血球の誘発 繁田晴美, 矢嶋信浩…… 203

### 資料・情報

- 小核の動原体染色法について 小田切陽一, 内田博之…… 217
- 「In Vitro 染色体異常試験」検討会 …… 223

日本学術会議だより (No. 38) …… 231

### 付記

- 日本環境変異原学会 会則…… 233
- “ 平成6~7年 役員名簿 …… 234
- “ “ 評議員名簿 …… 235

環境変異原研究 投稿規定	236
“ 執筆規定	237
日本環境変異原学会入会申込書	238
住所・所属等変更届	240
賛助会員	241
広告	242

## お詫びと訂正

Vol. 17, No. 2,  
p. 143 2行目の英文タイトル

誤: Amti-tumorigenic 正: Anti-tumorigenic

## 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  
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  
ショーシン EM 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)  
和光純薬工業株式会社 (表 4)  
(50 音順)

## 薬用人参の抗腫瘍活性

### Amti-tumorigenic activities of *Panax ginseng*

朱 錦華, 竹下達也, 森本兼曩

Jin Hua Zhu, Tatsuya Takeshita and Kanehisa Morimoto

大阪大学医学部 環境医学教室  
565 大阪府吹田市山田丘 2-2

Department of Hygiene and Preventive Medicine, Osaka University, School of Medicine,  
2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565, Japan

(受付: 1994 年 12 月 7 日; 受理: 1995 年 6 月 2 日)

## Summary

*Panax ginseng* is widely used as a tonic in many oriental countries, such as China, Japan and Korea. For more than 2000 years, ginseng was believed to be effective in maintaining general health and facilitating recovery after surgery or severe illness. Recent *in vivo* and *in vitro* studies have also revealed therapeutic effects of ginseng in the prevention and treatment of cancer. *Panax ginseng* can increase appetite in cancer patients, to provide necessary nutrition for fighting the disease. It potentiates immunological activity during pre- and post-surgical periods in cancer patients, and prohibits the recurrence of disease. In addition, it serves as a facilitator to speed up the recovery process of bone marrow damaged due to radiation injury. Ginseng was found to be an effective growth suppressor of various tumor cells and an inducer of reverse transformation of Morris hepatoma cells and B16 melanoma cells. Animal experiments demonstrate that ginseng can potentiate therapeutic activity in chemotherapy. Mitomycin C combined with 70% methanolic extracts from ginseng showed strong anti-tumor effects. Further research on ginseng's anti-mutagenic or anti-carcinogenic effects is needed.

**Keywords:** *Panax ginseng*, ginsenoside, saponin, anti-tumorigenicity

## 1. はじめに

日本は現在平均寿命が、男性 76.25 歳、女性 82.51 歳 (厚生省 93 年簡易生命表による) と、日本は男女そろって世界最高水準の長寿国となった。高齢化社会へと構造を変えようとしているが健康で長生きすることはいつの時代でも誰もが求め願うものである。医学が毎年進歩しているとはいえ、がんは、死亡原因の第一位であり、死亡総数に占める割合は平成 3 年に 27.0% で年々増加しつつある。がんは難治性疾患であり、その治療の困難さは、第一に診断が大変遅れることにある。第二に病状が複雑で治療上がん細胞を殺せば正常細胞をも傷害する可能性が高く副作用を免か

れないことにある。一方薬用人参は 2000 年以上前から万病通治の漢方薬として中国や韓国はもとより、日本においても不老長寿の霊薬といわれ、珍重され、広く使われてきた。薬用人参の抗腫瘍活性も報告されており、いくつかの挑戦が行なわれている。

## 2. 薬用人参について

薬用人参はウコギ科 (Araliaceae) の宿根草、オタネニンジン *Panax ginseng* C. A. Meyer の根である。お湯で浸した後、軽く乾燥させたものを「白参」という。熟蒸した後晒して、乾かし、あるいは火で乾燥したものを「紅参」と呼ぶ。化学分析

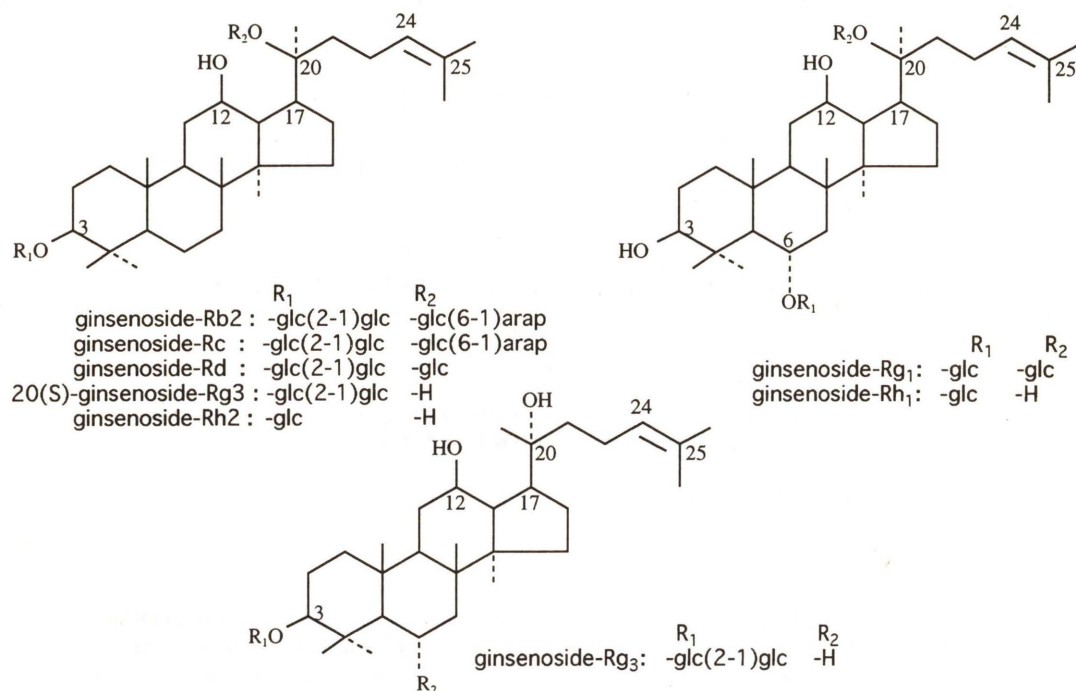


Fig. 1. The chemical structure of saponins derived from ginseng.  
glc:  $\beta$ -D-glucopyranosyl, arap: -L-arabinopyranosyl.

によれば、人参はサポニンに属する ginsenosides (Fig. 1), 単糖類, 人参酸, 多種のビタミン, 多種のアミノ酸, コリン酵素などを含有する (中国甘肅省新医薬研究所 1987)。

### 3. 薬用人参の宿主生体への作用

薬用人参の抗腫瘍活性作用は宿主生体への作用とがん細胞自体への作用など多面的に検討されている。薬用人参は多彩な生物活性を通して担癌患者の新陳代謝を促進し全身状態の改善とともに抵抗力を高めるといわれている (Brekman and Dardymov, 1960; Yamaguchi *et al.*, 1985; Odashima *et al.*, 1985)。すなわち、薬用人参は生体反応修飾物質 (Biological Response Modifier) (徳永, 1994) のような宿主介在性の抗腫瘍活性がある。

#### (1) 薬用人参の食欲ならびに栄養状態の改善効果

山本ら (1989) は、悪性疾患術後患者 113 例に対して紅参末 (6 g/day) を 2 週間以上投与した。

113 例中 24 例は投与前から食欲は良好であり、残り 89 例が投与前に食欲不振を訴えていた。この 89 例のうち 68 例 (77.5%) に食欲改善を認め、食欲が低下したのはわずか 7 例 (7.9%) であった。他覚所見として体重、血清アルブミン値、血清コリンステラーゼ値などはいずれも投与前に比べて投与後に有意な改善効果を認めている。さらに細胞性免疫の指標となるツベルクリン (purified protein derivative of tuberculin, PPD) 反応については、25 症例の測定値が投与前  $11.4 \pm 10.9$  mm, 投与後  $15.7 \pm 15.1$  mm であり、有意差はないが改善の傾向を認めている (Table 1)。

#### (2) 薬用人参の術前投与と術後生体免疫能低下防止効果

一般に開腹手術などの大手術を受けた後にはその生体の免疫能は一過性に低下することはよく知られており、この免疫能の低下ががんの進展、再発などを助長するといわれている。

山本ら (1989) は消化器がん手術後早期に起

Table 1. The effects of KG on the nutritional state.

	Before administration of KG <sup>a</sup>	After administration of KG	<i>p</i>
BW <sup>b</sup> (kg) <i>n</i> = 110	46.4 $\pm$ 7.6	47.0 $\pm$ 7.8	<i>p</i> < 0.01
Albumin (g/dl) <i>n</i> = 116	4.1 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 0.6	<i>p</i> < 0.01
Ch.E. <sup>c</sup> (I.U./l) <i>n</i> = 113	930 $\pm$ 302	1064 $\pm$ 326	<i>p</i> < 0.01
PPD <sup>d</sup> (mm) <i>n</i> = 25	11.4 $\pm$ 10.9	15.7 $\pm$ 15.1	

<sup>a</sup> Korean Red Ginseng Powder.

<sup>b</sup> Body Weight.

<sup>c</sup> Serum Cholinesterase.

<sup>d</sup> Purified protein derivative of tuberculin.

Table 2. The effects of Red Ginseng administered before operation on the post operation immunological activities.

		Before administration	Two weeks after operation	<i>p</i> -value
PPD <sup>a</sup> (mm)	KGC-P <sup>f</sup> ( <i>n</i> = 11)	18.0 $\pm$ 13.6	10.9 $\pm$ 14.0	< 0.01
	KGC <sup>g</sup> ( <i>n</i> = 10)	13.3 $\pm$ 6.5	25.0 $\pm$ 15.0	< 0.01
Su-PS <sup>b</sup> (mm)	KGC-P ( <i>n</i> = 4)	14.5 $\pm$ 1.0	8.3 $\pm$ 4.7	
	KGC ( <i>n</i> = 5)	9.6 $\pm$ 4.7	9.8 $\pm$ 4.0	
NK activity <sup>c</sup> (%)	KGC-P ( <i>n</i> = 11)	33.5 $\pm$ 13.5	18.2 $\pm$ 8.3	< 0.05
(18-40) <sup>d</sup>	KGC ( <i>n</i> = 10)	28.0 $\pm$ 14.5	26.7 $\pm$ 6.5	< 0.05
ADCC activity <sup>e</sup> (%)	KGC-P ( <i>n</i> = 9)	64.0 $\pm$ 8.2	55.6 $\pm$ 9.4	
(41-72) <sup>d</sup>	KGC ( <i>n</i> = 9)	65.4 $\pm$ 5.7	62.6 $\pm$ 13.0	

<sup>a</sup> Purified protein derivative of tuberculin.

<sup>b</sup> Subpopulation.

<sup>c</sup> Natural Killer cell activity.

<sup>d</sup> The normal range.

<sup>e</sup> Antibody-dependent cellular cytotoxicity.

<sup>f</sup> The placebo treatment group.

<sup>g</sup> The Red Ginseng treatment group

こって来る免疫能の低下防止を期待して紅参の術前投与による効果を検討した。対象症例は胃がん患者の治療切除術を施行した 21 症例であり、その結果は Table 2 に示したように、紅参投与によりツベルクリン反応の低下および natural killer (NK) 活性の低下が有意に抑制された。また Killer 細胞活性の指標となる Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 活性については有意差は見られなかったが、低下の程度が対照群に比べて軽度であった。以上の成績を総合すると、紅参には Biological Response Modifier としての作用があることが考えられ、免疫能低下に伴う感染症などの合併症の予防に有効であることが示唆された (山本ら, 1989)。

#### (3) 放射線障害に対する人参の効果

がんの放射線治療において、治療効果を高めるには、がんに十分な線量を照射すると同時に正常組織の障害、とくに造血器の障害や、免疫能の低下を防ぐことが重要である。以下、人参の放射線障害防護効果について概説する。

Brekman ら (1960) はマウスに 4 Gy 照射後 1 日おきに 1 か月間、20 g あたり 0.1 ml の 10% 人参抽出液を腹腔内投与すると、30 日生存率が 16% から 40% に増加することを観察した。彼らは続いて、2 か月間 <sup>60</sup>Co で  $\gamma$  線 (合計 30 Gy) 照射したラットに人参抽出物を連続腹腔内注射すると、平均生存日数が延長 (105 日  $\rightarrow$  191 日) し血液像が改善されるという結果を得た (Brekman and Mayansky, 1965)。

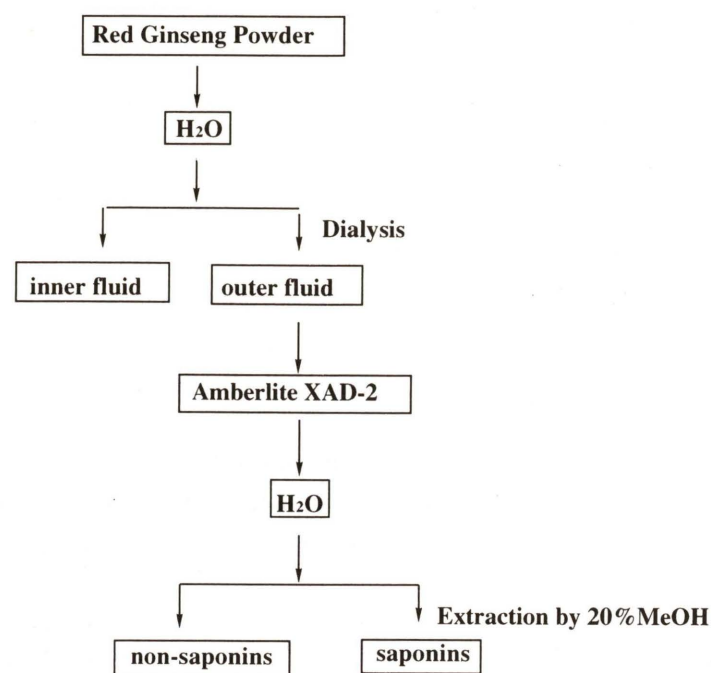


Fig. 2. Various components extracted from Red Ginseng Powder.

赤木ら (1986) は人参抽出物分画 (全液, 透析外液, および内液, サポニン, 非サポニン液) を Fig. 2 に示す方法で得て, ICR 7 週齢のマウスの腹腔内に投与した。非サポニン分画の投与により, 照射後, 一たん急激に血小板数は減少するが 10 日目頃より増加に転じ, 非常に早い回復が認められた。とくに骨髓死がおこる 2 週前後に血小板数が増加してきた。すなわち, 非サポニン分画は, 血小板減少の防護効果でなく回復を促進させることで骨髓死の防護効果をきたすと考えられた。

田中と赤木 (1992) はマウスに  $^{60}\text{Co}\gamma$  線を照射後, 非サポニン分画 (16 mg/匹) の投与によって造血臓器の幹細胞数 Colony Forming Unit (CFUs) の増加をみとめた。

以上を総合すると, 放射線治療に人参を主体とした漢方薬を用いることは, 大変有意義なことから考えられるが, 今後さらに基礎, 臨床両面からの研究が必要である。

#### 4. 薬用人参の抗腫瘍効果

##### (1) 薬用人参に含まれる腫瘍細胞増殖抑制物質

山本ら (1989) および片野ら (1992) は紅参末中には水溶性かつ脂溶性という特性をもつ数種の腫瘍細胞増殖抑制物質が存在していることを見出した。その一つがポリアセチレン系アルコールの Panaxytriol であった。この Panaxytriol は Table 3 (山本ら, 1989) に示すようにヒト胃がん腹水から分離した MK-1 細胞, 大腸癌細胞 (SW 620), 白血病細胞 (K 562) および子宮癌細胞 Hela, マウス悪性黒色腫瘍細胞 (B16) および線維芽細胞由来の L929 など腫瘍細胞に対しては増殖抑制に働くが, 対照のヒト線維芽細胞 (MRC-5) に対しては抑制効果が弱いことがわかった。Panaxytriol はサポニンとは全く異なる物質である。腫瘍細胞増殖抑制の作用機序についてはまだ不明であり, 現在研究が進められている。

一方, ginsenoside 粗分画が *in vivo* において Sarcoma 180 腫瘍細胞の増殖抑制に働くことも示されている (林ら, 1978)。

Table 3. The suppressive effects of panaxytriol extracted from Red Ginseng on the proliferation of tumor cells

Tumor cell line	Dose of panaxytriol needed to suppress the proliferation of tumor cells by 50% ( $\mu\text{g/ml}$ )
MK-1	0.6
SW620	2.0
K562	5.0
HeLa	10.0
B16	3.0
L929	3.0
MRC-5	>40.0

##### (2) Ginsenoside によるがん細胞の再分化誘導

がん細胞が形態的にも機能的にも正常細胞に類似した性質を示すようになること, すなわち一度がん化 (脱分化) した細胞が正常細胞の方向に再び形質変換する現象をがん細胞の再分化 (reverse transformation) と呼んでいる (Odashima *et al.*, 1979; Odashima, 1986; Odashima and Guo, 1992; Abe *et al.*, 1979)。がん細胞の再分化誘導には, がん細胞の増殖能の喪失および失われた固有細胞機能の回復などの内容が含まれる。

Odashima *et al.* (1985) は低分化型のがん細胞として B16 メラノーマ細胞を用い, 細胞増殖抑制およびメラニン合成を指標として Rh<sub>1</sub> および Rh<sub>2</sub> の再分化誘導能を検討した。Rh<sub>1</sub> は B16 メラノーマ細胞の増殖を抑制しないが, Rh<sub>2</sub> は 8.0  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度で B16 メラノーマ細胞の増殖を完全に抑制した。一般に B16 メラノーマ細胞では試験管内で多層性の増殖態度を示す piling up が随所にみられる。Rh<sub>2</sub> を含む培養液中で培養すると細胞は大型化し, 細胞質内に多数の微細顆粒がみられるようになり, 細胞間の境界は明瞭で単層性の増殖態度を示すようになり piling up などの増殖果はみられなくなった (Odashima *et al.*, 1985)。Rh<sub>2</sub> はこの B16 メラノーマ細胞のメラニン合成も用量依存的に促進した。このメラニン合成は色素細胞における分化した機能の一つであると考えられている (Prasad and Edwards-Prasad, 1982)。また Rh<sub>2</sub> は *in vivo* でヒト卵巣癌由来細胞に対して著明な増殖抑制効果を現わした (戸出ら, 1992a, 1992b)。

##### (3) がん悪液質に対する紅参の作用

体の中にがんが発生すると, がん悪液質により, 食欲低下, 体重低下, 貧血などの症状が出現してくる。このがん悪液質が出現するのはがん細胞からがん毒素 (トキソホルモン L) が分泌され, これが宿主である生体に種々の悪い影響を及ぼすためであると考えられている (Fig 3)。薬用人参の中にトキソホルモン L を阻害する物質が存在する。奥田ら (1985) および奥田 (1992) の研究は, このトキソホルモン L を阻害する物質は非サポニン分画に存在することを明らかにした。しかし, この活性成分は同じく脂肪分解を促進するホルモンである ACTH (副腎皮質刺激ホルモン) の作用は阻害しない。すなわち, がん毒素の作用のみを低下させ, 生理的なホルモン作用は阻害しないことが判明した。薬用人参はがん悪液質に対して, やせや食欲不振の改善に有用であると期待される。

##### (4) 薬用人参のがん化学療法剤マイトマイシン C の抗腫瘍効果に対する増強作用

Chun-ning *et al.* (1992) および久保と松田 (1993) は紅参エキス (RMe) がマウス由来の腹水肝がん Ehrlich ascites carcinoma 及びラット由来の腹水肝がん AH130 に対するマイトマイシン C (MMC) の抗腫瘍効果を増強させることを明らかにした。その作用機序として RMe の lysosome labilizer 作用と MMC の腫瘍細胞への取り込みの促進作用が明らかにされた。また戸出ら (1992a, 1992b) は, Rh<sub>2</sub> と化学療法剤 cisplatin の併用で癌細胞の増殖が抑制される傾向をみとめた。

##### (5) 薬用人参のがん転移阻止活性およびがん浸潤阻止活性

東 (1992) は人参サポニンである Ginsenoside Rb<sub>2</sub>, 20(S)Rg<sub>3</sub>, 20(R)Rg<sub>3</sub>, Rd, Rg<sub>1</sub> などにメラノーマ B16-BL 細胞に対する浸潤抑制活性があることを認めた。また北川ら (1993) は Ginsenoside 20(S)Rg<sub>3</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, 20(R)Rg<sub>3</sub> に, ラット腸間膜中皮細胞への AH134 腹水肝がん細胞の浸潤抑制活性を報告している。

Kitagawa *et al.* (1994) は AH130 腹水肝癌細胞

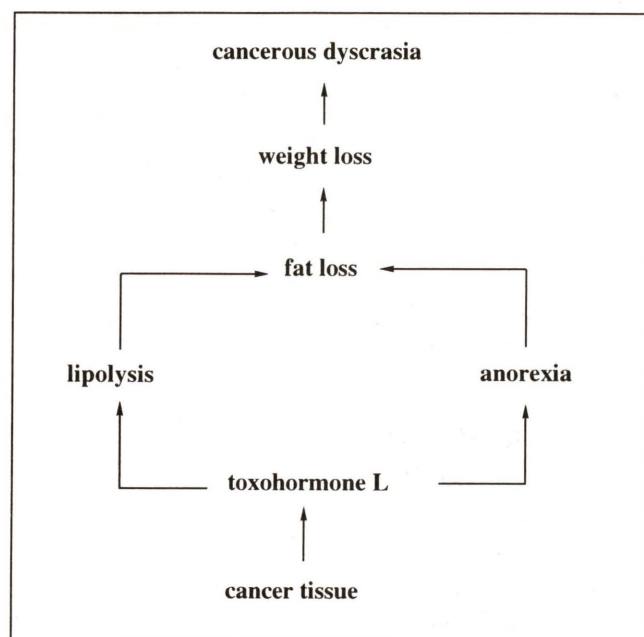


Fig. 3. Effects of toxohormone L on the nutritional state of cancer patients.

の *in vitro* における浸潤, マウスメラノーマ B16 細胞の *in vitro* における浸潤および *in vivo* における肺転移が ginsenoside Rg3 で抑制されることを示した。

東 (1993) は薬用人参由来サポニン, ジンセノサイドが腫瘍血管の新生を有意に抑制することを報告している。

#### 5. Ginsenoside Rh<sub>2</sub> の変異原性修飾効果

著者らは, 最近 Rh<sub>2</sub> が変異原性を修飾する効果を有することを見出した (Zhu *et al.*, 1995). Rh<sub>2</sub> の  $1.0 \times 10^{-10}$  M 以上の濃度においてヒト末梢リンパ球の baseline SCE (sister chromatid exchange; 姉妹染色分体交換) および MMC 誘発 SCE 頻度を有意に減少させた。とくにヒト正常細胞において baseline SCE 頻度を抑制する物質はほとんど知られておらず, SCE 抑制のメカニズム及び腫瘍抑制効果との関連が興味深い。

#### 6. おわりに

がん問題の本質は, がん細胞が宿主である人間の命を絶つというところにある。薬用人参は人体抗がん機能を高めてがんの進展を抑制し, 人体の

回復力を促進するという重要な意義を有する可能性が高い。薬用人参の抗腫瘍活性に関しては, 宿主生体に対する働きと腫瘍細胞自体に対する作用等多面的な研究が進められており, がん治療への応用が期待される。薬用人参に代表されるような, 伝統医学において高い有効性が認められている物質に関する研究は抗変異原, 抗がん作用研究の上で重要な意義を有するであろう。

#### 参考文献

- Abe, H., S. Arichi and S. Odashima (1979) Ultrastructural studies of Morris hepatoma cells reversely transformed by ginsenosides, *Experientia (Basel)*, **35**, 1647-1648.
- 赤木 清, 鹿浦砂智子, 田中敬正 (1986) マウスの放射線骨髄死に対する紅参末の防護効果, *和漢医薬学会誌*, **3**, 308.
- 東 市郎 (1992) 癌の免疫学的制御と癌転移抑制の試み, *The Ginseng Review*, **15**, 3-13.
- 東 市郎 (1993) 薬用人参由来サポニン, ジンセノサイドによる腫瘍血管新生の抑制, *The Ginseng Review*, **16**, 21-23.
- Brekhman, I. I. and I. V. Dardymov (1960) New substances of plant origin which increase nonspecific resistance, *Ann. Rev. Pharmacol.*, **9**, 419-430.
- Brekhman, I. I. and G. M. Mayansky (1965) Eleuthero-coccus-A mean of increase of unspecific resistance of the organism, *Izv. Akad., Nauk. SSSR. Ser. Biol.*, **5**, 762.

Brekhman, I. I., L. I. Oskotsky and A. I. Khakham (1960)

The action of some preparations from the aralia family in experimental radiation sickness, *NACSIS-CAT*, **5**, 33.

中国甘肅省新医薬研究所 (1987) 中薬学の臨床応用. 常用中薬 400 種の基礎から方剤応用まで, 人民衛生出版社, pp. 361-362.

Chun-ning, T., H. Matsuda and M. Kubo (1992) Pharmacological study on panax ginseng C. A. Meyer. XV. Effects of 70% methanolic extract from red and white ginseng on the antitumor activity of mitomycin C, *Yakugaku Zasshi*, **112**, 856-865.

林 輝明, 有地 滋, 久保道徳, 阿部博子, 久山 健, 小田島肅夫 (1978) *In vivo* におけるマウス Sarcoma 180 に対する ginsenoside の抗腫瘍効果, *金医大誌*, **3**, 171-137.

片野光男, 山本裕士, 松永 尚, 齊田哲也, 森 昌斗 (1992) 薬用人参中の腫瘍細胞増殖抑制物質, *The Ginseng Review*, **15**, 22-28.

北川 勲, 明渡 均, 新貝清子, 向井睦子 (1993) Inhibition of tumor cell invasion and metastasis by Ginsenosides, *The Ginseng Review*, **16**, 16-20.

Kitagawa, I., M. Kobayashi, H. Akedo, K. Shinkai, M. Mukai and F. Imamura (1994) Mechanism of Structure-Specific Inhibition of Tumor cell Invasion by Ginsenosides, *The Ginseng Review*, **18**, 33-36.

久保道徳, 松田秀秋 (1993) 紅参による癌化学療法剤の抗腫瘍効果増強作用, *The Ginseng Review*, **16**, 24-27.

Laitha, L. G. (1965) Current topics in radiation research, Ebert, M., Howard, A., eds., North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

Odashima, S. (1986) Reverse transformation of neoplastic cells and phytoglycosides, with special reference to re-differentiation induction in cancer cells by ginsenosides, *Nippon Rinsho*, **44**, 245-253.

Odashima, S. and J. Q. Guo (1992) 癌細胞の再分化誘導. 代謝, **29**, 406-413.

Odashima, S., Y. Nakayabu, N. Honjo, H. Abe and S. Arichi (1979) Induction of phenotypic reverse transformation by ginsenosides in cultured Morris hepatoma

cells, *Eur. J. Cancer*, **15**, 885-892.

Odashima, S., T. Ohta, H. Kohno, T. Matsuda, I. Kitagawa, H. Abe and S. Arichi (1985) Control of phenotypic expression of cultured B16 melanoma cells by plant glycosides, *Cancer Res.*, **45**, 2781-2784.

奥田拓道, 升野博志, 李 松載 (1985) 癌悪液質に対する紅参の作用, 熊谷 朗ら (編) 薬用人参 '85—その基礎・臨床医学研究一, 共立出版, pp. 88-107.

奥田拓道 (1992) 薬用人参に含まれる癌毒素・トキシホルモン L 阻害物質について, *The Ginseng Review*, **15**, 34-37.

Prasad, K. N. and J. Edwards-Prasad (1982) Effects of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture, *Cancer Res.*, **42**, 550-555.

田中敬正, 赤木 清 (1992) 放射線照射マウスに対する紅参末の防護効果, *The Ginseng Review*, **14**, 21-24.

戸出健彦, 菊池義公, 喜多恒和, 平田純子, 今泉英司, 永田一郎 (1992a) ヒト卵巣癌由来細胞の増殖に及ぼすジンセノサイド Rh<sub>2</sub> 人参成分の影響, *The Ginseng Review*, **14**, 7-13.

戸出健彦, 菊池義公, 喜多恒和, 平田純子, 今泉英司, 永田一郎 (1992b) 卵巣癌由来細胞の増殖に及ぼす人参成分の影響, *The Ginseng Review*, **15**, 14-21.

徳永 徹 (1994) がんと生体防御, 東京大学出版会, 東京.

Yamaguchi, N., H. Kohno, M. Yawara, S. Odashima and H. Abe (1985) Effect of saikosaponin derivatives upon the immune response against T-dependent and T-independent antigens in mice, *Int. J. Immunopharm.*, **7**, 827-832.

山本裕士, 片野光男, 松永 尚 (1989) 薬用人参 '89—その基礎・臨床研究の進歩— (大浦彦吉, 奥田拓道, 森澤成司, 山本昌弘編), 共立出版, pp. 219-226.

Zhu, J. H., T. Takeshita, I. Kitagawa and K. Morimoto (1995) Suppression of the formation of sister chromatid exchanges by low concentrations of ginsenoside Rh<sub>2</sub> in human blood lymphocytes, *Cancer Res.*, **55**, 1221-1223.

## T細胞抗原受容体遺伝子を指標とするヒト体細胞突然変異アッセイ系とそのバイオドシメトリーへの応用

### Assay system of human somatic mutations using T-cell antigen receptor gene as a marker and its application to biodosimetry

京泉 誠之, 梅木 繁子, 秋山 實利  
Seishi Kyoizumi, Shigeko Umeki and Mitoshi Akiyama

放射線影響研究所 放射線生物学部  
732 広島市南区比治山公園 5-2

Department of Radiobiology, Radiation Effects Research Foundation,  
5-2 Hijiyama Park, Minami-ku, Hiroshima 732 Japan

(受付: 1995年7月6日; 受理: 1995年9月20日)

#### Summary

We established a flow cytometric assay for detecting and enumerating mutant cells with a loss of or alteration of the T-cell receptor (TcR)  $\alpha$  or  $\beta$  gene expression among human mature CD4<sup>+</sup> T cells. The presence of mutant CD4<sup>+</sup> T cells was demonstrated by isolating and cloning them from peripheral blood. Their abnormalities can be accounted for by alterations in TcR  $\alpha$  or  $\beta$  expression, such as defects of protein expression and partial protein deletion. The mutant frequency (Mf) in peripheral blood increased with age in normal donors and was highly elevated in patients with ataxia telangiectasia, an inherited disease with defective DNA repair and variable T-cell immunodeficiency. A significant increase of TcR Mf was observed in various radiation-exposed people such as thyroid cancer patients treated with <sup>131</sup>I, patients treated with Thorotrast and uterine cancer patients treated with localized radiotherapy. In the thyroid cancer patients, a dose-related increase of Mf was detected. However, the dose response of TcR Mf was very shallow among atomic bomb survivors due to *in vivo* elimination of mutant T-cells during the long time since exposure. By analyzing the relationship between years after radiotherapy and TcR Mf in the uterine cancer patients, the half life of *in vivo* mutant T-cells was found to be about two to three years. Thus, the TcR mutation assay can provide useful biological dosimetry measurements of recent exposures to genotoxic agents.

**Keywords:** somatic mutation, T-cell receptor gene, biodosimetry

#### 1. はじめに

70年代に始まるT細胞抗原受容体分子(以下TcRと略す)を同定しようとする免疫学者たちの努力は、80年代中盤のM. Davis, T. W. Mak, S. TonegawaらのTcR  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ 各遺伝子のクローニングの成功により一応の結実をみた。さらに、その後には始まるTリンパ球の抗原認識機構や分化機構の分子生物学的研究はTcR分子の機能を中心に現在も多数の免疫学者により精力的に行われ

ている。我々はそういった免疫学的知見の進展を考慮に入れながら、TcR遺伝子をヒトの環境変異原曝露のモニタリングのための指標として用いることを試み、その突然変異検出系の確立を行った(Kyoizumi *et al.*, 1990)。その当時、ヒトの体細胞突然変異測定系として知られていたのはAlbertini (1982)やMorey (1983)らの開発したTリンパ球コロニー形成法によるHPRT遺伝子突然変異測定系と、Jensenらが開発したフローサイトメ

トリーによる赤血球グリコフォリン A 遺伝子測定系 (Langlois *et al.*, 1986; Kyoizumi *et al.*, 1989a) だけであり, 新しい方法の確立が待望されていた. *in vivo* の体細胞突然変異体頻度 (Mf) を求めることにより, 対象者あるいは集団が環境変異原に曝露されたか否かを判断し, その曝露量を Mf から推定する (バイオドシメトリー) ことがこうした研究の目的である. またそれにより, 発癌リスクの評価を行なうという最終ゴールへと発展することが期待される (Perera, Whyatt, 1994; Akiyama *et al.*, 1995).

## 2. 測定原理

TcR 分子には TcR  $\alpha\beta$  型と TcR  $\gamma\delta$  型があり, TcR  $\alpha\beta$  は末梢の成熟 CD4<sup>+</sup> (ヘルパー T リンパ球) および CD8<sup>+</sup> (キラー/サプレッサー T リンパ球) に発現され, 一方, TcR  $\gamma\delta$  は CD4<sup>-</sup> 8<sup>-</sup> T リンパ球に発現されている. 我々の作成した体細胞突然変異測定系は CD4<sup>+</sup> T リンパ球集団中の TcR  $\alpha\beta$  の膜発現に異常のある変異細胞をフローサイトメトリーにより検出し, その頻度を求めるものである.

TcR  $\alpha$  および  $\beta$  鎖遺伝子は基本的には allelic exclusion 機構により, B リンパ球の抗体遺伝子同様二つの対立遺伝子のうち一方のみが発現を行っている. つまり TcR  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖遺伝子はそれぞれ常染色体上にあるにもかかわらず, X 染色体上にある HPRT 遺伝子と同様にヘミ接合体の状態にあるため, 通常の頻度 ( $10^{-5}$  前後) で突然変異体の検出が可能となる. 従って, この突然変異アッセイは  $10^6$  個のリンパ球で充分可能となる. 最近, T リンパ球の一部では TcR  $\alpha$  および  $\beta$  鎖遺伝子の allelic exclusion 機構が厳格に働いていないことが報告され (Padovan *et al.*, 1993; Davodeau *et al.*, 1995), 特に TcR  $\alpha$  鎖遺伝子では末梢 T リンパ球の 1/3 が 2 種類の  $\alpha$  鎖を発現しているらしい. このことは本来の TcR Mf は測定値よりもさらに高いことを示唆している. 実際の TcR アッセイでは反応性の弱い抗 TcR 抗体の代わりに抗 CD3 $\epsilon$  抗体を用いる. Fig. 1 に示すように TcR  $\alpha\beta$  分子は CD3 分子群 ( $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta$  鎖) と大きな分子複合体を形成するが,  $\alpha$  または  $\beta$  鎖が欠損したり異常が生じると不完全な TcR/CD3 複合体分子は膜表面へ移行できず, ゴ

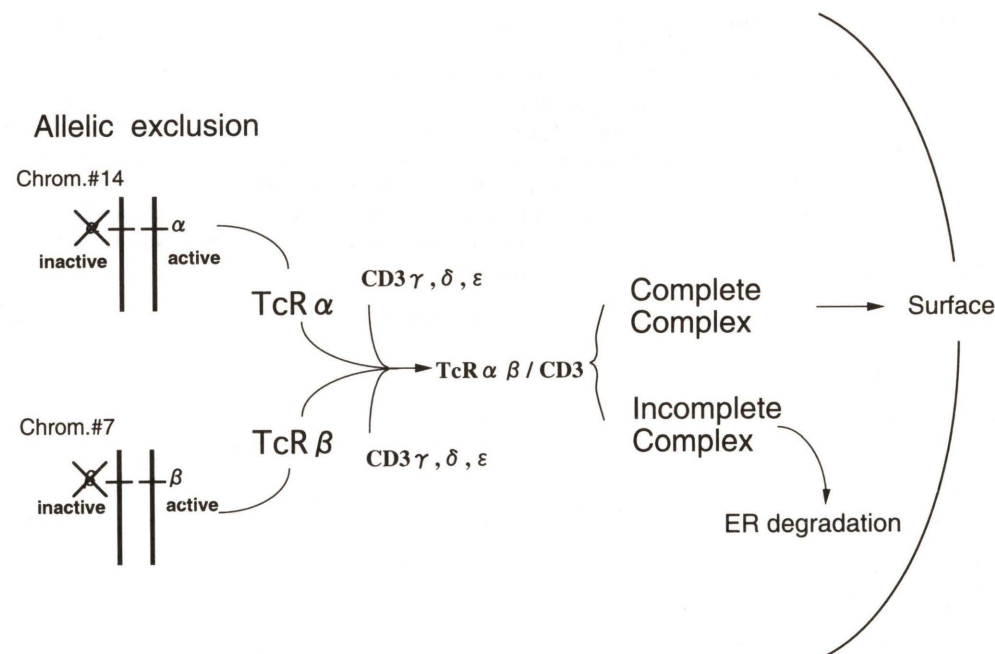


Fig. 1. Biosynthesis and degradation of TcR/CD3 complex. Incomplete complexes with abnormal TcR  $\alpha$  or  $\beta$  chains are degraded in ER.

ルジ体へ運ばれることなく小胞体 (ER) で分解される (Klausner and Sitia, 1990). 従って, CD4<sup>+</sup> T 細胞集団中の CD3<sup>-</sup> 細胞は TcR  $\alpha$  鎖または  $\beta$  鎖の発現に異常を持つ突然変異体と考えられる. CD3 遺伝子群には allelic exclusion 機構は働いておらず, CD3 を欠損する変異体はこの分画にはほとんど無いと考えられる. 後で述べるように, CD3<sup>-</sup> 4<sup>+</sup> T リンパ球をセルソーターにより分離し, 変異体 T リンパ球クローンを樹立した. その変異体の TcR/CD3 の発現を調べると, TcR  $\alpha$  または  $\beta$  鎖いずれかが欠損するかいずれかが異常を持っていることが証明された. TcR Mf は CD4<sup>+</sup> ヘルパー T リンパ球中の CD3<sup>-</sup> 4<sup>+</sup> の割合で表すが, 正常人で平均約  $2.5 \times 10^{-4}$  である. この頻度は TcR  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖遺伝子の Mf の総和である.

## 3. 測定方法

FACS を用いた測定法の詳細を記す. 末梢血サンプルは最低 1~2 ml あれば測定可能である.

- ①ヘパリン採血により得られたヒト末梢血から Ficoll/Hypaque 法 (比重 1.0771, 400 g, 30 分, 室温遠心) により単核球集団を得る.
- ②  $1 \times 10^6$  個の単核球をエッペンドルフチューブに分注し, 2000 rpm, 4°C, 2 分遠心する. 沈査に 20  $\mu$ l の FITC-標識抗 Leu3 (CD4) 抗体 (50

$\mu$ g/ml) と同量の PE-標識抗 Leu4 (CD3) 抗体を加え, よく混合し, 氷上で 30 分反応させる. 両抗体とも Becton Dickinson (BD) 社から購入できる.

- ③ 0.75 ml の PBS (1% BSA, 0.01% NaN<sub>3</sub>) により 1 回洗浄後 0.25 ml の同じバッファーに懸濁する. さらに死細胞を強染色する目的で, 最終濃度 10  $\mu$ g/ml になるように propidium iodide (PI) を加える.

- ④次にフローサイトメトリー (我々は BD 社の FACSscan を用いている.) により CD3<sup>-</sup> 4<sup>+</sup> 細胞を検出し, その頻度を測定する. まず, 少量の染色されたリンパ球を FACSscan に向け, 前方および側方光散乱のフローパターンによりリンパ球分画に gate をかける (Fig. 2A). なお, 我々は解析用ソフトとして Cosort 30 (HP コンピューター用) あるいは Cell Quest (Mac コンピューター用) を用いているが, ここでは Cosort 30 を用いた方法を示す. 基本的方法はどの解析ソフトでも同じである. Data acquisition は "Dual Parameter Correlated" モードを用いて行う.
- ⑤リンパ球に gate をかけた状態で, FL-1 (FITC-CD4) および FL-2 (PE-CD3) の 2 パラメーターモードで最低 20 万個のイベントをフロ

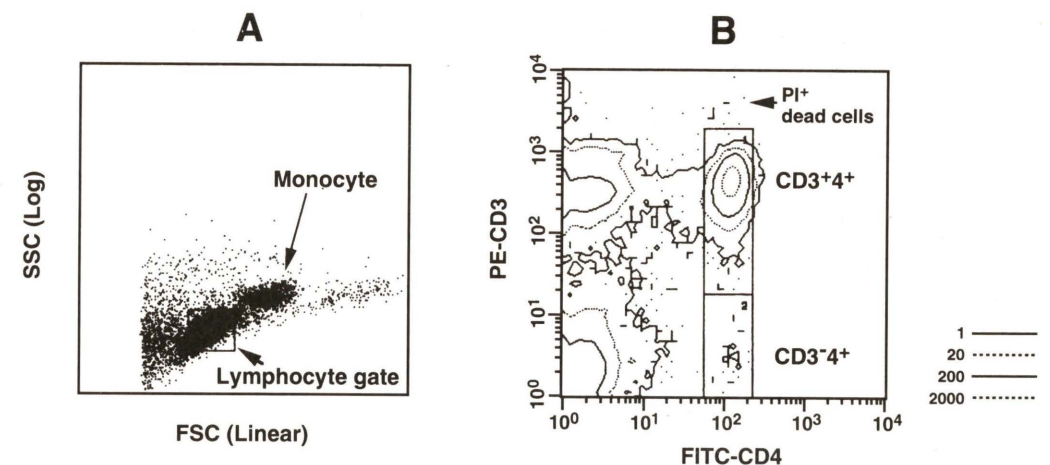


Fig. 2. TcR mutation assay using flow cytometry.

(A) Light scattering pattern of peripheral blood mononuclear cells. The lymphocyte fraction is gated for the TcR mutation assay. (B) Flow cytogram of  $2 \times 10^5$  lymphocytes stained with FITC-anti-CD4 and PE-anti-CD3 antibodies. Setting of a window for CD3<sup>-</sup> 4<sup>+</sup> mutants is described in the text.

ピーあるいはハードディスク内に読み込む。

⑥得られたデータを画面上に出し (Fig. 2B, 等高線は 1, 20, 200, 2000 event/channel), 正常 CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> の FL-2 (CD3) のピーク (モード) の蛍光強度を求める。次に CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> の突然変異体の領域を設定する。この際領域の FL-2 の上限は正常 CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> のピーク値の 1/25 の位置, 下限は 10<sup>0</sup>, また FL-1 の領域の左右は正常 CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> 集団の FL-1 (CD4) のピーク (モード) のそれぞれ 1/2 および 2 倍の位置に設定する (Fig. 2B)。

⑦この領域内の CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> のイベント数を CD4<sup>+</sup> の総イベント数で割った値が Mf になる。

#### 4. 突然変異体クローンの解析

TcR Mf は健康人で  $1 \sim 5 \times 10^{-4}$  の範囲にある。この値は通常の突然変異体頻度  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  に比べれば 10~100 倍高いが、通常のフローサイトメトリーに携わっている者にとっては、この程度の頻度のイベントはゴミかノイズと解釈されるであろう。そこで、これらが真の変異体であることを証明するためにはこれらの突然変異 T リンパ球を分離し、その性質を調べることが必要である。実際に、CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> 分画のイベントをセルソーターにより分離し、顕微鏡下で観察すると 95% 以上は確かに FITC (CD4) でのみ染まり PE (CD3) では染色されていないリンパ球であることが分かった (Kyoizumi *et al.*, 1990)。そこでこれら変異体 T リンパ球を PHA で刺激し、IL-2 とフィーダー細胞存在下でクローニングを試みた。しかしながら、正常 CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> T リンパ球のクローニ

ング効率は 50~80% であるのに対し、CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> 変異体の場合は 10% 以下で極めて増殖能の低い細胞群であることが分かった。おそらく、TcR/CD3 複合体が膜発現されないことで PHA や IL-2 に対しても不応答な状態になっていると思われる。しかし、このようにクローニング効率が低いにもかかわらず、4 人の正常人より 37 個の突然変異 T リンパ球クローンを樹立し、その性質を解析した (Kyoizumi *et al.*, 1990)。

Table 1 に示すように、この 37 個の変異体クローンは TcR/CD3 の発現様式から 3 つのタイプに分類された。つまりその多くは TcR  $\alpha$   $\beta$ /CD3 複合体すべてを表面に発現していないタイプ (I 型) であったが、他に CD3 を低レベルに発現しているが TcR  $\alpha$   $\beta$  に対する抗体と反応しないもの (II 型)、CD3 および TcR  $\alpha$   $\beta$  ともに低発現のもの (III 型) も得られた。I 型の 28 個の突然変異クローンは細胞質内に不完全な TcR/CD3 複合体を発現しており、そのうち 22 クローンは TcR  $\beta$  鎖を欠損し、6 クローンは TcR  $\alpha$  鎖を欠損していた。また、II 型の CD3 低発現クローンでは  $\alpha$  鎖か  $\beta$  鎖のどちらかは分子サイズが小さく、部分欠失の可能性が考えられた。おそらく、その部分欠失は抗 TcR  $\alpha$   $\beta$  抗体が認識する部位を含むと思われる。III 型では TcR  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖ともに正常の分子サイズであったが発現量が非常に低下しているということが分かった。

また、II 型の変異体クローンの中に TcR  $\gamma$   $\delta$  の異常を持つクローンが見られた。通常  $\gamma$   $\delta$  型の T リンパ球は CD4<sup>+</sup> 8<sup>+</sup> であるが、1% 前後 CD4 を発現している (Kyoizumi *et al.*, 1991)。この異常ク

ローンは種々の抗 TcR  $\gamma$   $\delta$  抗体との反応性から  $\gamma$  鎖あるいは  $\delta$  鎖に異常があると考えられた。

以上のデータは CD3<sup>+</sup> 4<sup>+</sup> 細胞として検出されるイベントは確かに CD4<sup>+</sup> T リンパ球の TcR  $\alpha$  鎖あるいは  $\beta$  鎖の発現異常を持つ突然変異体であると考えられた。TcR  $\beta$  鎖を欠損する変異体クローンの数が TcR  $\alpha$  鎖のそれの 3 倍近くあるのは、前述したように TcR  $\alpha$  鎖遺伝子の方が allelic exclusion が働かない T リンパ球が多いためであろう。なお、突然変異クローンのうち一つについては、TcR  $\alpha$  鎖遺伝子 (14 番 q11) に切断点を持つ染色体異常 [t(13; 14)(q32; q11)] が検出されたが、その他のクローンには染色体異常は観察されなかった。なお、この染色体異常を持つクローンは TcR  $\alpha$  の発現を欠損していた。

#### 5. 健康人の末梢血 T リンパ球の TcR Mf

健康人約 100 人の末梢血 CD4<sup>+</sup> T cell の平均 TcR Mf は約  $2.5 \times 10^{-4}$  で、理由は不明であるが男性の方が女性より有意に高かった。また、Fig. 3 に示すように年齢とともに有意に増加した (Kyoizumi *et al.*, 1990)。この年齢による Mf の上昇は赤血球 GPA、T リンパ球の HPRT や HLA-A 遺伝子座でも同様に観察された (Akiyama *et al.*, 1995)。赤血球 GPA 遺伝子座の場合は年齢とともに造血幹細胞に蓄積する突然変異を反映していると

考えられる。一方、T リンパ球の場合は、末梢での turnover を考慮に入れる必要がある。後述するように、放射線療法を受けた子宮癌患者の TcR Mf は放射線照射後半年で  $25 \times 10^{-4}$  前後に上昇するが (Umeki *et al.*, 1992)、その後急速に低下し、10 年で約 1/10 となり、バックグランドレベルにまで低下する (Iwamoto *et al.*, 1994) (Fig. 4)。この TcR Mf の減衰は不安定型染色体異常のそれ (Buckton *et al.*, 1967) と非常によく似ており、正常の T リンパ球の末梢での turnover もその程度の速度であると考えられる。つまり、末梢の TcR Mf は突然変異の生成と消失のバランスの結果である。また、TcR の発現を欠損する T リンパ球前駆細胞は胸腺で排除されと考えられ、多能性幹細胞あるいは T リンパ球前駆細胞で生じた変異体は末梢には出てこないだろう。とすれば、末梢における TcR 突然変異の実際のイベント数は検出されるよりもかなり大きいと考えられる。

#### 6. 高発癌性遺伝病患者の TcR Mf

染色体脆弱性を示す ataxia telangiectasia (AT)、Fanconi's anemia (FA)、Bloom's syndrome (BS) など高発癌性遺伝病患者の TcR Mf は明らかに高い値を示した (Table 2) (Kyoizumi *et al.*, 1990; Kusunoki *et al.*, 1994)。AT や BS では実に 300~500 個の細胞に 1 個という高頻度で突然変異体が

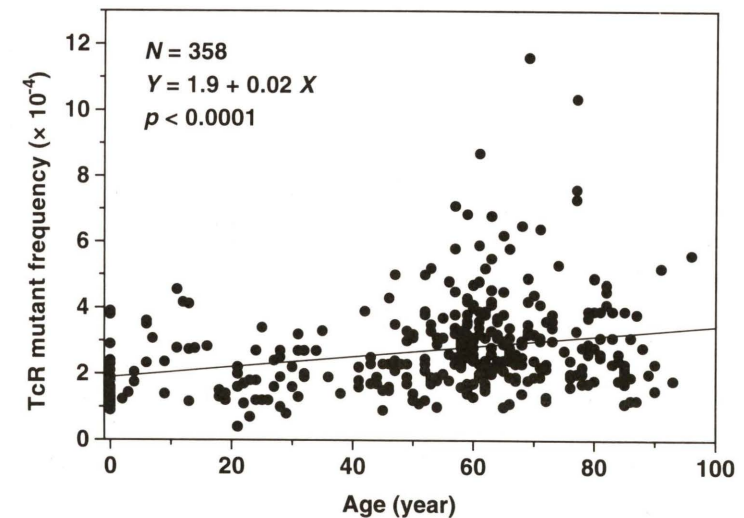


Fig. 3. Relationship between the TcR Mf and age in healthy donors.

Table 1. Surface and cytoplasmic expression of the TcR/CD3 complex in variant CD4<sup>+</sup> T cell clones.

Variant type	Antigens		Surface		Cytoplasm			No. of clones
	Antibodys		CD3	TcR $\alpha$ $\beta$	CD3	TcR $\alpha$ $\beta$ dimer	TcR $\alpha$	
			(Leu4)	(WT31)	(Leu4)	(WT31)	( $\alpha$ F1)	
I			—	—	+	—	+	22
			—	—	+	—	+	6
II			Low	—	+	—	+	3
			Low	—	+	—	—	1
III			Low	Low	+	+	+	5
Total								37

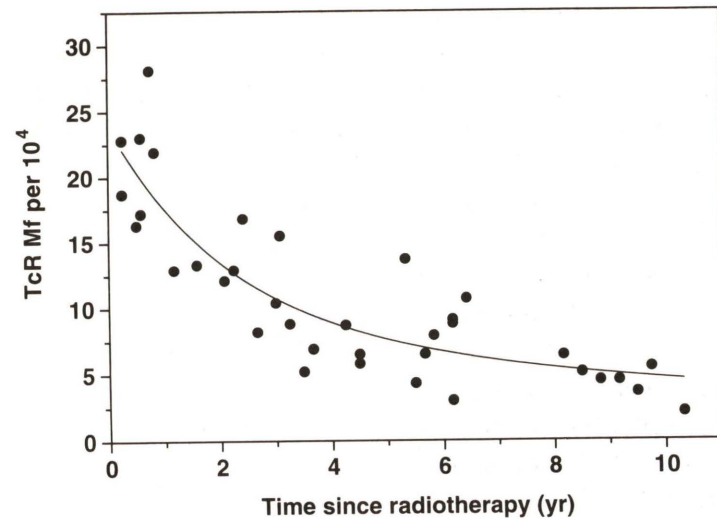


Fig. 4. Relationship between the TcR Mf and time post radiation treatment for uterine cervical cancers.

Table 2. TcR Mf in patients with cancer prone hereditary diseases.

Patient	TcR Mf ( $\times 10^{-4}$ )
Ataxia telangiectasia	
#1	16.6
#2	17.9
#3	37.8
Heterozygous father	3.5
Heterozygous mother	3.4
Bloom's syndrome	
#1	36.2
Fanconi's anemia	
#1	5.5
#2	6.0
Down's syndrome	
#1	1.9

検出される。これらの遺伝病においては赤血球 GPA 遺伝子座の Mf でもやはり高値を示すことが分かっている (Kyoizumi *et al.*, 1989b)。特に興味深い点は、胸腺の发育異常 (Peterson *et al.*, 1964) や T リンパ球機能異常 (Nelson *et al.*, 1983) などの免疫不全を示す AT で異常に高い Mf を示した点である。なお、BS の患者でも免疫不全の報告がある。AT では 7 番と 14 番の TcR および イムノグロブリン (Ig) 遺伝子を介する染色体異常が T リンパ球や T-リンパ腫に高頻度に観察されることが分かっており (Heppell *et al.*, 1988; Russo *et al.*, 1988), TcR および Ig 遺伝子の不安定性

がこの病気の特徴であろう (Peterson and Funkhouser, 1980)。AT の原因遺伝子は放射線誘発 DNA 切断の修復に関与していると考えられているが、TcR gene の再構成やその安定性の保持にさらに T リンパ球の分化や機能にも重要な役割を果たしているのであろう。また、TcR gene の異常や TcR 遺伝子座を介する染色体異常と T-lymphoma の発症機構との関係も興味深い点である。

#### 7. 放射線被曝者の TcR Mf

TcR 突然変異が放射線被曝により誘導されるか否かを放射線治療患者や原爆被曝者、トロトラスト症患者について調べ、放射線被曝のバイオドシメトリーのマーカーとしての可能性を検討した (Kyoizumi *et al.*, 1992; Akiyama *et al.*, 1995)。Fig. 5 は甲状腺癌を治療するために  $^{131}\text{I}$  を注入した患者の TcR Mf であるが、注入した  $^{131}\text{I}$  の量と有意な相関関係を示した。この dose response は *in vitro* 照射の dose response とよく似ている (論文投稿中)。また、トロトラスト症患者においても有意に高い Mf が検出され TcR アッセイが内部放射線被曝の検出に有用であることが示された。一方、原爆被曝者の dose response は有意ではあるが非常にゆるやかで (Fig. 6)、矢印で示した outlier を除くと統計的な有意差は無くなった。この

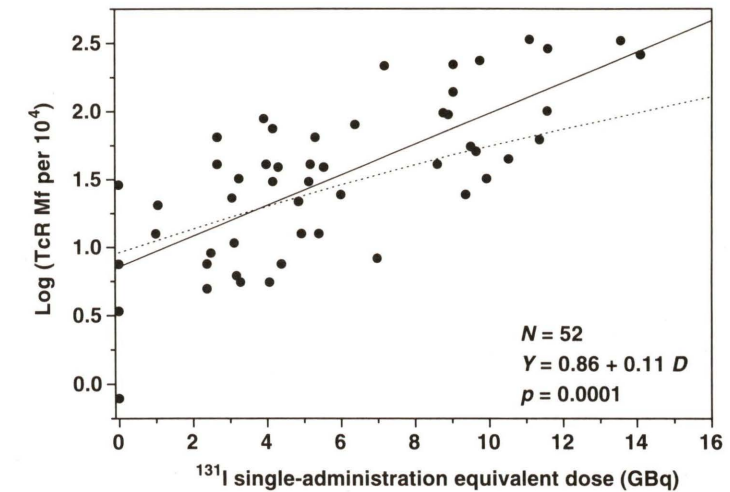


Fig. 5. Correlation between the TcR Mf and total radioactivity of  $^{131}\text{I}$  received by thyroid cancer patients. The amounts of  $^{131}\text{I}$  administered for the TcR assay were calibrated as a equivalent single dose by applying the 2 year mutant half-life. The dotted line indicates the *in vitro* dose response curve of the TcR Mf in X-irradiated lymphocytes.

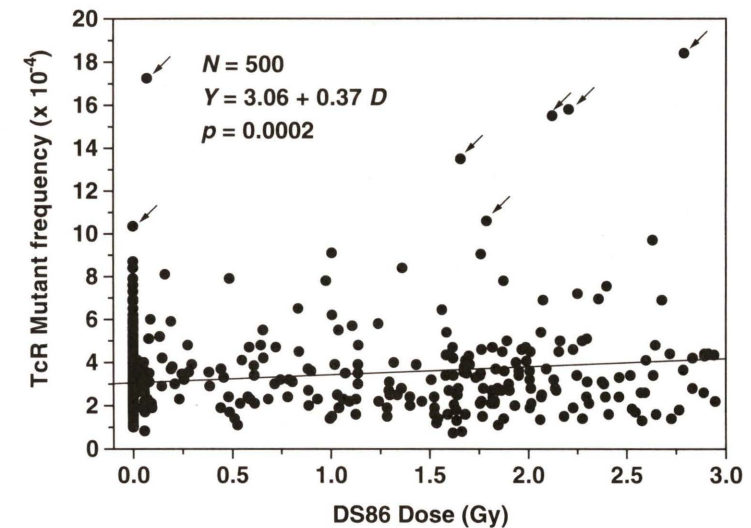


Fig. 6. Relationship between the TcR Mf and DS86 exposure dose ( $< 3\text{ Gy}$ ) for atomic bomb survivors. The arrows indicate the outliers whose TcR Mfs were more than  $10 \times 10^{-4}$ .

原爆被曝者の結果は TcR アッセイが外部被曝には有効でないことを示しているか、あるいは放射線被曝後何十年も経過すると突然変異体が消失することを示している。

そこで、局所放射線療法 (計 50 Gy) を受けた子宮癌患者の TcR Mf を測定し、放射線治療後の経過時間に対してプロットしてみた (Fig. 4)。照射後 TcR Mf は徐々に上昇し、約数ヶ月後で約 2.5

$\times 10^{-3}$  までになる。照射後長期の経過が必要なものは末梢の T リンパ球はほとんど  $G_0$  期にあり、既に膜発現している TcR/CD3 複合体がその代謝回転により消失するのに時間がかかるということであろう。一方、上昇した TcR Mf はその後徐々に減少し、2~3 年で半減、約 10 年でコントロールレベルまで低下した。この子宮癌患者の結果は TcR 突然変異は外部被曝でも誘導され、誘導され

た変異体は半減期約2~3年で体内から消失していくことを示している。原爆被爆者で dose response が非常にゆるやかであった理由は被爆後の長期経過による突然変異体の消失であると考えられる。

なお、チェルノブイリ事故被曝後4年以内の消防士の TcR Mf は異常高値を示した (Kyoizumi *et al.*, 1992)。

## 8. TcR 突然変異体の *in vivo* での増殖

原爆被爆者集団中に見られる高い TcR Mf を持つ outlier (Fig. 5) はどのようにして生じたのであろうか。原爆放射線により誘発された突然変異 T リンパ球のほとんどは、前述したように自然に起こる turn over により被爆後徐々に消失していったと考えられるが、そのような動向に抗するためには突然変異 T リンパ球が体内で増殖する必要がある。実際に outlier の TcR 変異体のほとんどは (90% 以上) CD45 RA<sup>-</sup> または RO<sup>+</sup> のメモリー型 T リンパ球で、*in vivo* で何らかの増殖刺激を受けていることが分かった (未発表データ)。現在、これらの被爆者から変異体 T リンパ球をセルソーターにより分離し、前述の方法により変異体クローンを得、その性質を調べている。1人の被爆者では得られた変異体クローンすべてにおいて TcR  $\beta$  鎖 mRNA の発現を完全に欠損しており、その遺伝子再構成パターンが全く一致していた。これは1個の突然変異 T リンパ球が *in vivo* でクローナルに増殖したことを明確に示している。このような突然変異 T リンパ球の clonal expansion は HPRT 遺伝子でも知られている (Nicklas *et al.*, 1988)。しかし、TcR/CD3 の膜発現を全く欠く T cell が *in vivo* で増殖できることは免疫学的にも非常に興味深い現象であり、そのメカニズムについて現在検討中である。

## 9. 化学変異原物質による TcR 変異体の誘導

TcR 変異体は放射線だけでなく抗癌剤などの化学変異原物質でも誘発される。*in vitro* でヒト末梢血リンパ球をアルキルおよび DNA 鎖架橋化剤であるマイトマイシン C で処理すると、濃度依存性に TcR Mf は上昇する (梅木, 1994)。しかしな

がら、代謝拮抗剤である 5-FU では明らかな TcR Mf の上昇は観察されなかった。また *in vivo* でも抗癌剤を投与された小児白血病の患者では有意に高い TcR Mf が検出された (Hirota *et al.*, 1994)。

## 10. バイオドシメトリーへの応用とその問題点

以上のように、放射線により *in vivo* で確かに TcR 遺伝子に突然変異が誘導されるが、半減期数年で徐々に消失していく。これは TcR アッセイが放射線被曝の長期にわたる蓄積線量を求めるには不適であることを示す。この点は HPRT や HLA-A 遺伝子突然変異体も同様で、T リンパ球を材料にする限り避け難い問題点である。しかしながら、被曝後10年以内であれば Mf の上昇を検出することができる。その際、減衰曲線から被曝直後の Mf を逆算することも可能であろう。また、慢性的に放射線を被曝している場合は計算はさらに複雑になるが可能かもしれない。現在、数学モデルによるアプローチを検討中である。

もう一つの問題点として、前述したように突然変異形質発現まで半年近く経過する必要があるという点である。この点は *in vitro* でマイトジェンである PHA で T-cell を増殖刺激し、TcR/CD3 の細胞内での代謝回転を促進することにより突然変異形質を短期間で検出できることが可能である (論文準備中)。つまり、末梢血リンパ球を *in vitro* で種々の線量の X 線で照射し PHA とともに培養すると、TcR Mf は徐々に増加し7日目でピークに達する。7日目の dose response は linear-quadratic model が最もよく適合した。前述の子宮癌患者の TcR Mf は放射線治療 (1週間で10Gyの局所照射) 直後は治療前の値とほとんど変わらないが、1週間 PHA とともに培養すると Mf は約  $17 \times 10^{-4}$  まで上昇した。この値を使って *in vitro* 照射の dose response から平均被曝線量を求めると約0.9Gyであった。この線量は同様の放射線治療を受けた子宮癌患者の不安定型染色体異常頻度から求めた値と近いものであった (Leonard *et al.*, 1987)。

## 11. 終わりに

以上、TcR 遺伝子の体細胞突然変異検出系につ

いて現在までの知見をまとめてみた。この方法の優れた点は少量の血液で可能であり、フローサイトメトリーを用いて短時間で客観的な定量ができる点である。また、用いる抗体は市販されており、FACS を持つ研究室ならどこでも可能である。*in vivo* での変異形質発現まで数ヶ月近くかかる点が欠点であるが、*in vitro* 培養法により克服できるだろう。我々の研究室では現在まで、4種類の突然変異アッセイ系 (GPA, TcR, HPRT, HLA-A 遺伝子) を樹立してきた (Akiyama *et al.*, 1992)。TcR 法は T リンパ球を用いるため、被曝後長期間を経ると生体内から消失する欠点はあるが、これらの中でこの TcR 法が最も簡便でデータの安定性や放射線被曝に対する感度も最も優れていると考えている。さらに、マウスモデルを用いた TcR 検出系が既に完成しており (論文準備中)、このマウスモデルを用いることによってヒトで不明であった *in vivo* の dose response や突然変異誘導のメカニズムなどの解析が可能となろう。

## 参考文献

- Akiyama, M., Y. Kusunoki, S. Umeki, Y. Hirai, N. Nakamura and S. Kyoizumi (1992) Evaluation of four somatic mutation assays as biological dosimeter in humans, In: A. W. C. Dewey *et al.* (Eds), "Radiation Research: A Twentieth-Century Perspective Vol. II", New York, Academic Press, pp. 177-182.
- Akiyama, M., S. Umeki, Y. Kusunoki, S. Kyoizumi, N. Nakamura, T. Mori, Y. Ishikawa, M. Yamakido, K. Ohama, T. Kodama, K. Endo and J. B. Cologne (1995) Somatic cell mutations as a possible predictor of cancer risk, *Health Physics*, **68**, 643-649.
- Albertini, R. J., K. L. Castle and W. R. Borcherting (1982) T cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6617-6621.
- Buckton, K. E., W. M. Court Brown and P. G. Smith (1967) Lymphocyte survival in men treated with X-rays for ankylosing spondylitis, *Nature*, **214**, 470-473.
- Davodeau, F., M. A. Poyrat, F. Romagne, A. Necker, M. M. Hallet, H. Vie and M. Bonneville (1995) Dual T cell receptor  $\beta$  chain expression on human T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **181**, 1391-1398.
- Heppell, A., S. V. Butterworth, R. J. Hollis, A. A. Ken- naugh, D. W. Beatty and A. M. R. Taylor (1988) Breakage of the T cell receptor  $\alpha$  chain locus in non-malignant clones from patients with ataxia telangiecta-

- sia, *Hum. Genet.*, **79**, 360-364.
- Hirota, H., M. Kubota, S. Adachi, A. Okuda, Y. W. Lin, R. Bessho, Y. Wakazono, K. Matsubara, K. Kuwakado, Y. Akiyama and T. Tsutsui (1994) Somatic mutations at T-cell antigen receptor and glycophorin A loci in pediatric leukemia patients following chemotherapy: Comparison with HPRT locus mutation, *Mutat. Res.*, **315**, 95-103.
- Iwamoto, K. S., Y. Hirai, S. Umeki, Y. Kusunoki, S. Kyoizumi, T. Kodama, K. Ohama, N. Nakamura and M. Akiyama (1994) A positive correlation between T-cell-receptor mutant frequencies and dicentric chromosome frequencies in lymphocytes from radiotherapy patients, *J. Radiat. Res.*, **35**, 92-103.
- Klausner, R. D. and R. Sitia (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum, *Cell*, **62**, 611-614.
- Kusunoki, Y., T. Hayashi, Y. Hirai, J. Kushi, K. Tatum, T. Kurihara, M. Zghal, M. R. Kamour, H. Takebe, A. Jeffreys, N. Nakamura and M. Alciyama (1994) Increased rate of spontaneous mitotic recombination in T lymphocytes from a Bloom's syndrome patient using a flow-cytometric assay at HLA-A locus, *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 610-618.
- Kyoizumi, S., N. Nakamura, M. Hakoda, A. A. Awa, M. A. Bean, R. H. Jensen and M. Akiyama (1989a) Detection of somatic mutations at the glycophorin A locus in erythrocytes of atomic bomb survivors using a single beam flow sorter, *Cancer Res.*, **49**, 581-588.
- Kyoizumi, S., N. Nakamura, H. Takebe, K. Tatsumi, J. German and M. Akiyama (1989b) Frequency of variant erythrocytes at the glycophorin-A locus in two Bloom's syndrome patients, *Mutat. Res.*, **214**, 215-222.
- Kyoizumi, S., M. Akiyama, Y. Hirai, Y. Kusunoki, K. Tanabe and S. Umeki (1990) Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4<sup>+</sup> T cells, *J. Exp. Med.*, **171**, 1981-1999.
- Kyoizumi, S., M. Akiyama, Y. Hirai and Y. Kusunoki (1991) Isolation and characterization of human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cell clones expressing  $\gamma \delta$  T cell receptors, *Immunol. Letters*, **29**, 197-204.
- Kyoizumi, S., S. Umeki, M. Akiyama, Y. Hirai, Y. Kusunoki, N. Nakamura, K. Endoh, J. Konishi, M. Sasaki, T. Mori, S. Fujita and J. B. Cologne (1992) Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T-cell antigen receptor gene among radiation-exposed people, *Mutat. Res.*, **256**, 173-180.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee and R. H. Jensen (1986) Measurements of the frequency of human erythrocytes with gene expression loss phenotypes at the glycophorin A locus, *Hum. Genet.*, **74**, 353-362.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee, S. Kyoizumi, N. Nakamura, M. A. Bean, M. Akiyama and R. H. Jensen (1987) Evidence for increased somatic cell mutations at the glycophorin A locus in atomic bomb survivors, *Science*, **236**, 445-448.

- Leonard, A., G. Decat, E. D. Leonard, A. Wambersie and J. Renard (1987) Chromosome aberrations in patients irradiated for pelvic tumors, *Strahlentherapie Onkol.*, **163**, 795-799.
- Morley, A. A., K. J. Trainor, R. Seshadri and R. G. Ryall (1983) Measurement of *in vivo* mutations in human lymphocytes, *Nature*, **302**, 155-156.
- Nelson, D. L., W. E. Biddison and S. Shaw (1983) Defective *in vitro* production of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes in ataxia-telangiectasia, *J. Immunol.*, **130**, 2629-2634.
- Nicklas J. A., J. P. O'Neill, L. M. Sullivan, T. C. Hunter, M. Allegretta, B. F. Chastenay, B. L. Libbus and R. J. Albertini (1988) Molecular analyses of *in vivo* hprt mutations in human T-lymphocytes, II Demonstration of a clonal amplification of hprt mutant T-lymphocytes *in vivo*, *Environ. Mol. Mutagen.*, **12**, 271-281.
- Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus and A. Lanzavecchia (1993) Expression of two T cell receptor  $\alpha$  chains: dual receptor T cells, *Science*, **262**, 422-424.
- Perera, F. P. and R. M. Whyatt (1994) Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/cancer research, *Mutat. Res.*, **313**, 117-129.
- Peterson, R. D. A., W. D. Kelly and R. A. Good (1964) Ataxia telangiectasia, its association with a defective thymus, immunological-deficiency disease and malignancy, *Lancet*, **i**, 1189-1193.
- Peterson, R. D. A. and J. D. Funkhauser (1989) Speculations on ataxia-telangiectasia: defective regulation of the immunoglobulin gene superfamily, *Immunol. Today*, **10**, 313-315.
- Umeki, S., S. Kyoizumi, Y. Kusunoki, N. Nakamura, S. M. Sasaki, T. Mori, Y. Ishikawa, J. B. Cologne and M. Akiyama (1991) Flow cytometric measurements of somatic cell mutations in Thorotrast patients, *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1349-1353.
- Umeki, S., Y. Kusunoki, K. Endo, K. Ohama, T. Kodama, M. Yamakido and M. Akiyama (1992) Somatic mutation at the TCR loci as a biological dosimeter of radiation-exposed people. In: International Conference on Radiation Effects and Protection, Tokyo. Japan Atomic Energy Research Institute: pp. 151-154.
- 梅本繁子 (1994) フローサイトメトリーによる T 細胞抗原受容体遺伝子を指標とした体細胞突然変異に関する研究, *広島大学医学雑誌*, **42**, 249-264.

# 水道水中有機塩素化合物のヒト細胞に対する DNA 損傷性の評価

## DNA strand breaks in human cells induced by chlorinated organo compounds containing in tap water

川西 優喜<sup>1</sup>, 松田 知成<sup>1</sup>, 八木 孝司<sup>2</sup>, 武部 啓<sup>2</sup>, 松井 三郎<sup>1</sup>

Masanobu Kawanishi<sup>1</sup>, Tomonari Matsuda<sup>1</sup>, Takashi Yagi<sup>2</sup>,  
Hiraku Takebe<sup>2</sup> and Saburo Matsui<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 京都大学工学部環境質制御研究センター 520 大津市由美浜 1-2

<sup>2</sup> 京都大学医学部放射線遺伝学教室 606-01 京都市左京区吉田近衛町

<sup>1</sup> Research Center for Environmental Quality Control, Faculty of Engineering, Kyoto University, Yumihama 1-2, Otsu, 520 Japan

<sup>2</sup> Department of Radiation Genetics, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-01 Japan

(受付: 1995 年 6 月 29 日; 受理: 1995 年 8 月 30 日)

### Summary

Thirteen chlorinated organo compounds were added to the Standard of Tap Water Quality in 1993 in Japan. We assessed the DNA strand breaks in human cells induced by eleven these chlorinated chemicals, using the FADU (fluorometric Analysis of DNA Unwinding) method. We estimated DNA strand breaks in SV40-transformed human fibroblast cells, WI38-VA13 which were exposed to the chemicals for one hour, followed by incubation for three hours in MEM medium containing 10% serum, 10  $\mu$ M arabinofuranosyl cytosine and 2 mM hydroxyurea. DNA strand breaks were induced by 1,2-dichloroethane and 1,3-dichloropropene. The activity which induced the strand breaks was increased when 1,2-dichloroethane was activated by S-9mix. DNA strand breaks were not induced by 1,2-dichloroethane in SV40 transformed xeroderma pigmentosum cells XP2OS(SV). These findings suggest that the DNA damage induced by 1,2-dichloroethane might be repaired in excision repair processes which xeroderma pigmentosum cells lack.

**Keywords:** chlorinated organo compounds, DNA strand breaks, human fibroblast cells

### 緒言

水道法第 4 条に基づく水道水質基準が、平成 4 年 12 月 21 日公布、平成 5 年 12 月 1 日施行の省令により改正され、新たに 13 種類の有機塩素化合物が健康に関連する項目として追加された (Table 1)。

これらの物質は原核生物や実験動物などでは変異原性が確認されているが、ヒトに対する影響はよくわかっていない (Table 2) (IARC Monographs, 1987; 1991)。そこで今回私たちはこれらの物質のヒト線維芽細胞に対する DNA 損傷性

を、アルカリ巻戻し法の 1 つである FADU 法 (Fluorometric Analysis of DNA Unwinding) (Birnbom and Jevak, 1981) を用いて、DNA 鎖切断を検出することによって評価した。

FADU 法の原理を Fig. 1a に示した。DNA をアルカリ変性させると、切断のない DNA は両端からのみ変性が始まり両端だけが 1 本鎖になるのに対し、切断のある DNA では切断点からも変性が始まるため 1 本鎖の部分は DNA 鎖切断の数に依りて多くなる。一定時間経過したところで pH を調整してアルカリ変性を止め、超音波で DNA

Table 1. Thirteen chlorinated organocompounds which were newly added to Water Quality Standard.

Chemicals	Standard	Chemicals	Standard
Carbon tetrachloride	≤0.002 mg/l	Trichloroethylene	≤0.03 mg/l
1,2-Dichloroethane	≤0.004 mg/l	Chloroform	≤0.06 mg/l
1,1-Dichloroethylene	≤0.02 mg/l	Chlorodibromomethane	≤0.1 mg/l
Dichloromethane	≤0.02 mg/l	Bromodichloromethane	≤0.03 mg/l
cis-1,2-Dichloroethylene	≤0.04 mg/l	Bromoform	≤0.09 mg/l
Tetrachloroethylene	≤0.01 mg/l	1,3-Dichloropropene	≤0.002 mg/l
1,1,2-Trichloroethane	≤0.006 mg/l		

を短い断片にする。このとき DNA 鎖切断数が多いと 2 本鎖 DNA の割合が減少し 1 本鎖 DNA の割合が多くなる。次に臭化エチジウムを加え、蛍光を測定する。臭化エチジウムは 2 本鎖 DNA の量に対応した強さの蛍光を発するので、測定される蛍光を比較することにより 2 本鎖 DNA の量が求まり、従ってもとの DNA が持っていた切断の多寡が求まる。

13 種類の有機塩素化合物のうち低沸点のため試験に用いなかった dichloromethane [1665-00-5] と 1,1-dichloroethylene [75-35-4] を除く 11 種類の物質について FADU 法を適用した。その結果 1,2-dichloroethane [107-06-2], 1,3-dichloropropene [542-7-6] の 2 物質がヒト細胞に濃度依存的な DNA 鎖切断を誘起することがわかった。更に 1,2-dichloroethane が引き起こす DNA 損傷は DNA 修復を欠損する色素性乾皮症 (XP) 細胞での試験結果との比較から除去修復機構で修復されることが示唆された。

## 実験材料および方法

## 1. 細胞株

ヒト繊維芽細胞 WI38-VA13

SV40 で形質転換したヒト繊維芽細胞株 WI38-VA13 を用いた。(Girardi, Jensen and Korpowski, 1965)

色素性乾皮症 (XP) (相補性 A 群) 患者由来の  
繊維芽細胞 XP2OS(SV)

XP2OS は7才の日本人の女性である。XP2OS (SV) はXP2OSの皮膚繊維芽細胞をSV40で形質転換した細胞株である (Yagi and Takebe, 1983).

細胞は Dulbecco 改変 MEM 培養液に仔牛血清を 10% (v/v) 加えた培養液中で培養した。

## 2. 試料の作成

各種有機塩素化合物は和光純薬から購入した。これらをそれぞれ dimethyl sulfoxide (DMSO) [67-68-5] に溶解し、各濃度の有機塩素化合物溶液を作成した。この溶液を無血清 MEM 培養液または S-9 mix に、溶液が 1% (v/v) となるように溶解し試料とした。

### 3. 試料の曝露

前日にガラスシャーレ ( $\phi 60$  mm) 当り  $1.1 \times 10^6$  個ずつ細胞を撒き、10% 血清入りの MEM 培養液で一晩培養した。有機塩素化合物への曝露は試料 5 ml で細胞を  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間処理することによって行った。細胞は試料を除去した後、りん酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、DNA 修復過程での DNA 合成を阻害するため、araC-HU 培養液 (10% (v/v) 仔牛血清,  $10\mu\text{M}$  arabinofuranosyl cytosine, 2 mM hydroxyurea を含む Dulbecco 改変 MEM 培養液) を加え、 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  の条件下で 3 時間培養した。この処理をすることにより化学物質が直接 DNA を切断する場合だけでなく、DNA 付加体を生じるような場合も、それが細胞の修復系で認識・切断されるなら、DNA 鎖切断として併せて検出できる。続いて PBS で一回洗い、トリプシン-EDTA 溶液でシャーレから細胞を回収し、できるだけ速やかに FADU を行った。

#### 4. FADU 法

本実験では Birnboim と Jevcak ら (1981) による方法を改良した FADU 法 (松田ら, 1993) で DNA 鎖切断数を定量した。

Table 2. Genetic and related effects of chlorinated chemicals.

[illegible]

Pro<sup>a</sup>: Prokaryotes, L-eu<sup>b</sup>: Lower eukaryotes.

A: aneuploidy, C: chromosomal aberrations, D: DNA damage, DL: dominant lethal mutation, G: Gene mutation, I: inhibition of intercellular communication, M: micronuclei, R: mitotic recombination and gene conversion, S: sister chromatid exchange, T: cell transformation.  
 + : considered to be positive for the specific endpoint and level of biological complexity.

+: considered to be positive for the specific endpoint and level of biological complexity.

+<sup>1</sup>: considered to be positive, but only one valid study was available to the Working Group.

—: considered to be negative.

—<sup>1</sup>: considered to be negative, but only one valid study was available to the Working Group.

?: considered to be equivocal or inconclusive.

\*: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 6 (1987).

\*\* IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 52 (1991).

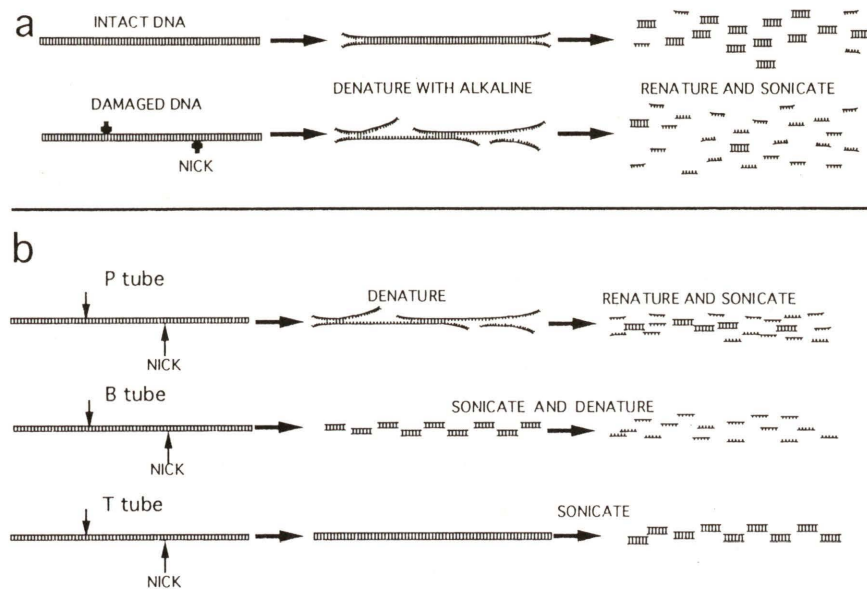


Fig. 1. Principle of FADU.

#### 試薬

A液; 9M urea, 10mM NaOH, 2.5mM cyclohexane diaminetetraacetic acid, 0.1% SDS

B液; 0.2 N NaOH と A 液を 11.5 : 8.5 の割合 (v/v) で混ぜたもの。

C液; 1 M glucose, 14mM mercapethanol

D液; 2  $\mu$ g/ml ethidium bromide, 13.3 mM NaOH

#### 方法

回収した細胞浮遊液を 0.2 ml ずつ 3 種類の試験管に分注した。これらを便宜上 P 試験管, B 試験管, T 試験管とする。各種類 2 本ずつの試験管を用い, これらの平均値を結果とした。各々の試験管に 0.2 ml の A 液を加え, 0°C で 10 分間静置し, 細胞を溶解させた。次に P 試験管と B 試験管に 0.2 ml の氷冷した B 液を加え DNA の変性を開始した。P 試験管は 0°C で 30 分間, その後 28°C で 45 分間静置した後, 0.4 ml の氷冷した C 液を加え変性を止め, 超音波処理により平均 1 kbp ぐらいまで DNA をせん断した。B 試験管は B 液を加えた後超音波処理して 60°C で 60 分間静置し完全に DNA を変性させた。その後 P 試験管と条件を揃えるため 0.4 ml の C 液を加えた。T 試験管は A 液を加え 10 分間静置した後, B 液 0.2

ml と C 液 0.4 ml をあらかじめ混ぜ合わせた液を加えて超音波処理をした。その後全ての試験管に 1.5 ml の D 液を加え, 蛍光分光光度計で蛍光を測定した (励起波長: 520 nm, 測定波長: 590 nm)。

ここで, P 試験管はまだアルカリ変性がおよんでいない部分の DNA による蛍光を, B 試験管はバックグラウンドの蛍光を, T 試験管はもとの細胞浮遊液に含まれる 2 本鎖 DNA による蛍光を与えている。従って (P 試験管の蛍光 - B 試験管の蛍光) は, 変性しなかった 2 本鎖 DNA の量を, (T 試験管の蛍光 - B 試験管の蛍光) はもとの細胞浮遊液の 2 本鎖 DNA の量を表わしている (Fig. 1b)。

$\%D = (P \text{ 試験管の蛍光} - B \text{ 試験管の蛍光}) / (T \text{ 試験管の蛍光} - B \text{ 試験管の蛍光})$  とすると, 変性した DNA 量は切断点数と相関しているので, DNA 切断数が多いほど  $\%D$  は小さくなる。

化学物質に曝露した細胞の  $\%D$  から無処理細胞の  $\%D$  を差し引き,  $\Delta D$  とした。

線量当りの DNA 鎖切断数が既知の  $\gamma$  線を細胞に照射し,  $\Delta D$  と切断数の関係も求め, これを検量線として,  $\Delta D$  を DNA 鎖切断数に換算した。

#### 結果および考察

各種有機塩素化合物 (最高 2000 (v/v) ppm) にヒト線維芽細胞 WI38-VA13 を S-9 mix 添加および非添加の 2 条件下で曝露し, DNA 鎖切断を測定した。その結果 1,2-dichloroethane と 1,3-dichloropropene で濃度依存的な DNA 鎖切断が観察された (Figs. 2, 3)。1,2-dichloroethane は S-9 mix の添加で活性化された。その他の物質では DNA 鎖切断の濃度依存性は確認できなかった (data not shown)。これらはそれぞれ独立した 1 回の実験で得られた知見である。また実験毎の 0 dose の切断数は, 0.05-0.5 strand breaks/10,000 kbp の範囲でばらついた。

つぎに 1,2-dichloroethane が引き起こす DNA 鎖切断について詳しく調べた。WI38-VA13 を 1,2-dichloroethane (+S-9mix) に曝露後 araC-HU 培地で培養した細胞と, 曝露後通常の培地で培養した細胞で観察される DNA 鎖切断量を比較した (Fig. 4)。その結果前者の DNA 鎖切断量が多かった。これは観察された DNA 鎖切断が DNA 修復の過程で生じたものであることを示唆している。

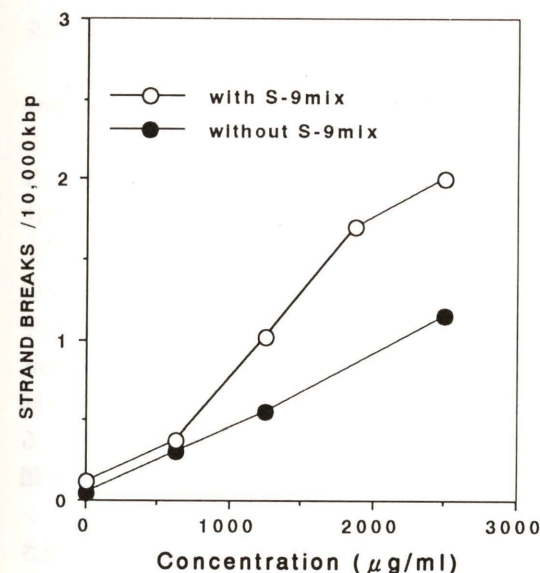


Fig. 2. 1,2-Dichloroethane-induced DNA strand breaks in the human fibroblast cells WI38-VA13.

Closed circle: without S-9mix activation, open circle: with S-9mix activation.

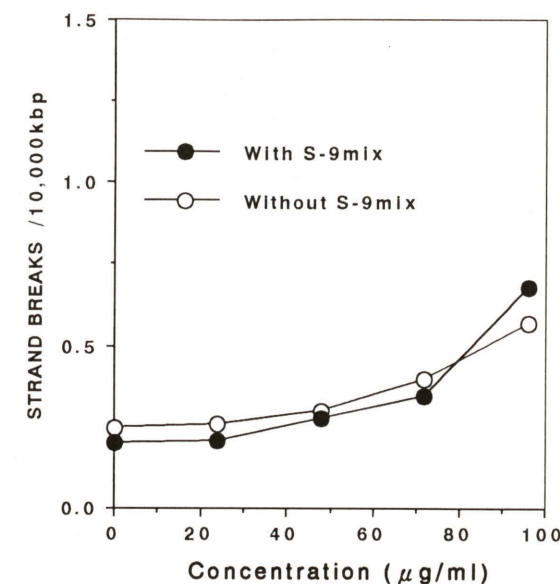


Fig. 3. 1,3-Dichloropropene-induced DNA strand breaks in the human fibroblast cells WI38-VA13.

Closed circle: with S-9mix activation, Open circle: without S-9mix activation.

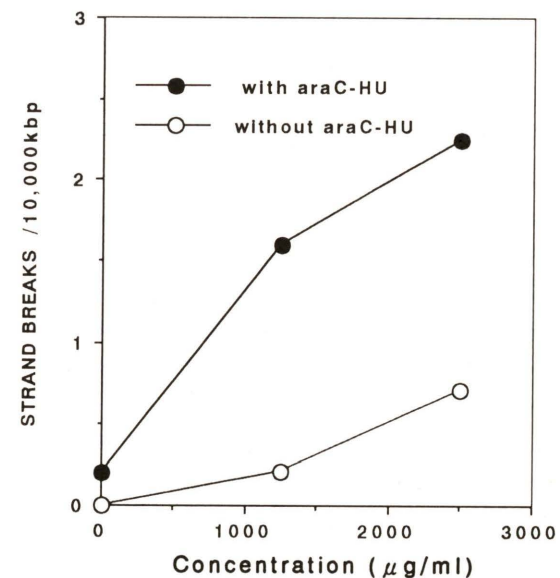


Fig. 4. 1,2-Dichloroethane-induced DNA strand breaks. After exposure to 1,2-dichloroethane with S-9mix, cells were incubated for 3 hr in medium with (●) or without (○) 10  $\mu$ M arabinofuranosyl cytosine and 2 mM hydroxy-urea.

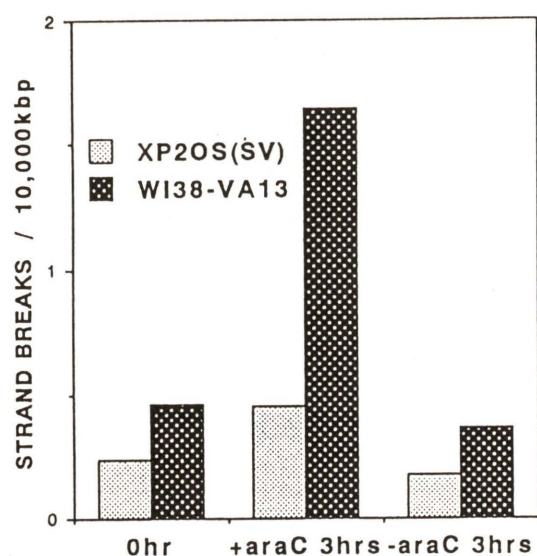


Fig. 5. 1,2-Dichloroethane (2000 (v/v) ppm, with S-9mix)-induced DNA strand breaks in normal human cells (WI38-VA13) and XP cells (XP2OS (SV)).

0hr: DNA strand breaks detected just after 1 hr-exposure to 1,2-dichloroethane. +araC 3 hrs: DNA strand breaks detected after 3 hr-incubation in araC-HU medium following 1 hr-exposure to 1,2-dichloroethane. -araC 3 hrs: DNA strand breaks detected after 3 hr-incubation in normal medium following 1 hr-exposure to 1,2-dichloroethane.

すなわち 1,2-dichloroethane による DNA 損傷は DNA 修復の対象となることがわかった。

さらに 1,2-dichloroethane で観察される DNA 鎖切断を除去修復系を欠損する細胞 XP2OS (SV) と正常の WI38-VA13 で比較した (Fig. 5). 試料曝露後 araC-HU を加え修復過程での DNA 鎖切断を蓄積させた細胞で観察される DNA 鎖切断量は正常細胞のほうが XP 細胞に比べて著しく多い。これは 1,2-dichloroethane による DNA 損傷が、XP2OS (SV) が欠く除去修復機構で修復されることを示唆している。XP (相補性 A 群) 患者は 1,2-dichloroethane による DNA 損傷を修復できないことが予想されるが、この点についてはさらなる検討が必要である。

1,2-dichloroethane の細胞内での変異原性獲得に関しては glutathione S-transferase による glutathione conjugation で half-sulfur mustard (2-chloro-

ethyl 2-hydroxyethyl sulfide) になるか、microsomal oxidation により 2-chloroacetaldehyde になる 2つの代謝経路が知られている。half-sulfur mustard は guanine の 7 位に結合して 7-(2-hydroxyethyl thioethyl)guanine を生じる (Guengerich *et al.*, 1980; Van Bladeren *et al.*, 1981). 2-chloroacetaldehyde は adenine, cytosine および guanine と直接反応し cyclic etheno adduct を形成する (Fedtke *et al.*, 1990).

1,2-dichloroethane による DNA 鎖切断の誘起が S-9mix の添加で顕著になったことと XP 細胞を用いた実験の結果より、7-(2-hydroxyethyl thioethyl)guanine, あるいは cyclic etheno adduct は除去修復系で修復される可能性があることがわかる。ところで 2-chloroacetaldehyde の XP 細胞での突然変異率をシャトルベクターを用いて調べたところ、正常細胞との差は認められなかった (Matsuda *et al.*, in press). これらの結果は cyclic etheno adduct ではなく 7-(2-hydroxyethyl thioethyl)guanine が除去修復の対象となっていることを示唆している。

以上まとめると、水道水質基準改正に伴い新たに基準に加えられた 13 種類の有機塩素化合物の内 11 種類のヒト細胞に対する DNA 損傷性を DNA 鎖切断を検出することによって評価した。

その結果 1,2-dichloroethane と 1,3-dichloropropene が濃度依存的な DNA 鎖切断を誘起した。しかしその他の化合物は DNA 鎖切断を誘起しなかった。過去のヒト細胞を用いた文献データと比較すると (Table 2), 1,2-dichloroethane は遺伝子突然変異を、1,3-dichloropropene は DNA 損傷を引き起こすことが知られており、我々の結果と矛盾しない。bromodichloromethane, bromoform, chlorodibromomethane, trichloroethylene はヒト細胞に SCE (sister chromatid exchange) を誘発することが知られているが、我々の実験では DNA 鎖切断は検出できなかった。SCE はマイトマイシン C をはじめとするクロスリンク剤によって誘発されることが知られており、もしこれらの物質がクロスリンクを引き起こしているとするれば、FADU ではクロスリンク剤が存在すると、DNA 鎖切断の検出感度が著しく減少するため、今回のような

結果もありうる。

1,2-dichloroethane は S-9mix で代謝活性化され 1,2-dichloroethane による DNA 損傷は除去修復の対象となることが示唆された。

いずれの実験結果も水質基準の 1 万倍以上の濃度のものであるので、基準値程度の濃度での影響を評価するには、さらなる研究が必要である。

## 参考文献

- Birnboim, H. C. and J. J. Jevcak (1981) Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation, *Cancer Res.*, **41**, 1888-1892.
- Fedtke, N., J. A. Boucheron, M. J. Turner Jr and J. A. Swenberg (1990) Vinyl chloride-induced DNA adducts. I: Quantitative determination of N<sup>2</sup>,3-ethenoguanine based on electrophore labeling, *Carcinogenesis*, **11**(8), 1279-1285.
- Girardi, A. J., F. C. Jensen and H. Koprowski (1965) SV 40-induced transformation of human diploid cells: crisis

and recovery, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **65**, 69-84.

Guengerich, F. P., W. M. Crawford Jr, J. Y. Domoradzki, T. L. Macdonald and P. G. Watanabe (1980) *In vitro* activation of 1,2-dichloroethane by microsomal and cytosolic enzymes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 303-317.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1987) Suppl. 7.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1991) Vol. 52.

松田知成, 八木孝司, 武部 啓, 松井三郎 (1993) FADU 法による環境微量汚染物質の DNA 損傷性の評価, *環境工学研究論文集*, **30**, 227-233.

Van Bladeren, P. J., D. D. Breimer, G. M. T. Rottevel-smiz, P. de Knijff, G. R. Mohn, B. van Meeterenwalchil, W. Buijjs and A. van der Gen (1981) The relation between the structure of vicinal dihalogen compounds and their mutagenic activation via conjugation to glutathione, *Carcinogenesis*, **2**, 449-505.

Yagi, T. and H. Takebe (1983) Establishment by SV40 transformation and characteristics of a cell line of xeroderma pigmentosum belong to complementation group F, *Mutat. Res.*, **112**, 59-66.

## 屋内プール水の変異原性

### Mutagenic activity of indoor swimming pool water

斎藤 治子, 磯田 信一, 加藤美津子, 長岡 登

Haruko Saito, Shinichi Isoda, Mitsuko Kato and Noboru Nagaoka

横浜市衛生研究所 環境衛生課  
235 横浜市磯子区滝頭 1-2-17

Division of Environmental Hygiene, Yokohama city Institute of Health,  
1-2-17 Takigashira, Isogo-ku, Yokohama 235, Japan

(受付: 1995 年 6 月 30 日; 受理: 1995 年 8 月 25 日)

#### Summary

Organic compounds accumulate more easily in indoor swimming pool water than in drinking water. It is assumed that indoor swimming pool water might be contaminated with higher amounts of chlorinated by-products, and therefore mutagenic activity would be higher too, compared to drinking water, because of continuous chlorination. Therefore, we tried to detect mutagenic activity in four samples of indoor swimming pool water and in chlorinated organic compounds, using the Ames test, and analyzed the relationships between them. We also analyzed each sample of swimming pool water for quality. Each sample of swimming pool water was passed through an XAD-4/8 resin column followed by elution with ethylacetate. Standard substances, detected in swimming pool water which we used the following seven chemicals: MX, monochloroacetic acid, dichloroacetic acid, trichloroacetic acid, dibromoacetic acid, dichloroacetonitrile and chloral hydrate. These compounds were used for the Ames test employing *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains, following pre-incubation in the presence or absence of S9mix. The highest mutagenicity of 24000-79000 rev./l was found in the sample of indoor swimming pool water with TA100-S9. Among the chlorinated organic compounds, MX had the highest mutagenicity of 60 rev./ng, followed by dichloroacetonitrile, then dibromoacetic acid. Monochloroacetic acid, trichloroacetic acid and chloral hydrate were negative.

The fraction of total mutagenic activity in swimming pool water attributable to chlorinated by-products was about 10%.

**Keywords:** indoor swimming pool water, mutagenic activity, chlorinated by-products, MX, halogenated compounds

#### 緒言

近年の健康ブームを反映して、乳幼児から高齢者まで、屋内プールの利用が盛んである。このような屋内プールの維持管理は、「遊泳用プールの衛生基準」(厚生省)に基づいて行われている。しかし、年間を通じて利用されるため、経済性等を考慮して、屋内プール水の換水は年一回程度のところが多く、補給水と、濁質を除去するための循環ろ過装置を用いて水質管理を行っているのが

現状である。このため、循環ろ過装置の維持管理や、補給水が適正に保たれないと衛生基準を上回る施設もでてくる(斎藤ら, 1990)。

一方、プール水は、この衛生基準に基づき塩素剤による消毒を行っている。屋内プール水は、水道水に比較して有機物量が多く、また、継続的に塩素処理されていることから、有機物と塩素の反応によって多数の消毒副生成物が生ずることが報告されている(Rook, 1974; Beller *et al.*, 1974; 杉

野ら, 1993; 健名ら, 1991; Erdinger *et al.*, 1990; 磯田ら, 1995). その中には水道水中に検出された MX (Hemming *et al.*, 1986; Meier *et al.*, 1987a; 磯田ら, 1994) も含まれる。

これらのうち、ハロ酢酸やハロアセトニトリルなどの水溶性消毒副生成物に関する発がん性や変異原性についての報告には次のようなものがある: Bull, 1985; Herren-Freund, 1987; Meier *et al.*, 1985; Simmon *et al.*, 1977; Horth, 1989; Waskell, 1978; 鶴川ら, 1988.

一方、屋内プール水の変異原性を直接調べた報告は極めて少なく、Whong *et al.* (1983) が *Salmonella typhimurium* SV50 を用いて、また、Honer *et al.* (1980) が TA100 を用いて行った結果を報告しており、国内においては後藤ら (1994) の報告があるのみである。

以上のことから、屋内プール水中の消毒副生成物の実態を把握し、その健康影響リスク評価について考えておく必要があると考えた。その第一歩として、屋内プール水の変異原性を検討した。併せて消毒副生成物を測定し、屋内プール水の変異

原性に対する消毒副生成物の寄与率がどの程度であるかを検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 試料の採取及び調製

試料: 平成5年6月及び12月の2回に分けて、横浜市内の屋内プール4施設より、プール水を30L採取した。Table 1 に施設の概要を示した。また、試験水は、プールのほぼ中央より採取した。

変異原性試験及びMX分析に供するための試料の調製は、Fig. 1 に示す濃縮フローに従って行った。

試薬: 試験に使用した試薬は以下のとおりである。

- 1) 塩酸: 和光純薬工業: 有害金属測定用
- 2) 精製アンバーライト XAD-4/8: ガスクロ工業
- 3) Ethyl acetate (酢酸エチル; CAS No. 141-78-6): 関東化学; 残留農薬用
- 4) Dimethylsulfoxide (DMSO; CAS No. 67-68-5): 和光純薬工業: 生化学用

Table 1. The outline of 4 indoor swimming pools employed in this study.

Pool	Water volume m <sup>3</sup>	Method of water filtration	Further treatment	Numbers of swimmers No./month	Suppling water volume m <sup>3</sup> /month	Substance used for chlorination
A	300	Sund	Yes	10367	480	NaClO
B	243	Cartridge	No	1000	243	NaClO
C	390	Sund	No	900	1600	NaClO
D	390	Cartridge	No	7924	400	NaClO

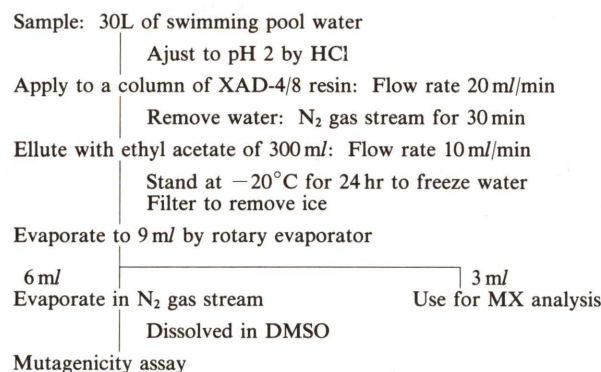


Fig. 1. Extraction and concentration of chlorinated by-products from swimming pool water for mutagenicity assay and MX analysis.

- 5) 3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX; CAS No. 77439-76-0): Ultra Fine Chemical
- 6) Monochloroacetic acid (MCAA; CAS No. 79-11-8): Aldrich: 特級
- 7) Dichloroacetic acid (DCAA; CAS No. 79-43-6): 和光純薬工業: 1 級
- 8) Trichloroacetic acid (TCAA; CAS No. 76-03-9): 和光純薬工業: 特級
- 9) Dibromoacetic acid (DBAA; CAS No. 631-64-1): 関東化学: 特級
- 10) Dichloroacetonitrile (DCAN; CAS No. 3018-12-0): Aldrich: 特級
- 11) Chloral hydrate (CH; CAS No. 302-17-0): 和光純薬工業: 特級
- 12) 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2; CAS No. 3688-53-7): 和光純薬工業: 特級
- 13) 2-aminoanthracene (2-AA; CAS No. 613-13-8): 和光純薬工業: 特級
- 14) ニュートリエントブロス No. 2 (N.B.#2): Oxoid
- 15) エームス試験培地: クリメディア AM-N; 三光純薬
- 16) S9: キッコマン: phenobarbital 及び 5,6-benzoflavone の腹腔内投与による誘発ラット肝ホモジネート
- 17) コファクター: オリエンタル酵母

### 2. 水質試験

「遊泳用プールの衛生基準」(厚生省) に定める水質基準項目 (pH, 濁度, 過マンガン酸カリウム消費量, 硬度, 残留塩素) について水質試験を行

うと共に、全有機炭素 (TOC) 及び全有機ハロゲン化合物 (TOX) についても測定した。

また、ハロ酢酸類 (5 物質)、ハロアセトニトリル類 (5 物質) 等の消毒副生成物については、上水試験法 (1993) に従って、電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフィー (ECD-GC) 及びガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) を用いて測定した。

MX の定量については、高分解能 GC/MS-SIM を用いる、磯田ら (1994) の方法によった。

### 3. 変異原性試験

屋内プール水及び MX, MCAA, DCAA, TCAA, DBAA, DCAN, CH の 7 物質について変異原性試験を行った。

試験に用いた物質の純度等は Table 2 に示したとおりである。試験時、DMSO に溶解し、変異原性試験に供した。

変異原性試験は労働省の労働安全衛生法による変異原性試験 (1991) に準じたエームス法で行った。Salmonella typhimurium (S. typh.) TA98 及び TA100 菌株 (日本バイオアッセイ研究センター由来) を使用し、プレインキュベーション法で、S9 mix 無添加の方法 (直接法, 以下-S9) 及び S9mix を添加する方法 (代謝活性化法, 以下+S9) の 2 つの試験方法で行った。

陽性対照には AF-2, 2-AA を DMSO に溶解して使用した。

前培養は、培地には N.B.#2 を用い、S 字型振盪により行った。また、エームス試験用培地には、クリメディアを使用し、S9mix の調製は、S9 にコファクターを加え、用時調製した。

変異原性試験の結果の判定は労働安全衛生法に

Table 2. Chlorinated compounds used for identifying swimming pool water mutagens.

Substances	Company	Grade	Purity (%)
MX	Ultra Fine Chemical	Unknown	94.0
Monochloroacetic acid	Aldrich	Special	99.0
Dichloroacetic acid	Wako Pure Chemical	First	97.0-101.0
Trichloroacetic acid	Wako Pure Chemical	Special	99.0
Dibromoacetic acid	Kanto Chemical	Special	90.0
Dichloroacetonitrile	Aldrich	Special	98.0
Chloral hydrate	Wako Pure Chemical	Special	99.5

準じて、溶媒対照の2倍以上復帰コロニーが出現したとき試験陽性とし、かつ、量-反応性がある場合変異原性陽性とした。上述の条件にあてはまらないものは全て変異原性陰性と判定した。

また、変異原性陽性と判定したプール水及び消毒副生成物については、次に示す式により変異原活性を求めた。

$$V.A. = (S_v - N) / C_v$$

V.A.: 試験水量当たりの変異原活性値; rev./l

$S_v$ : 当該試験水量におけるコロニー数;  
rev./plate

$N$ : 陰性対照試験のコロニー数; rev./plate

$C_v$ : 当該試験水量; l/plate

$$W.A. = (S_w - N) / C_w$$

W.A.: 重量当たりの変異原活性値; rev./mg

$S_w$ : 当該濃度におけるプレート当たりのコロニー数; rev./plate

$N$ : 陰性対照試験のコロニー数; rev./plate

$C_w$ : 当該濃度; mg/plate

## 結 果

### 1. 水質試験結果

調査した4施設の屋内プールは市内の平均的な規模の施設 (Table 1) で、水量や消毒用塩素剤に大きな差はなかった。しかし、水処理のための濾過方法はA及びC施設では砂濾過を採用していたが、B及びD施設ではカートリッジによる濾過処理を行っていた。

水質試験結果の概要は Table 3 に示したとおりである。残留塩素濃度はB及びC施設で高く、水質管理目標値の1.0 mg/l の1.5倍程度であった。過マンガン酸カリウム消費量 ( $KMnO_4C$ ) は、水質基準値の12 mg/l を超えたのはD施設の15 mg/l のみであった。基準値はかろうじて超えな

かったが、B施設 (11 mg/l) がこれに続いた。他の2施設は基準値の半分以下の濃度であった。

TOC 及び TOX 濃度は、 $KMnO_4C$  とほぼ比例する傾向で、D 及び B の施設が高かった。

プール水から検出された消毒副生成物は、MX, MCAA, DCAA, TCAA, DBAA, DCAN 及び CH であった。このうち、最も高濃度に検出されたのは、TCAA であり、次いで CH であった。

MX は高感度の測定法を用いて定量したところ、27-71 ng/l の濃度レベルで、B 施設が最も高かった。

### 2. 屋内プール水の変異原性試験結果

屋内プール水の変異原性試験の結果を Fig. 2 に示した。変異原性陽性を示したのものについて、試験水量 1l 当たりの変異原活性値を求め、Table 4 に示した。

この結果、A 施設から得た試料の TA98+S9 の場合を除き、他の全てにおいて変異原性が認められた。また、変異原活性値は TA98 よりも TA100 を用いた場合に高く、かつ、-S9 の条件下でより高い値が得られた。即ち、いずれの施設からの試料においても、TA100-S9 の条件で最も高い変異原活性値が得られた。また、変異原活性値を比較すると、B 施設及び D 施設からの試料が高い値を示した。TA100+S9 においては、B 施設が最も高く、A そして D 施設と続いた。一方、TA98-S9 では、B 施設が最も高い値を示した。今回の試験結果では、TA98 に対する+S9 が最も低い変異原活性値を示した。

### 3. 消毒副生成物の変異原性試験結果

屋内プール水中に検出された7種の消毒副生成物について、変異原性の認められた物質の重量当

Table 3. Results of swimming pool water chemical quality analysis.

Pool	ClO <sup>-</sup> mg/l	KMnO <sub>4</sub> C <sup>a</sup> mg/l	TOC mg/l	TOX mg/l	MX ng/l	MCAA mg/l	DCAA mg/l	TCAA mg/l	DBAA mg/l	DCAN mg/l	CH mg/l
A	1.0	5	3.08	0.34	26.6	0.002	0.016	0.057	<0.001	0.022	0.110
B	1.5	11	9.92	2.64	71.1	0.011	0.117	1.200	<0.001	0.021	0.260
C	1.5	5	4.86	0.50	41.1	0.002	0.021	0.135	0.001	0.005	0.198
D	0.7	15	11.4	1.73	33.4	0.015	0.175	0.451	0.001	0.018	0.332

<sup>a</sup>  $KMnO_4$  Consumed.

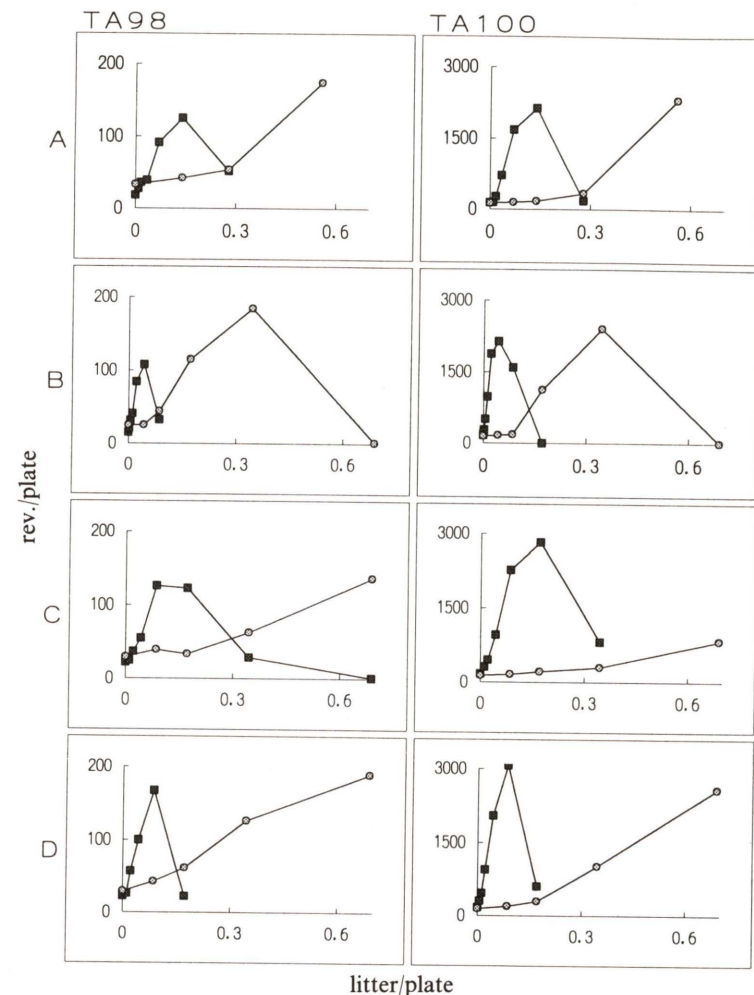


Fig. 2. Mutagenic activity of swimming pool water from 4 sites; with (—○—) or without (—■—) S9mix using TA98 and TA100.

Table 4. Mutagenic activity of water samples from swimming pool. (rev./l)

Pool	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
A	1000	— <sup>a</sup>	24000	4000
B	3200	520	79000	6500
C	1200	160	24000	1000
D	1800	280	44000	3500

<sup>a</sup> Negative.

たりの変異原活性値を求め、Table 5 に示した。7物質の内、変異原性が認められたのは、MX, DCAA, DBAA 及び DCAN の4物質であった。MCAA 及び TCAA は、菌に対する生育阻害 (killing) は示したが、変異原性は示さなかった。

MX は、TA98 及び TA100 を用いた-S9 で変異原性が認められた。他の消毒副生成物に比較して最も高い変異原活性値が得られ、TA98 では  $5 \times 10^6$  rev./mg を示し、TA100 では  $6 \times 10^7$  rev./mg を示した。しかし、両菌株共に、+S9 では変異原性を示さなかった。

DCAA は、TA100-S9 でのみ変異原性が認められた。DBAA は、TA100 を用いた場合、変異原性が認められた。DCAN は、TA98 を用いた場合、-S9 で変異原性が認められたが、+S9 では変異原性を示さなかった。TA100 を用いた場合は、+S9 及び-S9 で変異原性が認められた。

Table 5. Mutagenic activity of reference chlorine-containing substances.

Substance	TA98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
MX	$5 \times 10^6$ (0.027 $\mu\text{g/p}$ ) <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>	$6 \times 10^7$ (0.005 $\mu\text{g/p}$ )	—
MCAA	—	—	—	—
DCAA	—	—	140 (2560 $\mu\text{g/p}$ )	—
TCAA	—	—	—	—
DBAA	—	—	440 (640 $\mu\text{g/p}$ )	330 (640 $\mu\text{g/p}$ )
DCAN	110 (313 $\mu\text{g/p}$ )	—	1300 (156 $\mu\text{g/p}$ )	1400 (313 $\mu\text{g/p}$ )
CH	—	—	—	—

<sup>a</sup> Minimum positive concentration.<sup>b</sup> Negative.

## 考 察

### 1. 屋内プール水の変異原性の特徴

Whong *et al.* (1983) は *S. typh.* の SV50 を用いてプール水の変異原性について報告しており、-S9 では変異原性を認めた。また、Honer *et al.* (1980) は、TA100 を用いてプール水の変異原性を報告している。彼等は、濃縮に XAD-2 樹脂を用い、試料を酸性条件下で吸着させ、ether あるいは acetone で溶離している。acetone 溶離試料の場合、変異原活性値は -S9 で 18000 rev./l、+S9 では 7400 rev./l であった。この結果は、筆者らの結果とほぼ一致している。

一方、これまでプール水の TA98 に対する変異原性の報告はないが、中室ら (1992) は、水道水について、XAD-2 に吸着後、dichloromethane 溶離試料で、TA98 の + 及び -S9 においても変異原性が示されたと述べている。プール水についての TA98 を用いた我々の結果は新しい知見であり、同様に塩素処理を行っている水道水についての上記の報告と矛盾しない。

プール水の変異原性と水質測定結果を比較すると、4 施設のプール水の中で、 $\text{KMnO}_4$ 、TOC 及び TOX で示される有機物、また、消毒副生成物の MX、DCAA、TCAA 及び CH の高かった B 及び D 施設において、プール水の変異原性も高かった。このことは、プール水の変異原性は有機物質や消毒副生成物の濃度と係わりの強いことを示唆していると考えられる。

また、プール水の変異原性は、塩基対置換型直接変異原性を有意に示すが、フレームシフト型直

接変異原性も示す特徴がある。

### 2. 消毒副生成物の変異原性試験

1) MX について、Meier *et al.* (1987a; 1987b) の報告では、TA98-S9 における重量当たりの変異原活性値は  $9 \times 10^6$  rev./mg であり、TA100-S9 では  $6 \times 10^7$  rev./mg 及び  $6.4 \times 10^7$  rev./mg であった。しかし、Backlund *et al.* (1989)、Ishiguro *et al.* (1988)、Kronberg *et al.* (1988) の報告では、TA100-S9 で、それぞれ  $2.9 \times 10^7$  rev./mg、 $2.6 \times 10^7$  rev./mg、 $2.6 \times 10^7$  rev./mg と Meier *et al.* の値の約半分程度であった。筆者らの結果は Meier *et al.* の値とよく一致していた。Meier *et al.* (1987b) は MX の変異原試験を Bio-His トップアガーの pH を変化させて行った結果、pH 7 では  $6.3 \times 10^7$  rev./mg となり、pH 8 においては、 $2.6 \times 10^7$  rev./mg であったと報告している。このことは、TA100-S9 における変異原性は、Bio-His トップアガーの pH によって変化すると考えられる。我々の用いたトップアガーは、pH 7.4 であった。

我々の実験においては、TA98 及び TA100 の +S9 の条件下で MX は変異原性陰性であった。Tikkanen *et al.* (1990) も TA98 の +S9 で変異原性を認めていない。他方、Meier *et al.* (1987b) 及び Ishiguro *et al.* (1988) は TA98 については陰性ではあるが、TA100 については変異原活性を認めている。この点については今後実験条件を変えるなどして追及していきたい。

2) クロロ酢酸の内、MCAA については、McCann *et al.* (1975) が、TA98 及び TA100 に對

する -S9 及び +S9 の全てにおいて変異原性陰性と報告しており、筆者等のデータと一致している。また、我々の行った全ての条件において、菌に対する作用濃度の公比を小さくしても、変異原性陽性になることなく、生育阻害を起こした。これは、MCAA に蛋白変性作用があるためと考えられる。

DCAA については、鶴川ら (1988) が、TA98 及び TA100 を用いた -S9 及び +S9 の全てにおいて変異原性陰性と報告している。これらは TA100-S9 の場合を除いて、筆者等のデータと一致した。我々の実験結果では、TA100-S9 の条件では変異原性陽性であったが、変異原活性値は 140 rev./mg と低かった。また、TA98-S9、+S9 及び TA100+S9 において変異原性が陰性となったのは、MCAA と同様、蛋白変性作用による影響が現れているためと考えられる。TCAA については、Waskell (1978) 及び鶴川ら (1988) は、TA98 及び TA100 を用いた -S9 及び +S9 において、筆者らの結果報告と同様に全て変異原性陰性と報告している。また、これらの結果は、MCAA と同様に、蛋白変性作用による影響が現れていると考えることができる。

以上のように、クロロ酢酸の場合、蛋白変性作用による影響が強く現れ、変異原性は陰性を示す結果となった。

3) DBAA については、他に報告例はなく、新しい知見と考えられる。我々の結果では、TA100-S9 及び +S9 に変異原性が認められたが変異原活性値は低く、-S9 で 440 rev./mg、+S9 で 330 rev./mg であった。このことは、DBAA は代謝の有無に関係なく塩基対置換型の弱い変異原性を有していると解釈される。

4) DCAN については、Meier *et al.* (1985) の報告があり、TA98-S9 及び TA100+S9 において変異原性陽性で変異原活性値はそれぞれ、26 rev./mg、850 rev./mg であった。これは筆者等の結果、TA98-S9 の 110 rev./mg 及び TA100-S9 の 1400 rev./mg よりも低い値である。Simmon *et al.* (1977) も、TA100-S9 において変異原性陽性と報告している。一方、TA98 及び TA100 の +S9 については、調べた限りでは報告はなかった。

5) CH について Waskell (1978) は、TA98-S9 及び +S9 においては、変異原性陰性と報告しており、筆者等の結果と一致した。しかし、彼等の報告では、TA100 の -S9 及び +S9 においては変異原性陽性となっている。しかし、その判定法は溶媒対照を超えたプレートのコロニー数から判断するものであり、筆者らの判定方法とは異なっている。そこで、実際のデータを筆者らの判定方法によって判定すると、変異原性陰性となった。

### 3. プール水の変異原性に対する消毒副生成物の寄与

屋内プール水の変異原性試験結果に与える、消毒副生成物の寄与率を次式により求めた結果を Table 6 に示した。

$$\text{寄与率 (\%)} = \Sigma (C_i \times SA_i) \times 100 / PA$$

但し、 $C_i$ : 試料中消毒副生成物濃度 (mg/l)

$SA_i$ : 消毒副生成物の重量当たりの変異原活性値 (rev./mg)

$PA$ : プール水の試験水量当たりの変異原活性値 (rev./l)

Table 6 より、屋内プール水の TA98-S9 に対する変異原性では 9.4-17.2% の範囲でプール水の変異原性に消毒副生成物が寄与していることが明らかになった。一方、TA98+S9 では、今回対象とした消毒副生成物 7 物質の変異原性が屋内プール水の変異原性に寄与していないことから、これら以外の物質によって変異原性がもたらされていると考えられる。また、最も高い変異原活性値を示した TA100-S9 では、寄与率は 4.7-10.3% であった。TA100+S9 では、消毒副生成物の寄与率が 0.5-0.7% と他の場合に比べて低い値であった。

以上の結果から、屋内プール水の変異原性に占

Table 6. Attributable rate of the chlorinated products in total mutagenic activity of swimming pool water. (%)

Pool	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
A	13.2	—	6.8	0.8
B	11.2	0	5.5	0.5
C	17.2	0	10.3	0.7
D	9.4	0	4.7	0.7

める塩素消毒副生成物の寄与率は、およそ10%程度であった。今後、調査物質の種類を増やし、プール水の変異原性に占める寄与率の高い物質を追及していきたい。

## 結 語

今回測定した7物質では、屋内プール水の変異原性に対する寄与を十分に解明するには至らなかった。しかし、プール水の変異原性を、消毒副生成物という視点から総合的に評価するための足掛かりが出来たと考える。

今後は、プール水中に存在する、これら今回対象とした消毒副生成物以外の塩素消毒による副生成物、あるいは消毒副生成物以外の化学物質のプール水の変異原性に対する寄与について検討していきたい。また、プール水の変異原性がプール水質、特に有機物質による汚濁との関係が示唆されたことから、試料数を増やし、これらの関係を明らかにして、水質管理のための一助としていきたい。

## 謝 辞

本研究に際して、ご協力いただきました、横浜市衛生局公衆衛生課並びに各保健所の皆様に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- Backlund, P., E. Wondergem, K. Voogd and A. De Jong (1989) Mutagenic activity and presence of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone (MX) in chlorinated raw and drinking waters in the Netherlands, *Sci. Total Environ.*, **84**, 273-282.
- Beller, T. A., J. J. Lichtenberg and R. C. Kromer (1974) Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters, *J. Am. Water Works Assoc.*, **66**, 703-706.
- Bull, R. J. (1985) Carcinogenic and mutagenic properties of chemicals in drinking water, *Sci. Total Environ.*, **47**, 385-413.
- Erdinger, L. and H. G. Stonntag (1990) Schwer-fluechtige halogenorganische verbindungen als neben-produkte der schwimmbadwasser-aufbereitung, *Forum Staedte-Hygiene*, **41**, 185-188.
- 後藤和弥, 後藤真美, 下位香代子, 木苗直秀 (1994) プール水抽出物の変異原性, 日本薬学会第114年回年会講演要旨集, **3**, 161.
- Hemming, J., B. Holbom, M. Reunanen and L. Kornberg

- (1986) Determination of the strong mutagen in chlorinated drinking and humic waters, *Chemosphere*, **15**, 549-556.
- Herren-Freund, S. L., M. A. Pereira, M. D. Khoury and G. Olson (1987) The carcinogenicity of trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid in the mouse liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **90**, 183-189.
- Honer, W. G., M. J. Ashwood-Smith and C. Warby (1980) Mutagenic activity of swimming-pool water, *Mutat. Res.*, **78**, 137-144.
- Horth, H. (1989) Identification of mutagens in drinking water, *Aqua*, **38**, 80-100.
- Isiguro, Y., J. Santodonato and M. W. Neal (1988) Mutagenic potency of chlorofranones and related compounds in Salmonella, *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 225-234.
- 磯田信一, 斎藤治子, 伊藤英幸, 高木博夫, 真柄泰基 (1994) 水道水およびプール水中の強変異原性物質 3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone の定量, 横浜市衛生研究所年報, **33**, 119-124.
- 磯田信一, 伊藤英幸, 菅谷なえ子, 長岡 登 (1995) 屋内プールの衛生学的検討—プール水中の消毒副生成物について—, 日本薬学会第115回年会講演要旨集, **3**, 200.
- 健名智子, 高柳信孝, 井山洋子, 斎藤尚仁 (1991) 室内プール水中の低分子有機ハロゲン化合物について, 富山県衛生研究所年報, **14**, 202-204.
- Kronberg, L. and T. Vartiainen (1988) Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone and of its geometric isomer E-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxo-butenic acid in chlorine-treated tap waters, *Mutat. Res.*, **206**, 177-182.
- 厚生省生活衛生局水道環境部監修 (1993) 上水試験方法 1993年度版, 日本水道協会, 東京, pp. 357-383.
- 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.
- Meier, J. R., H. P. Ringh, W. E. Coleman, J. W. Munch, R. P. Streicher, W. H. Kaylor and K. M. Schenck (1985) Identification of mutagenic compounds formed during chlorination of humic acid, *Mutat. Res.*, **157**, 111-122.
- Meier, J. R., R. B. Knohl, W. E. Coleman, H. P. Ringhand, J. W. Munch, W. H. Kaylor, R. P. Streicher and F. C. Kopfler (1987a) Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acid solutions, *Mutat. Res.*, **189**, 363-373.
- Meier, J. R., W. F. Blazak and R. B. Knohl (1987b) Mutagenic and clastogenic properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-franone: a potent bac-

terial mutagen in drinking water, *Environ. Mol. Mutagen.*, **10**, 411-424.

中室克彦, 佐谷戸安好 (1992) 水道水中変異原物質の濃縮方法とその変異原特性, 第43回全国水道研究発表会抄録, 705-707.

労働省安全衛生部化学物質調査課編 (1991) 微生物を用いる変異原性試験の具体的手法と結果の評価, 安衛法における変異原性試験, 中央労働災害防止協会, 東京, pp. 40-63.

Rook, J. J. (1974) Formation of haloforms during chlorination of natural waters, *Water Treat. Exam.*, **23**, 234-243.

斎藤治子, 磯田信一, 森本康子, 荒井 稔, 古谷桂子, 山本親男, 佐藤洋子, 河村太郎 (1990) 屋内プール水の衛生学的研究, 横浜市衛生研究所年報, **22**, 95-98.

Simmon, V. F., K. Kauhanen and R. G. Tardiff (1977) Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water, In: D. Scott, B. A. Bridges and F. H. Sobels (Eds.), *Progress in Genetic Toxicology*, Elsevier, North-

Holland Biomedical Press pp. 249-258.

杉野邦雄, 堀本能之, 高津章子 (1993) 水道水, 水泳プール水中のハロ酢酸類の分析, *環境化学*, **3**, 496-497.

Tikkanen, L. and L. Kronberg (1990) Genotoxic effects of various chlorinated butenoic acids identified in chlorinated drinking water, *Mutat. Res.*, **24**, 109-116.

鶴川昌弘, 中村清一, 宮野啓一, 布浦雅子 (1988) 水中有機物の検索に関する研究 (第4報) —水道水中のハロゲン化合物の分析—, 大坂府立公衛研所報, **26**, 63-70.

Waskell, L. (1978) A study of the mutagenicity of anesthetics and their metabolites, *Mutat. Res.*, **57**, 141-153.

Whong, W. Z., J. D. Stewart, D. C. Adamo and T. Ong (1983) Mutagenic detection of complex environmental mixtures using the Salmonella/arabinose-resistant assay system, *Mutat. Res.*, **120**, 13-19.

「ヒトし尿の生物処理水中に存在する Trp-P-2 の同定と評価」

Detection and evaluation of Trp-P-2 in biologically treated human feces and urine

小野芳朗<sup>1</sup>, 毛利紫乃<sup>1</sup>, 宗宮 功<sup>1</sup>, 小田美光<sup>2</sup>

Yoshiro Ono<sup>1</sup>, Shino Mohri<sup>1</sup>, Isao Somiya<sup>1</sup> and Yoshimitsu Oda

<sup>1</sup>京都大学工学部衛生工学教室

606-01 京都市左京区吉田本町

<sup>2</sup>大阪府立公衆衛生研究所

537 大阪市東成区中道一丁目 3-69

<sup>1</sup>Dept. Environmental & Sanitary Engineering, Kyoto University,

Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan

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

3-69, Nakamichi 1, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan

(受付: 1995 年 7 月 3 日; 受理: 1995 年 9 月 20 日)

Summary

A bacterial assay, named the *umu*-test, which can detect DNA damage, and HPLC fractionation followed by GC-MS analysis, to identify genotoxic substances, were used to test samples from a night soil treatment plant. By using the *umu*-test system, which is highly sensitive to aromatic amines, genotoxicity related to aromatic amines was detected in effluents from each treatment process. Coagulation followed by ultra filtration partially removed toxic substances from the solution, and activated carbon adsorption almost completely removed the substances. Trp-P-2, which is a mutagenic and carcinogenic heterocyclic amine, was detected in the effluent from the ultra filter after bioreaction. These results show that human feces and urine include genotoxic substances, such as Trp-P-2, which remain after biological treatment. It is suggested that advanced treatment, such as ozonation, is necessary if waste water is recycled.

**Keywords:** genotoxicity, night soil, ozonation, Trp-P-2, *umu*-test

緒言

近年, 都市域で, 渇水や災害の際の水の備蓄, あるいは修景用水として, 下水処理水の再利用が検討され始めている. このような場合, 処理水中に残存する微量有機物の, 人体や生態に与える影響が評価されねばならない. 生活排水, し尿あるいは工場排水を含む都市下水は通常, 活性汚泥を用いた生物処理で有機物を無機化あるいは生物塊化するが, その沈殿上澄水, すなわち処理水には, *in vitro* において DNA 損傷を誘発する物質が存在することを筆者らは示してきた (Ono *et al.*,

1992). 処理水に検出される遺伝毒性が, どのような物質に由来し, その起源は確定可能なのか. 筆者らのし尿処理場の調査により, それらの遺伝毒性物質が人間の食生活由来の物質の可能性があること, そして生物学的に分解されにくいことが示されてきた. 第 1 に, し尿処理場の流入水, すなわちヒト糞便を中心とした有機物中には, バクテリアアッセイで高い遺伝毒性が示され, それは, 窒素除去を含む生物処理工程では除去しきれていない (Ono *et al.*, 1995). 第 2 に, この遺伝毒性は芳香族アミン, ニトロアレーンに高感受性を有す

るバクテリアアッセイで陽性を示した (Ono *et al.*, in press). 一方, ヒト糞便中において, 食品の加熱タンパクに含まれているヘテロサイクリックアミン類が同定されている (Hatyatsu *et al.*, 1985). 本研究では下水の終末処理場, あるいはし尿処理場の処理水の再利用の観点から, 処理水中の遺伝毒性物質の抽出, 検出に加え, 同定を試みた. また, 都市下水処理の立場から, 有効な毒性物質の除去法としてオゾン酸化の効果についても検討した.

## 実験材料および方法

### 1. 試薬

ヘテロサイクリックアミンの 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ, CAS No. 76180-96-6), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline (MeIQ, 77094-11-2), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx, 77500-04-0), 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1, 75104-43-7), 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2, 72254-58-1), 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeAαC, 68006-83-7) は和光純薬工業製, 2-amino-6-methyl-dipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1, 67730-11-4) はフナコシ製を用いた. S9, 並びに S9mix 調整用 cofactor 群はオリエンタル酵母工業製のものを用いた. し尿処理場の処理水中の有機物は, 弱疎水性物質を広範囲に吸着する Sep-pak plus C<sub>18</sub> Env. カートリッジ (Millipore Co., Waters Div.) と, 3 環以上の多環芳香族を選択的に吸着するブルーレーヨン (フナコシ製) を用いて回収, 濃縮した.

### 2. 試料

試料は, 処理水量 10 (kL/day) の, 硝化・脱窒システムを備えた生物処理施設と, 固液分離に限外濾過システムを適用している A し尿処理場で採取した. 流入したし尿は, 沈砂池, ドラムスクリーンを経て, 活性汚泥法を用いた生物処理により, 有機物とアンモニア性窒素が除去される. この活性汚泥は限外濾過され, 色度除去のため, 凝集の後再度限外濾過されている. この濾過水は活性炭処理後, 塩素消毒されて海洋に放流されてい

る. 試料採取点は, (a) 生物処理後の膜濾過水; UF1, (b) 凝集後の膜濾過水; UF2, (c) 活性炭処理水; AC とした.

### 3. 抽出

遺伝毒性の処理効果を検討するために, Sep-pak C<sub>18</sub> カートリッジを適用し, 有機物質を回収した. 試料 20 L を流速 20 (mL/min) で Sep-pak C<sub>18</sub> カートリッジに通水した. 吸着物質はメタノール溶出し, 溶出液はロータリーエバポレーターで減圧蒸発乾固ののち, メタノール 10 mL に溶解させた.

ヘテロサイクリックアミンの分析には, 多環芳香族を選択的に吸着するブルーレーヨンを適用した. ガラス管 (6 mmφ×200 mm) に 1.0 g のブルーレーヨンを充填し, メタノール/25% アンモニア水 (50/1, v/v), 超純水による前処理の後, マイクロチューブポンプ<sup>®</sup>により流速 10 mL/min で, 試料 20 L を 5 L/カラム本で通水した. 超純水で通水洗浄した後, メタノール/25% アンモニア水 (50/1, v/v) 100 mL を通過させ溶出した. これをロータリーエバポレーターで減圧蒸発乾固し, メタノール 1 mL に溶解させた.

### 4. ヘテロサイクリックアミンの HPLC 分析

高速液体クロマトグラフィー用分取カラム PREP-ODS column (20 μm particle, 20 mmφ×250 mm, Shimadzu) を使用し, 逆相 HPLC 分析を行った. メタノール/10 mM 酢酸アンモニウム (6/4, v/v), 流速 5 mL/min で溶出, 265 nm の UV 吸光度においてモニターした. 遺伝毒性試験のため, 画分を 2 分ごと, 10 mL ずつ分取した. また, 画分 2 本ずつを減圧蒸発乾固し, メタノール 20 μL に溶解させ GC-MS 分析に供した.

### 5. ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) による同定

使用カラム fused silica capillary column HP-5 (0.32 mmφ×30 m, Hewlett-packard) のガスクロマトグラフ分析を行った. GC 条件は, オープン温度は 190°C 3 min, 昇温 35°C/min で 235°C とした. MS 条件は ionizing current 0.3 mA, ionizing

voltage 70 eV とした.

## 6. 遺伝毒性試験

### (1) 試験株

化学物質による DNA 損傷の誤りがちの修復を行う *umuDC* 遺伝子の発現を測定する *umu-test* 株 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 (Oda *et al.*, 1985) と, 同様の原理で更に芳香族アミン, ニトロアレーンに高感受性を持つ菌株である *S. typhimurium* NM2009 と, それに対して感受性が低い株, NM2000 用いた (Oda *et al.*, 1993). 芳香族アミンはラット肝 S9 画分 (S9) 中の P450 酵素により活性化され, アリールヒドロアミン中間体に変換される. *O*-アセチル転移酵素高産生株である *S. typhimurium* NM2009 (TA1535/pSK1002/pNM12) は, これらの誘導体をさらに *O*-アセチル転移酵素によって活性化し, 最終反応の求電子体ニトレニウムイオンを形成する. 一方, NM2000 (TA1535/1,8-DNP/pSK1002) 株は *O*-アセチル転移酵素活性を持たない. したがって, S9 を添加した NM2009 と NM2000 株の組み合わせは, 試料中の芳香族アミン由来の遺伝毒性活性の違いによって特異的に検出することができる (Oda *et al.*, 1995).

### (2) 試験手順

LB 培地 (1% Bactotrypton, 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract, 20 mg/L ampicillin, 10 mg/L chloramphenicol), TGA 培地 (1% Bactotrypton, 0.5% NaCl, 0.2%, 20 mg/L ampicillin) で 2 段階培養された菌株を, 試験管に 2.4 mL ずつ分注し, 0.1 mL の被検物質を投与した. この時, それぞれの試験管にリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL を添加した代謝活性化なしの系を -S9mix, 代謝活性化後の影響を見るために 50 μL の S9 画分と補酵素, 助酵素群を含む 0.5 mL の S9mix を添加した系を -S9mix とした. 37°C, 145 rpm で 4 時間振とう培養した後, β-galactosidase 活性を測定した. DNA 損傷により誘発される SOS 反応に应答する *umuC* 遺伝子は, β-galactosidase 活性をコードする *lacZ* 遺伝子と融合されている. 酵素活性の測定法, 単位の計算式は, Miller (1972) によった.

本論中では, 検体を投与した β-galactosidase 活性値 (A) より溶媒対象の活性値 (B) を引いた値 (A-B) を遺伝毒性の指標とし, 判定は (A-B)/B > 1 を陽性とした.

## 7. オゾン処理実験

オゾン処理の毒性低減効果を調べるために, 処理水にオゾン処理を行ったのち遺伝毒性試験に供した. オゾン処理方法は, 容量 3 L のガラス製セパラブル型反応槽中で, 下部よりオゾンガスを送入し, マグネティックスターラーで攪拌した. 試水 2 L, 送入オゾンガス濃度 20 mg/L-gas, 反応時間 10, 20, 30 分, ガス流量 1, 3, 5 L/min とした.

反応後, 直ちに試水に亜硫酸ナトリウムを投入し, 溶存オゾン消費したのち, Sep-pak C<sub>18</sub> カートリッジにて濃縮した. オゾン消費量に対する遺伝毒性試験結果の判定結果を示した.

## 結 果

### 1. Sep-pak C<sub>18</sub> で濃縮された排水流出水中の遺伝毒性の検出

Fig. 1 は, それぞれ H し尿処理場の (a) 生物処理後の膜濾過水 (b) 凝集後の膜濾過水 (c) 活性炭処理後の流出水試料より得られた NM2009 株と NM2000 株による *umu* テストの結果を示す. Sep-pak-メタノール濃縮により得られた乾燥物重量 (dryweight; DW) はそれぞれ, 濃縮前の試料中, すなわち図中の倍率 1 において 18.75 mgDW/L, 8.25 mgDW/L, 2.88 mgDW/L である. 図中の横軸は *umu* テストの反応液中における試料の濃縮倍率である. これらの図では, 芳香族アミン由来の遺伝毒性であると判断される NM2009 株と NM2000 株の β-galactosidase 活性値の差を示した. 生物処理後の膜処理水は, 芳香族 *o*-NY 由来の遺伝毒性を示し, これらは生物学的硝化脱窒処理後も除去され得ないものであった. この毒性は, 凝集処理過程においても変化をみせなかったが, 活性炭処理により低減する. 当し尿処理場においては, 実際の水環境中に排出される時点での遺伝毒性は低減しているが, 生物処理のみでは除去され得ないことが明らかとなった.

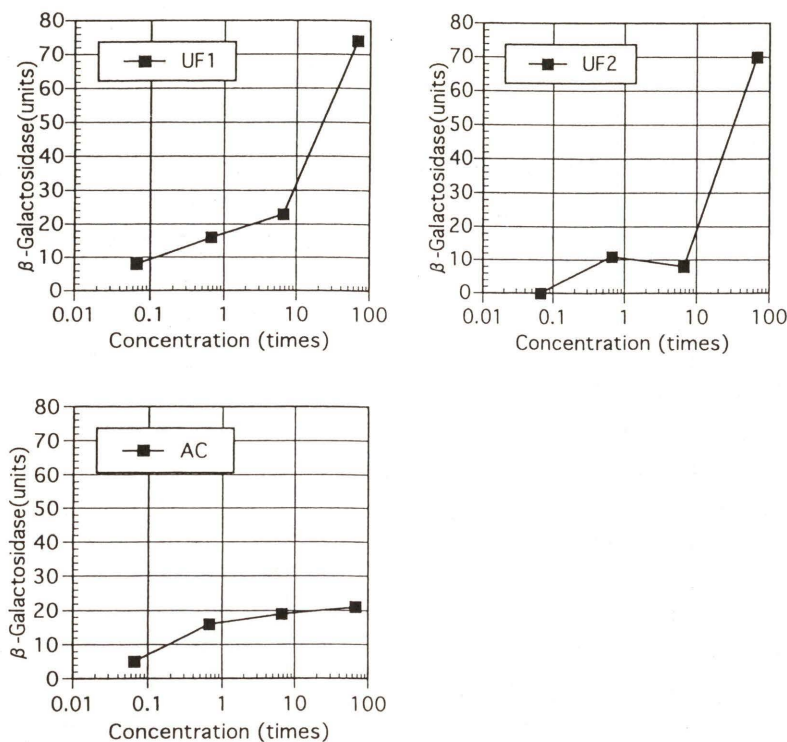


Fig. 1. Dose-response curves for genotoxicity of Sep-pak C<sub>18</sub> extracts of samples from nightsoil treatment plant. The genotoxicity was assayed by *umu*-test using *S. typhimrium* NM2009 and NM2000 strains in the presence of S9mix described as in the text. Each point (■) represents difference in  $\beta$ -galactosidase activity between NM2009 strain and NM2000 strain regarded as *umuC* gene induction by aromatic amines. Legend: UF1, effluent from filtration after biological treatment; UF2, effluent from coagulation-filtration; AC, effluent of activated carbon adsorption.

## 2. 生物処理後の膜濾過水 (UF1 試料) 中の遺伝毒性物質の同定

### (1) ブルーレーヨン濃縮された UF1 試料中の遺伝毒性の検出

ブルーレーヨン濃縮により得られた, UF1 試料中の乾燥物重量は, 1.33 mgDW/L であった. Fig. 2 は, NM2009 株と NM2000 株のそれぞれの  $\beta$ -galactosidase 活性値を示す. UF1 試料のブルーレーヨン濃縮により得られた抽出物は芳香族アミン由来の強い遺伝毒性を示すことが図よりわかる. これらの結果はブルーレーヨンに吸着される, すなわち多環芳香族の構造を持つ物質が生物処理後も残存し, それらは NM シリーズを使用した *umu* テストによって, 芳香族アミンを含むことが示唆された.

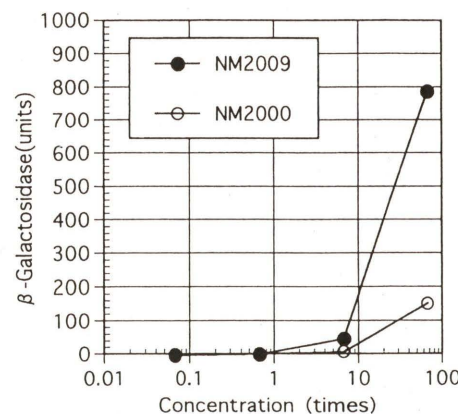


Fig. 2. Dose-response curves for genotoxicity assay by *umu*-test using *S. typhimrium* NM2009 and NM2000 strains in the presence of S9mix of blue-rayon extracts of UF1 sample (effluent from filtration after biological treatment). Symbols: ●, NM2009; ○, NM2000.

### (2) UF1 試料中のヘテロサイクリックアミンの HPLC 分析と遺伝毒性の検出

ヘテロサイクリックアミン標準試料とブルーレーヨン濃縮試料の, HPLC クロマトグラムを Fig. 3(a), (b) にそれぞれ示す. Fig. 4 は, HPLC 分析により分画された 10 mL ずつの画分の NM シリーズにより検出された, 芳香族アミン由来の遺伝毒性であると判断される NM2009 株と NM2000 株の  $\beta$ -galactosidase 活性値の差を示す.

これらの図より, 比較的高い遺伝毒性を示し, かつヘテロサイクリックアミン標準試料のピークに相当するとみられる Fig. 3(b) ブルーレーヨン濃縮試料 HPLC クロマトグラム中の 4 つのエリアを斜線で示す. それぞれ, Fig. 3(a) 標準試料 HPLC クロマトグラムの MeIQx + IQ, Glu-P-1, Trp-P-2, MeA $\alpha$ C 相当のピークと一致した. すなわち, 処理水中に検出される遺伝毒性が標準物質で同定されるヘテロサイクリックアミン由来であ

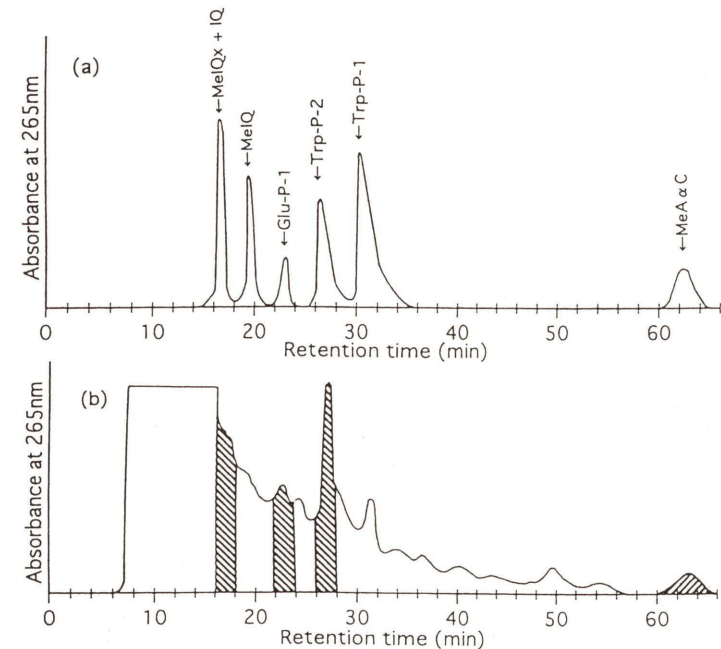


Fig. 3. HPLC chromatograms of authentic heterocyclic amines (a) and blue-rayon extracts of UF1 sample (b) by using a PREP-ODS column. In Fig. (b), areas hatched represent peaks corresponding to both peaks of authentic heterocyclic amines and peaks in activity regarded as *umuC* gene induction by aromatic amines.

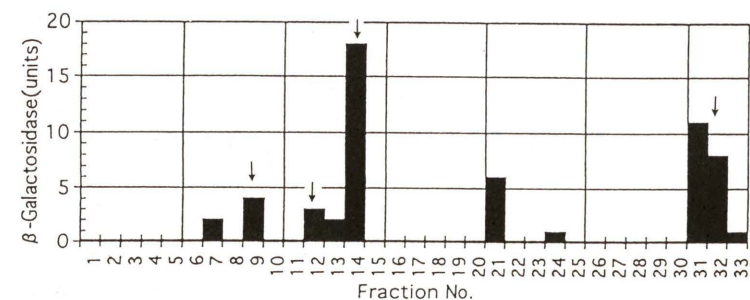


Fig. 4. Genotoxicity of HPLC fractions of blue-rayon extract of UF1 sample assayed by *umu*-test in the presence of S9mix. Each value represents difference in  $\beta$ -galactosidase activity between NM2009 strain and NM2000 strain regarded as *umuC* gene induction by aromatic amines.

る可能性が強く示唆された。

### (3) 遺伝毒性画分中の Trp-P-2 の同定

もっとも明白に遺伝毒性を示した画分は No. 14 であり、これは Trp-P-2 のピークに相当した。Fig. 5(a) は標準物質 Trp-P-2 の分子量 197 における GC-MS クロマトグラムを示す。同条件下で、No. 13, 14 の濃縮試料の GC-MS クロマトグラムが Fig. 5(b) である。これらより、生物処理後の膜濾過水中に、Trp-P-2 が濃度  $1 \mu\text{g/L}$  オーダーで存

在することが確認された。

### 3. オゾン処理の遺伝毒性の低減に対する効果

下水または尿中に検出された遺伝毒性は、生物処理によっては完全には除去されないことが示されてきた。処理水の遺伝毒性を減少させるために、オゾン酸化を適用した。Fig. 6 は、溶液中の有機炭素当たりの消費オゾン量と遺伝毒性減少の関係を示す。オゾン消費量 0.5 から  $1.0 \text{ mgO}_3/\text{mgC}$

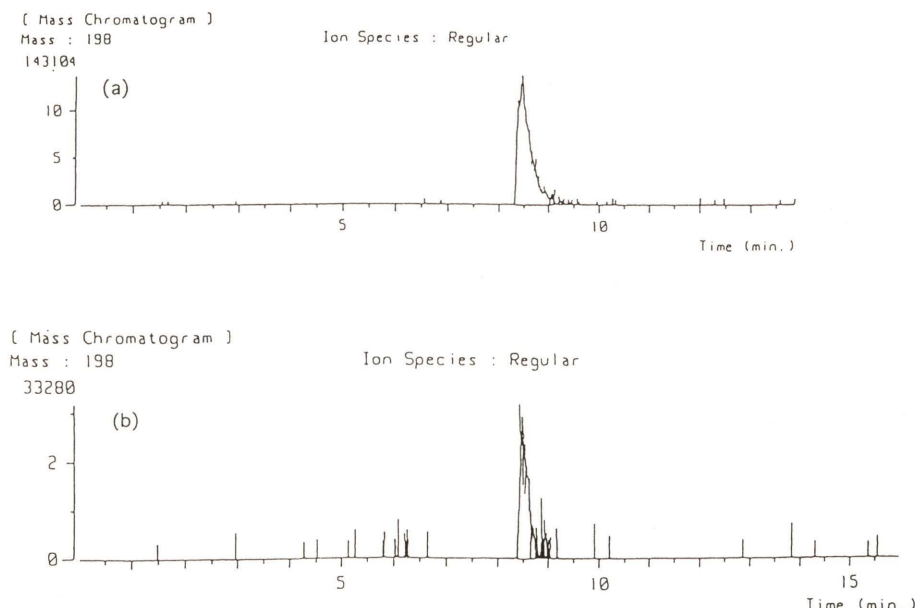


Fig. 5. GC-MS chromatograms of authentic Trp-P-2 (a) and isolated Trp-P-2 from blue-rayon extract of UF1 sample in the HPLC fractions (No. 13, 14) (b) using an Fused Silica Capillary Column HP-5.

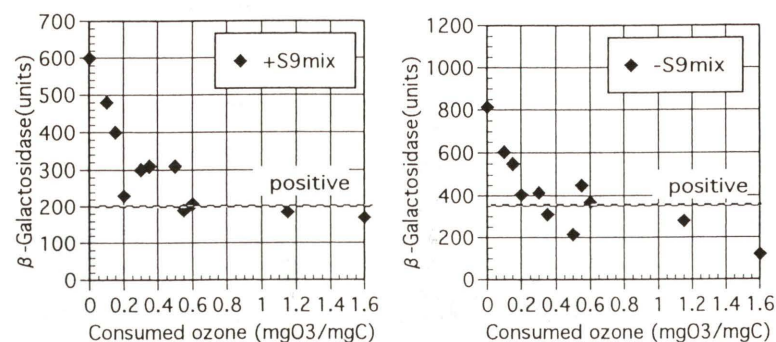


Fig. 6. Relation between decrease in genotoxicity and ratio of consumed ozone. Samples from nightsoil treatment plant were oxidized by ozone then treated with Sep-pak  $\text{C}_{18}$  extraction for *umu* assay. Each point (◆) represents  $\beta$ -galactosidase activity assayed by *umu*-test using TA1535/pSK1002 strain in the presence (+S9mix) or absence (-S9mix) of S9mix.

で、Sep-pak-メタノール抽出液中の遺伝毒性を陰性レベルまで減少させることが可能であった。この効果はおそらくはオゾンによる有機物質の酸化分解によると推定される。

### 考 察

加熱された食肉中に、変異原性、発癌性を有するヘテロサイクリックアミンが存在することは知られている (Sugimura *et al.*, 1983; Yamaizumi *et al.*, 1980; Sugimura, 1983)。これら摂取されたヘテロサイクリックアミンは尿および糞便中に一部は代謝物として、またそのままの形で排出されることが報告されている (Hayatsu *et al.*, 1987)。Hayatsu らは焼き肉を摂取することで糞便中の変異原性が増加すること、それがタンパク質とアミノ酸の熱生成物に由来することを指摘した (Hayatsu *et al.*, 1985)。通常食の摂取の場合にも、MeIQ, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2 等のヘテロサイクリックアミンが、尿中に 24 時間尿当たり、各  $11 \sim 47 \text{ ng}$ ,  $0.12 \sim 1.97 \text{ ng}$ ,  $0.04 \sim 1.43$ ,  $0.03 \sim 0.68 \text{ ng}$  検出されることが報告されている (Ushiyama *et al.*, 1992)。また、大気中粒子物質や雨水中にも微量ながら Trp-P-1, Trp-P-2 が検出されるなど環境中でかなり広範囲にヒトが曝露されている発がん物質群であることが推測されている (Manabe *et al.*, 1989)。

一方、都市下水処理場の放流口で、比較的高い変異原性が検出されたという報告がある (Sakamoto *et al.*, 1990)。これらの物質の一部は芳香族アミンらしいと指摘されてはいるものの、生活排水、し尿、工場排水等多くの物質を含む下水中の変異原の同定は困難を究める。下水中の変異原性物質としては、都市下水処理場の流入水中に Trp-P-2 が  $2 \sim 94.8 \text{ ng/L}$  の濃度で確認され、これが活性汚泥にある程度吸着されることが示された (Segawa *et al.*, 1993; 1994)。大気中粒子状物質中、雨水中の Trp-P-2 の報告による濃度はそれぞれ  $10^{-4} \text{ ng/m}^3 \text{ air}$ ,  $10^{-1} \sim 10^{-2} \text{ ng/L}$  オーダーであり (Manabe *et al.*, 1989)、これらのみが都市下水中の Trp-P-2 の主要な由来とは考えがたく、他の可能性を考察せねばならない。筆者らは、多くの物質の混入する下水中の変異原性物質がヒト由来であ

ると仮定し、ヒト尿、糞便の流入のみであるし尿処理場を対象とした調査をしてきた (Ono *et al.*, 1995)。そこで検出された遺伝毒性は *umu* テスト用 NM2009 株及び NM2000 株によって芳香族アミン由来であることが示された (Ono *et al.*, in press)。これらのことから、微量の水環境試料中の芳香族アミンによる遺伝毒性検出において新しく開発された *umu* テスト用菌株の NM2009 株及び NM2000 株が有用であることが示され、し尿中のおそらくは食品由来と考えられる芳香族アミンの存在とその生物学的処理における難分解性が推察された。本論中では、このような遺伝毒性物質群の一つとして加熱食品中に存在するとされる Trp-P-2 を同定し、し尿処理場で観察された遺伝毒性の中に明らかにヒトの食品由来の物質が存在することを示した。また今回、GC-MS 分析によっては Trp-P-2 のみが同定される結果となったが、HPLC-UV 分析では他のヘテロサイクリックアミン類の存在も強く示唆されている。他のヘテロサイクリックアミン類が同定されなかった原因として、夾雑物の影響による検出限界や GC 分析そのものの問題が考えられ、分析方法の改善によって他のヘテロサイクリックアミン類も同定検出される可能性が高いと考えている。この結果は、様々な物質を受け入れ処理している都市下水処理場で検出された遺伝毒性物質の中に、ヒトの食品由来の毒性物質群が存在することを傍証するものとする。

し尿の生物処理水中の Trp-P-2 濃度は  $1 \mu\text{g/L}$  オーダーであったが、今回対象としたヘテロサイクリックアミン類中最高と推定される。Trp-P-2 の食品中の濃度は  $0.15 \sim 13.1 \text{ ng/g}$  であることが報告されている (Wakabayashi, 1994; Yamaizumi *et al.*, 1980) ことから、ヒトの加熱食肉由来の Trp-P-2 摂取量はおよそ  $0.03 \sim 2.62 \mu\text{g/day} \cdot \text{person}$  と概算される。もし、ヒトが  $1 \mu\text{g/L}$  という処理水中の濃度を直接摂取するのならば、飲料水量  $2 \text{ L/day} \cdot \text{person}$  として、 $2 \mu\text{g/day} \cdot \text{person}$  と決して小さな値とは言えない。もちろん、Fig. 1 に示したように、実際のし尿処理場の放流水中には凝集、活性炭濾過の高度処理を経て、ほとんど水環境中には流出してはいないことがわかる。ところ

で、都市下水処理場においては生物処理水は塩素消毒されたのち放流されることがある。下流域で再び上水源として取水する場合も、中途水域中で希釈され、浄水工程で処理されるため飲料水を通した曝露は考えがたい。しかしながら、処理水の再利用の需要の高まりの観点から、処理水中の毒性の検出、物質の同定、さらにはその除去法の確立は必須である。前述したように処理水の遺伝毒性除去のために必要なオゾン消費量は0.5~1 mgO<sub>3</sub>/mgCである。この値は、下水処理水中の全有機炭素量 TOC が10~20 mgC/Lとすれば (Ono *et al.*, 1992), 処理水の脱色に要するオゾン消費量 (Ono *et al.*, 1995) とほぼ同じ値となり、実用可能な除去法といえる。

#### 謝 辞

本研究は文部省科学研究費一般研究(B) 07458131 の援助によって行った。

#### 参考文献

- Hayatsu, Y., T. Hayatsu, Y. Wataya and F. H. Mower (1985) Fecal mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human, *Mutat. Res.*, **143**, 207-211.
- Hayatsu, Y., H. Kasai, S. Yokoyama, T. Miyazawa, Z. Yamaizumi, S. Sato, S. Nishimura, S. Arimoto, T. Hayatsu and Y. Ohara (1987) Mutagenic metabolites in urine and feces of rats fed with 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinolxaine, a carcinogenic mutagen present in cooked meat, *Cancer Research*, **47**, 791-794.
- Oda, Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato and H. Shinagawa (1985) Evaluation of the new system (*umu*-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens, *Mutat. Res.*, **147**, 219-229.
- Oda, Y., H. Yamazaki, M. Watanabe, T. Nohmi and T. Shimada (1993) Highly sensitive *umu* test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM3009 having high *O*-acetyltransferase and nitroreductase activities, *Environ. Mol. Mutagen.*, **21**, 357-364.
- Oda, Y., H. Yamazaki, M. Watanabe, T. Nohmi and T. Shimada (1995) Development of high sensitive *umu* test system: rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM 2009 possessing high *O*-acetyltransferase activity, *Mutat. Res.*, **334**, 145-156.
- Ono, Y., I. Somiya, M. Kawamura and K. Uenishi (1992) Genotoxicity of organic substances in municipal sewage and its ozonated products, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 285-291.
- 小野芳朗, 宗宮功 (1992) 下水処理水中難分解性有機物の遺伝毒性に関する研究, *下水道協会誌論文集*, **30** (357), 92-99.
- Ono, Y., I. Somiya and T. Kawaguchi (1995) Evaluation of genotoxic potency on substances contained in nightsoil and its reduction performance by ozonation, *Ozone Science & Engineering*, **17**, 195-203.
- Ono, Y., I. Somiya and T. Kawaguchi (in press) Genotoxicity of substances in the nightsoil and its biologically treated water, *Water Res.*
- Manabe, S., E. Ueno and O. Wada (1989) Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in airborne particles and rain water, *Mutat. Res.*, **226**, 215-221.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harvour Laboratory, pp. 352-355.
- Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo river system, Kyoto-Osaka, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 521-528.
- Segawa, T., H. Ueno, K. Nakamuro and Y. Sayato (1993) Behavior of Trp-P-2 during activated sludge process, *Jap. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**(2), 132-138.
- Segawa, T., K. Nakamuro and Y. Sayato (1994) Biodegradation of Trp-P-2 by bacteria in activated sludge, *Jap. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**(1), 71-77.
- Sugimura, T. and S. Sato (1983) Mutagens-carcinogens in foods, *Cancer Res. (Suppl.)*, **43**, 2415s-2421s.
- 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.
- 若林敬二 (1994) ガン原性ヘテロサイクリックアミン化合物のヒト曝露量, *水環境学会誌*, **17**, 217-222.
- Yamaizumi, Z., T. Shimoi, 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.

## 5-Diazouracil および 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium 塩のマウス末梢血における小核誘発作用の vitamin E 欠乏による増強

### Enhancement of 5-Diazouracil- and 4-(Hydroxymethyl)benzenediazonium Salt-Induced Micronuclei of Mice Peripheral Reticulocytes by Vitamin E-Deficiency

加藤 哲太, 日景しをり, 菊川 清見

Tetsuta Kato, Shiwori Hikage and Kiyomi Kikugawa

東京薬科大学 薬学部

192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

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

(受付: 1995 年 5 月 11 日; 受理: 1995 年 8 月 15 日)

#### Summary

The effects of pre-feeding with vitamin E-deficient diet on the induction of micronucleated peripheral reticulocytes (MNRETs) by 5-diazouracil and 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt (HMBD) was investigated in male ICR mice. The vitamin E level in the blood of mice fed vitamin E-deficient diet for a week was significantly lower than that in mice fed a diet adequate in vitamin E. The frequency of MNRETs induced by 5-diazouracil (5.0 mg/kg) in mice fed vitamin E-deficient diet was  $1.69 \pm 0.45\%$ , and was significantly enhanced in comparison with that of mice receiving a diet with adequate vitamin E ( $0.88 \pm 0.29\%$ ) ( $p < 0.01$ ). The induction of micronuclei by HMBD (90 mg/kg) was also enhanced significantly ( $p < 0.05$ ) by feeding vitamin E-deficient diet. It is suggested that vitamin E deficiency leads to a reduction in protective ability against 5-diazouracil- and HMBD-induced chromosomal damage. The chromosomal damage, ascribable to the carbon-centered radicals generated from these diazo and diazonium compounds, was effectively prevented by vitamin E *in vivo*.

**Keywords:** micronuclei test, 5-diazouracil, 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt, carbon-centered radical, vitamin E-deficiency

#### 緒 言

フェノールと亜硝酸の反応によって生じる diazoquinone 類 (Kato *et al.*, 1992), 薬品の 5-diazouracil (Hiramoto *et al.*, 1994b), benzenediazonium 塩 (Griffiths and Murphy, 1992), 西洋キノコの発がん物質 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium 塩 (HMBD) (Hiramoto *et al.*, 1995) および 2-aminofluorene と亜硝酸の反応によって生成する fluorene-2-diazonium 塩 (Hiramoto *et al.*, 1994a) は生理的条件下で DNA 鎖を切断し、この作用は窒素分子を脱離して生成した炭素ラジカル

に起因すると考えられている (Fig. 1). 一方, diazoquinone 類 (Kikugawa *et al.*, 1988) や 5-diazouracil (Hiramoto *et al.*, 1994b) および HMBD (Hiramoto *et al.*, 1995) は、微生物を用いた *in vitro* およびマウスを用いた *in vivo* の変異原性試験において陽性であることが確認されており、*in vivo* での小核発現にも DNA 鎖切断作用を持つ炭素ラジカルが関与している可能性が考えられる。著者らは、炭素ラジカルが関与する場合、ラジカルスカベンジャーである vitamin E の欠乏がラジカルに起因する小核の発現を増強すると考え、今

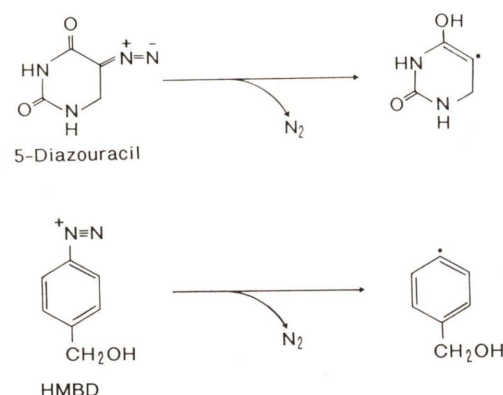


Fig. 1. Proposed conversion of 5-diazouracil and HMBD into carboncentered radical.

回, 5-diazouracil および HMBD について一連の小核試験を行った。その結果, vitamin E 欠乏マウスにおいて, 小核の発現に有意な上昇が認められたので報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 試薬

5-diazouracil [2435-76-9] (1 水和物) は Sigma Chemical Company 製の市販品を, 陽性対照の Mitomycin C [50-07-7] は和光純薬 (株) 製の市販品を用いた。

### 2. 4-(Hydroxymethyl)benzenediazonium 塩 [78246-53-4] (HMBD) の調製

HMBD は Ross ら (1982) の方法により調製し, その同定は融点, 紫外吸収スペクトル, 核磁気共鳴スペクトルおよび高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により行った (Hiramoto *et al.*, 1995)。

### 3. マウス

6 週齢の ICR 系雄マウス (日本クレア (株)) を用いた。マウスを 2 群に分け, コントロール群には普通食 (4.4% 大豆油, 7.3 mg% vitamin E) (日本配合飼料 (株)), vitamin E 欠乏マウス群には vitamin E 欠乏食 (6% 豚脂, 0 mg% vitamin E) を 1 週間与えた後, 血液中の vitamin E の測定および小核試験に供した。

### 4. 血液中の vitamin E の定量

マウス血液中の vitamin E 濃度は Lehmann と Martin (1982) の方法によりけん化した後, HPLC により定量した (Kikugawa *et al.*, 1994)。

### 5. 小核試験

コントロール群および vitamin E 欠乏群のマウスについて, 各種濃度の 5-diazouracil または HMBD を含むリン酸緩衝液を腹腔内投与し, 24, 48 および 72 時間後の末梢血網状赤血球中に発現する小核 (MNRETs) を Hayashi ら (1990) の方法に基づき測定した。末梢血網状赤血球中の小核の頻度は, マウス末梢血中の網状赤血球 1000 個当りに発現する小核数を計測して求めた。コントロール群および vitamin E 欠乏群のマウスに生理食塩水を投与した場合, MNRETs は両群とも 0.2% 以下であった。またコントロール群に 1 mg/kg の mitomycin C を投与した場合の 48 時間後の MNRETs は 1.9% であった。

### 結果および考察

Vitamin E 欠乏食 (6% 豚脂, 0 mg% vitamin E) で 1 週間飼育したマウス血液中の vitamin E 濃度を HPLC で測定した結果は  $1.12 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$  で, 普通食 (4.4% 大豆油, 7.3 mg% vitamin E) で飼育したコントロール群の血液中濃度 ( $1.95 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ ) に比べて有意 ( $p < 0.01$ ) に減少したので, このマウスを vitamin E 欠乏マウスとして小核試験に用いた。

5-Diazouracil の vitamin E 欠乏マウスを用いた小核試験の結果を, コントロールマウスと比較して Fig. 2 に示した。5-Diazouracil を 2.5 および 5.0 mg/kg 投与した場合, 24, 48 および 72 時間のいずれにおいても, MNRETs は vitamin E 欠乏マウスで高い値を示した。5-Diazouracil を 2.5 mg/kg 投与した 24 時間後においては, コントロール群の MNRETs が  $0.79 \pm 0.42\%$  であったのに対し, vitamin E 欠乏群で  $1.32 \pm 0.68\%$  と約 1.7 倍の値を示し, 有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。また 5-diazouracil を 5.0 mg/kg 投与した 48 時間後においても, コントロール群の MNRETs が  $0.88 \pm 0.29\%$  に対し, vitamin E 欠乏群では  $1.69 \pm 0.45\%$

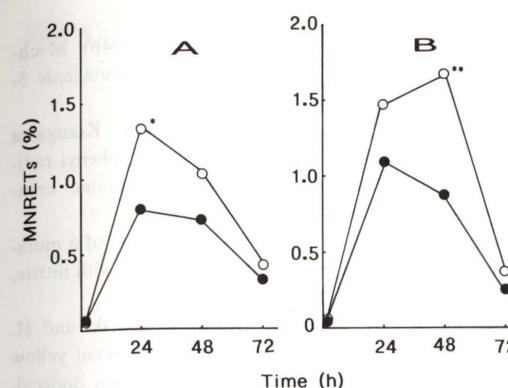


Fig. 2. Frequencies of MNRETs from peripheral blood of mice fed vitamin E-deficient diet (○) and vitamin E-adequate diet (●) after a single intraperitoneal administration to 12 mice at 2.5 mg/kg (A) and 5.0 mg/kg (B) 5-diazouracil for each.

\*\* and \*: Significantly different from corresponding vitamin E-adequate diet group,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively.

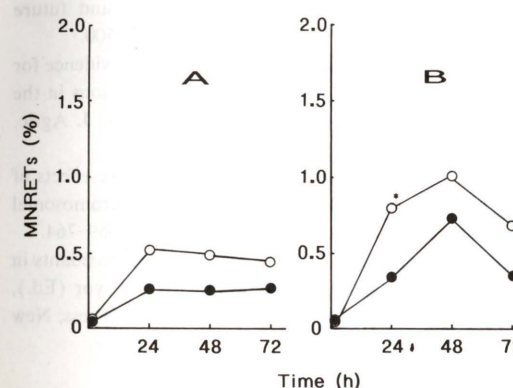


Fig. 3. Frequencies of MNRETs from peripheral blood of mice fed vitamin E-deficient diet (○) and vitamin E-adequate diet (●) after a single intraperitoneal administration to 10 mice at 30 mg/kg (A) and 90 mg/kg (B) HMBD for each.

\*: Significantly different from corresponding vitamin E-adequate diet group,  $p < 0.05$ .

と約 1.9 倍の値を示し, 有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。

Fig. 3 には HMBD の小核誘発に及ぼす vitamin E の影響について検討した結果を示した。30 および 90 mg/kg の HMBD を投与した場合, 小核の発現頻度はいずれの測定時間においても, vitamin E 欠乏マウスにおいてコントロール群のマウスより

高い傾向が認められた。90 mg/kg HMBD を投与した場合, コントロール群の 24 時間後の MNRETs は  $0.35 \pm 0.13\%$ , 72 時間後は  $0.35 \pm 0.15\%$  であったのに対し, vitamin E 欠乏マウスでは, 24 時間後は  $0.80 \pm 0.25\%$ , 72 時間後は  $0.68 \pm 0.27\%$  を示し, いずれも有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

Hiramoto らは, 5-diazouracil (1994b) および HMBD (1995) は DNA 鎖切断活性を持ち, その作用には各々から生成した炭素ラジカルが深く関与していることを ESR スペクトルおよびラジカルトラップ剤を用いた実験により示している (Fig. 1)。またこれらの化合物は, 微生物を用いた Ames 試験およびマウスを用いた小核試験においても陽性であることを報告している。

今回, 5-diazouracil および HMBD の生体内における小核の発現に, vitamin E が関与するかどうか検討したが, vitamin E は生体内に存在する抗酸化剤で, 生体の酸化傷害を防御し (Witting, 1980; Chow, 1991), また紫外線照射や化学物質による発ガンや変異原性の発現に対して, 抗ガン, 抗変異原作用をもつと考えられている (Prasad and Edwards-Prasad, 1992; Bostick *et al.*, 1993; Fenech and Rinaldi, 1994)。Sarma と Kesavan (1993) は  $\gamma$ -線照射によるマウスの骨髄細胞における小核と染色体異常の発現が vitamin E によって顕著に抑制されたと報告している。また Odagiri ら (1992) は X-線および 6-mercaptopurine による骨髄細胞の小核発現に対する vitamin E の影響について検討し, フリーラジカルを経由しないで作用すると言われている 6-mercaptopurine では vitamin E の影響が認められなかったのに対し, 活性酸素ラジカルが作用の発現に関与していると考えられる X-線照射による小核の発現が vitamin E 欠乏マウスで有意に上昇したと報告している。今回の実験において, vitamin E 欠乏食で 1 週間飼育することにより, マウス血液中の vitamin E 濃度はコントロール群の 57% にまで減少した。この vitamin E 欠乏マウスにおいては, 5-diazouracil および HMBD により誘発された MNRETs はコントロールマウスに比べて有意に高い値を示した。これらの結果は, vitamin E の欠乏が, 5-

diazouracil や HMBD による染色体損傷に対する防御能を低下させたことを示唆しており, vitamin E が 5-diazouracil および HMBD などの薬物の小核誘発性に対しても, 抑制的に作用することが示された。

# 参考文献

- Bostick, R. M., J. D. Potter, D. R. McKenzie, T. A. Sellers, L. H. Kushi, K. A. Steinmetz and A. R. Folsom (1993) Reduced risk of colon cancer with high intake of vitamin E: The Iowa women's health study, *Cancer Res.*, **53**, 4230-4237.
- Chow, C. K. (1991) Vitamin E and oxidative stress, *Free Rad. Biol. Med.*, **11**, 215-232.
- Fenech, M. and J. Rinaldi (1994) The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B<sub>12</sub> and folic acid, *Carcinogenesis*, **15**, 1405-1411.
- Griffiths, J. and J. A. Murphy (1992) Cleavage of DNA resulting from exposure to phenyl radicals. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 24-26.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slide, *Mutat. Res.*, **245**, 245-249.
- Hiramoto, K., M. Inoue, K. Maeda, T. Kato and K. Kikugawa (1994a) Generation of a carbon-centered radical with DNA-breaking activity from mutagenic fluorene-2-diazonium salt, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.*, **40**, 414-421.
- Hiramoto, K., M. Kaku, T. Kato and K. Kikugawa (1995) DNA strand breaking by the carbon-centered radical generated from 4-(hydroxymethyl)benzodiazonium salt, a carcinogen in mushroom *Agaricus bisporus*,

- Chem. Biol. Interact.*, **94**, 21-36.
- Hiramoto, K., T. Kato and K. Kikugawa (1994b) Mechanisms of the DNA breaking activity of mutagenic 5-diazouracil, *Mutat. Res.*, **306**, 153-163.
- Kato, T., K. Kojima, K. Hiramoto and K. Kikugawa (1992) DNA strand breakage by hydroxyphenyl radicals generated from mutagenic diazoquinone compounds, *Mutat. Res.*, **268**, 105-114.
- Kikugawa, K. and T. Kato (1988) Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite, *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 209-214.
- Kikugawa, K., M. Beppu, T. Kato, S. Yamaki and H. Kasai (1994) Accumulation of autofluorescent yellow lipofuscin in rat tissues estimated by sodium dodecyl-sulfate extraction, *Mech. Ageing Dev.*, **74**, 135-148.
- Lehmann, J. and H. L. Martin (1982) Improved direct determination of alpha- and gamma-tocopherols in plasma and platelets by liquid chromatography, with fluorescence detection, *Clin. Chem.*, **28**, 1784-1787.
- Odagiri, Y., T. Karube, H. Katayama and K. Takemoto (1992) Modification of the clastogenic activity of X-ray and 6-mercaptopurine in mice by prefeeding with vitamins C and E, *J. Nutr.*, **122**, 1553-1558.
- Prasad, K. N. and J. Edwards-Prasad (1992) Vitamin E and Cancer Prevention: Recent advances and future potentials, *J. Amer. College Nutr.*, **11**, 487-500.
- Ross, A. E., D. L. Nagel and B. Toth (1982) Evidence for the occurrence and formation of diazonium ions in the *Agaricus bisporus* mushroom and its extracts, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 521-525.
- Sarma, L. and P. C. Kesavan (1993) Protective effects of vitamins C and E against  $\gamma$ -ray-induced chromosomal damage in mouse, *Int. J. Radiat. Biol.*, **63**, 759-764.
- Witting, L. A. (1980) Vitamin E and lipid antioxidants in free radical-initiated reactions. In: W. A. Pryor (Ed.), *Free Radicals in Biology Vol. IV.*, Academic Press, New York, pp. 295-319.

*Environ. Mut. Res. Commun.*, **17**: 191-201 (1995)

論 説

## 都市ごみ焼却排ガスの変異原性

### Mutagenicity of exhaust gas from municipal waste incinerator

吉野 秀吉<sup>1</sup>, 浦野 紘平<sup>2</sup>

Hidekichi Yoshino<sup>1</sup> and Kohei Urano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 神奈川県環境科学センター 環境工学部

254 平塚市中原下宿 842

<sup>2</sup> 横浜国立大学 工学部

240 横浜市保土ヶ谷区常盤台 156

<sup>1</sup> Kanagawa Environmental Research Center, Division of Environmental Engineering, 842 Nakaharashimojyuku, Hiratuka-shi, 254

<sup>2</sup> Yokohama National University, Laboratory of Safety and Environmental Engineering, 156 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama-shi, 240

(受付: 1995 年 6 月 29 日; 受理: 1995 年 9 月 20 日)

#### Summary

There were served studies on mutagenicity of exhaust gas from municipal waste incinerators. The conventional sampling methods collected particuler materials by filter, but many gaseous mutagenic compounds were found in the exhaust gas. Further, the mutagenic levels, the mutagenic compounds, their formation conditions and their decreasing methods had not been cleared.

We developed a sampling method for mutagenic substances in exhaust gas from municipal waste incinerators. The mutagenic substances could be collected with apparatus which comprised a condenser and a silica wool column as shown in Fig. 2, and all the mutagenic substances could be extracted completely with ethylacetate (Yoshino and Urano, 1994).

By using the above sampling method, mutagenicity of exhaust gas of 16 incinerators were bioassayed by the Ames test TA98 and TA100 *Salmonella typhimurium* strains, with or without the S9 mixture.

It had been found that exhaust gas of the several incinerators were highly mutagenic (Yoshino and Urano, 1995a). The exhaust gas from fluidized bed type incinerators showed higher mutagenicity than that from stoker-type incinerators, and exhaust gas from old plants also showed higher mutagenicity. Since many mutagenic substances were formed under conditions of incomplete combustion, the mutagenicity levels could be decreased by secondary combustion and a sufficient supply of air.

The ethylacetate extract of the above sampling method was fractionated by high performance liquid chromatography, and mutagenic compounds in the each fraction were analysed by gaschromatography mass spectrometry (Yoshino and Urano, 1995a). Sixty two compounds were identified, and 28 of which showed mutagenicity. The compounds identified as mutagenic were polycyclic aromatic hydrocarbons and the their chlorinated derivatives. But it was expected that there were many other mutagenic compounds in the exhaust gas of municipal waste incinerator. We should study more about the mutagenic compounds, their formation condition and their decreasing methods for improving safety of the waste incineration.

**Keywords:** ames test, municipal waste incineration, exahust gas, sampling method, mutagenic compounds

## 1. はじめに

人間は、暖房や照明、調理などのために燃焼の熱や光を利用してきた。一般に、炭素や水素、酸素を主成分として構成される有機物は、完全燃焼すれば二酸化炭素と水にまで分解されるが、実際の燃焼時には必ず不完全燃焼の部分が生じ、熱化学反応によって多種類の化学物質が生成する。このため、様々なものの燃焼によって変異原性物質が生成されることが報告 (Linak *et al.*, 1989; De Marini, 1994; 吉野, 浦野, 1995c) されている。最近では自動車の普及に伴って自動車排ガス、とくにディーゼルエンジン排ガスに含まれる変異原性物質 (Rannug, 1983; Pederson *et al.*, 1981; 山田ら, 1991) が問題となっている。自動車のディーゼルエンジン用の軽油の全国での年間消費量は約 3300 万トンであり、ガソリンエンジン用ガソリンの消費量は約 3500 万トンである。

一方、多量に排出される都市ごみの約 4 分の 3 は焼却され大量の灰や排ガスが排出されている。すなわち、都市ごみの年間焼却量は約 3800 万トンであり、さらに、産業廃棄物として年間約 1 億 5000 万トンが焼却されている。これらのことから、廃棄物の焼却による環境へのインパクトは自動車排ガスのインパクトより大きい可能性がある。

たとえば、都市ごみ焼却灰の変異原性について、Shane ら (1993)、Nogueria ら (1989)、Silkowski ら (1992)、吉野と浦野 (1993, 1994a) の報告がある。これらの報告では、灰に吸着している変異原性物質の抽出方法や炉底から排出される残灰と集塵器で捕集される飛灰の変異原性の比較などが行われている。抽出方法としては、ジメチルスルホキシド (DMSO) を用いる簡便で抽出率も高いこと (吉野, 浦野, 1993)、残灰より飛灰の変異原性が高く、不完全燃焼によって変異原性が高くなることなどがわかっている (吉野, 浦野, 1994a)。しかし、飛灰の変異原性は排ガス全体の変異原性に比べて寄与率が低いと考えられ (Kamiya and Ose, 1987a)、飛灰の変異原性はガス体の変異原性物質の一部が付着したためのものと考えられている (Yoshino and Urano, 1995a)。なお、都市ごみ焼却に伴って生成する塩素化ダイオ

キシン類についても変異原性の場合と同様に飛灰に比べてガス体に多く含まれていることが報告されている (蒲ら, 1989)。また、都市ごみ焼却施設の洗煙水などにも変異原性を示すものもあることが報告 (Kamiya and Ose, 1989) されている。

さらに、都市ごみ焼却作業員と他の作業員との尿の変異原性を比較したところ、前者が明かに高くなっているとの報告 (Scarlett *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1992) もある。なお、焼却施設からのばいじんと周辺の大気中浮遊ばいじんの変異原性との間に相関があるという報告 (Pani *et al.*, 1983; Watts *et al.*, 1989a) もある。しかし、都市ごみ等の廃棄物の焼却生成物の変異原性の詳細な報告は少ない。

著者らは、サルモネラ変異菌 TA98 株、TA100 株を用いた Ames 変異原性試験によって、都市ごみ焼却に伴って排出される排ガスの変異原性試験のための採取・調製方法及び変異原性の実態と特性および変異原性物質について検討してきたので、それらの結果を中心に、都市ごみ焼却排ガスの変異原性に関する研究の現状をまとめて紹介する。

## 2. 変異原性試験のための排ガス試料の採取・調製方法

都市ごみ焼却排ガスの変異原性については、Kamiya と Ose (1987a) は、10~15 m<sup>3</sup> の排ガスのばいじんを円筒濾紙で捕集し、次に高沸点物質をガス冷却瓶で、低沸点物質を活性炭カラムで捕集している。捕集後、円筒濾紙、ガス冷却瓶、活性炭は、いずれもベンゼン：エタノール=1:1 の有機溶媒で抽出し、ロータリーエバポレータで濃縮して、変異原性試験や変異原性物質の分析を行っている。Victorin ら (1988) は、3~30 m<sup>3</sup> の排ガスからばいじんをガラスファイバーフィルターで捕集し、次に高沸点物質をガス冷却装置で、低沸点物質を XAD-2 で捕集している。捕集後、ガラスファイバーフィルターと XAD-2 はアセトンでソックスレー抽出を行い、ガス冷却装置は塩化メチレンで抽出し、両者を混合して有機溶媒を蒸発させた後、2~3 ml の DMSO に再溶解して変異原性試験を行っている。

また、Driver ら (1989) は、医療系廃棄物の焼却

排ガスについてハイボリウムサンプラーを用いてガラスファイバーフィルターにばいじんを捕集し、塩化メチレンで抽出して変異原性試験を行っている。この場合、ばいじん捕集前で排ガスを冷却しているので高沸点物質もフィルターに付着するとしている。Watts ら (1989b) も都市ごみ焼却炉やロータリーキルン式産業廃棄物焼却炉からの排ガスの変異原性物質の捕集にガラスファイバーフィルターを用いている。以上の方法は、いずれの場合も排ガス中の化学物質検索のために開発された方法を参考にして排ガス中の変異原性物質を捕集しているものである。

後藤ら (1981) は、排ガスではないが大気中浮遊粉塵をガラスファイバーフィルターに捕集してアセトニトリルやベンゼン、ヘキサン、ベンゼン／エタノール混合溶媒などを用いて抽出し、変異原性の比活性から最適抽出溶媒を検討している。また、対象物質に Benzo(a)pyrene や Quinoline などを用いてソックスレー抽出時の化学物質の安定性について検討を加え、ベンゼン：エタノール=4:1 (v/v) の混合溶媒が変異原性物質の抽出溶媒としては最も優れていると報告している。しかし、都市ごみ焼却排ガスではガラスファイバーフィルター等で捕集できる粒子状物質だけでなく、ガス状物質にも変異原性物質が多いと考えられる。また、従来の方法では排ガス中の変異原性物質の捕集には、排ガス吸引量も大量で捕集時間も長い。

そこで、著者らは、排ガスの Ames 変異原性試験のためのサンプリング方法を開発した (吉野, 浦野, 1994b)。とくに、廃棄物焼却排ガスを採取する場合、採取位置は高所であることが多く、足場は必ずしもよいわけではないので、なるべく簡易な採取装置で、捕集物の抽出も容易にできる方法を検討した。

排ガス中の変異原性物質の捕集には、50 ml の水を入れた 250 ml ガス冷却・洗浄瓶、5 ml の石英ウールを充填したガラスカラム、吸着樹脂 PS2 (日本ミリポア製) 1 ml 及び孔径 0.2 μm テフロンフィルターの順に構成した装置を用いた。変異原性物質の抽出には、極性の異なるヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、アセトン、メタノール

の 5 種類を用いて最適な抽出溶媒を選定した。すなわち、ガス冷却・洗浄瓶の捕集された凝縮水の抽出には、ヘキサン、塩化メチレン、酢酸エチルの 3 種類を用い、同一試料について、まず、一種類ずつの溶媒で抽出操作を行い、さらに溶媒を変えて抽出するという操作を繰り返して抽出溶媒を選定した。各溶媒での抽出液の変異原性を調べたところ、ヘキサンでは抽出できないものが酢酸エチルで抽出でき、さらに極性の高いメタノールで抽出した部分には変異原性が認められなかったことから、酢酸エチルが変異原性物質の抽出に最も適していることがわかった。ガス冷却・洗浄瓶の付着物のリンスや石英ウールカラムに析出したものについても、同様の検討を行ったところ、ヘキサンでは抽出できないものが酢酸エチルで抽出でき、アセトンやジクロロメタン、メタノールで抽出した部分には変異原性は認められなかった。これらの結果から、捕集された変異原性物質の抽出には酢酸エチルが最も適していることがわかった。次に、酢酸エチルによる抽出時間や抽出回数などを検討したところ、凝縮水の約 4 分の 1 量の酢酸エチルで 5 分間、1 回抽出するだけで凝縮水中の変異原性物質を抽出することができた。石英ウールカラムについては、カラム上部から 20 ml の酢酸エチルを注入し、自然流下速度で通液することで変異原性物質を抽出することができた。なお、吸着樹脂及びテフロンフィルターに捕集されたものはいずれの溶媒抽出によっても全く変異原性が認められなかった。また、0.2 μm フィルターで捕集されたばいじんについても変異原性は認められなかった。すなわち、排ガス中の大部分の変異原性物質は高沸点物質で冷却瓶及び石英ウールのみで、ほぼ完全に捕集されることが確認された。

排ガスの吸引速度については、2 施設において 1 l/min~4 l/min で検討したところ、Fig. 1 に示したように 4 l/min では冷却瓶での水分凝縮が不十分になるため、石英ウール上に水分が凝縮し、変異原性物質が漏出してしまうため、吸引速度は約 2 l/min で 1~2 時間吸引するのがよいことが分かった。また、石英ウールカラムを 2 本、直列につないで付着物の変異原性を測定したところ、変

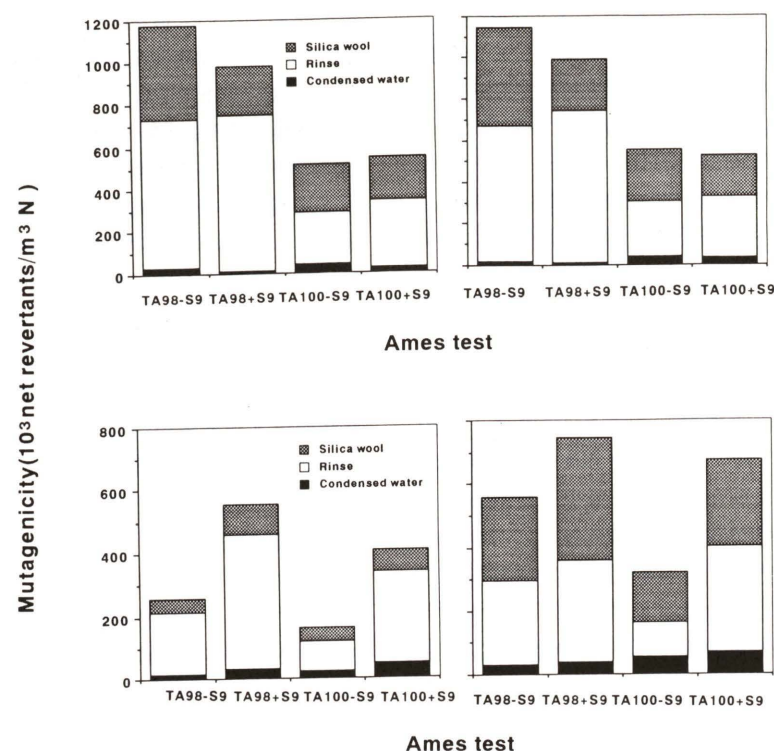


Fig. 1. Mutagenicity of exhaust gas at the different flow rate (Yoshino and Urano, 1994b).  
(Top left: N-7, 2.6 l/min, 150 l; Top right: N-8, 1.7 l/min, 112 l; Bottom left: T-9, 4.0 l/min, 268 l; Bottom right: T-10, 1.8 l/min, 108 l, m<sup>3</sup>N: Gas volume at 0°C and atm).

異原性が非常に高い場合でも2本目のカラムには変異原性が認められなかったことから、1本のカラムで十分であることが確認された。なお、高沸点物質の析出によって黄褐色に着色する範囲が拡大し、カラムの半分を占めるまでは変異原性物質は破過しないことも確認された。以上の結果からFig. 2に示した方法で排ガスを採取することにより、変異原性物質が捕集できることが確認された。

捕集された変異原性物質の抽出は、まず、凝縮水を分液ロートにとり、約4分の1量の酢酸エチルで5分間抽出する。次に、ガス冷却・洗浄瓶にガラスウールカラムを接続し、20 mlの酢酸エチルをガラスウールカラム瓶に自然流下させた後、カラムを取り外し、冷却瓶内壁をリンスする。洗浄後、冷却瓶に約20 mlの酢酸エチルを加えて、十分に内壁の変異原性物質を抽出した後、この酢酸エチル溶液を分液ロート中の酢酸エチル溶液に

合わせ約5 gの硫酸ナトリウムで脱水する。ロータリーエバポレータで濃縮後、酢酸エチルを完全に蒸発させて5 mlのDMSOに再溶解したものをAmes変異原性試験に用いればよい。化学分析が必要な場合には、酢酸エチル濃縮試料液を用いればよい。なお、現在、厚生省が推奨している都市ごみ焼却排ガスからの塩素化ダイオキシン類の捕集方法（廃棄物研究財団, 1991）と本法との関係を検討している。

### 3. 都市ごみ焼却排ガスの変異原性の実態及び特性

都市ごみ焼却によって排ガスに変異原性が認められることは、1987年にKamiyaとOse (1987a)が報告し、その中で排ガスの変異原性がごみ焼却の不完全燃焼と関係があることや飛灰によりガス体に変異原性が高いことを示した。また、不完全燃焼によって多環芳香族炭化水素類 (PAHs) が生

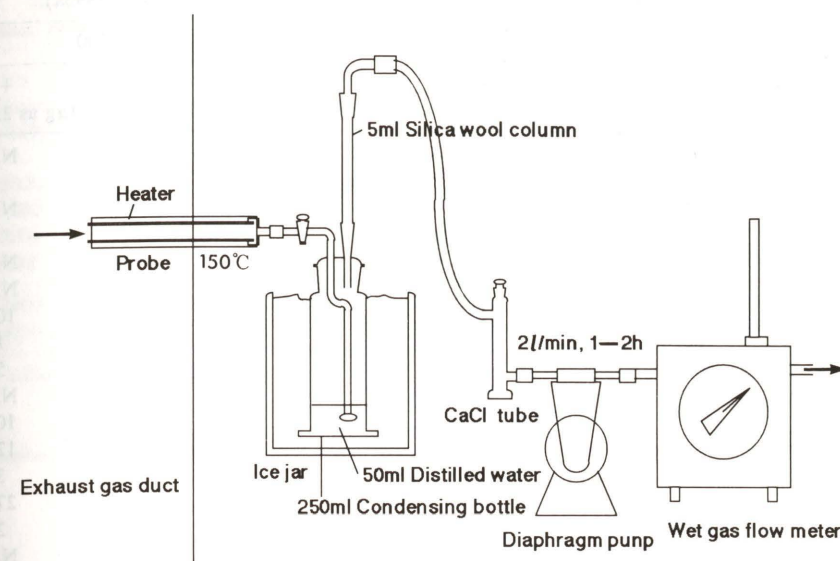


Fig. 2. Developed sampling method of exhaust gas (Yoshino and Urano, 1994b).

成しやすいこと、その後の研究 (Kamiya and Ose, 1987b) で排ガスと洗煙水との変異原性の分配比が9:1であることを示している。また、Victorinら (1988) は、排ガスの変異原性がごみ焼却の不完全燃焼と強い係わりがあり、PAHsの濃度とも相関があることを示している。Wattsら (1989b) も都市ごみ焼却排ガス中のばいじんを大量に捕集して、ジクロロメタンで抽出した試料を用いて変異原性試験を行っている。その結果、変異原性物質は不完全燃焼によって生成されとしている。また、Wattsら (1992) は、ディーゼルやガソリンエンジン排ガス、発電のための石炭燃焼や木材ボイラーなどの変異原性と比較して、都市ごみ焼却の排ガスの方が著しく高いことを示している。

著者らは、都市ごみ焼却排ガスの変異原性の実態や特性を調べて報告した (Yoshino and Urano, 1995a)。16カ所の都市ごみ焼却施設の排ガスの変異原性試験を行ったところ、Table 1に示したように全く変異原性が認められなかった2施設を除いた14の施設でなんらかの変異原性が認められた。また、集塵器で捕集される飛灰の変異原性 (吉野, 浦野, 1994a) に比べて排ガスの変異原性がかなり高いことが明らかにされた。排ガスの変異原性は塩基置換型とフラームシフト型の両方に

認められるが、特に代謝活性化した場合のフラームシフト型の変異活性が高くなる傾向が示された。都市ごみ焼却で使われる焼却炉は、主にストーカ式焼却炉と流動床式焼却炉であるが、ストーカ式焼却炉より流動床式焼却炉の場合に変異原性が高く、また古い焼却炉ほど高い傾向が認められた。しかし、焼却炉の規模や焼却温度による差は認められなかった。

また、排ガスの変異原性は、Fig. 3に示したように、排ガスのCO濃度が高くなるとともに高くなる傾向が認められた。したがって、Table 2に示した例に見られるように、二次燃焼空気を増加させて酸素濃度を高くすることによりCO濃度を低くでき、変異原性も低くできることがわかった。

以上の結果から、不完全燃焼により変異原性物質が生成されやすくなるので、焼却炉の改造や燃焼管理によりCO濃度を500 ppm以下に保てば、変異原性が著しく高くなることはないことがわかった。なお、塩素化ダイオキシン類の生成抑制のためには、CO濃度を新設50 ppm、既設100 ppm以下にすることが望ましいとされている (廃棄物研究財団, 1991) ので、このレベルで変異原性を測定するため、現在、変異原性試験の一層の高感度化を検討している。

Table 1. Relative mutagenicity of exhaust gas samples (Yoshino and Urano, 1995a).

Plant	TA98		TA100	
	-S9 ( $\mu\text{g}$ as 4NQO/ $\text{m}^3\text{N}$ )	+S9 ( $\mu\text{g}$ as 2AA/ $\text{m}^3\text{N}$ )	-S9 ( $\mu\text{g}$ as 4NQO/ $\text{m}^3\text{N}$ )	+S9 ( $\mu\text{g}$ as 2AA/ $\text{m}^3\text{N}$ )
A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B	11	16	N.D.	63
C	14	N.D.	N.D.	N.D.
H	82	71	7	58
I	13	16	N.D.	N.D.
M	6	16	N.D.	N.D.
N	741	764	91	1020
O	36	50	2	100
P	344	738	29	540
R	4	N.D.	N.D.	N.D.
S	410	1060	38	1020
T	758	1980	82	1290
V	311	613	18	367
X	710	5120	110	2710
Y	191	467	13	279
Z	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

$\text{m}^3\text{N}$ : Gas volume at  $0^\circ\text{C}$  and 1 atm.

N.D.: MR values are under 1.5.

All of the values are converted to the concentration of positive standard compounds 4 Nitroquinoline-1-oxide (4NQO) and 2-Aminoanthracene (2AA) per unit volume of gas.

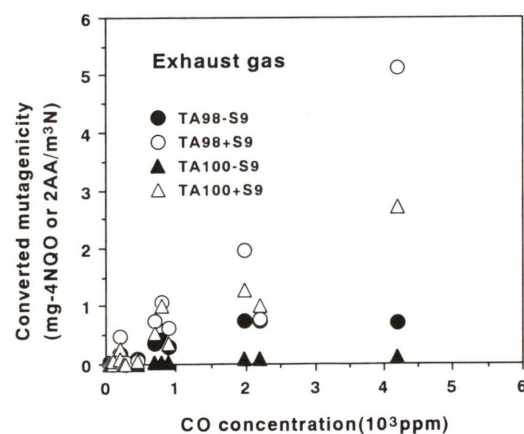


Fig. 3. Relation between CO concentration and mutagenicity in exhaust gas (Yoshino and Urano, 1995a).

( $\text{m}^3\text{N}$ : Gas volume at  $0^\circ\text{C}$  and 1 atm).

#### 4. 都市ごみ焼却排ガス中の変異原性物質

燃焼に伴って生成される変異原性物質の中で今までに明らかにされている物質は、主に PAHs であり、PAHs にメチル基などのアルキル基 (Harris and Remsen, 1987) やニトロ基 (Holmberg and Ahlbor, 1983) が付加した変異原性の高い物

質、PAHs のケトン体 (Ramdahl, 1985) なども報告されている。Kamiya と Ose (Kamiya *et al.*, 1987a; 1988) は、都市ごみ排ガス試料をシリカゲルを充填したカラムクロマトグラフィーにより最初にイソオクタンを用いて分離し、次にイソオクタン：ベンゼン=1:1、ベンゼン：メタノール=1:1 の順に溶媒を変えて分離する方法を採用している。各分離液は濃縮してガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) を使って分析し、1-methylnaphthalene, Methylfluorene, Methylphenanthrene, Fluoranthene, Benzo-fluorene, Benzoanthracene, Chrysene, Triphenylene, Benzo(a)pyrene, Perylene, Benzo(ghi)perylene およびニトロピレンなどの変異原性物質を検出している。

著者らは、酢酸エチル抽出液として得られた変異原性試験用試料を HPLC 分画した後、GC/MS 分析などで物質の同定を行った (Yoshino and Urano, 1995b)。同定できた各物質は、Ames 変異原性試験により変異原性を調べた。HPLC には、分取用のシリカゲルカラムを用い、移動相には 5% 酢酸エチル/ヘキサン溶液を用い、分画は、Fig. 4 のクロマトグラムのフラクション 1 から 6

Table 2. Influence of air volume into secondary combustion on mutagenicity of exhaust gas (Yoshino and Urano, 1995b).

Plant	Air volume ( $\text{m}^3\text{N}/\text{h}$ )	Incinerator temperature ( $^\circ\text{C}$ )	CO concentration in exhaust gas (ppm)	TA98		TA100	
				-S9 (net rev./ $\text{m}^3\text{N}$ )	+S9 (net rev./ $\text{m}^3\text{N}$ )	-S9 (net rev./ $\text{m}^3\text{N}$ )	+S9 (net rev./ $\text{m}^3\text{N}$ )
N	13000	895	300	$15 \times 10^3$	$22 \times 10^3$	$15 \times 10^3$	$51 \times 10^3$
	11000	895	670	$32 \times 10^3$	$31 \times 10^3$	$50 \times 10^3$	$43 \times 10^3$
	9000	900	1000	$54 \times 10^3$	$36 \times 10^3$	$70 \times 10^3$	$94 \times 10^3$
	7000	870	2000	$169 \times 10^3$	$147 \times 10^3$	$211 \times 10^3$	$533 \times 10^3$
T	2400	820	2500	$276 \times 10^3$	$352 \times 10^3$	$214 \times 10^3$	$366 \times 10^3$
	4200	850	600	$114 \times 10^3$	$111 \times 10^3$	$69 \times 10^3$	$93 \times 10^3$

$\text{m}^3\text{N}$ : Gas volume at  $0^\circ\text{C}$  and 1 atm.

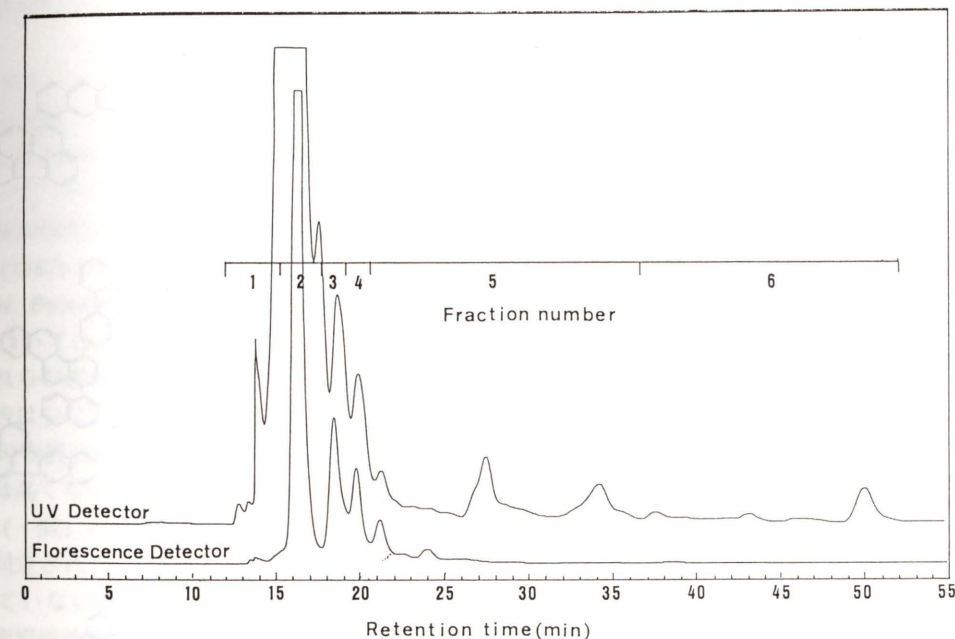


Fig. 4. Chromatograms and fractions by HPLC (Yoshino and Urano, 1995b).

Table 3. Mutagenicity of each fraction by HPLC (Yoshino and Urano, 1995b).

	TA98 (net rev./ $\text{m}^3\text{N}$ )		TA100 (net rev./ $\text{m}^3\text{N}$ )	
	-S9	+S9	-S9	+S9
NO 1	N.D. (0)	N.D. (0)	N.D. (0)	N.D. (0)
NO 2	7000 ( 3.5)	19000 ( 8.3)	N.D. (0)	5900 (14.2)
NO 3	18000 ( 9.0)	55000 (24.2)	N.D. (0)	82000 (19.7)
NO 4	25000 (12.5)	43000 (18.3)	N.D. (0)	88000 (21.1)
NO 5	36000 (18.0)	19000 ( 8.3)	66000 (23.4)	N.D. (0)
NO 6	13000 ( 6.5)	N.D. (0)	62000 (21.9)	N.D. (0)

$\text{m}^3\text{N}$ : Gas volume at  $0^\circ\text{C}$  and 1 atm.

N.D.: MR values are under 1.5.

( ): Recovery ratio of each fraction (%).

Table 4. Identified mutagenic compounds by GC/MS (Yoshino and Urano, 1995b).

MW	Compounds name	Mol formula	Constitutional
220	Dichloroacenaphthylene	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub>	
192	9-Methylantracene	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub>	
212	Monochloro anthracene	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl	
190	4,5-Methylenepheneanthrene	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub>	
202	Fluoranthene	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	
236	Monochlorofluoranthene	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> Cl	
270	Dichlorofluoranthene	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	
270	Dichloropyrene	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	
216	2,3-Benzofluorene	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub>	
226	Benzo(ghi)fluoranthene	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub>	
260	Monochlorobenzo(ghi)fluoranthene	C <sub>18</sub> H <sub>9</sub> Cl	
294	Dichlorobenzo(ghi)fluoranthene	C <sub>18</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	
228	Triphenylene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	
228	Chrysene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	
228	2,3-Benzanthracene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	
252	Benzo(b)fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
286	Monochloro benzo(b)fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> Cl	
320	Dichloro benzo(b)fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub>	
252	Benzo(e)pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
286	Monochloro benzo(e)pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> Cl	
320	Dichloro benzo(e)pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub>	
252	Benzo(a)pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
286	Monochloro benzo(a)pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> Cl	
320	Dichloro benzo(a)pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub>	
252	Perylene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
286	Monochloroperylene	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> Cl	
320	Dichloroperylene	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub>	
276	Benzo(ghi)perylene	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	

を分取した。各フラクションを濃縮して、GC/MSなどの化学分析を行い、また溶媒をDMSOに変換して、Ames変異原性試験を行った。Table 3に示したように、フラクション1には変異原性は全く認められなかったが、フラクション2~6には変異原性が認められた。TA98(-S9)では、フラクション2~6に変異原性が認められ、TA98(+S9)ではフラクション2~5に変異原性が認められた。TA100(-S9)では、フラクション5,6に変異原性が認められ、フラクション2~4には認められなかったが、TA100(+S9)では、フラクション2~4に変異原性が認められ、TA100では、直接変異原性物質と間接変異原性物質とが分画できた。

各フラクションの同定できた化学物質は62物質であったが、変異原性が認められたのはTable 4に示したPAHsとPAHsの1~2塩素化物28物質であった。PyreneやFluorantheneの1~3塩素化物の変異原性については、水の塩素処理において森ら(1987)や高橋ら(1984)が報告しており、Chrysene, fluoranthene, Pyreneの塩素化物の変異原性については、Bhatiaら(1987)の報告があるが、これらの都市ごみ焼却排ガスとの関連についての報告は少ない。また、変異原性が確認されたこれらの物質の排ガス全体の変異原性に対する寄与率は高くない。さらに、TA98(-S9)及びTA100(-S9)の直接変異原性物質についてはほとんど同定されていない。したがって、今後は同定できていないPAHsの多塩素化物類をはじめとする変異原性物質の分離定量と生成抑制に関する研究が必要と思われる。

## 5. おわりに

都市ごみ焼却施設からの排ガスの安全性については様々な指摘や研究があり、変異原性についてもいくつかの研究が行われてきた。しかし、都市ごみ焼却排ガスからの変異原性物質の捕集方法、排ガスの変異原性レベル、変異原性物質の分離定量、施設の改善対策などの詳細については不明な点が多い。ここでは、これらについての研究の現状を紹介し、今後の課題を論じた。

都市ごみ焼却排ガスや大気の変異原性について

は、従来、フィルターによって粒子状物質を捕集して試験されている例が多い。しかし、ガス状物質にも高い変異原性が認められている。そこで著者らは、冷却トラップと石英ウールカラムで変異原性物質を捕集し、酢酸エチルで効率よく抽出する方法を開発し、16カ所の施設の変異原性レベルをAmes法で調査するとともに、変異原性物質の分離定量を試みた。

今までの研究によると、多くの都市ごみ焼却施設の排ガスからかなり高い変異原性が認められ、飛灰の変異原性よりガス体の変異原性の方がはるかに高いこと、ストーカ炉に比べて流動床炉の方が変異原性が高い場合が多いこと、古い施設で変異原性が高い場合が多いこと、CO濃度が500ppm以上になると変異原性が高くなること、二次燃焼室の改善などで変異原性を低減できることなどが明らかになっている。

また、都市ごみ焼却排ガス中の変異原性物質としては、自動車排ガスなどでも検出されている多環芳香族炭化水素(PAHs)の他に、水の塩素処理などでも検出されているPAHsの1~3塩素化物が検出されている。しかも、これらの排ガス全体の変異原性に対する寄与率は低く、PAHsの4以上の塩素化物をはじめとする未同定の変異原性物質が多数存在すると考えられる。

今後は、さらに変異原性物質の分離定量を進めるとともに、変異原性物質の捕集と変異原性試験の一層の簡易化や高感度化方法の検討、焼却物や焼却施設の種類あるいは焼却条件や排ガス処理方法などと変異原性との関係のより詳細な検討、塩素化ダイオキシン類の生成条件との関連の明確化、具体的な削減対策の検討などを進める必要がある。関係者の協力によって、これらの研究が進められ、都市ごみ焼却排ガスの安全性が一層改善されることを期待したい。本稿が、そのために多少とも役立てば幸である。

## 参考文献

- Bhatia, A.L., H. Tausch and G. Stehlik (1987) Mutagenicity of chlorinated polycyclic aromatic compounds, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **14**, 48-55.
- DeMarini, D. M. (1994) Induction of mutation spectra by complex mixtures: approaches, problems, and possibilities.

- ties, Environ. Health Perspect., **102**, 127-130.
- Driver, J. H., H. W. Rogers and L. D. Claxton (1989) Mutagenicity of combustion emissions from a biomedical waste incinerator, PB Rep., PB-89-222798, 1-14.
- 後藤純雄, 河合明宏, 米川 徹, 久松由東, 松下秀鶴 (1981) 大気浮遊粉じんの変異原性に及ぼす抽出溶媒の影響, 大気汚染学会誌, **16**, 18-25.
- 廃棄物研究財団 (1991) 廃棄物処理におけるダイオキシン等の発生メカニズム等に関する研究総合報告書, pp. 251-312.
- Harris, W. R. and J. F. Remsen (1987) Correlation of nitroaromatic compounds with the mutagenic activity of coal fly ash, J. Toxicol. Environ. Health, **20**, 81-103.
- Holmberg, B. and G. U. Ahlbor (1983) Consensus report: Mutagenicity and carcinogenicity of car exhausts and coal combustion emissions, Environ. Health Perspect., **47**, 1-30.
- 蒲 敏幸, 小松正幹, 上田彬博, 松野喜六, 足立雅彦 (1989) ごみ焼却場の排ガス処理過程におけるポリ塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシンについて (II), 京都府衛生公害研究所年報, **34**, 64-71.
- Kamiya, A. and Y. Ose (1987a) Mutagenic activity and PAH analysis in municipal incinerators, Sci. Total Environ., **61**, 37-49.
- Kamiya, A. and Y. Ose (1987b) Study of the behaviour of mutagens in wastewater and emission gas from a municipal incinerator evaluated by means of the Ames assay, Sci. Total Environ., **65**, 109-120.
- Kamiya, A., Y. Ose (1988) Isolation of dinitropyrene in emission gas from a municipal incinerator and its formation by a photochemical reaction, Sci. Total Environ., **72**, 1-9.
- Kamiya, A., Y. Ose (1989) The mutagenicity of refuse leachate from a municipal incinerator, Sci. Total Environ., **78**, 131-145.
- Linak, W. P., J. V. Ryan, E. Perry, R. W. Williams and D. M. DeMarini (1989) Chemical and biological characterization of products of incomplete combustion from the simulated field burning of agricultural plastic, JAPCA, **39**, 836-846.
- 森 康明, 内藤昭治, 後藤純雄, 松下秀鶴 (1987) 水中ビレンの塩素化反応によるモノクロピレン及びジクロロピレンの生成, 衛生化学, **33**, 313-320.
- Ma, X. F., J. G. Babish, J. M. Scarlett, W. H. Gutenmann and D. J. LISK (1992) Mutagens in urine sampled repetitively from municipal refuse incinerator workers and water treatment workers, J. Toxicol. Environ. Health, **37**, 483-494.
- Nogueira, M., H. J. Moriske and H. Ruden (1989) Chemical and biological characterization of electrofilter dusts of a waste incinerator. 1. Comparison of different extraction methods for organic dust contents and their mutagenicity, Zentralbl Hyg Umweltmed, **188**, 404-420.
- Pani, B., U. Laurenzi, N. Babudri, A. Collareta, S. Venturini, R. Ferri, M. Carrozzì, F. Burlini and C. Monti Bragadin (1983) Mutagenicity test of extracts of airborne dust from the municipal incinerator of Trieste, Environ. Mutagen., **5**, 23-32.
- Pederson, T. C. and J. S. Siak (1981) The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts, J. Appl. Toxicol., **1**, 54-60.
- Ramdahl, T. (1985) Characterization of polar compounds such as polycyclic aromatic ketones in air pollution including wood smoke, Environ. Int., **11**, 197-203.
- Rannug, U. (1983) Data from short-term tests on motor vehicle exhaust, Health Perspect., **47**, 161-169.
- Scarlett, J. M., J. G. Babish, J. T. Blue, S. E. Voekler and D. J. Lisk (1990) Urinary mutagens in municipal refuse incinerator workers and water treatment workers, J. Toxicol. Environ. Health, **31**, 11-27.
- Shane, B. S., W. H. Gutenmann and D. J. Lisk (1993) Variability over time in the mutagenicity of ash from municipal solid waste incinerators, Mutat. Res., **301**, 39-43.
- Silkowski, M. A., S. R. Smith and M. J. Plewa (1992) Analysis of the genotoxicity of municipal solid waste incinerator ash, Sci. Total Environ., **111**, 109-124.
- 高橋淳子, 木村栄作, 岩原繁雄, 安藤正典, 佐谷戸安好 (1984) 水中フルオランテンの塩素処理時における挙動と変異原性, 衛生化学, **30**, 268-274.
- Victorin, K., M. Stahlberg and U. G. Ahlberg (1988) Emission of mutagenic substances from waste incinerator plants, Waste Management & Research, **6**, 149-161.
- 山田和正, 布柴達夫, 西岡 一 (1991) ディーゼル排ガス粒子の変異原性に対する環境要因, 同志社大学理工学研究報告, **32**, 1-7.
- 吉野秀吉, 浦野紘平 (1993) 廃棄物焼却炉飛灰の変異原性試験のための試料調製方法, 廃棄物学会論文誌, **4**, 64-71.
- 吉野秀吉, 浦野紘平 (1994a) 一般廃棄物焼却灰の変異原性の実態と特性, 廃棄物学会論文誌, **5**, 11-18.
- 吉野秀吉, 浦野紘平 (1994b) 廃棄物焼却炉排ガスの変異原性試験のための試料採取・調製方法, 大気汚染学会誌, **29**, 245-253.
- Yoshino, H. and K. Urano (1995a) Mutagenicity of exhaust gas from incineration plants of municipal waste, Sci. Total Environ., **162**, 23-30.
- Yoshino, H. and K. Urano (1995b) Mutagenic compounds in exhaust gas from municipal waste incinerator, Sci. Total Environ., submitted.
- 吉野秀吉, 浦野紘平 (1995c) 燃焼・焼却に伴う変異原性物質の生成, 大気環境学会誌, 投稿中.
- Watts, R. R., D. M. Demarini and J. Lewtas (1989a) Use of bioassay to evaluate organic extracts of particles emitted from municipal waste combustion and a rotary kiln incinerator, PB Rep. PB-89-221279, 1-14.
- Watts, R., R. Fitzgerald, G. Heil, H. Garabedian, R. Williams, S. Warren, L. Fradkin and J. Lewtas (1989b) Use of bioassay methods to evaluate mutagenicity of ambient air collected near a municipal waste combustor,

J.A.P.C.A., **39**, 1436-1439.

Watts, R. R., P. M. Lemieux, R. T. Grote, R. W. Lowans, R. W. Williams, L. R. Brooks, S. H. Warren, D. M. Demarini, D. A. Bell and J. Lewtas (1992) Develop-

ment of source testing, analytical, and mutagenicity bioassay procedures for evaluating emissions from municipal and hospital waste combustors, Environ. Health Perspect., **98**, 227-234.

## エリスロポエチンによる小核赤血球の誘発

### Induction of micro-nucleated erythrocytes by erythropoietin

繁田 晴美, 矢嶋 信浩

Harumi Handa and Nobuhiro Yajima\*

雪印乳業株式会社生物科学研究所  
329-05 栃木県下都賀郡石橋町下石橋 519

Research Institute of Life Science, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.,  
519, Shimoishibashi, Ishibashi, Shimotsuga-gun, Tochigi, 329-05, Japan

(受付: 1995 年 7 月 6 日; 受理: 1995 年 9 月 25 日)

#### Summary

Erythropoietin (EPO) stimulates red blood cell production by promoting both the growth of late erythroid precursor cells and their maturation into proerythroblasts. EPO is a small peptide (166 amino acids) with no obvious potential to react with DNA. It reacts with specific receptors on erythroid precursor cells to increase numbers of erythrocytes when oxygen tension is low. A recombinant human EPO (rhEPO) was administered once i.p. to CD-1 male mice. At 48, 72, and 96 hour-sampling times, rhEPO at 400-50,000 IU/kg induced a significant increase in the frequency of micro-nucleated reticulocytes (MNRET) in peripheral blood in a clear positive dose-response relationship. In bone marrow, the 12,500-50,000 IU/kg treatments induced only a marginally significant increase in micro-nucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE). Conversely, chromosomal aberrations were not detected in the bone marrow cells of mice dosed with rhEPO, even at 100,000 IU/kg. Comparative studies on rhEPO and urinary human EPO (uhEPO) showed that both produced similar chromosomal effects. When mice were dosed with 50,000 IU/kg rhEPO or uhEPO once each day for six days and micro-nucleus preparations were made 24 hours after the last dosing, micro-nucleus induction in the bone marrow was not clearly demonstrated. As before, MNRETs in these mice were significantly induced in both cases. Consequently, it was concluded that errors in the process of erythrocyte enucleation or differentiation should be considered as possible mechanisms for the induction of MNPCE and MNRET together with DNA damage or error in the DNA repair process.

**Keywords:** erythropoietin (EPO); micro-nucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE); micro-nucleated reticulocyte (MNRET); chromosomal aberration

#### 1. はじめに

##### 1.1 赤血球分化とエリスロポエチン

骨髓や脾臓などの造血組織において、幹細胞 (Stem Cell) に対して様々な増殖因子や分化誘導因子が作用し、各種の血球細胞が成熟・分化することが知られている (Fig. 1). エリスロポエチン (Erythropoietin, EPO) は、Erythrocyte colony-forming unit (CFU-E) と呼ばれる後期赤芽球前駆

細胞に作用し、赤芽球細胞 (erythroblast) への分化・増殖を促進する。EPO は低酸素条件下で CFU-E 上の特異的受容体と反応し、赤血球数を増加させ、また極度の貧血条件下では高レベルになり幼若な赤血球を増加させる (Goldwasser, 1975; Fisher *et al.*, 1983; Sytkowski *et al.*, 1984). EPO と赤芽球前駆細胞との反応は受容体を介した特異的反応であり、赤芽球の増殖と成熟の過程

\* To whom correspondence should be addressed.

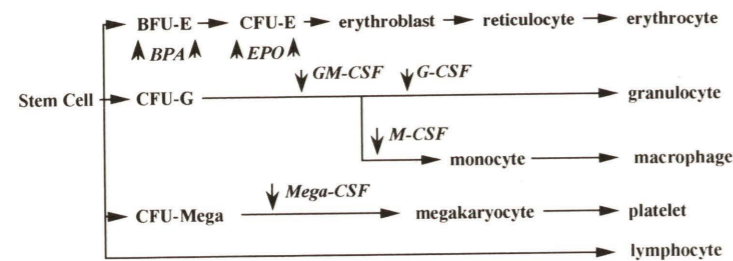


Fig. 1. Erythropoiesis and Differentiation of Blood Cells.

Abbreviation: BFU-E, erythrocyte burst-forming unit; CFU-E, erythrocyte colony-forming unit; CFU-G, granulocyte-macrophage colony-forming unit; CFU-Mega, megakaryocyte colony-forming unit; BPA, burst promoting activator; EPO, erythropoietin; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; M-CSF, macrophage colony stimulating factor; Mega-CSF, megakaryocyte colony stimulating factor.

における EPO の作用点は特異的である。

## 1.2 EPO の生産

EPO は腎臓で生産され、166 個のアミノ酸からなる糖蛋白質で、従来は、単クローナル抗体を用いて貧血患者の尿より精製したもの (Yanagawa *et al.*, 1984; Sasaki *et al.*, 1987) が実験室レベルで使用されていた。現在では、遺伝子組換え技術によって、クローニングされたヒトの EPO 遺伝子を哺乳類の培養細胞に導入し、大量の遺伝子組換え型ヒトエリスロポエチン (rhEPO) が生産できるようになり (Jacobs *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985; Goto *et al.*, 1988) 臨床での使用が可能になった。

## 1.3 EPO の変異原性

受容体を介して生物学活性を示す物質の変異原性を調べる際に、変異原性試験として普及している Ames 試験 (Ames *et al.*, 1975; Maron and Ames 1983) や *in vitro* の培養細胞を用いた染色体異常試験 (Ishidate and Odashima, 1977) といった試験では、使用する細胞がその物質に対する特異的受容体を持たないため、細胞は無反応であり、遺伝毒性に関して意味のある情報を提供し得ないと思われた。

実際に、著者らの行った細菌を用いた復帰変異試験では、188–6,000 IU/plate の rhEPO は *S. typhimurium* の TA100, TA98, TA1535, TA1537 株あるいは *E. coli* の WP2 *uvrA*<sup>-</sup> に対して S9mix の

有無に係わらず非栄養要求株への変異を誘発しなかった。同様に、*in vitro* において 750–6,000 IU/ml の rhEPO は CHL やヒトのリンパ球に対して、染色体異常誘発能も示さなかった (Yajima *et al.*, 1993a)。

この様に、高濃度処理によって復帰変異や染色体異常が誘発されなかったことから、不純物も含め、著者らが用いた rhEPO は、DNA と直接反応を示さないと思われた。

## 1.4 EPO の小核誘発能に関する既知の報告

複数の研究者によって、貧血患者の尿由来の EPO (uhEPO) あるいは rhEPO が持つ、小核多染性赤血球 (MNPCE) の誘発能について、*in vitro* 及び *in vivo* の実験系を用いて検討されている。Nito ら (1986) は、uhEPO がマウスの骨髄由来の初代培養細胞に対して *in vitro* で MNPCE を誘発すると報告し、Suzuki ら (1989a) は、uhEPO で前処理したマウスでは、造血亢進によって変異原性物質に対する感受性が増し、小核出現頻度が増加すると報告している。さらに、Suzuki ら (1989b) は uhEPO が *in vivo* でマウス骨髄に小核正染性赤血球 (MNPCE) を誘発すると報告している。一方、須藤ら (1988) と井上ら (1990) はそれぞれ、rhEPO は 50,000 IU/kg あるいは 2,500 µg/kg という高濃度においてもマウス骨髄に小核多染性赤血球 (MNPCE) を誘発しないと報告している。

一見、統一の取れないこれらの報告について議論を始める前に、小核試験の機構について少し論

peripheral blood

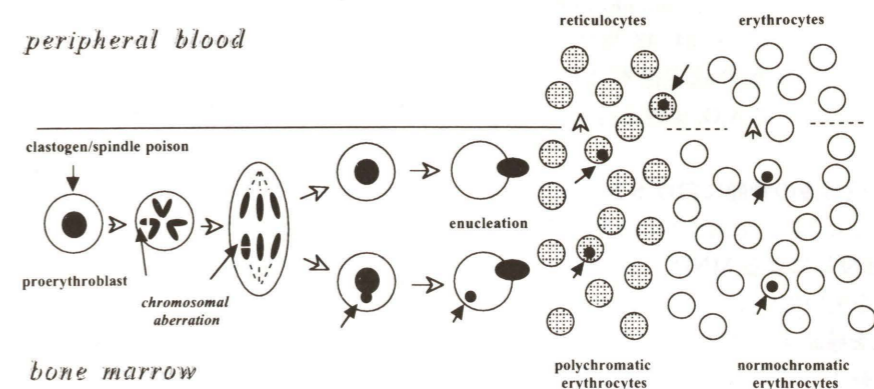


Fig. 2. Micronucleus formation by clastogen and/or spindle poison.

じたい。

## 1.5 小核試験の変異検出機構

マウスの骨髄を用いた小核試験は *in vivo* の短期試験法として Heddle (1973) や Schmid (1975) によって提唱され、染色体異常誘発物質や紡錘糸の形成阻害剤の検出に広く応用されている。Fig. 2 には Hayashi ら (1984) の小核形成に関する模式図を引用した。染色体異常誘発物質や紡錘糸の形成阻害剤によって前赤芽球に染色体の断片や不分離が生じると、その結果として多染性赤血球に小核として DNA 断片が残る。即ち、小核試験では、脱核後の幼若な赤血球に生じた小核の有無から、前赤芽球の遺伝物質に誘発された傷害の有無を推測することができる。また、近年、Hayashi ら (1990) によって、アクリジン・オレンジ (A.O.) を塗布したスライド上のマウスの末梢血網赤血球を用いた小核試験が新しく開発された。この方法を用いると、骨髄ばかりでなく、脾臓など他の造血臓器で前赤芽球に起こった遺伝子傷害も小核として検出できる可能性が生まれた。

## 2. EPO によって誘発される骨髄中の小核多染性赤血球 (MNPCE)

rhEPO および uhEPO によって誘発される小核について著者らの実験結果を中心に述べる。実験方法やデータ解析法の詳細は著者らの原著 (Yajima *et al.*, 1993a, b, c) を参考にされたい。

## 2.1 被験物質として用いた EPO

rhEPO はヒト EPO 遺伝子を導入、発現させた仔ハムスター腎由来 BHK-21 を大量培養後その上澄より、uhEPO は貧血患者の尿より、免疫親和性クロマトグラフィーを用いてそれぞれ精製した (Yanagawa *et al.*, 1984; Sasaki *et al.*, 1987; Goto *et al.*, 1988)。rhEPO および uhEPO の蛋白純度は RP-HPLC による面積百分率法でそれぞれ 99% および 95% 以上であった。rhEPO および uhEPO は、それぞれ、ヒト血清アルブミン (HSA) を局方生理食塩液で希釈した 0.25% HSA-Saline および PBS を用いて希釈した。被験物質および対照物質溶液は用時調製した。投与経路は腹腔内 (i.p.) とした。

## 2.2 使用動物

日本チャールス・リバー株式会社から 7 週齢の CD-1 系雄マウス (SPF) を購入し、1 週間の検疫・馴化後試験に供した。各群 6 匹を使用し、飼料は CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社)、飲料水は自家水をフィルター (孔径 0.45 µm) 濾過したものをそれぞれ自由に摂取させた。

## 2.3 骨髄塗抹標本の作製

EPO のマウスにおける最大耐量を求めることが出来なかったため、推定臨床用量 (50 IU/kg) の 1,000 倍に相当する 50,000 IU/kg を最高濃度とし、さらに 25,000 及び 12,500 IU/kg の 2 用量を設定した。陽性対照には、マイトマイシン C (MMC)

を用いた。骨髓の塗抹標本は Schmid (1975) 法に従ってマウスに単回投与後 24, 48 及び 72 時間に作製した。骨髓塗抹後の固定標本は Hayashi ら (1983) の方法に従って A.O. 染色を行った。

## 2.4 単回投与後の骨髓における MNPCE

既に述べたように、公表された複数の論文からは EPO 単回投与による MNPCE 誘発に関する結論は統一性を欠いているように思われたので、先ず、再現性を確認する意味から、2つの製造ロット G-002A および G-009A について実験を行った。

結果を Table 1 に示した。rhEPO 投与による死亡例は観察されなかった。24 時間後の MNPCE 出現率は、12,500 と 50,000 IU/kg の G-009A 投与

群では、それぞれ、0.28% ( $p < 0.05$ ) および 0.27% ( $p < 0.05$ )、48 時間後の MNPCE 出現率は、50,000 IU/kg の G-002A 投与群では 0.43% ( $p < 0.01$ )、12,500, 25,000 および 50,000 IU/kg の G-009A 投与群では、それぞれ、0.32% ( $p < 0.05$ )、0.35% ( $p < 0.01$ ) および 0.42% ( $p < 0.01$ ) と有意に増加した。PCE 比は両ロットとも投与後 24, 48 および 72 時間で増減はなかった。

次に、遺伝子組換え型の rhEPO と天然型であるヒト尿由来の uhEPO について比較実験を行った。rhEPO および uhEPO 投与による死亡例は観察されなかった。Table 2 に示したように、rhEPO および uhEPO による、統計学的に有意ではあるが散発的な MNPCE 出現率の増加が、全ての標本採集時間で一つ以上の群に観察された。50,000

Table 1. Micronucleus test in bone marrow cells of mice treated singly with rhEPO.

Chemical	Time <sup>a</sup>	Concentration (IU/kg)	Number of animals	MNPCE/PCE (%) <sup>b</sup>	PCE/NCE+PCE (%) <sup>b</sup>
rhEPO	24	0.00 <sup>c</sup>	6	0.10±0.09	55.9±1.3
G-002A		12,500	6	0.22±0.15	51.3±9.1
		25,000	6	0.12±0.13	47.6±4.9
		50,000	6	0.20±0.13	47.8±12.1
G-009A		12,500	6	0.28±0.29 <sup>*d</sup>	43.9±8.6
		25,000	6	0.22±0.20	51.7±6.6
		50,000	6	0.27±0.22 <sup>*d</sup>	48.6±8.5
MMC		2.00 (mg/kg)	6	4.37±1.11 <sup>*kd</sup>	35.2±6.8 <sup>+++</sup>
rhEPO	48	0.00 <sup>c</sup>	6	0.12±0.12	57.2±4.2
G-002A		12,500	6	0.23±0.08	51.2±13.1
		25,000	6	0.22±0.21	55.5±11.1
		50,000	6	0.43±0.30 <sup>*kd</sup>	52.5±9.7
G-009A		12,500	6	0.32±0.23 <sup>*d</sup>	56.9±8.0
		25,000	6	0.35±0.26 <sup>*kd</sup>	45.6±9.1
		50,000	6	0.42±0.25 <sup>*kd</sup>	57.7±7.5
MMC		2.00 (mg/kg)	6	4.10±1.15 <sup>*kd</sup>	14.4±7.0 <sup>+++</sup>
rhEPO	72	0.00 <sup>c</sup>	6	0.18±0.15	51.5±10.0
G-002A		12,500	6	0.23±0.16	54.0±8.7
		25,000	6	0.27±0.19	55.0±9.8
		50,000	6	0.20±0.19	60.0±4.9
G-009A		12,500	6	0.28±0.18	54.9±9.6
		25,000	6	0.23±0.08	61.4±7.5
		50,000	6	0.27±0.21	51.0±5.3
MMC		2.00 (mg/kg)	6	0.25±0.19	21.9±15.8 <sup>+++</sup>

<sup>a</sup> Sampling times after administration.

<sup>b</sup> Mean±S.D.

<sup>c</sup> 0.25% HSA-Saline, referred to the manuscript.

<sup>d</sup> Significantly different from control by the method of binomial based Kastenbaum and Bowman (1970) (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ ).

<sup>e</sup> Significantly different from control by Dunnett's *t*-test (1964) (++;  $p < 0.01$ ).

Table 2. Micronucleus test in bone marrow cells of mice treated singly with rhEPO and uhEPO.

Chemical	Time <sup>a</sup>	Concentration (IU/kg)	Number of animals	MNPCE/PCE (%) <sup>b</sup>	PCE/NCE+PCE (%) <sup>b</sup>
rhEPO	24	0.00 <sup>c</sup>	6	0.13±0.12	53.4±7.3
		12,500	6	0.30±0.20 <sup>*e</sup>	44.1±5.2
		25,000	6	0.13±0.08	51.8±5.7
		50,000	6	0.20±0.14	54.8±5.3
uhEPO	24	0.00 <sup>d</sup>	6	0.12±0.24	51.4±8.5
		12,500	6	0.20±0.24	50.6±4.7
		25,000	6	0.32±0.19 <sup>*e</sup>	49.5±8.1
		50,000	6	0.13±0.14	49.2±3.0
MMC		0.50 (mg/kg)	6	1.17±0.48 <sup>*ke</sup>	50.6±7.0
rhEPO	48	0.00 <sup>c</sup>	6	0.07±0.05	49.8±4.8
		12,500	6	0.23±0.20 <sup>*e</sup>	49.1±7.9
		25,000	6	0.32±0.21 <sup>*ke</sup>	47.9±5.1
		50,000	6	0.18±0.15	47.4±6.4
uhEPO	48	0.00 <sup>d</sup>	6	0.08±0.12	52.4±3.5
		12,500	6	0.33±0.19 <sup>*ke</sup>	45.8±2.5
		25,000	6	0.28±0.19 <sup>*ke</sup>	47.5±5.8
		50,000	6	0.28±0.21 <sup>*ke</sup>	39.8±5.8 <sup>+++</sup>
MMC		0.50 (mg/kg)	6	0.32±0.18 <sup>*ke</sup>	48.8±3.4
rhEPO	72	0.00 <sup>c</sup>	6	0.08±0.12	54.3±3.8
		12,500	6	0.20±0.11	56.4±4.9
		25,000	6	0.22±0.13 <sup>*e</sup>	54.3±5.9
		50,000	6	0.27±0.15 <sup>*e</sup>	54.4±6.1
uhEPO	72	0.00 <sup>d</sup>	6	0.07±0.08	52.6±6.6
		12,500	6	0.13±0.10	56.3±1.8
		25,000	6	0.18±0.17	55.9±4.5
		50,000	6	0.25±0.10 <sup>*ke</sup>	54.5±3.7
MMC		0.50 (mg/kg)	6	0.20±0.09 <sup>*e</sup>	52.2±3.9

<sup>a-c</sup> See footnotes to Table 1.

<sup>d</sup> Phosphate buffered saline.

<sup>e</sup> Significantly different from control by the method of binomial based Kastenbaum and Bowman (1970) (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ ).

<sup>f</sup> Significantly different from control by Dunnett's *t*-test (1964) (++;  $p < 0.01$ ).

IU/kg の uhEPO 投与群の 48 時間後においてのみ、同時陰性対照 (52.4%) と比較して有意な (39.8%,  $p < 0.01$ ) PCE 比の減少を示した (Table 2).

以上のように、遺伝子組換え型の rhEPO も天然型であるヒト尿由来の uhEPO も骨髓における MNPCE 誘発能は僅かであり、投与後 48 時間に有意差が付くことが多かった。しかし、出現率や出現時間などを考慮したとき、陽性対照として用いた MMC が、投与後 24 時間にシャープな最大値を示す明確な MNPCE 誘発推移を描いたのに対して、EPO による MNPCE 誘発推移は不明確であり再現性の乏しいものであった。さらに、造血

因子であるにも係わらず、EPO の投与によって PCE 比の有意な増加は認められなかった。

## 3. EPO によって誘発される末梢血の小核網赤血球 (MNRET)

被験物質、動物、投与経路は骨髓における小核試験と同一条件で行った。

### 3.1 末梢血網赤血球 (RET) 標本の作製

マウス RET における小核試験は Hayashi ら (1990) の方法に従った。即ち、400–50,000 IU/kg の rhEPO を単回投与後、0, 24, 48, 72, 96 および 120 時間に腹側の尾の付け根にある末梢血管より

5-10  $\mu$ l の末梢血液を採取し、予め A.O. コート  
施したスライドガラス上に滴下し、カバーガラス  
を乗せた。このスライドガラスを冷暗所で一夜放  
置後、翌日、蛍光顕微鏡下で解析した。

### 3.2 単回投与後の末梢血における MNRET

rhEPO 投与による死亡例は観察されなかった。  
結果を Fig. 3 に示した。各投与群における投与開  
始時 (0 時間) の MNRET 出現頻度の平均値は  
0.12-0.18% であった。400, 2,000 および 10,000  
IU/kg の rhEPO によって誘発された MNRET 出  
現頻度は投与後 48 時間に最大値に達し、それぞ  
れ、0.48 ( $p < 0.05$ ), 0.72 ( $p < 0.01$ ) および 0.68%  
( $p < 0.01$ ) となった。50,000 IU/kg では投与後 72  
時間に最大値に達し、0.95% ( $p < 0.01$ ) を示した。  
投与後 120 時間では全 rhEPO 投与群の MNRET

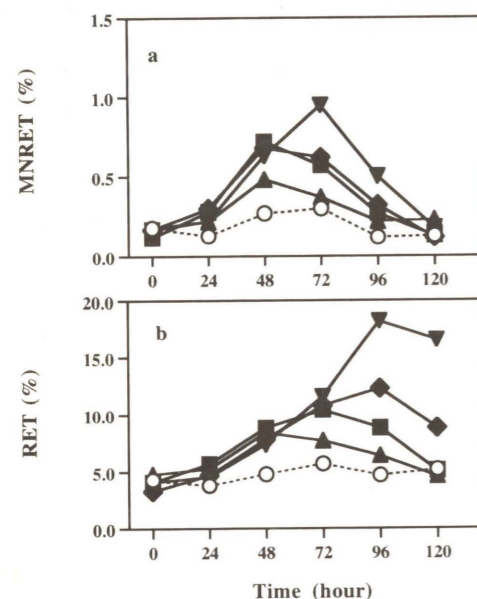


Fig. 3. Frequency of micronucleated reticulocyte, MNRET (a) and ratio of reticulocyte to 1,000 of all the erythrocytes, RET ratio (b), in peripheral blood of mice administered with rhEPO.

CD-1 male mice were i.p. administered once with 0 (○), 400 (▲), 2,000 (■), 10,000 (◆) and 50,000 (▼) IU/kg rhEPO at 0 h. Every 24 h after the administration, the preparations were performed at 0 to 120 h. Each point is the mean from 6 mice.

出現頻度はバックグラウンドレベルまで低下した (Fig. 3a).

Fig. 3b に示した様に、各群の RET 比の投与時  
の平均値は 3.3-4.8% であった。400, 2,000, 10,000  
および 50,000 IU/kg rhEPO 投与群の RET 比はそ  
れぞれ、投与後 48, 72, 96 および 96 時間で最大  
値、8.4, 10.4, 12.3 ( $p < 0.01$ ) および 18.2% ( $p < 0.01$ ) を示した。400-50,000 IU/kg rhEPO 投与群  
の RET 比は投与後 48 ( $p < 0.01$ ), 72 ( $p < 0.01$ ), 96  
( $p < 0.01$ ) および 120 ( $p < 0.01$ ) 時間で、有意な用  
量依存性を示した。これらの RET 比は投与後  
120 時間ではバックグラウンドレベルまで戻らな  
かった。

Fig. 4 には、rhEPO 単回投与後 72 時間に観察  
された末血の A.O. 染色による蛍光顕微鏡写真を  
示した。対照群 (Fig. 4a) で、一様に多数存在する  
黒い顆粒は成熟赤血球である。50,000 IU/kg  
rhEPO 投与後 72 時間 (Fig. 4b) では、脱核直後の  
RET が A.O. によって染色され、オレンジ色の蛍  
光を発色 (RNA と A.O. の反応による) してい  
る。Fig. 4a と Fig. 4b との定性的比較からも、  
RET 比の増加が容易に観察できる。同じ写真で  
黄色の蛍光を発色 (DNA と A.O. の反応による)  
しているのは有核細胞の核である。Fig. 5 には、  
50,000 IU/kg rhEPO 投与後 72 時間に観察された  
小核 (矢印) を示した。写真から出現した小核の  
大きさが不均一であることがわかる。

次に、EPO による MNRET の出現率や出現時  
間などを考慮した MNRET 誘発推移に関する再  
現性を確認する目的、ならびに、uhEPO が  
rhEPO と同様に MNRET を誘発するかどうかを  
調べるために、マウス腹腔内に 50,000 IU/kg の  
rhEPO あるいは uhEPO を単回投与し、両者の比  
較実験を行った。

rhEPO および uhEPO 投与による死亡例は観察  
されなかった。結果を Fig. 6 に示した。各群の投  
与開始時の MNRET 出現頻度は 0.13-0.33% の範  
囲であった。rhEPO および uhEPO 投与群の最大  
MNRET 出現頻度は共に 48 時間後に観察され、  
各々、1.02 および 0.87% を示した。これらの値  
は、同時対照である 0.25% HSA-saline の同一標  
本採取時間 (48 時間) における MNRET 出現頻

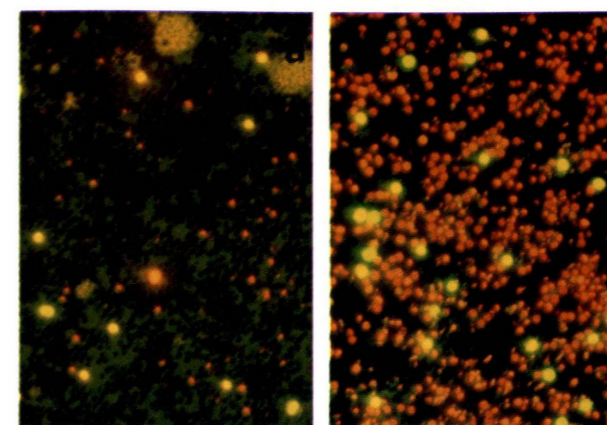


Fig. 4. Supervital staining of peripheral blood of the CD-1 mouse administered with rhEPO. Peripheral blood of CD-1 male mouse was obtained by piercing a tail blood vessel at 72 h after a single i.p. administration of 0.00 (a) or 50,000 IU/kg rhEPO (b). Five or 10  $\mu$ l of peripheral blood was placed on an acridine orange-coated slide and covered with a cover slip.

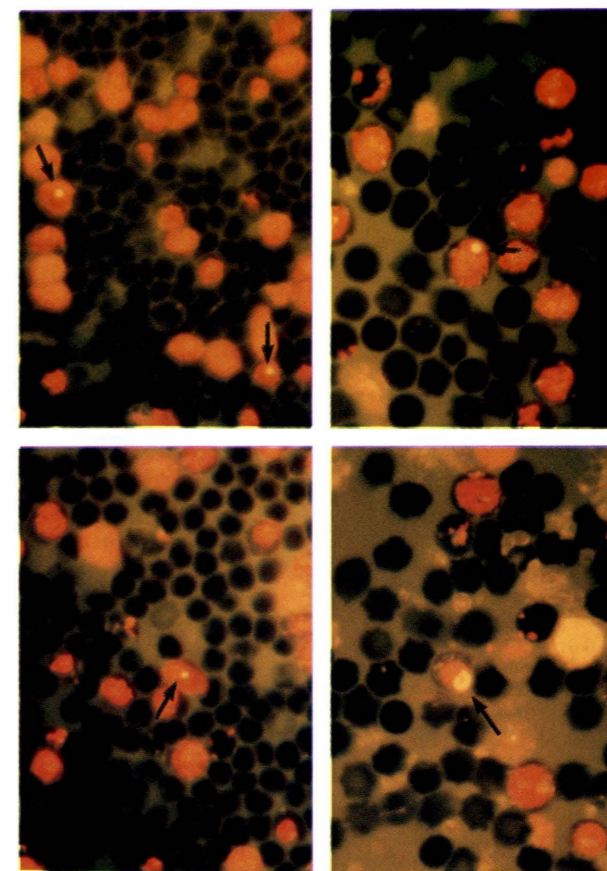


Fig. 5. MNRET in peripheral blood of the CD-1 mouse administered with rhEPO. Various sizes of micronuclei were observed in reticulocytes at 72 h after a single i.p. administration of 50,000 IU/kg rhEPO.

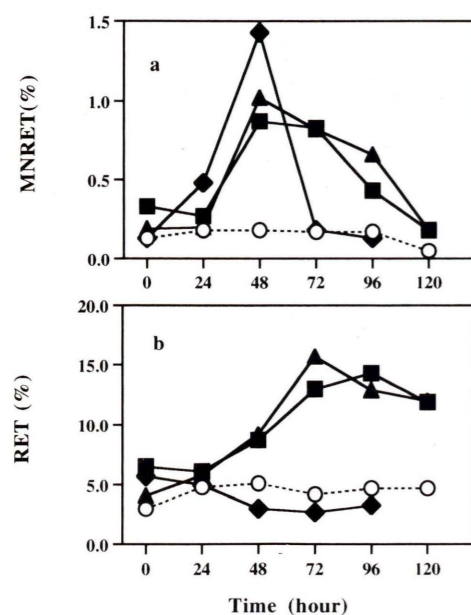


Fig. 6. Frequencies of MNRET (a) and RET ratio (b) in peripheral blood of mice treated with rhEPO or uhEPO. CD-1 male mice were dosed once, i.p., with 50,000 IU/kg rhEPO (▲) or uhEPO (■). Negative control (○) and positive control, 0.50 mg/kg MMC (◆), are also indicated. Preparations were made at 24 h intervals between 0 and 120 h. Each point is the mean from 6 mice.

度(0.18%)ならびに、各群の投与開始時の MNRET 出現頻度(それぞれ、0.19% および 0.33%)と比較して、有意な ( $p < 0.01$ ) 高値であった。投与後 120 時間では全 hEPO 投与群の MNRET 出現頻度は 0.18% とバックグラウンドレベルまで低下した。投与後 24 時間における 0.50 mg/kg の MMC 投与群の MNRET 出現率は 1.43% ( $p < 0.01$ ) を示し、明らかな陽性結果であった。Fig. 6b に示した様に、各群の投与開始時の RET 比は 4.1-6.5% の範囲であった。rhEPO および uhEPO の投与群の最大 RET 比はそれぞれ、72 および 96 時間後に観察され、各々、15.7 および 14.3% を示した。これらの値は、同時対照である 0.25% HSA-saline の各標本採取時間における RET 比と、また、各群の投与開始時の RET 比とも比較して、有意な ( $p < 0.01$ ) 高値であった。これら投与群の RET 比は投与後 120 時間では

バックグラウンドレベルまで戻らなかった。0.50 mg/kg MMC 投与群の RET 比は僅かに減少したものの、対照と比較して有意差はなかった。

以上のように、rhEPO も uhEPO も末梢血における MNRET 誘発能には再現性があり、両者とも同程度の活性を示した。しかも、投与後 48-72 時間に最大値を示し、明確で再現性のある MNRET 誘発推移を描いた。さらに、RET 比の増加から rhEPO も uhEPO も強い造血因子であることが示唆された。RET 比の増加を示す推移も再現性が示された。

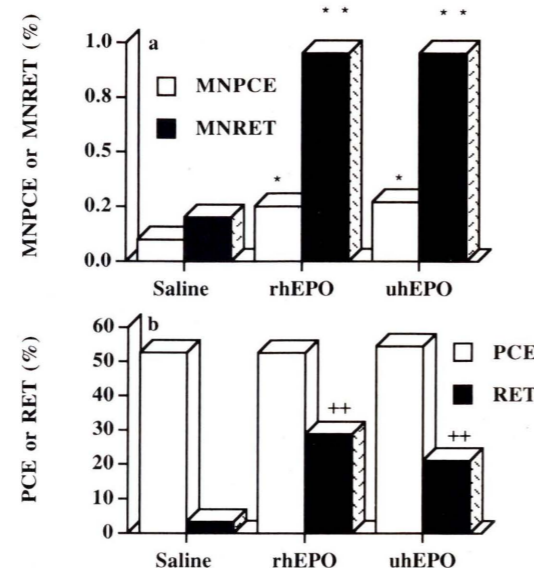


Fig. 7. a: Frequency of MNPCE (open symbols) in bone marrow and MNRET (closed symbols), b: PCE (open symbols) in bone marrow and RET (closed symbols) ratio in peripheral blood of mice given EPO at 50,000 IU/kg once each day for 6 days.

CD-1 male mice were dosed i.p. once each day for 6 days with 50,000 IU/kg rhEPO or uhEPO, and micronucleus preparations from bone marrow and peripheral blood were made 24 h after the last administration. Each point is the mean from 6 mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , when compared with control group treated with saline by the method of binomial based Kastenbaum and Bowman (1970). ++ $p < 0.01$ , when compared with control group treated with saline by Dunnett's *t*-test (1964).

### 3.3 連続投与後の骨髄および末梢血における小核

上記と同様の実験条件下で、CD-1 マウスに 1 日 1 回、50,000 IU/kg の rhEPO または uhEPO を 6 日間連続投与し、最終投与から 24 時間後に骨髄塗抹標本および末梢血標本を作製した。

骨髄における MNPCE および PCE 比、ならびに末梢血における MNRET および RET 比の頻度を Fig. 7 に示した。いずれの EPO 投与群においても有意な MNPCE と MNRET の誘発が認められたが、MNPCE の誘発頻度の増加が僅かであったのに比べ、MNRET の誘発頻度の増加は顕著であった。

ここで示された MNPCE 出現頻度は、著者らの研究室における背景データより僅かに高い程度であった。検定結果で EPO 投与群の MNPCE に認められた有意差は、同時対照 (Saline) が背景データと比較して低過ぎたことに原因があった。さらに、この試験では、EPO 投与群のマウスの RET 比が明らかに増加したが、同じマウスの PCE 比は EPO 投与の影響を受けていなかった。

### 4. 骨髄細胞における染色体異常試験

骨髄における MNPCE の増加率は少なかったものの、末梢血における MNRET の誘発頻度の増加が明瞭だったので、EPO-受容体がある骨髄細胞における染色体異常を調べた。

#### 4.1 骨髄細胞を用いた染色体標本の作製

染色体異常試験では、小核試験に用いた 50,000 IU/kg の 2 倍である 100,000 IU/kg を最高濃度とし、50,000 および 25,000 IU/kg の rhEPO を単回投与後 12, 24 および 48 時間にマウスの骨髄細胞を摘出した。この骨髄細胞を、最終濃度 0.2  $\mu$ g/ml の Colcemid (GIBCO) を含む細胞培養液 [Eagle's MEM に 20% (v/v) の牛胎仔血清を加えたもの] とともに、37°C、20 分間培養した。Colcemid 処理後の細胞に低張処理を行い、酢酸-メタノール固定後、通常の空気乾燥法により染色体標本を作製した。

#### 4.2 骨髄細胞の染色体異常

最高濃度である 100,000 IU/kg においても死亡例は観察されなかった。マウス骨髄細胞における

Table 3. Chromosomal aberration test in bone marrow cells of mice administered with rhEPO.

Time <sup>a</sup> (hr)	Concentration (IU/kg)	Number of animals	Number of cells analyzed	Incidence of chromosomal aberrations (%) <sup>b</sup>								Poly (%) <sup>c</sup>
				g	Chromatid		Chromosome		Others	Total		
					ctb	cte	csb	cse		+g	-g	
12	0.00 <sup>d</sup>	6	300	3.7	1.3	0.3	1.0	0.0	0.0	5.7	2.7	0.0
	25,000	6	300	3.3	1.3	0.0	0.7	0.0	0.0	4.7	2.0	0.0
	50,000	6	300	4.3	1.3	0.3	0.7	0.0	0.0	6.3	2.3	1.0
	100,000	6	300	3.0	0.7	0.0	0.7	0.0	0.0	4.0	1.3	0.7
24	0.00 <sup>d</sup>	6	300	2.7	0.3	0.0	1.0	0.0	0.0	3.3	1.3	0.7
	25,000	6	300	4.0	1.3	0.0	0.3	0.0	0.0	5.7	1.7	0.3
	50,000	6	300	2.7	2.7	0.0	0.7	0.0	0.0	5.3	3.3	0.7
	100,000	6	300	2.3	0.3	0.3	1.0	0.0	0.0	4.0	1.7	1.7
48	0.00 <sup>d</sup>	6	300	3.3	0.7	0.0	0.3	0.0	0.0	4.3	1.0	0.3
	25,000	6	300	2.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	1.3	0.3
	50,000	6	300	1.0	1.0	0.0	0.7	0.0	0.0	2.7	1.7	0.3
	100,000	6	300	0.7	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	2.0	1.3	1.3

<sup>a</sup> Sampling times after administration.

<sup>b</sup> g; gap, ctb and cte; chromatid break and exchange, csb and cse; chromosome break and exchange (dicentric, ring formation etc), others; (fragmentation, endoreduplication etc) Total; frequency of total aberrations, +g; including gaps, -g; excluding gaps.

<sup>c</sup> Incidence of polyploid cells.

<sup>d</sup> 0.25% HSA-Saline.

染色体異常試験の結果を Table 3 に示した。25,000–100,000 IU/kg の rhEPO はマウス骨髄細胞に対して構造的染色体異常も数次的染色体異常も誘発しなかった。PCE における小核は proerythroblasts に起こった染色体異常の結果である (Heddle, 1973; Hayashi *et al.*, 1984) ことが広く受け入れられているが、EPO-受容体があるはずの骨髄で高用量の rhEPO 投与に係わらず染色体異常は検出できなかった。

## 5. 考 察

増殖因子はその特異的受容体を介した反応を示すので、EPO 受容体を欠く復帰突然変異試験ならびに CHL 細胞やヒトのリンパ球を用いた染色体異常試験では rhEPO の遺伝毒性を検出出来ないことが予測された。既に述べたように、著者の結果でも、Ames 試験や *in vitro* の染色体異常試験では陰性の結果であった (Yajima *et al.*, 1993a)。しかし、rhEPO および uhEPO は *in vivo* で小核赤血球を誘発した。

また、rhEPO と uhEPO による MNPCE や MNRET の誘発に関する比較試験の結果から、赤血球における小核誘発は、天然型や遺伝子組換え型に係わらず質的にも量的にも EPO に共通した性質であると結論できた。

しかし、本報文で示した EPO による小核の誘発結果には、4つの矛盾が生じた。第1は、PCE における小核は proerythroblasts に起こった染色体異常の結果である (Heddle, 1973; Hayashi *et al.*, 1984) ことが広く受け入れられているが、EPO-受容体があるはずの骨髄で、高用量の EPO 投与に係わらず染色体異常が検出できなかったこと。第2は、EPO は MNPCE より明確な用量依存性のある MNRET を誘発したこと。第3は、EPO が造血ホルモンであるにも係わらず、EPO で処理されたマウスでは、末梢血の RET 比だけが増加し、骨髄の PCE 比は増加しなかったこと。第4は、MNRET のピークが RET のピークより約 24 時間先行したことである。

染色体異常誘発物質で処理した哺乳動物の骨髄細胞においては、小核は myeloblasts や myelocytes, erythroblasts など種々の細胞種で観察され

(Schmid, 1975)、染色体異常も同様に赤血球以外の細胞でも観察される。一方、Hayashi ら (1984) は骨髄中の PCE に小核が生じるためには化学物質による染色体異常が起こることが必須であることを主張している。しかし、EPO はその受容体の有無に係わらず骨髄中の細胞に染色体異常を誘発しなかった。

Suzuki ら (1989a) は、EPO による造血は DNA 修復効率を低下させ、変異原による MNPCE 誘発の機会を増加させると考察している。Kirkland (1991) は、EPO 投与によって造血亢進が起こると、未処理動物と比較して細胞周期が速く回転し、赤芽球の最後の分裂や脱核時において、自然状態でおこる DNA 傷害に対する修復の機会が減少し、小核誘発頻度が増加すると説明している。従って、EPO 処理による小核の増加は直接的な遺伝毒性によるものではないように思われた。

もし、rhEPO で処理した動物に起こった MNPCE や MNRET の原因が骨髄で起こった染色体異常であれば、染色体異常を起こした細胞のいくつかは死に、PCE 比と RET 比はそれらの動物では抑制されるはずである。しかし、変異原性物質で処理した動物の骨髄で観察されるような PCE 比の抑制はなく、著者らは EPO によって誘発された小核は骨髄での染色体異常に起因するものではないと結論した。

他の矛盾についてはただその可能性を推論するのみである。一般に、RET 比の増加は髄外造血を連想させ、rhEPO の標的としては骨髄中の赤血球前駆細胞だけではなく、脾臓のような他の造血臓器中の赤血球前駆細胞も考慮しなければならない。rhEPO で処理した動物の RET が骨髄ではなく脾臓の赤血球前駆細胞から分化した可能性がある。髄外造血が起こると、骨髄中の造血より多くの自然誘発小核が生じる可能性はないのであろうか。もし、MNRET と髄外造血が関与しているのであれば、著者らが観察した MNPCE の増加や Suzuki ら (1989a) が観察した MNPCE は、骨髄以外の造血臓器に由来する末梢血中の MNRET が骨髄中へ逆流したためとも考えられる。

髄外造血を示唆する結果として、EPO を 6 日間連続投与したマウスの脾臓の絶対及び相対重量

Table 4. Absolute and relative spleen weights for mice dosed repeatedly with rhEPO and uhEPO.

Chemical	Concentration (IU/kg)	Number of administration	Number of animals	Absolute spleen weight (g) <sup>a</sup>	Relative spleen weight (%) <sup>b</sup>
Saline	0	6	6	0.13±0.06	3.58±1.55
rhEPO	50,000	6	6	0.52±0.09***	14.27±2.78***
uhEPO	50,000	6	6	0.59±0.06***	16.04±1.94***

<sup>a</sup> Mean±S.D.

<sup>b</sup> [Spleen weight (g)/body weight (g)]×1,000, Mean±S.D.

<sup>c</sup> Significantly different from group of saline by Student's *t*-test (\*\*; *p*<0.01).

が、生理食塩液投与群の約 5 倍に増加した (Table 4) ことが挙げられる。さらに、著者らは、ヒトの EPO 遺伝子を組換え技術によって導入したハムスターの細胞をヌードマウスに移植し、rhEPO の連続的暴露を試みた。その結果、脾臓重量の増加や脾臓における顕著な髄外造血像を病理組織学的にも認めた。しかし、脾臓における MNPCE の出現頻度は骨髄における MNPCE の出現頻度と同程度であり、染色体異常も検出することはできなかった (Yajima *et al.*, 1993b)。

脾臓での髄外造血と染色体異常が直接結び付かなかったので、末梢血中の MNRET が骨髄細胞に由来する可能性を再度考えた。この可能性を再検討しなければならない根拠としては、マウス骨髄由来の初代培養細胞に *in vitro* で MNPCE を誘発することができた報告 (Nito *et al.*, 1986) と、外来の EPO によって刺激され、成熟した赤芽球は骨髄中に留まる時間が短縮し、分裂回数も 1–2 回は削減 (skipped division) したとする報告 (Hirashima and Takaku, 1964) を挙げることができる。

MNRET のピークが RET のピークより 24 時間先行したことに対する適当な説明として、この skipped division を挙げることができる。EPO は赤芽球の成熟や増殖を促し、骨髄中での貯留時間を短縮 (Papayannopoulou and Finch, 1975) し、RET の骨髄からの放出を促進 (Chamberlain *et al.*, 1975) するとされ、後期赤芽球の一部が分裂なしに成熟し、脱核し、時間短縮した骨髄貯留の後、MNRET として末梢血中へ放出される可能性が考えられた。あるいは、赤芽球に対して骨髄からの放出促進が極端に強まった場合には、骨髄中で脱核せずに、末梢血中で脱核することを予測できないであろうか。EPO によって骨髄中で刺激された残りの赤芽球は、分裂し、脱核し、末梢血中へ放出され、24 時間遅れて出現する小核を持たない RET として説明できる。EPO による MNRET 誘発機構に関する推論仮説を Fig. 2 に準えて図示したものが Fig. 8 である。

以上のような理由から rhEPO は明確な用量依存性のある MNPCE を誘発しなかった可能性が

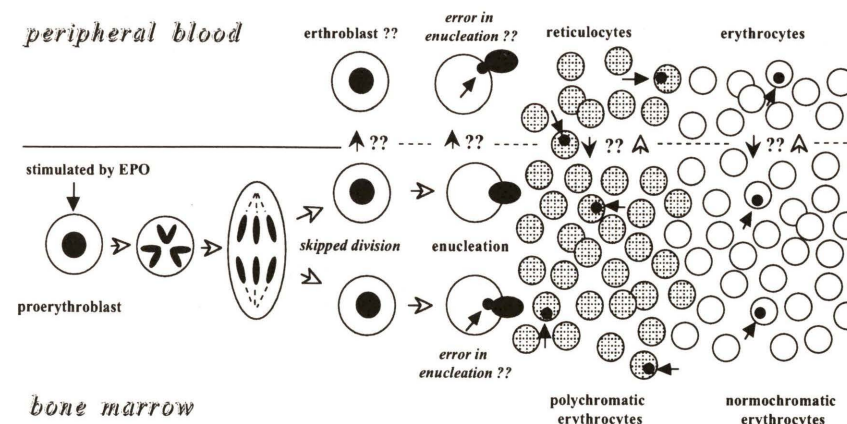


Fig. 8. Micronucleus formation by erythropoietin.

ある。MNPCE 誘発に関する須藤ら (1988) や井上ら (1990) の陰性結果と著者らの陽性結果の違いを正確に解釈するのは難しいが、著者らの MNPCE 誘発に関する陽性結果はギリギリの陽性結果である。MNPCE や MNRET の誘発原因としては最後の分裂や脱核時において自然状態でおこる DNA 傷害に対する修復の機会の減少 (Kirkland, 1991) ばかりでなく、脱核や分化の過程でエラーが起こる可能性も考慮すべきである。仮に、髄外造血で細胞が速く分裂していたとしても、脱核や分化で起こるエラーは、骨髓での造血と同じように小核生成機構の可能性として関与するはずである。そこで、MNPCE や MNRET 頻度の増加は遺伝学的修復過程ばかりでなく、脱核や分化の過程で起こったエラーの結果と推論した。

## 6. おわりに

EPO が CFU-E 上の特異的受容体と反応し、幼若な赤血球数を増加させることを前提として、EPO による小核の誘発を論じて来たが、近年、血管内皮細胞 (Anagnostou *et al.*, 1994) や神経細胞上 (Masuda *et al.*, 1993) にも EPO-受容体の存在が報告されている。また、がん抑制遺伝子として知られている retinoblastoma 遺伝子 (*Rb*) を *gene-target* 法で破壊し、ホモ欠損にしたマウス胎児は 14-15 日齢で死亡し、中枢神経系の形成傷害と造血系に傷害を起こしていた。そして、この *Rb* ノックアウトマウスでは有核の赤血球が増加していた (Clark *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992)。さらに、*Rb* は成人の造血や赤血球分化にも機能しているという報告もある (Condorell *et al.*, 1995)。これらの研究と著者らの研究がどの様に関連するのかは今後の課題であるが、これらの研究から、ヒトの末梢血を循環する血球のなかには、CFU-GEMM (erythroid, granulomonocytic, and megakaryocytic colony forming unit), BFU-E (erythroid burst forming unit) や CFU-GM (granulomonocytic colony forming unit) に相当する未熟な細胞が存在し、これらの細胞は EPO による成熟/分化/分裂刺激を受けて赤血球としての分化過程を辿り得ることが証明された (Udomsakdi *et al.*, 1992; Pesche *et al.*, 1993)。

## 参考文献

- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.
- Clarke, A. R., E. R. Maandag, M. van Roon, N. M. T. van de Lugt, M. van der Valk, M. L. Hooper, A. Berns and H. te Riele (1992) Requirement for a functional *Rb-1* gene in murine development, *Nature*, **359**, 328-330.
- Condorell, G. L., U. Testa, M. Valtieri, L. Vitelli, A. De Luca, T. Barberi, E. Montesoro, S. Campisi, A. Giordano and C. Peschle (1995) Modulation of retinoblastoma gene in normal adult hematopoiesis: Peak expression and functional role in advanced erythroid differentiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 4808-4812.
- Dunnett, C. W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, **20**, 482-491.
- Fisher, J. W. (1983) Control of erythropoietin production, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **173**, 289-305.
- Goldwasser, E. (1975) Erythropoietin and the differentiation of red blood cells, *Federation Proc.*, **34**, 2285-2292.
- Goto, M., K. Akai, A. Murakami, C. Hashimoto, E. Tsuda, M. Ueda, G. Kawanishi, N. Takahashi, A. Ishimoto, H. Chiba and R. Sasaki (1988) Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein, *Bio/Technology*, **6**, 67-71.
- 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.
- Hayashi, M., T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1984) Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow, *Mutat. Res.*, **127**, 129-137.
- Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.*, **245**, 245-249.
- Heddle, J. A. (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage, *Mutat. Res.*, **18**, 187-190.
- Hirashima, K. and F. Takaku (1964) Regulation of Erythropoiesis, *Japanese nuclear medicine*, **3**, 70-74.
- 井上 誠, 堀内一宏, 福田達也, 福田篤子, 矢野まり子, 松岡幸雄, 小泉妙子, 小嶋陽子, 佐藤忠夫 (1990) EPOCH の変異原性試験, *臨床医薬*, 6 巻 suppl. 2, 489-497.
- Ishidate, M. Jr. and S. Odashima (1977) Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*—a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res.*, **48**, 337-354.
- Jacks, T., A. Fazeli, E. M. Schmitt, R. T. Bronson, M. A. Goodell and R. A. Weinberg (1992) Effects of *Rb* mutation in the mouse, *Nature*, **359**, 295-300.

- Jacobs, K., C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neill, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S. S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsch, M. Kawakita, T. Shimizu and T. Miyake (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin, *Nature*, **313**, 806-810.
- Kastenbaum, M. A. and K. O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.*, **9**, 527-549.
- Kirkland, D. J. (1991) Selection of mutagenicity and cell transformation tests—Interpretation of results, in *Preclinical Evaluation of Peptides and Recombinant Proteins*, Association of the Swedish Pharmaceutical Industry and the Swedish National Board of Health and Welfare, 49-56.
- Lee, E. Y.-H. P., C. Y. Chang, N. Hu, Y. C. J. Wang, C. C. Lai, K. Herrup, W. H. Lee and A. Brandley (1992) Mice deficient for *Rb* are nonviable and show defects in neurogenesis and hematopoiesis, *Nature*, **359**, 288-294.
- Lin, F. K., S. Suggs, C. H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, S. M. Badrawi, P. H. Lai and E. Goldwasser (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **82**, 7580-7584.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215.
- Nito, S., Y. Kondo, T. Ono and F. Ariyuki (1986) *In vitro* micronucleus method with erythropoietin-differentiated erythrocytes, *Mutat. Res.*, **175**, 243-247.
- Papayannopoulou, T. and C. A. Finch (1975) Radioiron measurements of red cell maturation, *Blood Cells*, **1**, 535-546.
- Peschle, C., U. Testa, M. Valtieri, M. Gabbianelli, E. Pelosi, E. Montesoro, N. M. Sposi, C. Fossati, A. Camagna and A. Care (1993) Stringently purified human hematopoietic progenitors—stem cells analysis of cellular-molecular mechanisms underlying early hema-

- topoiesis, *Stem Cells*, **11**, 356-370.
- Sasaki, R., S. Yanagawa and H. Chiba (1987) Isolation of human erythropoietin with monoclonal antibodies, *Methods Enzymol.*, **147**, 328-340.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test, *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.
- 須藤鎮世, 佐藤静治, 牛房可枝, 山地智子, 富井さち子, 常磐知宣, 泉 英明, 天野健次 (1988) KRN5702 の変異原性試験, *基礎と臨床* Vol. 22, 5501-5516.
- Suzuki, Y., Y. Nagae, J. Li, H. Sakaba, K. Mozawa, A. Takahashi and H. Shimizu (1989a) The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio), *Mutagen.*, **4**, 420-424.
- Suzuki, Y., Y. Nagae, T. Ishikawa, Y. Watanabe, T. Nagashima, K. Matsukubo and H. Shimizu (1989b) Effect of erythropoietin on the micronucleus test, *Env. Mol. Mutagen.*, **13**, 314-318.
- Sytkowski, A. J. (1984) Erythropoietin: a prime regulator of red cell differentiation, *Biomed. Pharm.*, **38**, 369-371.
- Udomsakdi, C., P. M. Lansdorp, D. E. Hogge, D. S. Reid, A. C. Evans and C. J. Evans (1992) Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood, *Blood*, **80**, 2513-2521.
- Yanagawa, S., K. Hirade, H. Ohnata, R. Sasaki, H. Chiba, M. Ueda and M. Goto (1984) Isolation of human erythropoietin with monoclonal antibodies, *J. Biol. Chem.*, **259**, 2707-2710.
- Yajima, N., Y. Kurata, T. Sawai and Y. Takeshita (1993a) Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin, *Mutagen.*, **8**, 221-229.
- Yajima, N., Y. Kurata, T. Sawai and Y. Takeshita (1993b) Genotoxicity of genetic recombinant human erythropoietin in a novel test system, *Mutagen.*, **8**, 231-236.
- Yajima, N., Y. Kurata, T. Sawai and Y. Takeshita (1993c) Comparative studies in induction of micronuclei by three genetically recombinant and urinary human erythropoietins, *Mutagen.*, **8**, 237-241.

## 小核の動原体染色法について

### Immunohistochemical detection of kinetochore in micronuclei

小田切陽一<sup>1</sup>, 内田博之<sup>2</sup>

Youichi Odagiri<sup>1</sup> and Hiroyuki Uchida<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山梨県立看護短期大学 人間健康科学 400 山梨県甲府市池田 1-6-1

<sup>2</sup>埼玉医科大学 公衆衛生学教室 350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38

<sup>1</sup>Division of Human and Health Sciences, Yamanashi Prefectural College of Nursing,  
1-6-1 Ikeda, Kofu, Yamanashi 400, Japan

<sup>2</sup>Department of Public Health, Saitama Medical School,  
38 Moroyama-machi, Iruma-gun, Saitama 350-04, Japan

(受付: 1995 年 5 月 31 日; 受理: 1995 年 8 月 10 日)

#### Summary

A full method of immunohistochemical staining of the kinetochore in micronuclei in human lymphocytes is described. The anti-kinetochore sera were collected from scleroderma patients and were previously screened and shown to contain specific antigenicity against kinetochore. An immunoperoxidase method was used for the preparation of a permanent slide. This method allows discrimination between kinetochore-positive and -negative micronuclei and thus between micronuclei which arise from whole chromosome loss and those which arise from chromosome breaks.

**Keywords:** micronucleus, kinetochore, chromosome loss, chromosome break

#### 1. 緒 言

小核が染色体の切断 (breakage) によって生じる紡錘糸着糸点をもたない無動原体断片 (acentric fragment) や紡錘装置の障害の結果生じた遅滞染色体 (lagging chromosome) に由来することはよく知られている。コルヒチンやビンクリスチンなどの分裂阻害剤によって誘発された小核の多くは遅滞染色体に由来し、染色体断片に由来する小核に比較して大型であることから、誘発された小核の大きさの違いを利用した分裂阻害作用の検出が試みられた (Yamamoto and Kikuchi, 1980)。

近年、強皮症 (scleroderma) 患者の血清中に含まれている抗動原体抗体や血清自体を利用して小核中の動原体を免疫組織化学的に検出する方法や動原体のマイクロサテライト DNA に対するプ

ローブを利用した *in situ* hybridization による動原体の検出が可能となった。動原体の存在はその小核が一本以上の完全な染色体や動原体部分を含む不完全な染色体に由来することを示唆しており、そうした小核を有する細胞の存在は異数性 (aneuploidy) の原因となることが推察される。近年、このような考えに基づいて、異数性誘発作用の検出を目的とした小核中の動原体の検出がおこなわれるようになった (Thomson and Perry, 1988; Degraasi and Tanzarella, 1988; Eastmond and Tucker, 1989a; 1989b; Hayashi *et al.*, 1994)。

著者らの研究室では強皮症患者の血清を使用してヒトの末梢血リンパ球中の小核を対象とした免疫組織化学染色による動原体の検出をおこなってきた (Odagiri *et al.*, 1990; 1994; 小田切ら, 1992)。しかし、強皮症患者の血清を使用する場合、すべ

ての患者血清が動原体の検出に十分な抗体活性を有するとは限らないため、あらかじめ免疫組織化学染色に使用可能な血清を選別しておく必要がある。この選別法やペルオキシダーゼ標識抗体を二次抗体に使用した場合の永久標本の作製手技に関する問い合わせが多いので本稿の紙面をかりて紹介したい。

## 2. 強皮症患者血清の入手

血清は強皮症患者の血清であることから医療機関以外より入手することは困難であるとおもわれるが、米国 Antibodies Incorporated 社 (Davis, CA) より販売されている診断用キットのパーツ (Antinuclear Antibody Test, Positive Control Serum (Centromere)) を利用することもできる。この血清は以下に述べる選別操作をしなくても使用可能であるが、生産供給態勢が不安定なためかしばしば入手困難である。強皮症は医療機関において皮膚科領域として扱われることが一般的であるが、内科 (膠原病) が担当している場合もある。小核試験での利用は非臨床目的の使用であるが、患者血清であることから、患者の同意を得た上で入手しなければならない。著者らは強皮症と診断された患者のうち研究目的の使用に同意が得られた血清の一部を入手している。

採血後ただちに遠心分離された血清は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存され、採血後 1 年以内のものを入手して次に述べる方法で動原体染色に適する血清を選別している。

また、ヒト血清の取り扱いにはゴム手袋を着用するなど感染防止に注意することはいうまでもない。

## 3. 血清のスクリーニング方法

血清の選別のためにあらかじめヒト末梢血リンパ球の中期染色体スライド標本を常法に従い用意しておく。一例として末梢血よりファイコールを使用して分離したリンパ球を 10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培地に浮遊させ、フィトヘマグルチニン (PHA) を添加して 70 時間培養し、コルセミド ( $0.05\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) を添加してさらに 2 時間培養して標本を作製する。リンパ球浮遊液はハンクス液

で 1 回洗い、スピッツ半量の  $0.075\text{ M KCl}$  を加え、軽く攪拌し 20 分間放置する。次にカルノア液 (氷酢酸: メタノールを 1:3 に混合) を重層して攪拌、遠心して上清を捨て、カルノア液に置き換えてこの操作を 3 回繰り返す。最後に数滴のカルノア液に浮遊させて脱脂したスライドガラス上に滴下して自然乾燥させる。位相差顕微鏡で染色体の広がり具合を確認する。以上のような操作によって作成したスライド標本を用いて選別をおこなう。

血清の選別には Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) で 40 倍に希釈してミリポアフィルター (ポアサイズ  $0.45\text{ }\mu\text{m}$ ) でろ過した血清を先に作製しておいた染色体標本のスライドガラスの表面全体に十分な量を広げて載せる。スライドはあらかじめ湿度を高く保てるよう humid chamber などにいれておく。スライド表面からの血清の蒸発を防いで一夜 (約 16 時間) 室温で静置する。翌日、スライドを Tris-HCl 緩衝液で 3 回洗浄し、FITC で標識した抗ヒト IgG 抗体を Tris-HCl 緩衝液で 100 倍に希釈したものを載せて 3 時間室温で静置する。HCl-Tris 緩衝液で 3 回洗い、 $0.01\%$  Evans Blue 液で 30 秒間染色し、Tris-HCl 緩衝液で洗う。封入剤 (組成: 10% PBS/Phenylenediamine, 90% glycerol) を用いて封入し、蛍光顕微鏡下で観察 (FITC 励起: B2 フィルター使用, バリアーフィルター:  $520\text{ nm}$ ) して染色体の動原体部分が特異的にかつ強度に染色されている血清を選び出す。その際、静止核においても明瞭な点状の染色像のあることを確認する。このようにして選別された血清はセラムチューブなどに分注して使用までの間  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。

## 4. 小核標本の免疫組織化学染色

小核標本の動原体染色は上述した血清の選別法と同様に FITC 標識した抗ヒト IgG 抗体を二次抗体として使用した染色も行われるが、ペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体を使用し、DAB (ジアミノベンジジン) で発色すると永久標本の作成が可能であり、観察に追われることがない。

動原体染色をおこなう小核標本はサイトスピンもしくは相当品を用いると良好な標本を安定して

作成することができる。著者らは Schandon 社製の Cytospin 3 を使用しているがトミー精工製の細胞収集バケット (SC-2) も代用できる。

リンパ球は通常 PHA 添加して培養開始から 72 時間後に未固定のままサイトスピンで標本作成し、ドライヤーを利用して冷風ですばやく乾燥する。メタノールで 4 分間固定してから再度ドライヤーで乾燥させ、細胞表面が直接空気にふれないようにアルミホイルに包んで液体窒素の気中に保存する。著者らはこの状態で 4 カ月間の保存が可能であること、また窒素で置換することなく  $-80^{\circ}\text{C}$  下に保存しても 3 カ月間は染色性に变化のないことを確認している。しかしながら、動原体染色に際してスライドを室温条件に戻す時にドライヤーで送風してスライド表面に霜がつかないようにすることが肝要である。ここで室温に戻したスライドは細胞付着部分を免疫組織化学用ペン (DAIDO SANGYO 社製パップペン) でふちどりして反応面積を小さくしておくとその後の操作が簡単になり、また血清や二次抗体の節約になる。Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) に 10 秒間浸した後、一次抗体である血清を載せる。血清は Tris-HCl 緩衝液で 30-40 倍に希釈してミリポアフィルター ( $0.45\text{ }\mu\text{m}$ ) でろ過して使用する。

血清との反応は約 16 時間室温下で humid chamber 内でインキュベートしておこなうが、室温が高い時は冷蔵庫内 ( $5^{\circ}\text{C}$ ) に置くほうが好ましい (この条件でも 16 時間の反応時間で十分である)。次に、Tris-HCl 緩衝液で 3 回洗浄した後、二次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG 抗体 (和光純薬) と 3 時間室温でインキュベートする。その後、Tris-HCl 緩衝液で 3 回洗い DAB 反応液 (組成は Table 1) 中で発色させる。この DAB 反応液はイミダゾールと塩化ニッケルを含み通常の発色 (茶色) よりも黒みを帯びた発色となり、動原体観

Table 1. Reagent mixture for DAB reaction with imidazole  $\text{NiCl}_2$  modification

Tris-HCl buffer (pH 7.6)	4 ml
Diaminobenzidine (DAB)	1 mg
$\text{NiCl}_2$ (8% in Tris-HCl buffer)	25 $\mu\text{l}$
0.1 M Imidazole	40 $\mu\text{l}$
30% $\text{H}_2\text{O}_2$	10 $\mu\text{l}$

察にはこの組成を用いた変法が良い。また DAB 反応液は使用直前に作製し遮光しておく。DAB 発色は Tris-HCl 緩衝液中で反応を止め、発色の状態を顕微鏡下でチェックしながら適当なところで止める。発色時間は通常 40-90 秒程度であるが、長すぎると点状の染色部分が拡大してぼやけ、観察には不適當となる。対比染色にはメチルグリーンやニュートラルレッドなどの核染色剤が使用できるが、ヘマトキシリンは核質を強く染めてしまい動原体の観察が難しくなるので薦められない。著者らはフェノールで 2-3 回洗ったメチルグリーン 5% 液で 10 分間染色している。染色後は軽く水洗してドライヤーですばやく乾燥させる。長時間の水洗やいつまでも標本上に水滴が残っていると脱色したり、染色むらが生じて観察しにくくなる。乾燥させたスライドはブチルアルコールに数秒浸して分染し、適当な封入剤で封入する。著者らはオイキット (高橋技研硝子が輸入販売) を利用している。封入の際、キシロールに浸したり、パップペンのマーキングを無理に取ろうとしない方がよい。なお、DAB には発がん性があることから手袋を着用するなど取り扱いには十分な注意が必要である。

## 5. 観察の方法

標本の観察には油浸対物レンズを使用し、1000 倍で観察する。動原体は黒灰色のドット状 (点状) に染色される。動原体のサイズは  $0.3-0.8\text{ }\mu\text{m}$  で光学顕微鏡の分解能以内であり、理論的には一つの核内に 46 個のドットが期待される。しかし著者らが 52 細胞を対象として計数したドットの平均値 (標準偏差) は 29.9 (9.1) であり複数の動原体が重なりあっているためと考えられる。著者らは小核中の動原体を確認する際、Fenech and Morley (1990) に従ってその小核が属している細胞の主核に 20 個以上のドットを認めるものに観察対象を限定しているが、通常の染色で問題となることは少ない。小核中の動原体の有無は顕微鏡のフォーカスを微妙に上下させて気泡やゴミでないことを確認しながら慎重な観察をおこなう。

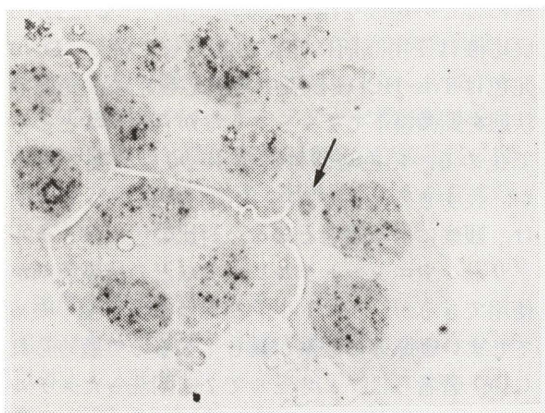


Fig. 1. Cytokinesis-blocked lymphocytes stained with antikinetochore sera from patients with scleroderma. Multiple kinetochores (usually more than 20) are visible in the main nucleus. The arrow indicates a kinetochore-positive micronucleus.

## 6. その他

Fenech and Morley (1990) は HRP 標識抗体を使用した小核の動原体染色法を既に報告しているが、この論文の中で彼らは正常ヒト血清を一次抗体とした場合の対照標本を同時に作成して非特異反応によるバックグラウンド値を求め、この値から小核の動原体陽性率を補正する必要性について述べている。彼らの報告したバックグラウンド値（対照標本での小核の動原体陽性率）は理由は不明であるが、14% と高く、補正の必要があると考えられるが、著者らのバックグラウンド値の平均値は 2.14% にすぎず、必ずしも正常血清を使用した対照標本をおく必要がないと考えている。

## 7. おわりに

ヒトの末梢血リンパ球を用いた小核試験は環境変異原の遺伝的リスクを簡便にモニタリングする方法として有用である（森本ら, 1994）。動原体染色法を併用してばく露された変異原の異数性誘発作用を同時に評価することは小核試験の有用性をさらに高めることになる。また、動原体染色法はマウス骨髄小核試験に対しても適用することが可能であり、これについては既にいくつかの報告もあるので参照されたい（Gudi *et al.*, 1990; Miller and Adler, 1990）。

小核中の動原体の検出は小核誘発を指標とした種々の遺伝毒性試験において同時に染色体の切断型異常と消失型異常の識別を可能とし、異数性誘発作用物質の検出系としての道を開くものである。しかし、ここで紹介した抗血清による動原体検出法はセントロメア DNA 結合タンパクである CEMP-A, CEMP-B, CEMP-C を反応性抗原とするために（Earnshaw and Rothfield, 1985; Muro *et al.*, 1990）これらのセントロメアタンパク質そのものが障害を受けた場合や不適切な標本作製や保存によって抗原活性が低下した場合には動原体陽性小核として検出することができないなど、試験法の限界があることも知らなければならない。

## 参考文献

- Degrassi, F. and C. Tanzarella (1988) Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: A new assay for the detection of aneuploidy, *Mutat. Res.*, **203**, 339-345.
- Earnshaw, W. C. and N. Rothfield (1985) Identification of a family of human centromere proteins using auto-immune sera from patients with scleroderma, *Chromosoma*, **91**, 313-321.
- Eastmond, D. A. and J. D. Tucker (1989) Kinetochore localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: A new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents, *Mutat. Res.*, **224**, 517-525.
- Eastmond, D. A. and J. D. Tucker (1989) Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Mutagen.*, **13**, 34-43.
- Fenech, M. and A. A. Morley (1989) Kinetochore detection in micronuclei: An alternative method for measuring chromosome loss, *Mutagen.*, **4**, 98-104.
- Gudi, R., S. S. Sandhu and R. S. Athwal (1990) Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone-marrow erythrocytes: An assay for the detection of aneuploidy-inducing agents, *Mutat. Res.*, **234**, 263-268.
- Hayashi, M., J. Makipaaakkanen, H. Tanabe, M. Honma, T. Suzuki, A. Matsuoka, H. Mizusawa and T. Sofuni (1994) Isolation of micronuclei from mouse blood and fluorescence *in situ* hybridization with a mouse centromeric DNA probe, *Mutat. Res.*, **307**, 245-252.
- Miller, B. M. and I. D. Adler (1990) Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, *Mutagen.*, **5**, 411-415.
- 森本兼寛, 牟礼佳苗 (1994) 末梢血リンパ球小核試験—ヒト・モニタリングへの応用—, *変異原性試験*, **3**, 49-54.

- Muro, Y., K. Sugimoto, T. Okazaki and M. Ohashi (1990) The heterogeneity of anticentromere antibodies in immunoblotting analysis, *Reumatol.*, **17**, 1042-1047.
- Odagiri, Y., J. L. Dempsey and A. A. Morley (1990) Damage to lymphocytes by X-ray and bleomycin measured with the cytokinesis-block micronucleus technique, *Mutat. Res.*, **237**, 147-152.
- 小田切陽一, 竹本和夫 (1992) 動原体抗体法を用いたヒトリンパ球中自然誘発小核の形成機序の検討, *変異原性試験*, **1**, 28-33.
- Odagiri, Y., J.-X. Zhang, H. Uchida, K. Kawamura, S.

- Adachi and K. Takemoto (1994) Predominant induction of kinetochore-containing micronuclei by extracts of diesel exhaust particulates in cultured human lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.*, **23**, 45-50.
- Thomson, E. J. and P. E. Perry (1988) The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy, *Mutagen.*, **3**, 415-418.
- Yamamoto, K. I. and Y. Kikuchi (1980) A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons, *Mutat. Res.*, **71**, 127-131.

## 「In Vitro 染色体異常試験」検討会

### 1. 検討会の開催にあたって

石館 基（オリンパス光学・CRC）

「in vitro 染色体異常試験」は、医薬品その他の生活関連物質の安全性を評価するための変異原性試験の一つとして、国内外でも、かなり定着されてきてはいるが、実際に試験を実施して見ると、まだまだ解決すべき問題が残されている。また、試験法プロトコールに関しても、最近、新たに国際間における調整が必要となり、OECDやICHなどの組織を通して、現在、内容の見直しが行われようとしている。

平成6年10月24-25日、第23回日本環境変異原学会が静岡県立大学で開催されたが、第一日目の終了後、木苗大会長のお許しを得て、表記の検討会を開催することになった。染色体異常試験に関する検討会は、既に、本学会のMMS分科会の活動の一部として、過去十数回に渡って開催されてきたが、少数のグループによる共同研究の内容とそこで得られた結果については、必ずしも学会員一同がよく把握しているわけではない。従って、今回は、この機会を借りて、その報告を兼ねて、日頃、染色体異常試験に携わっておられる方々を中心に、試験手法の具体的問題点について、自由に討論することを目的とした。

話題の提供者は、従来の共同実験で活動されてきた数人の方々にお願いした。約100名が参加したが、夜遅くまで熱心な討議がなされた。この誌上を借りて、その内容の一部を紹介したい。

### 2. In Vitro 染色体異常試験検討会の経緯

林 真（国立衛試・変異遺伝部）

第一回の検討会は、1990年9月6日に国立衛生試験所において「In vitro 染色体異常試験結果の統計学的解析法について考える会」として開催された。その時のプログラムは次のようなものであった。

1) 国立衛試の判定基準（10%法）について一統計学的判定の面から（東京大学医学部・橋本修二先生）

2) 各研究機関のデータと判定方法の紹介

3) 今後の検討方針

即ち、本検討会の当初の目的は、染色体異常試験で得られた結果の統計学的判定法を定式化することにあった。そこで、染色体異常試験の背景データを豊富に持ち合わせ、また、上記問題に関心の深い約10名の研究者が集まり、橋本先生の指導のもとに、共同研究を開始した。一年に2回のペースで検討会を行い、約6年間続いてきた。その間、本検討会は、JEMSの分科会であるMMS研究会の活動の一つとして、その結果はMMS会員に報告してきた。

本検討会の共同研究では、各研究機関で得られた背景データを基に、染色体異常試験のデータがどのような性質を持つものであるかを解析し、統計学的判定法の確立を図った。また、染色体異常試験の結果を左右する可能性のある要因について検討した。特に、その要因の一つとして、顕微鏡下における異常の判定法が、個々の観察者によって異なる可能性に注目し、標準的な標本作製した上、共同研究者に配布し、データのばらつきの程度を比較検討した。

更に、最近では、米国のEPAなどによって、推奨されているマウス・リンフォーマL5178Yを用いる突然変異試験（MLA）と染色体異常試験との比較を行うため、MLAのみで陽性となった化合物（米国NTPによる試験成績）を用いて、CHL/IU細胞に対する染色体異常（構造異常および倍数体）誘発性の有無を検討した。その結果、MLAで陽性となる化合物の大半が染色体異常試験でも陽性となることが分かった（後述の森田先生の報告を参照）。

### 3. *In vitro* 染色体異常試験結果の評価—統計学的立場から

笠原義典（帝人（株）医薬開発研）

本検討会は、当初、*in vitro* 染色体異常試験結果の評価に用いる検定法にどのような方法を適用すべきかという問題を中心に発足した。以下に、統計学的に検討した結果の概要について紹介する。

#### 1) バックグラウンドデータ、プロトコルの比較

(a) 各研究機関のバックグラウンドデータは、陰性対照群においては、大きな差異はなかったが、陽性対照群では、使用物質、濃度などが異なっているため、研究施設間での統計学的解析は不可能であった。

(b) プロトコルについては、各機関で大きな差は見られなかったものの、被験物質処理前の前培養時間と播種細胞数には、微妙な差が認められており、血清や S9mix などと共に試験結果の変動要因となりうると考えられた。

#### 2) 判定方法の整理と検出力の比較

各研究機関のプロトコルを基に、判定方法を整理すると、a) 試験の成立を判定するものと、b) 異常を判定するものとに分けられる。前者については、無処理群、溶媒対照群、陽性対照群などのデータを背景データと比較する方法（管理図法など）が考えられ、後者では、i) 処理群が一つの場合、ii) 処理群が三つ以上の場合、および、iii) 多重比較とプロトコルの問題とに分けて考えることができる。

染色体異常試験データの大きな特徴としては、陰性対照のデータがきれいな二項分布またはポアソン分布に従うこと（Fig. 1）、および背景データが利用できることを挙げることができる。このことから、処理群が一つの場合についての判定方式は「当該試験の陰性対照群との比較」および「背景データとの比較」の二つの方策が考えられる。前者では、「Fischer の正確確率検定法」、「 $\chi^2$  検定法（補正付）」、「条件付二項検定法」などがあり、後者では、「二項検定法」がある。また、「石館法（10% 法）」のように、ある定数と比較する方法もある。

以上の各種検定法について検出力を比較して見

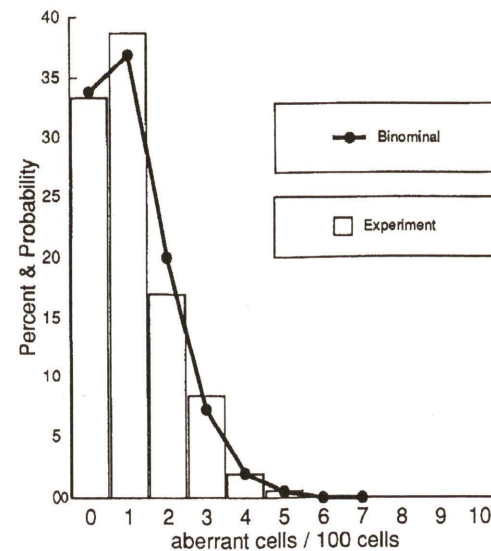


Fig. 1. 陰性対照群の異常細胞の分布  
溶媒対照群、100細胞の観察、代謝活性化法：一、処理回復時間：48-0h、□棒グラフ：実験の割合（577実験）、折れ線グラフ：あてはめた2項分布の確率（ $n=100$ ,  $p=0.0110$ ）。

たところ、背景データとの比較が最も検出力が高かった。しかし、この方法は、逆に、試験全体の偏りの影響を受け易く、第一種の過誤の確率を高めていることが分かった。では、従来から適用されている「10% 法」はどうかというと、この方法は、得られたデータの解析という概念ではなく、真の状態で、10%以上の異常細胞の出現率が陽性という仮説によって検定しているわけである。この方法では、以上に述べた殆どの検定法によって陽性と判断される10%の異常出現率を指標としているため、極めて偽陰性の確率の低い評価法であると言える。

次に、処理群が三つ以上の場合では、用量作用関係を導入した「Cochran-Armitage の傾向性検定と、処理群が一つの場合の検定を群数だけ繰り返す方法との比較になる。この場合は、多重性の問題が生ずるので、個々の検定水準を「有意水準／検定回数」と設定しておく必要がある。これらの検出力を前述と同様に比較して見たところ、やはり、「背景データとの比較」が最も検出力が高く、次に、「傾向性検定」が続いた（Fig. 2）。以上の検討結果から、林らは一つのサンプル検定

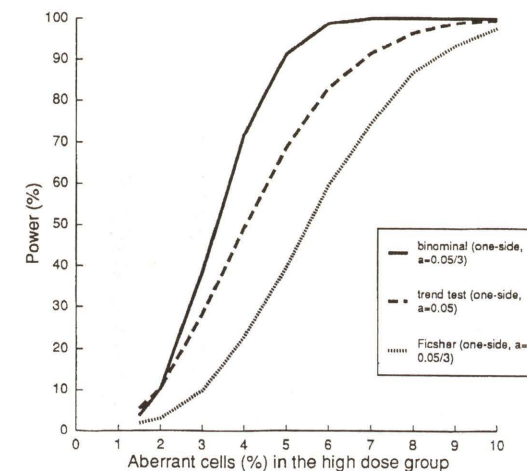


Fig. 2. 判定方法間の検出力の比較

設定条件：対照群と3処理群（低・中・高用量）、各群とも異常細胞数は2項分布（ $n=200$ ）、対照群の真の異常細胞出現率は0.015、対照群・低・中・高用量群の真の異常細胞出現率は、この順に差が一定。

法（検定フロー）を提唱している。<sup>1)</sup>

最後に、多重比較と試験プロトコルの問題である。染色体異常試験では、通常、直接法の24時間および48時間処理と、S9法の（-S9）および（+S9）など、同じような4つの試験系から成り立っている。その場合に、最終的な判定がいずれかのセット（あるいはいずれかの処理群）で有意差を生じた場合、「染色体異常誘発性を有する」とコールするのであれば、個々の検定確率を試験全体の検定回数で割っておくような処置を施すべきと考えられる。

以上の検討結果から、本検討会では、「用量-作用関係を導入すること」と「背景データを利用すること」をミックスした検定法（検定フロー）にすべきではないかと考えているが、さらに、あるセットに関する再試験を行った場合の処置などについては、今後検討すべき問題として残されている。

#### 3) 共同研究

以上までの検討では、有意水準をどのレベルに設定すれば現実（生物学的に）則しているかは分からない。これは、統計学者と生物学者が、その現象の意味するところを真剣に討議しながら決

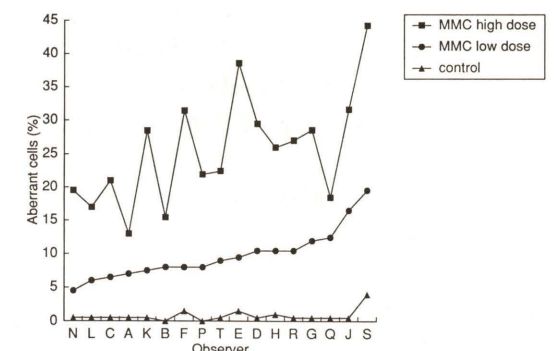


Fig. 3. 異常細胞出現率の観察者間の相違

横軸：観察者、縦軸：異常細胞出現率、MMC low dose での出現率の低い順に左から並べたもの。異常頻度が高くなるにつれ観察者間の差が大きくなっている。

めて行かなければならない。しかし、そのためには、共通な土俵の上で議論できるデータを採取することから初めなければならない。そのような観点から、同一の標本を複数の観察者によって観察し、そのデータを比較する共同研究が実施された。その結果、観察者内の変動は極めて少なく、観察者間の変動が比較的大きいことが明らかとなった（Fig. 3）。この要因は、観察対象とする分裂中期像の選択基準に差があるのではないかと考えられている。

#### 参考文献

- 1) 林 真（1992）染色体異常試験データの統計学的処理、変異原性試験、1(4), 255-261.

#### 4. 染色体異常試験のデータに及ぼす種々の要因

浅倉眞澄、杉山淑江、松島泰次郎

（日本バイオアッセイ研究センター）

培養細胞を用いる染色体異常試験で得られた結果を評価する際に、試験条件如何によって、検出感度が変わり得ることを考慮する必要がある。データに影響を与える要因として、以下のような項目が挙げられる。

- (1) 血清の影響（細胞の増殖性、細胞の特性、非動化の有無、変異原の吸着、代謝活性化の阻止など）

- (2) 代謝活性化 (S9 のロット, S9 の保存期間, 処理時の培地への添加の有無, 処理後の洗浄の有無, S9 量, 補酵素の組成など)
- (3) 細胞 (細胞の起源, 培養条件, 継代数など)
- (4) 被験物質の処理条件 (溶媒の選択, 処理の方法, 浸透圧, pH の影響, 蛍光灯 (黄色灯) の影響)
- (5) 染色体異常の観察 (標本の出来具合, 観察不能の細胞の削除の基準, 異常の判定基準, スライド上の観察範囲による誤差など)
- (6) その他 (被験物質の調整, 細胞数の計測, 培養液あるいは培養容器の選択, 室温放置時間など)

これらの条件の中, 今回は, CHL/IU 細胞を用いて, 血清の影響と代謝活性化の条件について検討した結果を報告する。

#### 1) 血清の影響

ロットの異なる種々の血清を用いて比較したところ, 細胞の倍加時間は, 12-21 時間の範囲でかなりばらつくことが分かった (Fig. 1)。また, マイトマイシン C (MMC) およびベンゾ (a) ピレン (BP) の効果を比較したところ, 染色体異常の出現率は血清のロットの違いによって大きな差を生じた。その原因の一つに, 被験物質処理時の細胞

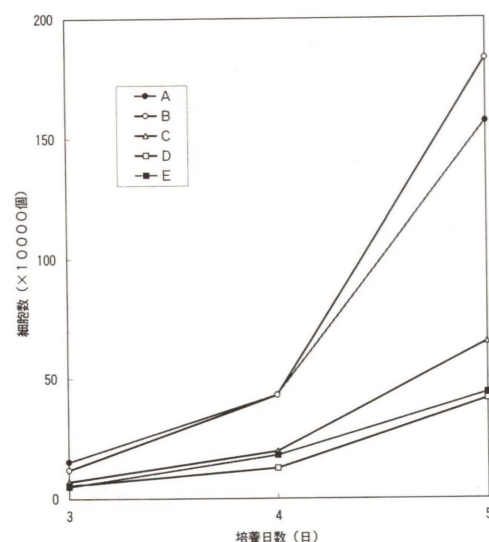


Fig. 1. 細胞増殖におよぼす血清ロットの影響

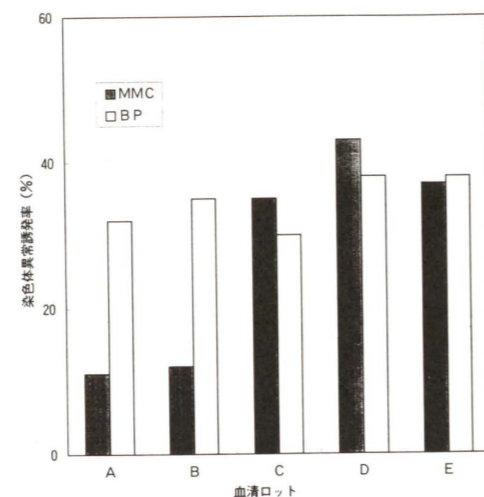


Fig. 2. 染色体異常誘発におよぼす血清ロットの影響

数の問題が挙げられる。細胞の倍加時間が数時間異なれば, 当然, 処理時の細胞数は大きく異なってくる。細胞数を変えて試験を実施したが, 少なくとも, MMC および BP を用いた場合には, 殆ど影響が現れなかった。しかし, 被験物質の種類によっては, 差が現れてくる可能性がある。今回用いた血清のロット間では, 染色体異常誘発率と細胞の増殖率には相関性はなく, また, 両化合物による染色体異常誘発率にも相関性はあまり見られなかった (Fig. 2)。

BP を用いて, 前培養, 被験物質処理, 回復時間などについて, 血清によるロット間の比較を行ったが, ロット差の生ずる要因は複数あることが示唆された。

我々の実験室では, 試験を行う前に, ロットのチェック (細胞増殖性, 染色体異常誘発性, コロニー形成率など) を行い, その値が, 過去のデータ (バックグラウンドデータ) に近い値を示すロットを使用するようにしている。今までの経験によると, コウシ血清よりも新生コウシ血清の方が, ロット差は少ないようである。

#### 2) 代謝活性化の影響

代謝活性化法に用いられるシクロホスファミド (CP) は, S9 の保存期間 (6 カ月以内) が長くなると, 染色体異常誘発率が高くなる傾向にある。一方, BP は S9 の保存期間にあまり左右されない

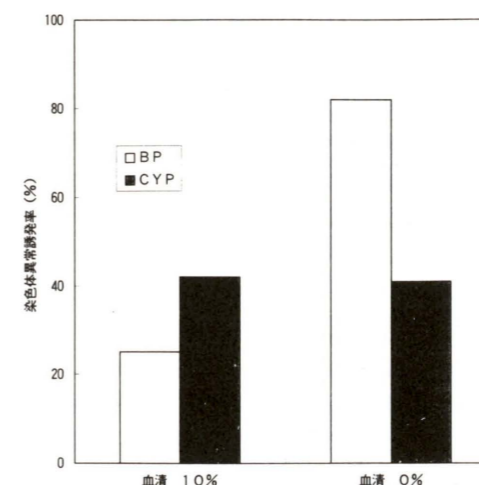


Fig. 3. 代謝活性化における血清の有無の影響

が, 異常の出現率が, 比較的狭い濃度範囲で急に上昇する場合があるため, データがばらつく傾向にある。

ジメチルニトロサミンなどは, S9mix の添加量を増すと, 異常の出現率が上昇する。被験物質によっては, 例え S9 の濃度は一定であっても, 添加量の増減によって異常の出現率が変わってくる場合も経験している。

S9mix の補酵素の組成を, 従来 Ames テストに用いられている組成に変えて試験を行ってみると, 異常の誘発率が低下する傾向にあった。

S9 処理時に血清を添加した培養液を用いた場合と血清を除いた場合とを比較すると, BP および CP 処理群では, 前者の方で異常の出現率が若干低下する傾向にあった (Fig. 3)。また, 通常, S9mix 処理後に細胞を洗浄するが, 洗浄しない場合に比べて, やや異常率は低下する。洗浄によって M 期にある細胞も同時に除外される可能性は避けられない。

#### 5. 染色体異常試験に用いる溶媒の検討

山影康次 (食薬センター・秦野研究所)

我が国のガイドラインおよびその解説書によると, 染色体異常試験に用いられる被験物質の最高用量は, 「細胞増殖または細胞分裂を 50% 以上抑制する濃度とする。細胞毒性が認められない場合は, 最高濃度を 5 mg/ml (または 10 mM 相当の濃

度とする)」と記載されている。

未知の被験物質について, 試験を実施する場合には, 先ず, 被験物質の調製に必要な溶媒の選択から始まる。一般に, 水溶性の場合は生理食塩液 (または蒸留水) を, 水に不溶の場合は DMSO がよく用いられている。これらの溶媒にも溶けにくい場合には, CMC ナトリウムを媒体として懸濁させる。生理食塩液や CMC ナトリウムの場合は, 培養液に対して 10% (v/v), また, DMSO の場合は 1% (v/v) を上限として加える。しかし, 実際に, 被験物質が脂溶性の場合には, 最高用量を得るために, かなり高濃度の被験物質溶液を調製することが必要となり, 従って, CMC ナトリウムの懸濁を用いるケースは少なくない。

一方, OECD のガイドラインなどでは, 「比較的溶けにくい被験物質は, その溶解限界まで試験する」と記載されており, CMC ナトリウムなどによる懸濁状態で試験を行うようには書かれていない。ただし, 最近の国際会議では, 我が国のデータを参考として, もし, 沈澱物が生じない濃度範囲で細胞毒性が見られない場合には, 沈澱物を生じる濃度範囲を含む方向で検討されている。

そこで, 同じ被験物質を, 一方では溶解限界, 他方では懸濁状態で試験を実施した場合に, 試験

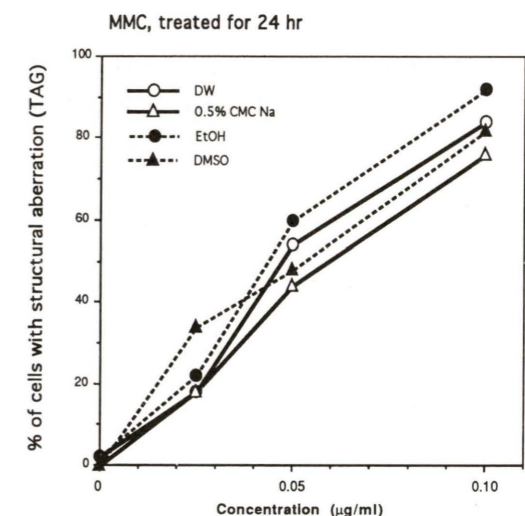


Fig. 1. Induction of chromosome aberrations treated with mitomycin C (MMC) dissolved or suspended in various vehicles at same doses.

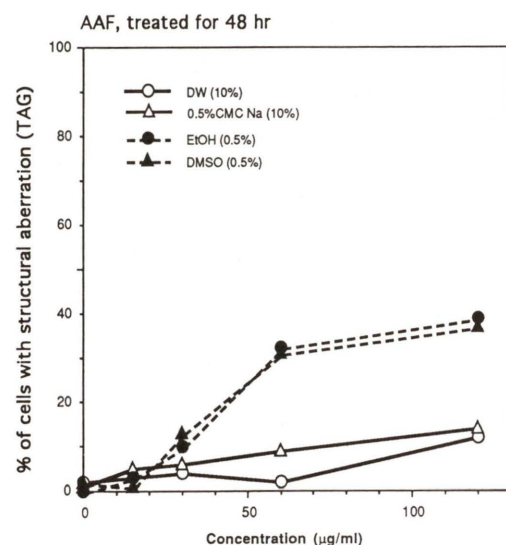
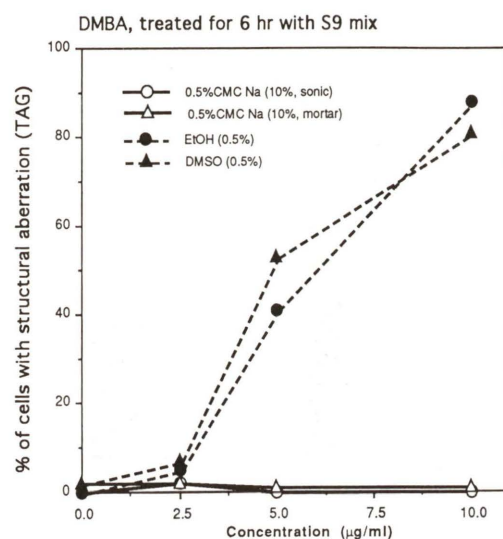


Fig. 2. Induction of chromosome aberrations treated with 2-acetylaminofluorene (AAF) and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) dissolved or suspended in various vehicles at same doses.



結果にどのように影響するかを把握しておくことが重要である。

以下、溶媒を変えた幾つかの実験例について紹介する。

#### 1) マイトマイシン C (MMC) の場合

CHL/IU 細胞に、同じ濃度の MMC を種々の溶媒に溶解もしくは懸濁して、24 時間処理した場合、染色体異常の出現率に差は認められなかった (Fig. 1). 水溶性であるため、当然のことながら、培養液中で溶解した結果と思われる。

#### 2) 2-アセチルアミノフローレン (AAF) および 7,12-ジメチルベンツ (a) アントラセン (DMBA) の場合

MMC 場合と同様に、CHL/IU 細胞を用いて、同じ濃度の AAF を 48 時間連続処理した場合、蒸留水 (DW) あるいは CMC ナトリウムに懸濁した場合と、DMSO あるいはエタノールに溶解した場合とを比較すると、後者の場合の方が、より高い染色体異常誘発率を示した。代謝活性化 (S9) を併用した DMBA の場合 (6 時間処理後、18 時間培養) もまた同様の傾向を示した (Fig. 2).

しかしながら、被験物質の 50% の増殖抑制濃度を基に用量設定して試験を行うと、DW あるいは CMC ナトリウムに懸濁した場合でも、染色体異常の誘発率は明らかに増加した (Fig. 3).

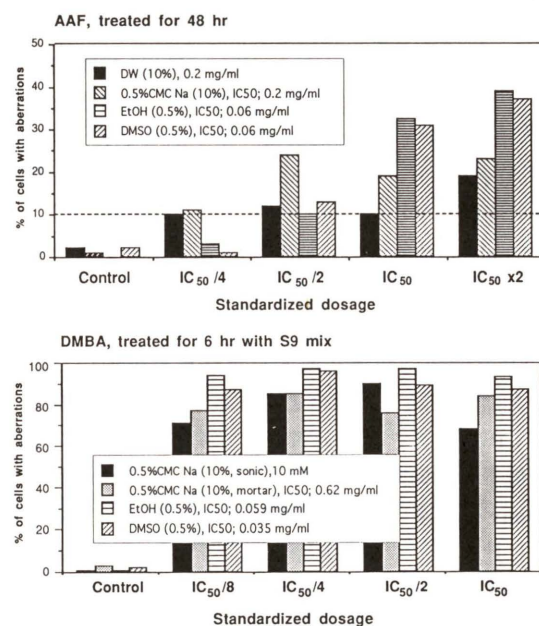


Fig. 3. Induction of chromosome aberrations in CHL/IU cells treated with 2-acetylaminofluorene (AAF) and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) dissolved or suspended in various vehicles at 50% growth inhibition dose.

以上の実験例からも分かるように、使用した溶媒 (媒体) による被験物質の細胞毒性 (50% 増殖抑制) を基にして試験を実施すれば、程度に多少

の差はあるとしても、似かよった結果が得られると判断される。

被験物質によっては、溶媒中では溶解しているが、培養液に添加した際に結晶 (沈澱物) が析出することをしばしば経験する。培養液中で沈澱物が析出する場合は、始めから懸濁状態で処理する場合と同じような条件になると考えられる。白石ら (1992) は、CHL/IU 細胞が、アスベストのような固形の微粒子をその貪食能によって細胞内に取り込むことを報告している。また、浅倉ら (1994) は、結晶が析出した状態でも、染色体異常は用量依存性をもって増加することを示した。

*In vitro* 試験に用いる最高用量の設定問題、沈澱を生ずる程の量が果たして生体内でどのような影響を及ぼすのかという疑問ともあいまって、最近の国際間におけるガイドラインのハーモナイゼーション化の重要な論点となっている。今後さらに、より多くの被験物質を用いてデータを蓄積し、最も実的な手法および考え方を見出して行くことが重要と思われる。

#### 参考文献

- 1) 山田英樹, 山影康次, 田中憲徳 (1992) 日本環境変異原学会, 要旨, p. 87.
- 2) 白石不二雄, 彼谷邦光, 祖父尼俊雄 (1992) 日本環境変異原学会, 要旨, p. 128.
- 3) 浅倉真澄, 野口 忠, 杉山淑江, 佐武 博, 井上みゆき, 松島泰次郎 (1994) 日本環境変異原学会, 要旨, p. 91.

#### 6. 米国 NTP 化合物による共同研究

森田 健 (日本グラクソ (株) 筑波研究所)  
染色体異常試験では、用いられた試験法プロトコールによって異なった結果が得られる場合のことが指摘された (Sofuni *et al.*, 1990).

米国 NTP で試験された化合物の中、Ames 試験および CHO 細胞を用いる染色体異常試験で陰性となり、マウス・リンフォーマを用いる遺伝子突然変異試験 (MLA) のみで陽性となった化合物 (MLA-unique positive chemicals, Zeiger *et al.*, 1990) を Table 1 に示す (但し、この中には SCE 試験で陽性となったものも含まれている)。

我々は、これらの化合物に注目し、同じ化合物について、日本のプロトコールによる染色体異常試験を実施し、NTP による試験結果と比較するための共同実験を行った。参加した共同研究機関は以下の通りである。

- 1) オリンパス光学工業 (株)・染色体研究センター
- 2) 国立衛生試験所・変異遺伝部
- 3) 食品薬品安全センター・細胞遺伝
- 4) 住友化学工業 (株)・安全性研究所
- 5) 第一製薬 (株)・開発研究所
- 6) 帝人 (株)・医薬開発研究所
- 7) 日本グラクソ・筑波研究所
- 8) 日本バイオアッセイ研究センター・変異原性試験部

Table 1. MLA unique positive chemicals by NTP\*

Chemicals	Chromosomal aberration		Carcinogenicity	MLA -S9/+S9	Note
	Structure	Polyploid			
Benzyl acetate*	-	-	+ (M)	+/	Gavage: + (1986), Feed: - (1993)
Bromodichloromethane*	+	-	+ (M&R)	-/+	
Chlorendic acid*	+	-	+ (M&R)	+/	SCE: +
Chlorodibromomethane*	-	+	+ (FM only)	+/	SCE: +
Cinnamyl anthranilate*	(under testing)	+	+ (M&R)	-/+	
Isophorone*	+	-	+ (MR only)	+/	SCE: +
Malonaldehyde Na salt	(unavailable)	+	+ (R)	+/	SCE: +
Pentachloroethane*	+	+	+ (M)	+/	SCE: +
1,1,1,2-Tetrachloroethane	-	+	+ (M)	+/+	SCE: +
Trichloroethylene*	-	-	+ (M)	-/+	SCE: +

M: mice, FM: female mice, R: rats, MR: male rats.

\*: 114 chemicals were evaluated by 4 *in vitro* tests (Ames, CA, SCE and MLA).

\*: Chemicals used in MHW/PMA MLA collaborative study.

染色体異常試験の手法は、基本的には、2年前のメルボルンのワークショップの報告 (Galloway *et al.*, 1994) に準ずるものである。

Table 1 に示す 10 種類の化合物の中、8 化合物について試験を行った結果、6 化合物に、構造異常あるいは倍数体誘発性が認められ、総合的に陽性と判定された。構造異常を誘発については、低 pH あるいは高細胞毒性に起因する可能性も考えられるが、一方、数的な異常 (倍数体) の誘発については、プロトコルの違いによって始めて検出された現象と言えよう。

ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) においても、哺乳類細胞を用いる遺伝子突然変異試験 (MCGM) を遺伝毒性試験のコア・バッテリーに含めるべきかについて検討中である。今回行われた共同研究の結果によれば、マウス・リンフォーマ試験で陽性を示す化合物の多くは、適切な試験法プロト

コールを採用する限り、染色体異常試験でも陽性となる可能性は極めて高い。従って、マウス・リンフォーマに独特な陽性化合物というものはそれほど多くはないものと推測される。

なお、現在、厚生省/日本製薬協の要請によって、さらに別の化合物についても、マウス・リンフォーマ試験の結果と染色体異常試験の結果とを比較するための共同研究が進められている。

#### 参考文献

- Galloway, S. M. *et al.* (1994) Report from working group on *in vitro* tests for chromosome aberrations, *Mutat. Res.*, **312**, 241-261.
- Sofuni, T. *et al.* (1990) A comparison of chromosome aberration induction by 25 compounds tested by two Chinese hamster cell (CHL and CHO) systems in culture, *Mutat. Res.*, **241**, 175-254.
- Zeiger, E. *et al.* (1990) Evaluation of four *in vitro* genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **16**, Suppl. 18, 1-14.

## 日本学術会議だより

№38

### 公開講演会「産業空洞化問題を考える」開催さる

平成 7 年 9 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、7 月に開催された日本学術会議主催公開講演会「産業空洞化問題を考える」の概要について紹介します。

日本学術会議は、学術の成果を市民に直接還元するための活動として、日本学術会議会員が講師となって、市民を対象に年 2 回、日本学術会議主催の公開講演会を開催しています。

日本学術会議のグローバリゼーションと社会構造の変化特別委員会は、いわゆるグローバリゼーションの進展によって我が国の経済・社会が受ける諸種の影響と、それに伴う様々な問題点を吟味し、今後、我が国がとるべきそれらへの対応策の在り方を検討することをその任務とし、特に、現在の我が国にとっての最も重大な危機的事態とも言うべき「産業空洞化」の問題の分析に最重点を置いて、審議を進めつつあります。

今回の公開講演会では、この特別委員会によるそのような分析・審議の成果を踏まえて、3 人の講演者によって、まず、(1)我が国の経済を全体として見てマクロ的に考察するという経済学的な視点からは、現在の長期不況と異常な「円高」に伴って余儀なくされつつある我が国産業の「空洞化」という事態をどう捉え、また、それに対応するべき経済政策はどうあるべきか、そして、次に、(2)技術工学的な観点からすれば、このような現在の状況はどのように把握され、また、それについて、どのような問題点が指摘されるべきか、そして、さらに、(3)企業経営の面から見た場合、このようなグローバリゼーションのインパクトはどのような意味を持ち、我が国の企業はどのようにそれに対応しつつあるのか、という 3 つの視角からの分析が行われました。

この講演会は、平成 7 年 7 月 14 日 (金) の午後 1 時 20 分から、日本学術会議講堂において約 200 名の聴講者を集め開催されましたので、その概要をお知らせいたします。

#### ◇次 第

- |        |                   |
|--------|-------------------|
| ○ 司 会  | 吉田 民人 (第 1 部会員)   |
| 1 開会の辞 | 利谷 信義 (日本学術会議副会長) |
| 2 挨拶   | 吉田 民人 (第 1 部会員)   |
| 問題提起   |                   |
| 3 講演   |                   |

- |                          |                   |
|--------------------------|-------------------|
| (1) 日本経済再生の方途            | 丹羽 春喜 (第 3 部会員)   |
| (2) 技術移転と空洞化             | 富浦 梓 (第 5 部会員)    |
| (3) グローバリゼーションと日本企業の多国籍化 | 岡本 康雄 (第 3 部副部長)  |
| 4 質疑応答                   |                   |
| 5 閉会の辞                   | 西島 安則 (日本学術会議副会長) |

#### ◇問題提起

吉田 民人 (第 1 部会員、中央大学文学部教授)

空洞化という言葉は、英語でフォローイングアウトと言われ、これが最初に問題になったのは 1960 年代のアメリカであり、当時 EC にアメリカの自動車あるいは電機産業が出て、アメリカの労働組合が、ジョブ、つまり仕事の輸出であるということとかなり反対したといったようなところから始まって、日本でも、1960 年代の後半には東南アジアに直接投資が開始されていた。もちろんこの種の問題は、経済のグローバリゼーションという、まさにグローバリゼーションと社会構造の変化特別委員会が担当しているテーマの一つであるが、その空洞化が特に最近、円高の状況の中で国際競争力の著しい低下を招くということで、ますます加速されるというふうにもみられているわけで、この種のテーマをグローバリゼーションと日本の社会構造の変化の中でも最も緊急のテーマの一つとして取り上げることになった。

空洞化といっても産業の空洞化、金融の空洞化、技術の空洞化、あるいは産業の空洞化も生産の空洞化、経営の空洞化あるいは雇用の空洞化といったさまざまな側面があるわけで、主としてその辺の問題を「産業の空洞化」という一言である意味でラフに総括させていただいた企画である。

中身は三つあり、(1)日本経済をマクロ的な角度から見た空洞化の原因とその対策について、(2)技術の空洞化に関して、(3)ミクロ的な企業がグローバリゼーションの中で国際化していく。まさにそういう意味で言えばミクロ的であると同時にグローバルな、その意味

でマクロ的な観点から、それぞれ講演が行われる。

ここで出る問題は多岐にわたるが、基本的には空洞化の原因の究明と、それに対する対応策という二つの側面からの講演となるが、例えば大蔵省の立場あるいは日銀の立場、あるいは地方公共団体の立場、あるいは企業の立場、それぞれの立場によって微妙に特殊利益が反映せざるを得ないような問題構造になっているが、研究者というのはそういう特定の、つまり職業的な集団の利益から比較的自由に、非常に客観的な判断をすることができる職業集団に属していることから、できるだけ客観的に、一般的に特殊な利害にとらわれない角度からの検討をさせていただくことになっているので、研究者としてはこういう見方をしているんだということをぜひお聞きいただきたい。

#### ◇日本経済再生の方途

～円高と産業空洞化問題をどう考えるべきか～

丹羽 春喜

(第3部会員、グローバリゼーションと社会構造の変化特別委員会委員長)

- ・ ケインズ 対 反ケインズ
  - ・ 経済学の50～100年の退歩  
——ベトナム後遺症のニヒリズム——
  - ・ 政策の不合理性と長期経済停滞
  - ・ 三重の悪循環的ジレンマによる不況の永続化
  - ・ 「信賞必罰」システムのフロート制と「円高」の責め苦、そして産業空洞化
  - ・ 「低成長→低税収→財政赤字→緊縮財政→不況永続化」の悪循環
  - ・ 「リストラ不況」の危険性
  - ・ 20年以上もの超長期不況
  - ・ 結果としての「近隣窮乏化」政策 (対外経済摩擦の根本的原因)
  - ・ 「正常な」国際分業と「異常な」空洞化とを混同するな
  - ・ ミスリーディングな「成熟経済」パラダイム
  - ・ 膨大なデフレ・ギャップ  
——それを直視しようとしないう「経済白書」の危険性——
  - ・ 「規制緩和」、「リストラ」、「行革」、「市場開放」、等々の限界と欺瞞性
  - ・ 「合成の誤謬」の問題をまじめに直視しようしない風潮
  - ・ 朝野をあげての幼児化現象
  - ・ 必要な「最善のシステム」ビジョン (市場経済+国民経済予算) への回帰  
——むしろ、デフレ・ギャップこそ「真の財源」——
  - ・ 震災復興と被災者支援の政策はどうあるべきか  
——国家の本質的な機能とは何か——
  - ・ 混迷からの脱却へ
- およそ、上記のような諸項目について、問題点を解

きあかし、日本経済再生の方途について、国民経済予算制度を現在の市場経済をベースにしている経済体制に組み込むべし等の提言を行いました。

#### ◇技術移転と空洞化

富浦 梓(第5部会員、新日本製鐵㈱常任顧問)

製造業は全て技術の発明と、その移転によって、拡大、発展を成し遂げてきた。鉄鋼業における技術移転の歴史を振り返ってみると、一般的に技術の個人依存性が高いものほど移転が困難であり、技術の表象可能性の高いものほど移転が容易である事に気がつく。

技術の完全な表象には多くの困難が存在し、それ故に未だ経験に依存するところが多い。技術の表象可能性を高めるには、製造に伴って生ずる現象を分析して、基本過程を取り出し、それ等を統合して新たなシステムを発現するという行為の繰返しが必要とされる。

このような経験の科学化を継続的に行われないとすると、技術の空洞化が生じやすくなる。

このような点について着目し、技術移転と空洞化について、生産技術としての工学から社会技術としての工学へのシフト等の具体的提案としてまとめました。

#### ◇グローバリゼーションと日本企業の多国籍化

岡本 康雄 (第3部副部長、青山学院大学国際政治経済学部教授)

日本の製造企業は、1960年代後半東南アジアに生産拠点を軸とした海外直接投資を始めた。そして70年代に入ると、貿易摩擦回避がらみで米国向けの海外直接投資が、電機・電子、さらに乗用車といった分野において大規模に行われるにいたった。EUにも同じ様な分野での生産拠点の形成が進められた。この間、日本企業の競争優位資源の海外移転が果たしてどのように行われうるか、が重要な課題であった。

他方、世界規模では、各国、特に先進国間の所得水準の平準化と市場の同質化技術水準の均等化と革新の同期化が進み、情報通信技術の急速な進歩とそれによる伝達コストの低下、各国制度の自由化がこれに加わって、80年代国境なき経済——グローバリゼーションが急速に進展し、グローバル規模での競争が重要な課題であった。

そして80年代後半からは、アジアNIES、90年代にはアセアンが台頭し、東アジア全体がグローバルな注目を浴びるにいたっている。そして日本は、急速な円高によりアセアンへの生産移転を急テンポに進めざるをえなくなっている。それは、日本国内の空洞化を誘発している。

これら三つは、今現在、同時解決を求められている課題である。このトライアドについて考察しました。

※ なお、この講演会の模様については、前回の講演会と同様、日学双書No.24「産業空洞化問題を考える」として、勸日本学術協力財団より刊行予定です。

## 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7年度役員名簿

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	若 林 敬 二	
会 計 監 査	佐 藤 茂 秋	
	白 須 泰 彦	
賞等選考委員	黒 田 行 昭 (委員長)	
	武 部 啓 世	
	須 藤 鎮 佑	
	清 水 英 次郎	
	松 島 泰 直 秀	
	木 苗 直 弘 康	
	島 田 弘 基 (委員長)	
編 集 委 員	石 館 清 見 雄	
	菊 川 純 潤 三	
	後 藤 木 徹 博	
	鈴 谷 敏 代子	
	澁 田 位 香	
企 画 委 員	秋 山 実 利 彦	
	能 美 健 康 宏	
	山 添 西	
	葛 西	

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 世	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

## 原著論文の募集

「環境変異原研究」に掲載する原著論文は随時受け付けています。昨年から「環境変異原研究」を原著論文掲載誌として刊行しておりますが、投稿論文が非常に少ない状況にあります。「環境変異原研究」を会員のための機関誌として育てていくため、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、本会が必要と認めた場合は転載し、また外部から引用の申請の許可があった場合には、編集委員会において検討の上許可することがある。ただし、著作者自身が自分の記事、論文などの一部を複製、翻訳などの形で利用することを妨げるものではない。しかし、著作者自身であっても、全文を複製の形で他の著作物に利用する場合には、事前に文書にて申し出を行い、許諾を求めなければならない。

#### 6. 校正

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

#### 7. 著者負担金

- 1) 投稿論文は、組版代の一部負担金として刷り上がり1頁につき2,000円を著者が負担する。また規定の頁数を越えた分については、超過頁分についての実費は著者負担とする。
- 2) カラー印刷等特殊印刷のため付加的に発生する費用は著者負担とする。
- 3) 別刷りは著者負担とする。別刷り希望者は著者

校正時に添付する申し込み書に50部単位で申し込むこと。

### 環境変異原研究執筆規定

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

日本文の場合：原稿はA4版用紙に1行22字、1頁20行で印字する（刷り上がりの1/4頁に相当する）。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。

英文の場合：原稿はA4版のタイプ用紙にダブルスペースでタイプする。一行打字数は約60字、1頁25-27行を標準とする。原稿は著者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点について数行記入のこと)				
加入学会名 (本学会以外の)				

推 薦 者 (日本環境変異原学会評議員)	
氏 名 (署名)	㊞
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	⑩
旧 所 属	

新 所属機関 部局 職名	(和)
	(英)
新 所属機関 所在地	〒 電話 内線 ( ) FAX (和)
	(英)
新 自 宅 住 所	〒 電話 内線 ( ) FAX (和)
	(英)
会誌送付先 ① 所属機関 ② 自 宅	

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

賛助会員名簿 (五十音順)

下記の皆様に日本環境変異原学会の賛助会員となって頂き、  
学会活動にご協力頂いております。

- 家田貿易株式会社
- エスビー食品株式会社 中央研究所
- 大塚製薬株式会社 PMS 部
- 株式会社化合物安全性研究所
- 株式会社新日化環境エンジニアリング
- 株式会社ツムラ ツムラ中央研究所
- 株式会社ナード研究所
- 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
- 日清製粉株式会社 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

## 「環境変異原研究」表紙デザイン再募集のお知らせ

一昨年、環境変異原研究誌の原著論文掲載を機に、会員相互のコミュニケーション誌にふさわしい表紙デザインを募集しましたが、応募作品が少なく決定するには至りませんでした。そこで、あらためて下記の要領で「環境変異原研究」の表紙デザインを再募集しますので、奮ってご応募下さい。なお採用の分には記念品を贈呈します。

募集内容：「環境変異原研究」にふさわしい表紙デザイン。

体裁：表裏見開き B4 版。おもて表紙 (B5 版) だけでも可。

大きさ：原寸大をお願いします。

色彩：黒色及び白色 (地色) を除いて 3 色まで使用可。

必須記載事項：[おもて表紙]

雑誌名 (環境変異原研究およびその英文 Environmental Mutagen Research Communications), 発行年ならびに通巻番号。

[背表紙]

雑誌名 (環境変異原研究), 発行年ならびに通巻番号

作品送付先：〒193 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 (編集委員長)

TEL 0426-91-7115 FAX 0426-91-7662



## 細胞増殖・障害研究用試薬

### キット

#### LDH-Cytotoxic Test Wako

##### 細胞毒性試験用

細胞膜に障害を受けた細胞から遊離されるLDH活性を測定

死細胞だけでなく生細胞の測定も可能 /

299-50601

960回用

#### Cell Counting Kit

(株)同仁化学研究所製

##### 細胞増殖/毒性試験用

MTTアッセイの問題点を改良 / (高水溶性テトラゾリウム塩

WST-1使用)

水溶性が高く、抽出操作不要 /

343-06464

100回用

349-06461

500回用

345-06463

2500回用

### 関連試薬

#### Alamar Blue™

##### 細胞増殖/毒性試験用

水溶性が高く、比色及び蛍光測定が可能な色素

537-33452

25ml

#### Propidium Iodide

##### 細胞毒性試験用

死細胞の蛍光染色に使用

164-16721

100mg

#### MTT

##### 細胞増殖/毒性試験用

345-01821

100mg

341-01823

1g

#### XTT

513-17631

100mg

#### WST-1

342-06451

25mg

348-06453

100mg

346-06454

500mg

\*資料をご請求下さい。

和光純薬工業株式会社

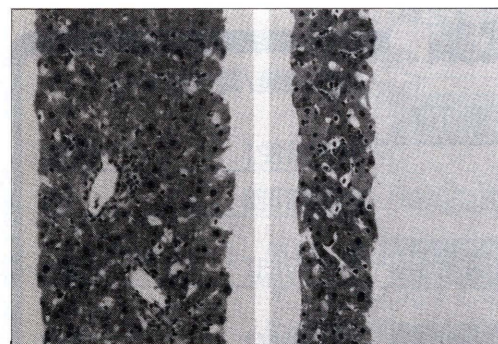
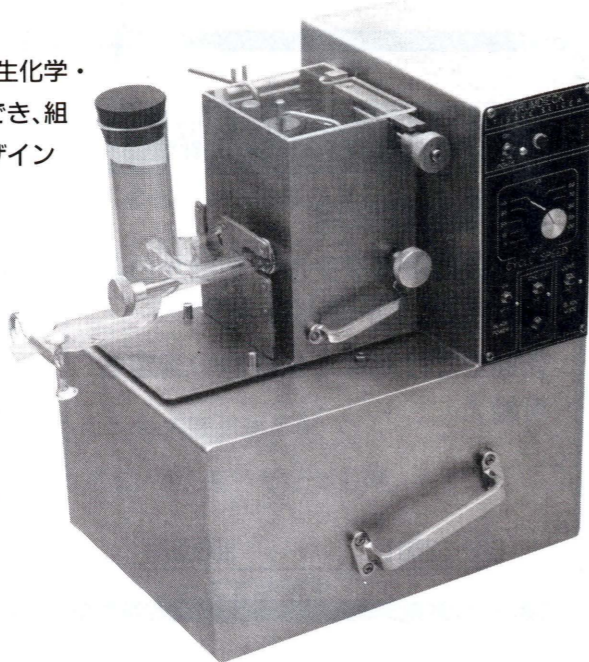
本社 大阪市中央区道修町三丁目1番2号  
〒541 電話 大阪 (06) 203-3741 (代表)  
東京支店 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号  
〒103 電話 東京 (03) 3270-8571 (代表)  
出張所 福岡・広島・名古屋・横浜・大宮・筑波・仙台・札幌

# THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

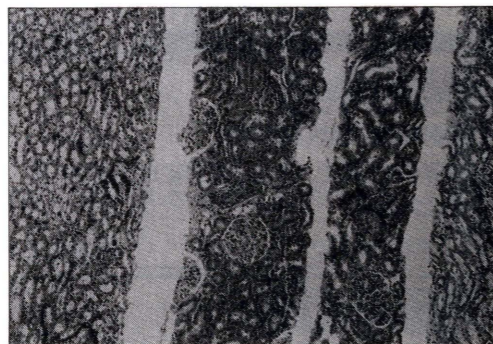
## 生きた組織の無菌スライスができます。

クルムディーク・ティッシュサイザーは、生化学・生理学・薬理学・毒物学などの研究に応用でき、組織培養のための無菌スライス作成用にデザインされています。

- 薄い円形のスライスが、5～15mm直径の範囲で作成できます。
- ボタンを押すだけで、2～3秒に一枚の割合で(最高スピードの場合)作成でき、初心者でも取扱いは簡単です。
- スライスは再現性良く、バラツキもなく60～1000 $\mu$ mの厚さで作成されます。



ラットの肝臓(倍率430 $\times$ )



ラットの腎臓(倍率100 $\times$ )

右の写真はラットの肝臓のスライス(厚さ60 $\mu$ mおよび135 $\mu$ m)で、左の写真はラットの腎臓のスライス(135～200 $\mu$ m)です。どちらも切片面の平行性と美しさ(ダメージがない)に注目して下さい。



販売元  
**ショーシンEM株式会社**  
〒444-02 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14(ショーシンビル)  
TEL. (0564) 54-1231番(代表)  
FAX. (0564) 54-3207番

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 1ml $\times$ 10本 コファクターA 9ml $\times$ 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 2ml $\times$ 3本 コファクターC 4.7ml $\times$ 3本	染色体異常試験でのデータを添付します

(保存は-80 $^{\circ}$ Cでお願い致します)

- エームテスト用コファクターA(注文量100ml以上)および染色体異常試験用コファクターC(注文量30ml以上)の単品注文もお受け致します。
- 従来品は引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 $\times$ 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 $\times$ 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

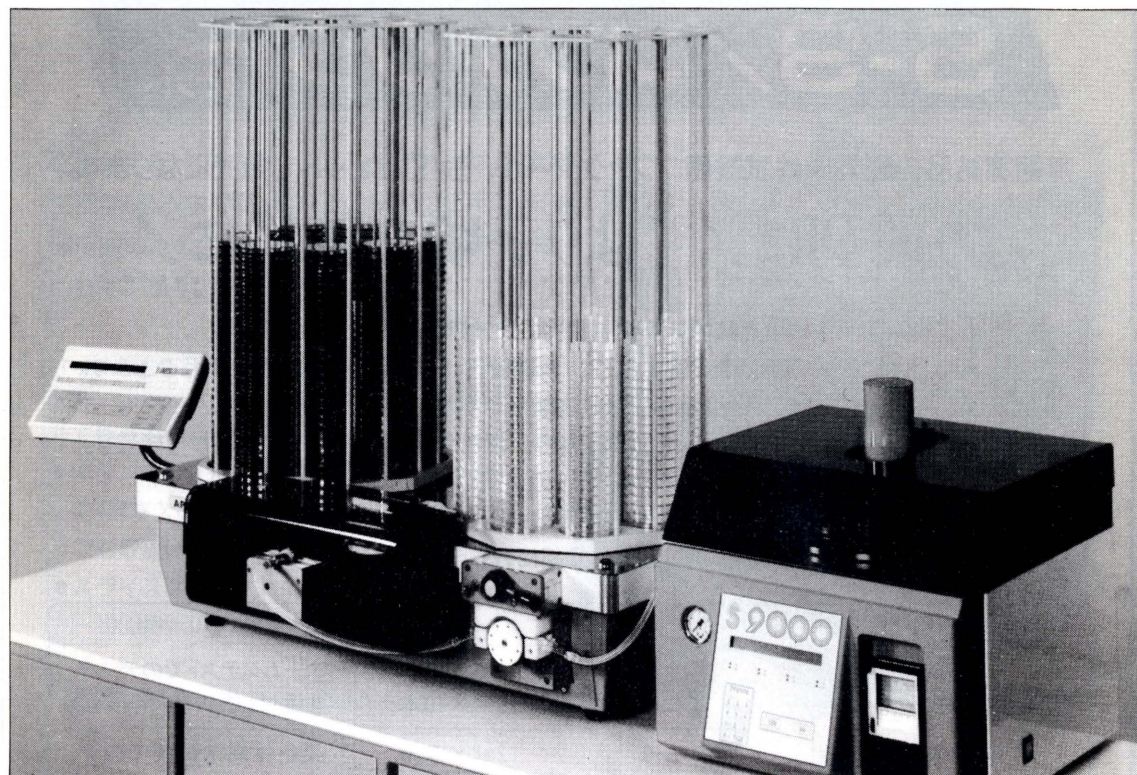
販売元



**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)

# 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、いかなる要求にも充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

## 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。

試験物質の名称: TEST

代謝活性化 の有無	被験物質濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	後帰変異数 (コロ)		
		塩基対置換型	TA100	TA1535
S9Mix (-)		WP2uvrA	150	149
			147	155
			153	152
			162	
	156	35	112	182
		36 (36)		180 (181)
	313	28		193
		29 (29)		193 (193)
	625	29		197
		29 (29)		208 (203)
S9Mix (+)	1250	30		112
		31 (31)		108 (110)
	2500	31		109
		31 (31)		118 (110)
	5000	9*		112
		9*		118 (111)
				262
				276 (269)
				272
				277 (275)

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・正式法の力価計算

S9Mix  
(+)

陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)
陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)

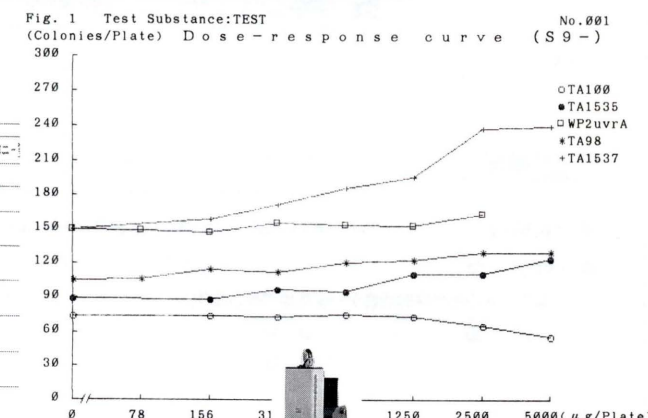
(備考) 数値の右の\*印は、菌の生育阻害が認められたものです。  
数値の右の#印は、菌の沈澱が認められたものです。

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

※依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元

**システムサイエンス株式会社**



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・正式法の力価計算

S9Mix  
(+)

陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)
陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)

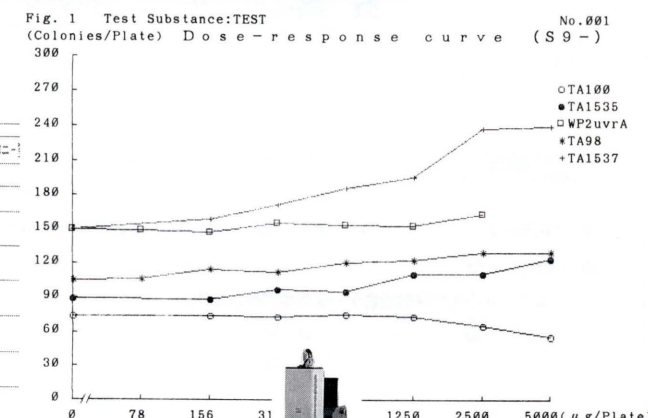
(備考) 数値の右の\*印は、菌の生育阻害が認められたものです。  
数値の右の#印は、菌の沈澱が認められたものです。

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

※依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元

**システムサイエンス株式会社**



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・正式法の力価計算

S9Mix  
(+)

陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)
陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)

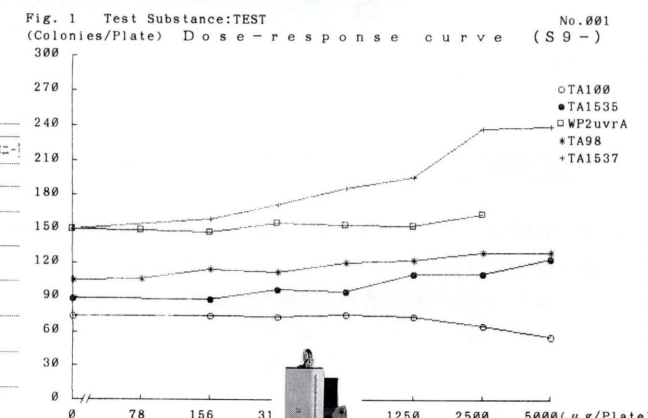
(備考) 数値の右の\*印は、菌の生育阻害が認められたものです。  
数値の右の#印は、菌の沈澱が認められたものです。

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

※依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元

**システムサイエンス株式会社**



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・正式法の力価計算

S9Mix  
(+)

陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)
陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)

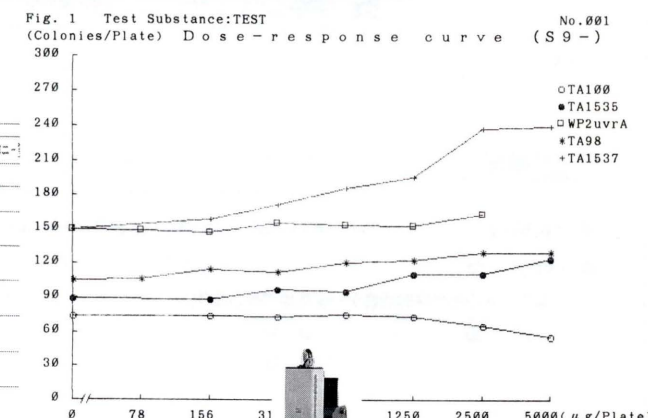
(備考) 数値の右の\*印は、菌の生育阻害が認められたものです。  
数値の右の#印は、菌の沈澱が認められたものです。

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

※依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元

**システムサイエンス株式会社**



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・正式法の力価計算

S9Mix  
(+)

陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)
陽性 対照	S9Mix を必要 とする もの	名称	濃度 ( $\mu\text{g}/\text{プレート}$ )	AF-2	コロニ-数/プレート	2AA	2.0	222	224 (223)

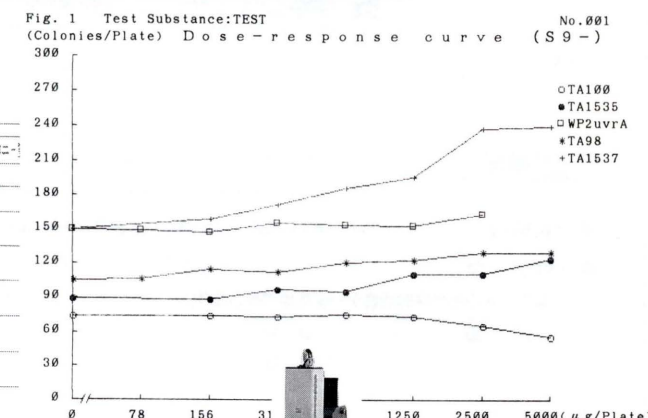
(備考) 数値の右の\*印は、菌の生育阻害が認められたものです。  
数値の右の#印は、菌の沈澱が認められたものです。

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

※依頼試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元

**システムサイエンス株式会社**



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・正式法の力価計算

S9Mix  
(+)

		(+)	313	29 ( 29)	193 ( 193)
			625	29 ( 29)	197
			1250	30	208 ( 283)
			31	31 ( 31)	
			2500	31 ( 31)	
			5000	9*	
陽性対照	S9Mix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		
			4.3		
陽性対照	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		
			16 ( 17)		




PCA-11S

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

# 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 アコリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
ミクロソーム (105,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

薬 物	菌 株*
ベンゾ(a)ピレン	TA-100、TA-98、TA-1537
2-アミノアントラセン	TA-100、TA-98、TA-1537
9,10-ジメチルアントラセン	TA-100、TA-98、TA-1537
自然発生突然変異株数	TA-100、TA-98、TA-1537

\* Salmonella typhimurium

## エームス試験用凍結S-9MIX

- 特長**
- ①エームス試験がより手軽になりました。
  - ②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。
  - ③解凍後、直ちにエームス試験にご使用いただけます。
  - ④S-9が1mlとコファクターミックスが9ml入っており、20プレート分の試験が可能です。

●包装単位：10ml×8本、5ml×4本

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

## 染色体異常試験用凍結S-9MIX

- 特長**
- ①染色体異常試験がより簡単になりました。
  - ②S-9にコファクターミックスを加え無菌的に調整しました。
  - ③解凍後、直ちに染色体異常試験にご使用いただけます。
  - ④S-9が1.05mlとコファクターミックスが2.45ml入っており、7プレート分の試験が可能です。

●包装単位：3.5ml×3本

カタログNo.	品 名	包 装	価 格
S-9	変異原性試験用凍結S-9	1.5ml×12本	¥36,000
S-9 MIX	エームス試験用凍結S-9 MIX	10ml×8本	¥43,200
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

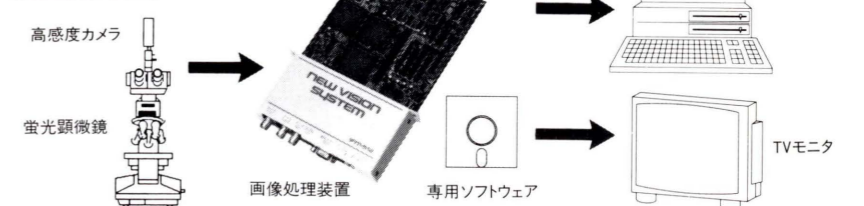
東京：〒113 東京都文京区本郷3-14-16 EKビル  
TEL.03(3816)2861 FAX.03(3814)5347  
大阪：〒564 大阪府吹田市南金田1-14-5  
TEL.06(338)1518 FAX.06(338)5626

## 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



## 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



《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》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。

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

### 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2号 1995年

平成7年10月25日 印刷  
平成7年10月30日 発行

発行者 日本環境変異原学会  
発行責任者 祖父尼俊雄  
印刷所 三造写真工業株式会社

新製品

BIG BLUE®



TRANSGENIC RAT

## MUTAGENESIS ASSAY

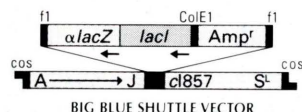
Big Blue Mouseと同じ特性を有しています。

## Big Blueの技術力

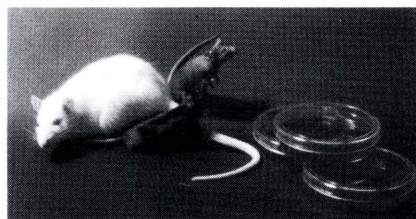
Big Blue Mouseは、*in vivo* 突然変異分析の簡素化に貢献してまいりました。

この度STRATAGENEは、この優れた特性をBig Blue Rat 及びRat2 Cell Lineに組み込むことに成功しました。

これら最先端の研究開発に対する取り組みはSTRATAGENEの一貫した技術アプローチの表れであり、*in vivo* 突然変異研究のパイオニアをお約束するものです。



BIG BLUE SHUTTLE VECTOR



## BIG BLUE RODENTS 及び CELL LINE

• 近交系C57BL/6、ハイブリッドB6C3F1 及び近交系Fisher 344を使った *in vivo* mutation assay system.

• Rat2胚繊維芽細胞による *in vitro* mutation assay system.

- 生殖細胞を含む全ての変異が同定可能。
- Sequence 分析によって容易な変異解析。
- 米国政府監督機関が評価を実施中。
- 無料のワークショップ及び技術サポート。

## 容易でかつ有効

全てのBig Blueシステムは、Big Blue Shuttle Vector内の1080-bp *lacI* geneが主役です。

この *lacI* geneはDNA から容易に回収できます。

突然変異の検出は大腸菌を使ったカラーセレクトションで行います。

DNAシーケンス解析も容易にできます。

Contact Stratagene for licensing information and a list of licensed contract laboratories that can conduct the assay for you.



STRATAGENE®

continuing to pioneer the future of *in vivo* mutation research

U.S. Patent No. 5,347,075 and Patents Pending

お問合せ先: **加商株式会社** 〒103 東京都中央区日本橋2丁目14番9号 電話 03-3276-7676 FAX.03-3276-7626  
ライフサイエンスグループ