

環境変異原研究

Environmental
Mutagen
Research
Communications

Vol.17 No.3 1996

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-ベンゾフランボンを腹腔内投与した肝臓から調整したものを標準としていますが、その他の動物種及び誘導剤についても御相談に応じております。

保存

S-9は活性の高い酵素系よりなっており、-80°C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ありませんので、よく攪拌して御使用下さい。

●包装単位：1.5ml×12本詰 ●特注品、S-9に関して詰容量は4.5mlまでお受けいたします。

活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

分画	測定データ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
ミクロソーム (10,000×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,
Benz[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

 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

環境変異原研究

Environmental Mutagen Research Communications

Volume 17, Number 3 1996

目次

一般論文

O-Dianisidine の *in vitro* および *in vivo* における染色体異常誘発能

畠中 豊, 豊田佳子, 北川義徳, 諏訪芳秀…… 231

O-アセチル転移酵素高産生株を用いた高感度 *umu* テストによる

河川水の遺伝毒性モニタリング 大江 武…… 237

肝がん原物質のマウス肝細胞を用いる *in vivo* 小核試験

鈴木 洋, 平野紀子, 大島 隆, 樽本保男…… 251

短報

Distribution of Mutagenic Polycyclic Aromatic Compounds in Leaves of a Woody Plant

Growing under Various Traffic Conditions

Daisuke Nakajima, Tsuyoshi Teshima, Masaki Ochiai,

Masako Tabata, Junzo Suzuki and Shizuo Suzuki…… 259

マウス腸上皮細胞を用いる小核試験法

大山ワカ子, 徳光 崇…… 265

特別企画 日本放射線影響学会・日本環境変異原学会合同シンポジウム（広島）

「生体リスク評価の現状と未来：動物モデルから人へ」の演題から

遺伝子多型と発癌リスク

食事由来のフィトエストロゲンとがん予防 川尻 要…… 271

渡辺 昌, 高橋東生, Adlercreutz, H.…… 279

特別企画 第24回大会ミニシンポジウム-4

「環境変異原と生殖細胞の変異」

ショウジョウバエ卵母細胞のガス環境と染色体不分離 藤川和男…… 285

メダカ生殖細胞突然変異実験系からわかったこと 嶋 昭絵…… 289

化学物質によるマウス始原生殖細胞の突然変異誘発 濑谷 徹, 堀谷尚古, 加藤基恵…… 293

原爆被爆者の生殖細胞突然変異をDNAレベルで子供にモニターする

高橋規郎, 佐藤千代子, 浅川順一, 小平美江子…… 301

ミニシンポジウム「環境変異原と生殖細胞の変異」のまとめ 一ツ町晋也, 濑谷 徹…… 307

資料・情報

変異原性が認められた化学物質の取扱いについて（労働省）…………… 309

日本放射線影響学会・日本環境変異原学会 合同シンポジウム（講演要旨）…………… 313

MMS Communications 掲載論文要旨…………… 325

AUTHOR INDEX	329
KEYWORD INDEX	330
日本学術会議だより (No. 39).....	332

付記

日本環境変異原学会 会則
 " 平成 8 年度 役員名簿
 " 平成 8~9 年度 評議員名簿

環境変異原研究 投稿規定
 " 執筆規定

日本環境変異原学会入会申込書

住所・所属等変更届

賛助会員名簿

Environ. Mut. Res. Commun., 17: 231-236 (1996)

o-Dianisidine の in vitro および in vivo における染色体異常誘発能
Clastogenicity of o-dianisidine in vitro and in vivo

畠中 豊, 豊田佳子, 北川義徳, 諏訪芳秀

Yutaka Hatanaka, Yoshiko Toyoda, Yoshinori Kitagawa and Yoshihide Suwa

サントリー株式会社・基礎研究所
 618 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1

Institute for Fundamental Research, Suntory Ltd.,
 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618 Japan

(受付: 1995年6月15日; 受理: 1995年10月16日)

Summary

o-Dianisidine (*3,3'-dimethoxybenzidine*), a benzidine analogues, is reported to be mutagenic in bacteria and in mammalian cells. This study evaluated the clastogenicity of *o-dianisidine* using the chromosome aberration test and the sister-chromatid exchange (SCE) test with Chinese hamster lung (CHL) cells *in vitro*, and with male CD-1 mice *in vivo*.

In these tests, we examined the *in vitro* clastogenicity with or without metabolic activation (treatment with S9: 6 h; recovery time: 18 h). In the *in vivo* chromosome aberration test and in the *in vivo* SCE test, *o-dianisidine* was administered orally by gavage to CD-1 mice, at a maximum dose of 600 mg/kg.

Induction of structural chromosome aberration and SCE, increased dose-dependently ($p < 0.01$) in both *in vitro* tests with and without metabolic activation by rat S-9. Although no chromosome aberration was detected in the *in vivo* SCE test, the maximum SCE induction response occurred ($p < 0.01$) at the highest dose level (600 mg/kg, p.o.).

These results show that *o-dianisidine* is not only mutagenic at DNA level but also clastogenic at chromosome levels, both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: *o-dianisidine, chromosome aberration, sister-chromatid exchange*

広告掲載会社一覧

家田貿易株式会社 (表 2)
 エルゼビアサイエンスジャパン
 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
 株式会社講談社
 システムサイエンス株式会社
 ショーション EM 株式会社
 株式会社東京エム・アイ商会
 トーマス科学器械株式会社 (表 4)
 和光純薬工業株式会社
 (50 音順)

緒 言

o-Dianisidine は benzidine 含有色素の工業用生産において、*o-toluidine*, *3,3'-dichlorobenzidine* などと共に広く利用されている。その代表的な色素および染料として *Direct Blue 218*, *1*, *15* および *25*, *Pigment Orange 16* などが挙げられ、これらは、主にゴム、プラスチック、繊維などの原料として使用されている。

この化合物に関する発癌性は、ラットやハムスターを用いた実験系ではすでに証明¹⁾されている。しかし、ヒトでは膀胱癌罹患との関係について

いくつかの疫学的な報告¹⁾⁻³⁾ がなされているが、発癌性を証明するには至っていない。一方、変異原性に関しては、細菌や哺乳動物培養細胞を用いた数多くの報告⁴⁾⁻¹⁰⁾ がされているが、*in vitro* の遺伝子レベルの突然変異のみに限定されている。

そこで今回、我々は *o-dianisidine* の染色体レベルでの構造異常誘発能および姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発能について、*in vitro* および *in vivo* の試験系を用いて検討した。

実験材料および方法

1. 被験物質および供試動物・細胞

o-dianisidine (CAS No. 119-90-4, Fig. 1) は Sigma Chemical Co. より購入し, *in vitro* の試験系では DMSO に、また *in vivo* の試験系では olive oil にそれぞれ溶解後、試験に供した。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, CAS No. 59-14-3) は Sigma Chemical Co. より、また同試薬の錠剤型 (50mg/Tablet) は Boehringer Mannheim GmbH. より購入した。5 週齢 CD-1 雄性マウスは、(株)日本チャールスリバーより入手した。チャイニーズ・ハムスター肺線維芽 (CHL) 細胞は国立衛生試験所より入手し、10% 牛胎仔血清 (三光純薬) を含む Eagle's MEM 培地 (GIBCO) を用いて 5% CO₂, 37°C 下で培養した。ラット肝ホモジネートミクロソーム画分 (S9) は phenobarbital より 5,6-benzoflavone で誘導したラットの肝臓より調製したものをおりエンタル酵母 (株) より購入した。

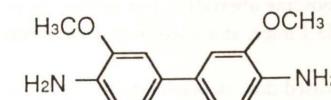


Fig. 1. Chemical structure of *o*-dianisidine.

2. *in vitro* 試験系

1) 染色体異常試験

CHL 細胞を用い、Ishidate ら¹¹⁾の方法に従い、代謝活性化によらない長時間処理法（直接法）および代謝活性化による短時間処理法（代謝活性化法）について実施した。直接法においては 24, 48 時間後に、また代謝活性化法においては 6 時間処理し、さらに回復時間として 18 時間培養後にそれぞれ標本を作製した。処理濃度は細胞増殖抑制試験の結果で得られた 50% 抑制濃度を最高濃度とし、公比 2 で 3 用量設定（直接法；0.025–0.2 mg/ml, 代謝活性化法；0.25–1.0 mg/ml）した。観察は 1 用量につき 200 個の分裂中期細胞について行った。

2) SCE 試験

CHL 細胞を用いて代謝活性化についてのみ行なった。15 時間 BrdU（最終濃度 10 μM）を細胞に取り込ませた後、検体および S9 で 3 時間処理を行ない、さらに培養を続けて 15 時間 BrdU を取り込み、標本を作製した。染色は Fluorescent Plus Giemsa (FPG) 法¹²⁾により行なった。処理濃度は染色体異常試験と同濃度で実施した。観察は 1 用量につき 30 個の分裂中期細胞について行い染色体数と SCE 数についてカウントした。

3. *in vivo* 試験系

1) 染色体異常試験

5 週齢の CD-1 雄性マウスに単回で経口投与し、投与後 22 時間目にコルセミド処理 (4 mg/kg) を行い、24 時間目に大腿骨を摘出し、骨髄細胞の染色体標本を作製した。染色は Giemsa 染色法により観察した。投与量は簡易急性毒性試験 (Lorke 法)¹³⁾における LD₅₀ 値 (1400 mg/kg p.o.) の約 40% の量 (600 mg/kg) を最高用量とし、公比 2 で 2 用量の投与群 (1 群 4 匹) を設けた。標本観察は 1 匹あたり 50 個の分裂中期細胞について行なった。

2) SCE 試験

予め、上背部の皮下に 1.5 錠の BrdU 含有錠剤を植え込んだ 5 週齢の CD-1 雄性マウスに *o*-dianisidine を単回経口投与した¹⁴⁾。投与 22 時間後にコルセミド処理 (4 mg/kg) を行い、さらに 2 時間後に大腿骨を摘出し、骨髄細胞の染色体標本を作製した。染色は Giemsa 染色液と 4Na-EDTA による姉妹染色分体分染法¹⁵⁾により行った。投与量は染色体異常試験と同様に 600 mg/kg を最高用量とし、公比 2 で 3 用量の投与群 (1 群 4 匹) を設けた。標本観察は 1 匹あたり 20 個の分裂中期細胞について行なった。

4. 統計学的処理

in vitro および *in vivo* の試験系で得られた値は Cochran-Armitage の傾向検定^{16)–18)}により有意性を検討した。

結 果

1. *in vitro* 試験系

1) 染色体異常試験

直接法では 24 時間処理で 0.2 mg/ml の濃度においてのみ染色体異常出現頻度が 14% と、有意 ($p < 0.05$) に増加した。一方、48 時間処理では各用量において有意な増加はみられなかった (Table 1)。

代謝活性化法における染色体異常出現頻度は 0.25–1.0 mg/ml の用量域で有意 ($p < 0.01$) に増加し、1.0 mg/ml の用量では 18% と陽性となった。観察された染色体異常は染色分体交換 (cte) がもっとも多くついて染色分体切断 (ctb) も見られ、これら染色分体型の構造異常が大部分を占めた。

2) SCE 試験

代謝活性化法において、分裂中期細胞および染色体あたりの SCE 出現頻度は 0.05–0.2 mg/ml の用量域で用量依存的に増加し、最高用量 (0.2 mg/ml) ではそれぞれ 18.8, 0.76 と陰性対照群 (6.9, 0.28) に比較し約 2.5 倍に増加し、有意差 ($p < 0.01$) が認められた (Table 2)。

2. *in vivo* 試験系

1) 染色体異常試験

高用量 (600 mg/kg) 投与群における染色体異常出現頻度は 4% と増加傾向は見られるものの、有意な差はみられなかった (Table 3)。

2) SCE 試験

分裂中期細胞および染色体あたりの SCE 出現頻度は 150–600 mg/kg の用量域で用量依存的に増加し、最高用量 (600 mg/kg) ではそれぞれ 8.3,

Table 1. Results of *in vitro* chromosomal aberration test treated with *o*-dianisidine in CHL cells.

Chemicals	Dose (mg/ml)	Metabolic activation	Treat.-recov. ^a time (hr)	Metaphase observed	Structural chromosome aberrations (%)					Judge ^h		
					ctg ^b	ctb ^c	cte ^d	frg ^e	csb ^f			
<i>o</i> -dianisidine	-	-S9	24–0	200	0	1	0	0	0	1	—	
	0.05			200	0	1	0	0	0	1		
	0.1			200	1	1	0	0	0	2		
	0.2			200	0	5	9	0	0	14		
MMC	0.00005			200	2	19	44	0	2	0	54	+
	-	-S9	48–0	200	0	0	1	0	0	0	1	—
	0.025			200	0	0	0	0	0	1	1	—
	0.05			200	0	1	1	0	0	0	1	—
MMC	0.1			200	1	2	2	0	0	0	4	—
	0.00005			200	2	23	50	0	2	0	60	+
<i>o</i> -dianisidine	-	+S9	6–18	200	0	0	0	0	0	0	0	—
	0.25			200	1	1	1	0	0	2	—	
	0.5			200	1	2	6	0	1	0	8	**
	1.0			200	1	5	12	0	0	0	18	+
B(a)P	0.02			200	10	43	73	0	2	0	80	+

Significant dose-response relations were demonstrated by Cochran-Armitage's test (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

a, Treatment-recovery time

b, chromatid gap c, chromatid break d, chromatid exchange

e, fragmentation f, chromosome break g, chromosome exchange

h, —; negative (<5%) ±; suspicious positive (<10%) +; positive (>=10%)

Table 2. Results of *in vitro* sister chromatid exchange test treated with *o*-dianisidine in CHL cells.

Chemicals	Dose (mg/ml)	Metabolic activation	Metaphase observed	No. of chromosome per Metaphase	SCEs per Metaphase	SCEs per Chromosome
<i>o</i> -dianisidine	-	+S9	30	24.9 ± 1.0	6.9 ± 2.8	0.28 ± 0.11
	0.25		30	24.9 ± 0.8	10.1 ± 3.8	0.40 ± 0.15
	0.5		30	24.8 ± 1.0	13.0 ± 4.7	0.52 ± 0.19
	1.0		30	24.9 ± 0.6	18.8 ± 8.0	0.76 ± 0.33
B(a)P	0.02		30	24.8 ± 0.8	26.8 ± 10.3	1.08 ± 0.42

Each value represents mean ± S.D. of 30 metaphases observed

Significant dose-response relations were demonstrated by Cochran-Armitage's test (* : p<0.05, ** : p<0.01)

Table 3. Results of *in vivo* chromosomal aberration test administered orally with *o*-dianisidine in mouse bone marrow cells.

Chemicals	Dose (mg/kg)	Metaphase observed	Structural chromosome aberrations (%)						Judge ^g
			ctg ^a	ctb ^b	cte ^c	frg ^d	csb ^e	cse ^f	
olive oil	-	200	1	0	1	0	1	0	2
<i>o</i> -dianisidine	300	200	1	1	0	0	1	0	2
	600	200	0	2	1	0	1	0	4
MMC	1	200	2	5	6	1	1	0	11

Each value derived from 4 mice in each group, 50 cells in each mouse.

a, chromatid gap b, chromatid break c, chromatid exchange

d, fragmentation e, chromosome break f, chromosome exchange

g, -: negative(<5%) ±; suspicious positive(<10%) +: positive(>=10%)

Table 4. Results of *in vivo* sister chromatid exchange test administered orally with *o*-dianisidine in mouse bone marrow cells.

Chemicals	Dose (mg/kg)	Metaphase observed	No. of chromosome per Metaphase	SCEs per Metaphase	SCEs per Chromosome
<i>o</i> -dianisidine	-	80	39.3 ± 1.8	5.0 ± 3.0	0.13 ± 0.07
	150	80	39.6 ± 1.7	5.1 ± 3.2	0.13 ± 0.08
	300	80	39.4 ± 2.0	5.6 ± 3.8	0.14 ± 0.10
	600	80	39.5 ± 1.9	8.3 ± 4.2	0.21 ± 0.11
	MMC	80	38.9 ± 2.1	11.9 ± 5.9	0.31 ± 0.15

Each value represents mean ± S.D. and derived from 4 mice in each group, 20 cells in each mouse.

Significant dose-response relations were demonstrated by Cochran-Armitage's test (* : p<0.05, ** : p<0.01)

0.21と陰性対照群(5.0, 0.13)に比較し約1.7倍に増加し、これらの結果は有意差($p < 0.01$)が認められた(Table 4)。

考 察

今回我々は *o*-dianisidine の染色体レベルでの変

異原性について検討を行った。その結果、*in vitro* の実験では、ラット肝ミクロソーム非存在下および存在下で染色体異常誘発能およびSCE 誘発能がそれぞれ認められた。また、*in vivo* の試験では、マウス骨髄細胞で SCE の誘発頻度の有意な増加が認められた。

o-dianisidine の癌原性については *in vitro*⁴⁻¹⁰, *in vivo*^{11, 19, 20}において様々な実験がデザインされ多くの報告がなされており、動物を用いた発癌実験ではその発癌性は明らかにされている。しかしながら、ヒトにおいては可能性を指摘するにとどまっている。

in vitro 試験系の結果から、*o*-dianisidine が細胞内の染色体 DNA に対し、直接的にあるいは代謝酵素を介して作用し、染色体レベルの突然変異を誘発することが明らかとなった。また、*in vivo* 試験系の結果では LD₅₀ 値の約 40% の用量以下で染色体突然変異は誘発しなかったものの、SCE の有意な増加が認められた。SCE は染色体 DNA の複製時に DNA 鎖の切断・再結合による組み換え現象によって起こるもので、発癌の直接要因にはならないが既知の発癌物質や変異原物質の多くがこの SCE を高頻度に誘発することが知られており²¹、これらのことから *o*-dianisidine が生体に対しても発癌性を示す可能性が高いことが示唆された。

o-dianisidine をはじめとする芳香族アミンの代謝経路に関してはこれまでの研究^{19, 20, 22, 23}により動物種間で大きく変動することが知られており、発癌の標的臓器も異なることが明らかとなっている。マウスやラットのような肝臓中の acetyltransferase 活性の比較的高い種では、芳香族アミンは N-アセチル化体を経て反応性に富む硫酸抱合体を生成するため肝臓が標的臓器となる^{19, 20}。逆に、イヌなどの acetyltransferase 活性の低い種では生成される N-アセチル化体は低レベルであり肝臓が標的臓器とはならず、他の代謝系である prostaglandin H synthase 系で産生される酸素ラジカルにより修飾を受け反応性の高い中間体を生じ、DNA に作用する^{24, 25}。この prostaglandin H synthase 系の活性が高い臓器・器官として膀胱、Zymbal 腺、乳腺および骨髄がよく知られており²⁶、実際にイヌでは芳香族アミンの投与によって膀胱癌が発生することが確認されている。ヒトでの疫学調査ではすでに膀胱癌のリスク寄与の可能性が指摘されており、また薬物代謝においても肝臓中の acetyltransferase 活性が低いことから、ヒトでの発癌性もイヌと同様の機序であ

ると推察される。また *in vitro* 実験系において prostaglandin H synthase 系によって生成した *o*-dianisidine の代謝中間体が DNA に架橋することがすでに報告されている²⁷。DNA cross-linking activity は benzidine と比べ、そのジメトキシ化体である *o*-dianisidine の方が弱いことから、benzidine についての SCE 誘発能を比較検討することにより、SCE 誘発とこの DNA に対する cross-linking activity との相関性についての知見が得られると考えられる。

本実験ではマウス経口投与によって SCE の誘発頻度の増加が認められたが、どの代謝経路が関与しているかについては、prostaglandin H synthase 系の inhibitor である aspirin を同時投与することにより検討が可能と考えられる。また肝臓のような標的臓器となりやすい他臓器において誘発するかどうかについても今後さらに検討を要する。

参考文献

- International Agency for Research on Cancer (1974) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human.—Some aromatic amines, hydrazine and related substances, N-nitroso compounds and miscellaneous alkylating agents, WHO/IARC public., Lyon, pp. 41-47.
- Genin, V. A. (1974) Hygienic assessment of dianisidine-sulphate production from standpoint of carcinogenous hazard for works, Gig. Tr. prof. Zabol., 6, 18-22.
- Clayson, D. B. (1976) Occupational bladder cancer, Prev. Med., 5, 228-244.
- Fluck, E. R. et al. (1976) Evaluation of DNA polymerase-deficient mutant of *E. coli* for the rapid detection of carcinogens, Chem.-biol. Interact., 15, 219-231.
- Martin, C. N. et al. (1978) Testing of known carcinogens and noncarcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells, Cancer Res., 38, 2621-2627.
- Probst, G. S. et al. (1981) Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: A comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds, Environ. Mutagenesis, 3, 11-32.
- Anderson, D. and Styles, J. A. (1978) Appendix II. The bacterial mutation test, Br. J. Cancer, 37, 924-930.
- Takemura, N. and Shimizu, H. (1978) Mutagenicity

- of some aromatic amino- and nitro-compounds (Abstract no. 35), *Mutation Res.*, **54**, 256–257.
- 9) Garner, R. C. et al. (1975) Testing of some benzidine analogues for microsomal activation to bacterial mutagens, *Cancer Lett.*, **1**, 39–42.
 - 10) Styles, J. A. (1978) Appendix III. Mammalian cell transformation *in vitro*, *Br. J. Cancer*, **37**, 931–936.
 - 11) Ishidate, M., Jr. and Odashima, S. (1977) Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*—A screening for chemical carcinogens, *Mutation Res.*, **4**, 337–354.
 - 12) Perry, P. and Wolff, S. (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, **251**, 156–158.
 - 13) Lorké, D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing, *Archives of Toxicology*, **54**, 275–287.
 - 14) Allem, J. W. and Latt, S. A. (1976) Analysis of sister chromatid exchange formation *in vivo* in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens, *Nature*, **260**, 449–451.
 - 15) Matsumoto, K. and Takayama, S. (1983) Reciprocally differential silver staining of BrdU substituted chromosomes, *Chromosome Information Service*, **35**, 17.
 - 16) Kastenbaum, M. A. and Bowman, K. O. (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation Res.*, **9**, 527–549.
 - 17) Margolin, B. H. et al. (1986) Statistical analyses for *in vitro* cytogenetic assays using Chinese hamster ovary cells, *Environ. Mutagen.*, **8**, 183–204.
 - 18) Margolin, B. H. and Risko, K. J. (1988) The statistical analysis of *in vivo* genotoxicity data: Report of the International Program on Chemical Safety's collaborative study on *in vivo* assays, Cambridge University Press, Cambridge Vol. 1, pp. 129–204.
 - 19) Martin, C. N. et al. (1982) Covalent binding of benzidine and *N*-acetylbenzidine to DNA at the C-8 atom of deoxyguanosine *in vivo* and *in vitro*, *Cancer Res.*, **42**, 2678–2686.
 - 20) Morton, K. C. et al. (1979) Metabolism of benzidine to *N*-hydroxy-*N,N'*-diacetylbenzidine and subsequent nucleic acid binding and mutagenicity, *Cancer Res.*, **39**, 3107–3113.
 - 21) Carrano, A. V. et al. (1978) Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis, *Nature*, **271**, 551–553.
 - 22) Poirier, L. A. et al. (1963) The *N*- and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene and the failure to detect *N*-acetylation of 2-aminofluorene in the dog, *Cancer Res.*, **23**, 790–800.
 - 23) Kadlubar, F. F. et al. (1977) Hepatic microsomal *N*-glucuronidation and nucleic acid binding of *N*-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis, *Cancer Res.*, **37**, 805–814.
 - 24) Thomas, W. P. et al. (1988) Ram seminal vesicle microsome-catalyzed activation of benzidine and related compounds: dissociation of mutagenesis from peroxidase-catalyzed formation of DNA-reactive material, *Carcinogenesis*, **9**, 51–57.
 - 25) Wise, R. W. et al. (1984) Metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by dog bladder and kidney prostaglandin H synthase, *Cancer Res.*, **44**, 1893–1897.
 - 26) 傅田阿由美, 小西陽一 (1990) 発癌物質の臓器特異性, 薬局, **41**, 59–69.
 - 27) Fourney, R. M. et al. (1986) Peroxidase catalyzed aggregation of plasmid pBR322 DNA by benzidine metabolites *in vitro*, **7**, 1535–1542.

Environ. Mut. Res. Commun., **17**: 237–249 (1996)

O-アセチル転移酵素高産生株を用いた高感度 *umu* テストによる河川水の遺伝毒性モニタリング

Monitoring of genotoxicity of river water in high sensitive *umu* test system using *Salmonella typhimurium* NM2009 having high *O*-acetyltransferase activity

大江 武

Takeshi Ohe

京都女子大学家政学部
605 京都市東山区今熊野北日吉町35

Department of Food and Nutrition Science, Kyoto Women's University,
Kitahiyoshi-cho 35, Imakumano, Higashiyama-ku, Kyoto 605, Japan

(受付: 1995年11月11日; 受理: 1995年12月28日)

Summary

Genotoxicity of organic chemicals in river water was investigated using a highly sensitive *umu* test with an *O*-acetyltransferase-overproducing strain *Salmonella typhimurium* NM2009. River water was sampled by the XAD-2 resin column and blue rayon hanging methods. Locations downstream from wastewater treatment plants showed high SOS-inducing activity in both the absence and the presence of a metabolic activation system, suggesting the occurrence of direct-acting nitroarenes and indirect-acting aminoarenes. XAD-2 resin column extracts showed higher SOS induction than those from the blue rayon hanging method throughout a one year period. No clear seasonal change in genotoxicity was observed but a significant correlation between genotoxicity and COD was observed. The present results demonstrate that a high sensitive *umu* test using an *O*-acetyltransferase-overproducing strain is a useful bioassay system for the detection of trace amounts of nitroarenes and aminoarenes in the water environment.

Keywords: genotoxicity, *umu* test, *Salmonella typhimurium* NM2009, XAD-2 resin, blue rayon, COD

緒言

異臭味の発生、発癌性が指摘されている trichloromethane の浄水過程における生成、ドライクリーニングや先端技術産業での洗浄剤、脱脂剤等に用いられる trichloroethylene, tetrachloroethylene などの有機塩素系溶剤、環境汚染物質として知られている phthalate, polynuclea aromatic hydrocarbons (PAHs), ゴルフ場や田畠等で使用される各種の農薬の検出などで明らかのように、ヒト

が生きていく上で必須である飲料水には、種々の微量化学物質が混入しており、ヒトの健康を脅かす状況となっていることが懸念されている (Meier, 1988; IARC, 1991; Onodera, 1991)。また、湖沼やダム湖の富栄養化に伴って大発生する藻類が生産する強力な肝臓毒であり、発癌プロモーターである microcystin が水道水に混入することの可能性も危惧されている (原田ら, 1994)。わが国でも大都市域での水道水中の chloroform をはじめとする trichloromethane, 3-chloro-4-dichlo-

romethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) などの濃度が地方都市に比較し高いことが報告されている (Kinae et al., 1992). このような状況のなかで、水域環境における水質を保全する目的で、工場排水のみならず河川や湖沼等の水中変異原物質の存在がバイオアッセイによって評価され、水道水源水中に変異原物質の存在することが明らかにされてきた (Meier, 1988; Houk, 1992). これらの事実は、大都市域の水道水源となっている河川水で、BOD, COD 等の従来測定されている水質汚濁指標では明らかにされない汚濁が進行していることを物語っている。

阪神地域住民の水道水源である淀川水系河川水には、Ames テストにより、frameshift 型の直接および間接変異原物質の存在が従来より報告されている (Maruoka and Yamanaka, 1982; Maruoka et al., 1985; Sakamoto and Hayatsu, 1990; Sayato et al., 1990; 佐谷戸ら, 1991; 1992; Nakamuro et al., 1992). 淀川の源である琵琶湖を水道源としている京都市の水道水と比較して、淀川下流域の河川を水道源としている大阪府下の水道水は、Rec-assay やヒト細胞での DNA 切断能が明らかに高いとの報告もある (Matui et al., 1992; Matuda et al., 1995). このような状況に対して水道水源の安全性を確保する目的で、広範囲での河川水の変異原性／遺伝毒性モニタリングを継続して実施することが必要であると思われる。

ところで、Oda et al. により開発された *umu* テストは、*Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 菌株の SOS 反応誘導能を測定する方法で、1 つの菌株で frameshift 型および basechange 型の変異原物質に対応できる、histidine を含む試料にも対応できる、アッセイの所要時間が 5~7 時間で迅速なスクリーニングが可能である、培養時間が短く完全な無菌操作が必ずしも必要でないなどの Ames テストにはない利点を有する (Oda et al., 1985; Nakamura et al., 1987). *umu* テストの持つこれらの利点は、水道水源としての河川水の変異原性／遺伝毒性の評価に適した簡便なモニタリング法の一つであるといえる。さらに、Oda et al. は、O-アセチル転移酵素 (O-ATase) 遺伝子を導入した菌株を用いた高感度 *umu* テストを用いて

nitroarene および aromatic amine 類の高感度検出が可能であることを報告している (Oda et al., 1993, 1995). しかしながら、環境試料への適用例としては、し尿処理場および下水処理場での各種の段階における処理水に関する報告 (Ono et al., in press; 小野ら, 1995) があるのみで、水源となる河川水や水道水等に適用した報告はない。そこで、本研究では O-ATase 遺伝子を導入した菌株を用いた高感度 *umu* テストによる河川水中微量の nitroarene および aminoarene の存在を知る遺伝毒性モニタリング法としての有効性を明らかにする目的で、水道水源として利用されている淀川水系河川水の遺伝毒性を 1 年間にわたって検討した結果について報告する。

実験方法

1. 試薬類

トリプトン、酵母エキスは、Difco 社製を、ampicillin, anhydrous はナカライトスク社製、chloramphenicol, 2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) および β-mercaptopethanol は、和光純薬工業製を使用した。標準変異原物質には、1-nitropyrene, 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2), 2-aminoanthracene, 2-acetylaminofluorene (以上は和光純薬工業製), benzo[a]pyrene (ナカライトスク製), 4-nitroquinoline-N-oxide (Sigma Chemical Co. 製), 2-nitrofluorene (Aldrich chemical Co. 製) および 3-nitrofluoranthene (H. W. Sands Co. 製) を用いた。その他の試薬類は特級または生化学用を用いた。

2. 試料の採取

Fig. 1 に示す淀川水系河川水の 4 地点 (B, D, G, H) において、1994 年 3 月から 1995 年 2 月までの 1 年間、毎月 1 回 XAD-2 樹脂カラム吸着法 (XAD-2 法) およびブルーレーション懸垂法 (BR 法) による試料の採取を行った。なお、B 地点は下水処理場の上流に位置し、D, G および H 地点はいずれも放流水が流入している下流に位置している。また、I, J, K および L の 4 地点では、1994 年 4 月および 9 月に BR 法による試料の採取を行った。

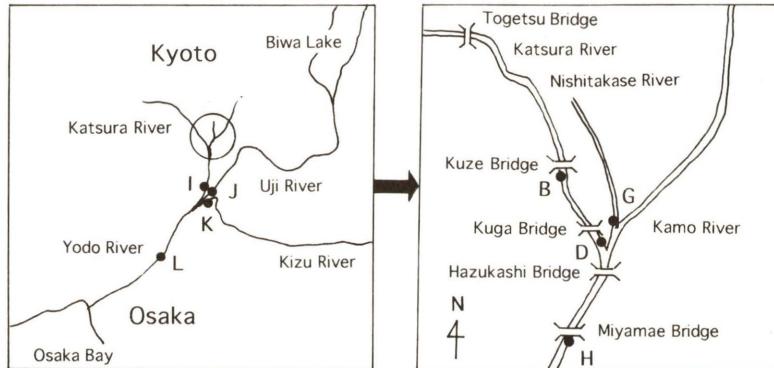


Fig. 1. Map of sampling locations.

3. 河川水中変異原物質の回収および抽出法

1) XAD-2 法；河川水 40L を HCl で pH 3 に調整した後、Junk et al. (1972) の方法に従って、前もって methanol, acetonitrile および diethyl ether で洗浄した XAD-2 樹脂 (オルガノ製, 15 × 150 mm) に通水した。ついで、diethyl ether 300 mL により吸着された化学物質を溶出し、sodium sulfate, anhydrous を加えて脱水した。ロータリーエバポレーターを用いて水浴上 40°C 以下で減圧濃縮して、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解、被験物質溶液として、冷蔵保存した。

2) BR 法；Sakamoto and Hayatsu (1990) の方法に準拠して行った。ブルーレーション (BR, ナカラコシ薬品製) 5 g をナイロン製ネットに入れ、錐を付けて採取地点に懸垂した。Fig. 1 に示した B, D, G および H 地点では、XAD-2 法での河川水採水時に懸垂を始めた。24 時間懸垂後、ネットを河川から引き上げ BR を取り出し、蒸留水で洗浄後、水気を十分に除去した。吸着された化学物質は、methanol : conc. ammonia (50 : 1) 混液 200 mL づつで 3 回振とう抽出を行った。この抽出液はロータリーエバポレーターを用いて水浴上 40°C 以下で減圧濃縮して、DMSO に溶解し、被験物質溶液として、冷蔵保存した。

4. 試験菌株

O-ATase 高産生株である *Salmonella typhimurium* NM2009 および O-ATase 欠損株である NM 2000 を用いた。これらの菌株は小田義光博士 (大

阪府立公衆衛生研究所) より供与された。

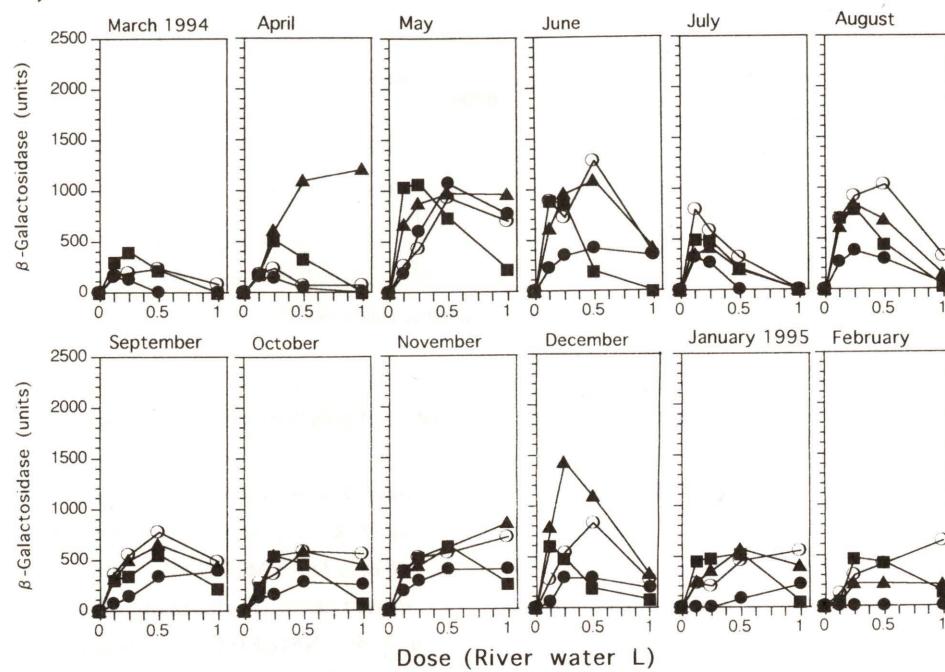
5. *umu* テスト

umu テストは、Oda et al. (1985; 1993) の方法に従って行った。NM2009 株は、ampicillin (終濃度 25 μg/ml) および chloramphenicol (終濃度 10 μg/ml) を、NM2000 株は、ampicillin (終濃度 25 μg/ml) を含む LB 培地で 37°C で一夜培養後、TGA 培地に 1/25 量植菌し、37°C でさらに振とう培養した。菌株が対数増殖期 (OD₆₀₀ が 0.25~0.3) に達したとき一定量の試験菌液 1.96 mL を試験管に取り、被験物質 40 μL および 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 0.4 mL を加える。S9 mix 存在下では、0.1 M phosphate buffer の代わりに 0.4 mL の S9 mix を加える。37°C でさらに 120 分振とう培養した後、菌液の一部で菌体内に產生された β-galactosidase 活性を測定し、残りの菌液の濁度 (OD₆₀₀) を測定する。β-galactosidase 活性は、Miller (1972) の方法に従って求めた。また、S9 は、phenobarbital および 5,6-benzoflavone により酵素誘導した後、調整したもの (オリエンタル酵母社製) を使用し、S9 量は S9 mix 1 mL 当たり 100 μL とした。試験はすべて 2 連で行いその平均値を測定値とした。また、試験の β-galactosidase 活性値とコントロールの β-galactosidase 活性値の差を正味の SOS 反応誘導能とした。

6. pH および化学的酸素要求量 (COD)

pH および COD の測定は衛生試験法・注解

1) - S9 mix



2) + S9 mix

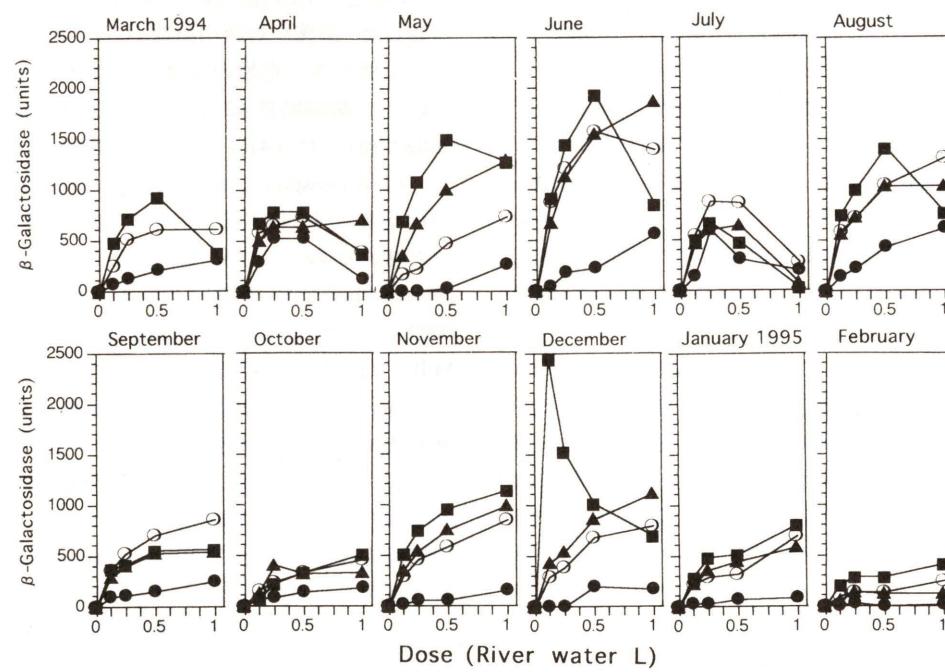


Fig. 2.

1990 の水質試験法の項に準拠して行った。

結 果

1. XAD-2 法による SOS 反応誘導能の用量-反応関係

Fig. 1 に示した淀川水系河川の 4 地点 (B, D, G および H) において、1994 年 3 月から 1995 年 2 月までの 1 年間、毎月 1 回 XAD-2 法により得た試料の S9 mix 存在下および非存在下における *umu* テストの用量-反応関係の結果を Fig. 2 に示す。誘導された β -galactosidase 値は、河川水量として、0~1L の濃度範囲で示した。Fig. 2 からも明らかなように、河川水量 1L の濃度では、多くの試料で β -galactosidase 値が、S9 mix の有無に関わらず低下する傾向が認められた。明らかな用量-反応関係が認められ、しかもコントロール値の 2 倍以上の β -galactosidase 値を示した場合を SOS 反応誘導能陽性とした。S9 mix 非存在下で陽性を示したのは、B 地点では 5, 6, 8, 9, 11 月、D 地点では 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1, 2 月、G 地点では 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1, 2 月、H 地点では 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1 月 (3 月は実施せず) で、陽性率は、それぞれ 42, 83, 100 および 91% であった。一方、S9 mix 存在下で陽性を示したのは、B 地点では 4, 6, 7, 8 月、D 地点で 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1 月、G 地点では 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1, 2 月、H 地点では 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1 月 (3 月は実施せず) で、陽性率はそれぞれ 33, 92, 100 および 91% であった。陽性率から判断すると、S9 mix の有無に関わらず、B 地点に

比べて、下水処理場放流水の流入している D, G, H 地点では明らかに高い傾向であることが認められた。特に、G 地点では測定した全ての月で陽性と判断され、また 12 月の S9 mix 存在下での β -galactosidase 値が河川水 125 ml で約 2500 units と著しく高い値を示した。

2. BR 法による SOS 反応誘導能の用量-反応関係

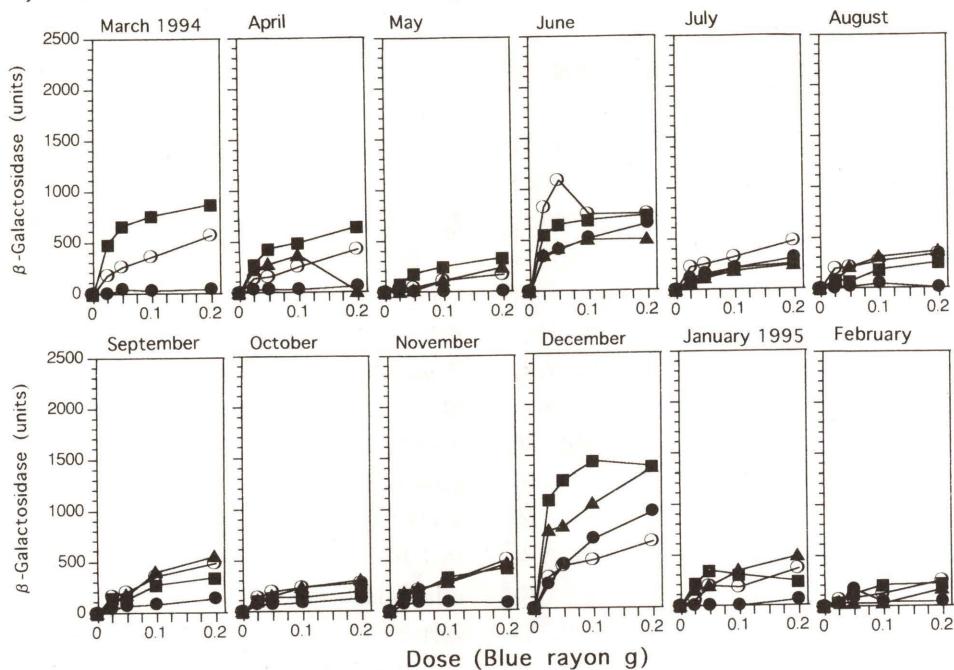
Fig. 3 は、XAD-2 法と同時に実施した BR 法で得た試料の S9 mix 非存在下および存在下における *umu* テストの用量-反応関係の結果を示す。誘導された β -galactosidase 値は、BR 相当量として 0~0.2g の範囲で示した。これ以上の濃度では β -galactosidase 値は低下する傾向が認められた。XAD-2 法と同様に、明らかな用量-反応関係が認められ、しかもコントロール値の 2 倍以上の β -galactosidase 値を示した場合を SOS 反応誘導能陽性とした。その結果、S9 mix 非存在下で陽性を示したのは B 地点では 6, 12 月 (陽性率 17%)、D 地点では 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 1 月 (陽性率 75%)、G 地点では 3, 4, 6, 9, 11, 12, 1 月 (陽性率 58%)、H 地点では 4, 6, 8, 9, 11, 12, 1 月 (3 月は実施せず、陽性率 64%) であった。一方、S9 mix 存在下で陽性を示したのは、B 地点では 6 月 (陽性率 8%)、D 地点では 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1, 2 月 (陽性率 100%)、G 地点では 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 2 月 (陽性率 92%)、H 地点では 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 1 月 (3 月は実施せず、陽性率 91%) であった。陽性率から判断すると、XAD-2

Fig. 2. Dose-response effects of SOS-inducing activity by XAD-2-ether extracts in NM2009.

Assays were performed as described in Methods, with two duplicate determinations per point. The value of β -galactosidase activity in chemical free-controls ($n=12$) in two strains was as follows: 62 ± 7 (NM2000, -S9 mix), 337 ± 20 (NM2009, -S9 mix), 66 ± 6 (NM2000, +S9 mix) and 319 ± 17 (NM2009, +S9 mix), and their values were subtracted from that in each sample. The values of positive standards without S9 mix ($n=12$) were: 1-nitropyrene ($0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$); 8 ± 4 for NM2000, 851 ± 35 for NM2009; 4-NQO ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$); 700 ± 48 for NM2000, 1184 ± 58 for NM2009; AF-2 ($0.03 \mu\text{g}/\text{ml}$); 736 ± 50 for NM2000, 1184 ± 58 for NM2009; 2-nitrofluorene ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$); 2 ± 1 for NM2000, 901 ± 45 for NM2009; 3-nitrofluoranthene ($0.003 \mu\text{g}/\text{ml}$); 11 ± 6 for NM2000, 931 ± 38 for NM2009. Those of positive standards with S9 mix were: benz[a]pyrene ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$); 86 ± 7 for NM2000, 528 ± 21 for NM2009; 2-aminoanthracene ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$); 41 ± 8 for NM2000, 864 ± 134 for NM2009; 2-acetylaminofluorene ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$); 17 ± 4 for NM2000, 1226 ± 50 for NM2009.

—●—, Location B; —○—, Location D; —■—, Location G; —▲—, Location H.

1) - S9 mix



2) + S9 mix

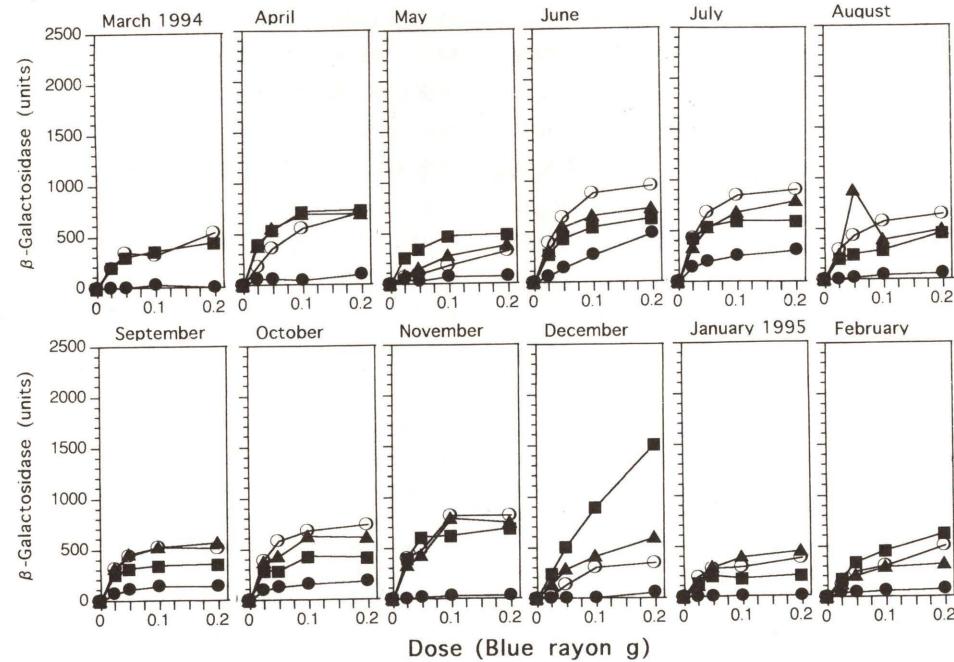


Fig. 3. Dose-response effects of SOS-inducing activity by blue rayon extracts in NM2009.

—●—, Location B; —○—, Location D; —■—, Location G; —▲—, Location H.

法と同様に S9 mix の有無に関わらず、B 地点に比べて、D, G, H 地点で高い傾向を示すことが認められたが、B 地点での陽性率は XAD-2 法に比べて低かった。D, G, H 地点の S9 mix 非存在下での陽性率も XAD-2 法に比べて低い傾向を示した。しかし、S9 mix 存在下での陽性率には、差は認められなかった。Fig. 2 および 3 の用量-反応関係からも明らかなように BR 法で得た試料の SOS

反応誘導能は、XAD-2 法で得た試料に比べて年間を通じて低い傾向にあることが観察された。

3. SOS 反応誘導能の月別変動

Fig. 2 および 3 の用量-反応関係が直線性を示す部分での最小二乗法により求めた直線回帰式から一定濃度における β -galactosidase 値の月別変動を算出し、Table 1 および 2 に示した。XAD-2 法

Table 1. Monthly changes of SOS-inducing activity of XAD-2-diethyl ether extracts (corresponding to 500 ml of river water) in NM2009 and NM2000.

Location	B		D		G		H	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
March 1994	— (—)	— (—)	— (—)	702 (57)	867 (113)	1064 (105)	nd	nd
April	— (—)	639 (105)	— (—)	857 (178)	1032 (—)	975 (181)	1157 (—)	781 (58)
May	1121 (—)	— (—)	934 (—)	421 (132)	2372 (—)	1672 (—)	1143 (—)	1088 (—)
June	467 (—)	277 (—)	1384 (—)	1792 (—)	1939 (40)	2163 (—)	1278 (—)	1718 (—)
July	— (—)	1172 (168)	1370 (—)	1027 (143)	1062 (113)	1429 (138)	901 (113)	1261 (—)
August	794 (116)	260 (74)	1970 (—)	885 (64)	1748 (—)	1571 (72)	1809 (—)	1136 (—)
September	323 (—)	— (—)	868 (—)	789 (50)	750 (—)	641 (—)	740 (—)	584 (—)
October	— (—)	— (—)	628 (—)	304 (—)	1090 (—)	299 (—)	684 (—)	803 (—)
November	573 (—)	— (—)	1102 (—)	544 (—)	714 (—)	1079 (—)	666 (—)	842 (—)
December	— (—)	— (—)	902 (—)	721 (—)	1119 (136)	10171 (56)	2978 (64)	938 (—)
January 1995	— (—)	— (—)	482 (—)	386 (—)	1069 (56)	1014 (62)	619 (—)	507 (—)
February	— (—)	— (—)	612 (—)	— (—)	918 (61)	282 (137)	— (—)	— (—)

Parentheses show activities in NM2000.

nd; not done.

—; negative response.

Table 2. Monthly changes of SOS-inducing activity of blue rayon extracts (0.1 g blue rayon equivalent) in NM2009 and NM2000.

Location	B		D		G		H	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
March 1994	— (—)	— (—)	405 (—)	394 (52)	894 (—)	417 (—)	nd	nd
April	— (—)	— (—)	271 (—)	602 (—)	572 (—)	813 (—)	406 (—)	796 (—)
May	— (—)	— (—)	— (—)	173 (—)	— (—)	526 (—)	— (—)	288 (—)
June	590 (—)	276 (—)	2347 (—)	982 (—)	837 (—)	617 (—)	573 (—)	751 (135)
July	— (—)	— (—)	359 (—)	967 (55)	— (—)	701 (—)	— (—)	770 (—)
August	— (—)	— (—)	298 (—)	641 (—)	— (—)	340 (56)	329 (—)	1744 (—)
September	— (—)	— (—)	381 (—)	607 (66)	284 (—)	405 (82)	399 (—)	610 (—)
October	— (—)	— (—)	— (—)	783 (—)	— (—)	471 (102)	— (—)	685 (101)
November	— (—)	— (—)	315 (—)	881 (—)	348 (—)	748 (—)	320 (—)	840 (—)
December	731 (—)	— (—)	547 (—)	308 (—)	1706 (—)	952 (—)	1175 (—)	458 (—)
January 1995	— (—)	— (—)	219 (—)	348 (—)	377 (—)	— (—)	366 (—)	428 (—)
February	— (—)	— (—)	— (—)	339 (160)	— (—)	518 (224)	— (—)	— (—)

Parentheses show activities in NM2000.

nd; not done.

—; negative response.

では河川水量 500 ml, BR 法ではブルーレーヨン 0.1 g 相当量が誘導する β -galactosidase 値で表している。また、O-ATase 欠損株である NM2000 株についても、NM2009 株と同様に用量-反応関係より、同量での β -galactosidase 値を算出して()内に示している。Table 1 および 2 からも明らかなように、XAD-2 法および BR 法で得た試料はともに S9 mix の有無にかかわらず、O-ATase 欠損株での値は低く、NM2009 株で誘導される β -galactosidase 値の大部分は O-ATase の関与によって活性を増大させることが認められた。また、用量-反応関係からも明らかであったように、XAD-2 法および BR 法とともに、S9 mix の有無にかかわらず B 地点に比べて D, G および H 地点は年間を通じて高い傾向にあることが認められた。全試料のうち XAD-2 法では G 地点 12 月の河川水 500 ml が S9 mix 存在下 10,171 units, BR 法では D 地点 6 月の BR 0.1 g が S9 mix 非存在下 2,347 units の β -galactosidase 活性最高値を示した。これらの値はコントロール値に対してそれぞれ約 32 倍と 7 倍であった。

4. 淀川支流の変異原性比較

Fig. 1 に示す淀川の 3 大支流である桂川(I), 宇治川(J), 木津川(K) および合流後の淀川(L)において、4 月および 9 月に BR 法で試料の採取を行った。これらの試料の濃度-反応関係で、直線性を示す部分での最小二乗法により求めた直線回帰式から算出した BR 0.1 g 当たりの β -galactosidase 値の比較を Fig. 4 に示した。この結果からも明らかなように桂川の活性値は、淀川に比べて S9 mix 非存在下で 1~1.2 倍、S9 mix 存在下で 1.4~1.5 倍と高く、次いで宇治川の高いことが観察された。また、対照地点として大堰川(京都府京北町)および天竜川(静岡県浜北市)で同様に実施した試料では、SOS 反応誘導能はみられなかった。

5. pH および COD の月別変動

試料採取地点で測定した pH および COD の月別変動の結果を Fig. 5 に示す。G, D および H 地点での pH は、6.5~7.9 の範囲にあったが、B 地点での夏期に 8.5~8.8 とアルカリ性を示す傾向

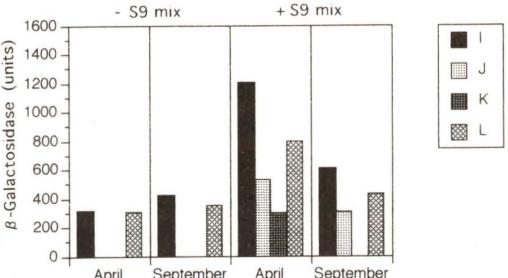


Fig. 4. SOS-inducing activity by blue rayon extracts (BR 0.1 g equivalent) at tributaries of the Yodo River.

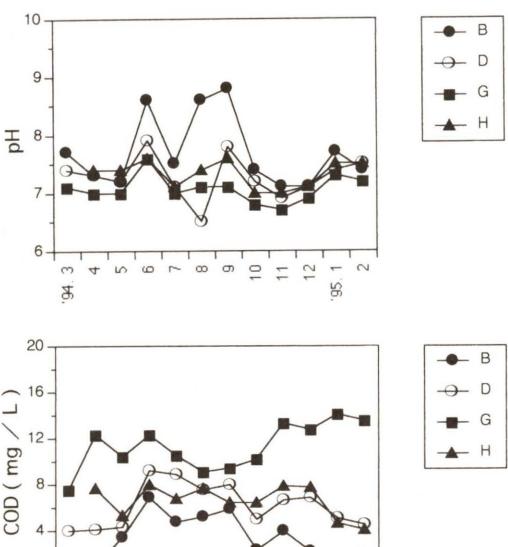


Fig. 5. Monthly changes of pH and COD.

が見られた。月別変動からみた B 地点での COD は、1~6.8 の範囲で常に最も低く、G 地点では 7.5~13.5 の範囲で常に最も高く、D および H 地点はそれらの間にあった。

6. SOS 反応誘導能活性と COD との相間性

モニタリングを実施した B, D, G および H 地点の試料を一括して SOS 反応誘導能と COD との相関性を観察し Fig. 6 に示した。SOS 反応誘導能は、コントロール値 (-S9 mix; 337, +S9 mix; 319) に対するそれぞれの試料の β -galactosidase 値の比で示している。XAD-2 法での SOS 反応誘

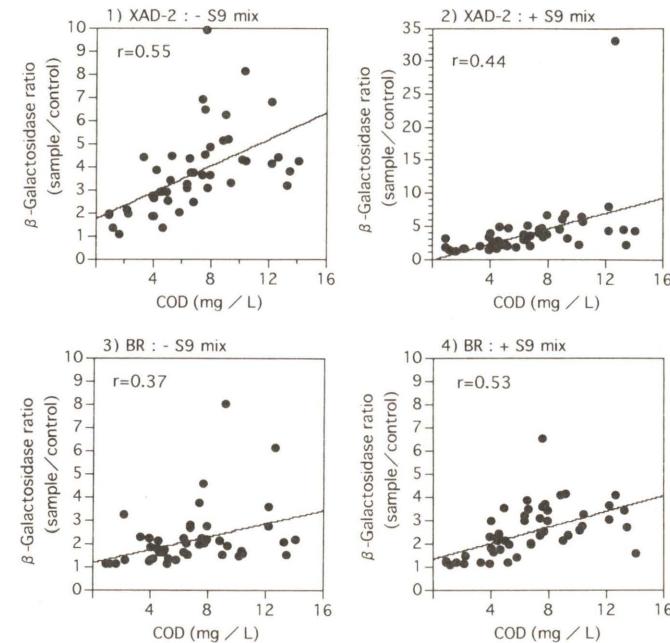


Fig. 6. Correlation between SOS-inducing activity and COD.

導能と COD との相関係数は、S9 mix 非存在下で $r=0.55$, S9 mix 存在下で $r=0.44$ であった。また、BR 懸垂法では、S9 mix 非存在下で $r=0.37$, S9 mix 存在下では $r=0.53$ であった (いずれも $n=47$)。これらはいずれも 1% 有意水準で相関性のあることが認められた。

考 察

河川水中変異原物質の存在は、淀川水系河川水のみならず、信濃川、相模川、紀ノ川、荒川、Rhine river, Meuse river, Cai river, Chao Phraya river など多くの報告があるが、淀川水系河川水に存在する frameshift 型の直接および間接変異原物質により誘発される変異原活性は、きわめて高い状況にあることが Ames テストで得られた結果から知られている (Van Kreijl *et al.*, 1980; Maruoka and Yamanaka, 1982; Maruoka *et al.*, 1985; 内海ら 1990; Sakamoto and Hayatsu, 1990; 佐谷戸ら, 1991, 1992; Hashizume *et al.*, 1992; Nakamuro *et al.*, 1992; 田中ら, 1993; Vargas *et al.*, 1993; Kusamran *et al.*, 1994)。大都市域での水道水の変異原活性が高いこと (中室・佐谷戸, 1993; 浦野ら, 1995), trihalomethane, MX 濃度の高いこと (Kinnae *et al.*, 1992) の理由として水道水源の汚染が進んでいることに原因があると思われ、大都市域での水道水源の悪化を防止する施策が必要となってきた。このためには、簡便なバイオアッセイ法の確立が望まれることから、本実験では河川水の遺伝毒性モニタリング法の一つとして高感度 umu テストの有効性の検討を行った。その結果、多くの Ames テスト (Maruoka and Yamanaka, 1985; Maruoka *et al.*, 1985; Sakamoto and Hayatsu, 1990; 佐谷戸ら, 1991, 1992; Nakamuro *et al.*, 1992) や CHL 細胞を用いた SCE での結果 (Ohe *et al.*, 1993) から既に知られているように下水処理場放流水の関与の有無により、SOS 反応誘導能にも明らかな差があることが認められた。また、Fig. 5 で明らかにされたように、淀川に対する遺伝毒性の寄与率は、淀川の三支流のうち桂川が S9 mix の存在下および非存在下ともに高いことも、TA98 株を用いた Ames テストの結果 (佐谷戸ら, 1992) と一致することが観察された。これらの結果から、O-ATase 高産生株を用いる umu テストは、河川水中の変異原性/遺

伝毒性を有する物質の存在の有無を知ることが可能であり、モニタリング法として有効であるといえる。

佐谷戸ら(1991)は、淀川水系河川水および下水処理場放流水のXAD-2樹脂カラム法およびBR法によって得た試料が、S9 mix非存在下で、TA98株を親株とするnitroreductase欠損株(TA98NR), O-ATase欠損株(TA98/1,8-DNP₆)では活性が認められず、nitroreductase高産生株(YG1021)およびO-ATase高産生株(YG1024)では著しく上昇することからnitroareneの含有が示唆されること、またS9 mix存在下において、O-ATase高産生株(YG1024)で高い活性を示すことからaminoareneを含有する可能性を示している。

今回の実験では、O-ATase高産生株とO-ATase欠損株を用いたumuテストの結果から、nitroarene及びaminoareneが淀川水系河川水中に存在することが示唆された。これらの事実は、淀川水系河川水試料において、Amesテストでの結果とumuテストでの結果が一致することを示しており、nitroarene及びaminoareneの存在がより強く示唆されたと言える。しかしながら、佐谷戸ら(1991)の報告ではS9 mix存在下での活性が非存在下に比べて、淀川で7倍、下水処理場放流水では約15倍高い。今回行ったumuテストの結果では、S9 mix存在下で著しく活性が高くなる傾向は、XAD-2法でのG地点の12月においてのみ見られたにすぎず、umuテストでは、S9 mix添加によって著しく活性が上昇する傾向は特に観察されなかった。このAmesテストとumuテストの違いは、採取試料の違いによるのか、あるいは変異原性/遺伝毒性を示す物質に対する感受性の違いであるのかは、今後検討を要する。

きわどって高い変異原活性を有するにもかかわらず淀川水系河川水中に存在する間接変異原物質としてはchrysene, benzo[a]anthracene, benzo[b]fluorantheneなどのPAHsの報告があるのみである(Sayato et al., 1993)。化石燃料の燃焼過程で生成するPAHsは、工場排水や都市下水道の種々の排水からも検出されている。山内ら(1989)は、神崎川(大阪府)、加古川(兵庫県)からのブルークリットン抽出物中のPAHs量の検出結果を報告

している。しかしながら、測定を行ったPAHs量では、抽出物のTA98での陽性の変異原活性の発現は見られず、抽出物の変異原性は、PAHsの代謝物或いはその誘導体に起因することを示唆している。

勢川ら(1993)は、人排泄物に存在が認められているheterocyclic amine(HCA)の一つであるTrp-P-2が都市下水中に存在することを認めている。一方、Ono et al.(1992, 1995)、小野ら(1992, 1995)は、都市下水処理水中には、生物処理により低減しているものの難分解性有機物による遺伝毒性がなお残存していることを、TA1535/pSK1002およびNM2009株を用いたumuテストで明らかにし、遺伝毒性を示す物質としてHCAの関与を報告している。これらのこととは、高度処理の行われていない下水処理場、し尿処理場で完全に分解しきれなかったHCAが河川水等に混入していく可能性を示唆してはいるものの、河川水中におけるHCAの存在を認めた報告はない。O-ATase高産生株を用いたAmesテストおよびumuテストで淀川水系河川水中にaminoareneの存在が強く示唆されたことから、変異原活性への寄与が認められるか、検討する必要がある。一方、直接変異原物質としては、Ohe and Nukaya(in press)は、淀川水系河川水中に1-nitropyreneの存在を確認しているものの、変異原活性に占める割合は、1%に過ぎない。今回、著者は河川水からの化学物質の回収方法として、XAD-2樹脂法およびBR法を用いた。Fig.3および4での用量-反応関係からも明らかなように、両者の比較からXAD-2法で得た試料のSOS反応誘導能が、BR法に比べて高い傾向を示している。BRは、芳香環を3つ以上縮合した化合物を選択的に効率よく吸着するのに対して、XAD-2樹脂は、幅広く吸着することからXAD-2法でのSOS反応誘導能を示す物質としては、aminoarene, nitroarene類のうち、2環以下の物質の関与が大きいことが推察される。いずれにせよ現段階では明らかにされていない変異原性/遺伝毒性を示す物質の本体の解明が望まれる。

年間を通じての測定結果から、季節変動が認められるかどうかを明らかにすることも環境中にお

ける遺伝毒性物質の動態を知る上で必要である。

Table 1および2に示した年間の結果を季節別(春季3~5月;夏季6~8月;秋季9~11月;冬季12~2月)の平均値でみたが、XAD-2法およびBR法とともに明瞭な季節変動は、認められなかつた。化学物質の分解の起こりやすい夏季の試料で比較的高い傾向を示しているのは、1994年のわが国の異常渇水により、河川水量が著しく少なくなったことにより、結果的に化学物質の濃縮がみられたのであろう。今回の結果から、試料間における遺伝毒性物質の質、量の変動の大きさがうかがわれたことから季節変動を明らかにするには、さらに試料採取頻度を多くした観察が必要であろう。

内海ら(1990)およびSakamoto and Hayatsu(1990)は、突然変異原活性と従来測定されている水質汚濁指標との間には全く相関性が認められないと報告している。一方、田中ら(1993)は、信濃川河川水のTA100によるS9 mix非存在下における変異原性は、COD(Mn), アンモニア性窒素, 全リン, BODとの相関性が高いことを認めている。今回相関性が認められたのは、定点地点での観察結果によることが考えられるが、この様に相反する結果が認められることは、従来の水質汚濁指標では、変異原性/遺伝毒性物質の存在が見過ごされる危険性を示唆するものであり、今後水質汚濁の総合指標の一つとして生物評価法を取り入れていくことは必要であろう。

米国EPA(環境保護庁)の報告によると水道源水中から400種類以上の化学物質が同定され、そのうち235種類の化学物質が水道水中に検出されている。一方、塩素消毒によって変異原性、発癌性などを有する副生成物の生成、またその変異原性強度は水質に依存することも周知の事実である(中室・佐谷戸, 1993)。化学物質に対する安全性の評価方法の国際的なコンセンサスが得られてきた状況を踏まえてわが国の新水質基準が平成5年12月より施行されている(安藤, 1994)。わが国の水道の普及率、安全性は世界有数のレベルにある一方、阪神間住民の重要な水道水源となっている淀川水系の変異原性/遺伝毒性は、きわどっていることも事実である。水道水源としての水質の安

全性とともに、環境水域へ放出された化学物質による生態毒性評価の重要性が、わが国でも注目されてきつつある(斎藤ら, 1995)。河川水中に存在する化学物質による生態毒性評価の方法の一つとして遺伝毒性試験法の確立も重要である。今回実施した遺伝毒性試験法の一つである高感度umuテストは、貴重な飲料水源の汚染を守るために広範囲にわたる河川水中微量nitroarene或いはaminoareneの存在を明らかにする変異原性/遺伝毒性モニタリング法として、有用な方法であると思われる。

謝 辞

本研究は、文部省科学研究費一般研究(c)06680523および厚生省がん研究助成金の援助によって行った。Salmonella typhimurium NM2000およびNM2009は小田義光博士(大阪府立公衆衛生研究所)から供与していただきました。又、本稿の実験結果は研究室の清水佳子氏および平野栄子氏の協力により得られたものです。深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 安藤正典(1994)新しい水道水質基準の考え方と検査方法、衛生化学、40, 317-327。
衛生試験法・注解1990、日本薬学会編、金原出版。
原田健一、辻清美、近藤文雄(1994)アオコが生産する有毒ペプチドの化学と分析法、水環境学会誌、17, 545-550。
Hashizume, T., K. Ueda, S. Tokutsu, I. Hanawa and N. Kinae(1992) Monitoring of mutagens in river and marine sediments by Salmonella/microsome assay combined with blue cotton method, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 49, 497-503.
Houk, V. S. (1992) The genotoxicity of industrial wastes and effluents, Mutat. Res., 277, 91-138.
IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (1991) Vol.52. 45-359, IARC, Lyon.
Junk, G. A., J. J. Richard, M. D. Grieser, D. Witak, J. L. Witak, M. D. Arguello, R. Vick, H. J. Svec, J. S. Frits and G. V. Calder(1974) Use of macroreticular resins in the analysis of water trace organic contaminants, J. Chromatogr., 99, 745-762.
Kinae, N., C. Sugiyama, M. Y. Nasuda, K. Goto, K. Tokumoto, M. Furugori and K. Shimo(1992) Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water, Wat. Sci. Tech., 25, 333-340.
Kusamran, W., K. Wakabayashi, A. Oguri, A. Tepsuwan,

- M. Nagao and T. Sugimura (1994) Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters, *Mutat. Res.*, **325**, 99–104.
- Maruoka, S. and S. Yamanaka (1982) Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* tester strains of XAD-2-ether extract, recovered from Katsura River water in Kyoto City, and its fraction, *Mutat. Res.*, **102**, 13–26.
- Maruoka, S., S. Yamanaka and Y. Yamamoto (1985) Mutagenic activity in organic concentrate from Nishitakase River water in Kyoto city, and its fractions separated by using liquid-liquid fractionation and thin layer chromatography, *Water Res.*, **19**, 249–256.
- Matsuda, T., T. Yagi, H. Takebe and S. Matsui (1995) Detection and quantification of DNA strand breaks in human cells induced by contaminants in Japanese tap water, 2nd IAWQ specialized conference on hazard assessment and control of environmental contaminants in water, 129–130.
- Matsui, S., N. Sembra, T. Matsuda and H. Yamada (1992) A new index Rec-volume for the evaluation of DNA toxic pollution in the water environment, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 301–308.
- Meier, J. R. (1988) Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water, *Mutat. Res.*, **196**, 211–245.
- Miller, J. H. (1972) "Experiments in molecular genetics." Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 352–355.
- Nakamura S., Y. Oda, T. Shimada, I. Oki and K. Sugimoto (1987) SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK 1002: examination with 151 chemicals, *Mutat. Res.*, **192**, 239–246.
- Nakamuro, K., H. Ueno and Y. Sayato (1992) Evaluation of mutagenicity of municipal river water concentrated using XAD resin column method, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 293–299.
- 中室克彦, 佐谷戸安好 (1993) 済水処理における変異原物質の毒性評価, 水環境学会誌, **16**, 19–853.
- 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 pro-mutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 possessing high *O*-acetyltransferase activity, *Mutat. Res.*, **334**, 145–156.
- Ohe, T., H. Ito and M. Kawabuti (1993) Genotoxicity of blue rayon extracts from river waters using sister chromatid exchange in cultured mammalian cells, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**, 293–297.
- Ohe, T. and H. Nukaya (in press) Genotoxic activity of 1-nitropyrene in Yodo River, Japan, *Sci. Tot. Environ.*
- 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, **30**, 92–99.
- Ono, Y., I. Somiya and T. Kawaguchi (in press) Genotoxicity of substances in the nightsoil and its biologically treated water, *Water Res.*
- 小野芳朗, 毛利紫乃, 宗宮 功, 小田義光 (1995) ヒト尿の生物処理水中に存在する Trp-P-2 の同定と評価, 環境変異原研究, **17**, 179–186.
- Onodera, S. (1991) Characterization and determination of organic compounds in the mutagenic XAD-2 extracts of drinking water, *J. Chromatogr.*, **557**, 413–427.
- 斎藤穂高, 岩見史郎, 茂岡忠義 (1995) 化学物質の生態毒性予測評価法, 衛生化学, **41**, 194–205.
- Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring genotoxicity of river water. Mutagens in Yodo River system, Kyoto-Osaka, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 521–528.
- Sayato, Y., K. Nakamuro, H. Ueno and R. Goto (1990) Mutagenicity of adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water, *Mutat. Res.*, **242**, 313–317.
- 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野 仁, 丈達泰史, 後藤里花, 長谷川達也, 早津彦哉, 坂本 博 (1991) 水中変異原物質のブルーレーション及びXAD-2樹脂による前処理濃縮法の比較的検討及び濃縮物の変異原特性, 衛生化学, **37**, 197–204.
- 佐谷戸安好, 中室克彦, 上野 仁 (1992) 都市河川水とその塩素およびオゾン処理水の変異原性に関する研究, 変異原性試験, **1**, 18–27.
- Sayato, Y., K. Nakamuro, H. Ueno and R. Goto (1993) Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in mutagenic adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water, *Mutat. Res.*, **300**, 207–213.
- 勢川利治, 上野 仁, 中室克彦, 佐谷戸安好 (1993) Trp-P-2 の活性汚泥処理における挙動に関する研究, 衛生化学, **39**, 132–138.
- 田中一浩, 守田康彦, 高橋敬雄 (1993) 新潟県内の水道水・河川水の変異原性について, 水環境学会誌, **16**, 657–665.
- 内海英雄, 濱田 昭, 早津彦哉, 橋本徳藏, 相沢 靖 (1990) 河川水中変異原活性の季節・流域変動—青緑法による検討および従来の水質汚濁指標との比較—, 水質汚濁研究, **13**, 227–234.
- 浦野紘平他 (1995) 水道水の Ames 変異原性に関する研究 第3報 日本の水道水の変異原性レベルの解析, 水環境学会誌, **18**, 1001–1011.
- Van Kreijl C. F., H. J. Kool, De Vries M., Van Kranen H. J. and De Greef (1980) Mutagenic activity in the rivers Rhine and Meuse in the Netherlands, *Sci. Tot. Environ.*, **15**, 137–147.
- Vargas, V. M. F., V. E. P. Motta and J. A. P. Henriques (1993) Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries, *Mutat. Res.*, **319**, 31–45.
- 山内あい子, 松本典文, 中川博之, 大塚孝子, 山崎裕康, 垣内靖男 (1989) ブルーコットン吸着法による河川水中の多環芳香族炭化水素の分析, *35*, 283–290.

肝がん原物質のマウス肝細胞を用いる *in vivo* 小核試験

An *in vivo* mouse liver micronucleus test of the hepatocarcinogens
using mouse hepatocytes

鈴木 洋, 平野紀子, 大島 隆, 樽本保男

Hiroshi Suzuki, Noriko Hirano, Takashi Ohshima and Yasuo Tarumoto

大正製薬株式会社 開発研究所
330 埼玉県大宮市吉野町 1-403

Pharmaceutical Research Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.,
1-403 Yoshino-cho, Ohmiya, Saitama 330, Japan

(受付: 1996年1月25日; 受理: 1996年2月3日)

Summary

The clastogenicity of six hepatocarcinogens in mouse hepatocytes was investigated using an *in vivo* mouse liver micronucleus test. It was found that four *N*-nitrosoamines, namely *N*-nitrosodiethylamine, *N*-nitrosomorpholine, *N*-nitrosodi-*n*-butylamine and *N*-nitrosopiperidine, showed clearly positive responses. On the other hand, peroxisome proliferators, namely clofibrate (CPIB) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), showed negative responses.

These results suggest that an *in vivo* mouse liver micronucleus test can be used for the evaluation of clastogenicity *in vivo*, with chemicals which produce mutagenicity through metabolic activation. It was considered that an additional test, by consecutive dosing, was needed for CPIB and DEHP. The relationship between the hepatocarcinogens and the micronucleus induction in hepatocytes seems to be important, not only for the results of the liver micronucleus test, but also for the evaluation by various mutagenicity tests using different indicators.

Keywords: *N*-nitroso compounds, peroxisome proliferator, hepatocarcinogens, liver micronucleus test

緒 言

骨髄細胞を用いる小核試験は、生体内での染色体異常誘発性を評価する試験として繫用されている。この試験で陽性となるげっ歯類発がん物質は、代謝拮抗剤・抗生物質・植物成分製剤などの制がん剤、アルキル化剤、エポキシ化合物などであり、代謝活性化を経て変異原性を示す芳香族アミン、ニトロソアミン類またハロゲン化合物、ニトロ化合物、ホルモン類などの発がん物質は、陰性となることが多い（若田ら, 1993）。それはこの試験の標的臓器が骨髄中の造血細胞（赤芽球）であることと関連性が深いと考えられる。特に、代謝活性化して変異原性を示す化合物は、肝での活

性代謝物が骨髄に到達しなかったり、到達しても十分な濃度で暴露がされない場合や不安定な活性代謝物である場合には、骨髄を用いる小核試験による変異原性の評価は適切とは言い難い（Angelosanto, 1995）。

肝での染色体異常を指標とした試験の報告は、*in vivo* の系 (Tates *et al.*, 1980; Braithwaite and Ashby, 1988) や初代肝細胞の系 (Müller *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 1993) での報告がある。ラット肝細胞での報告は数多くあるが、マウス肝細胞を用いた報告は比較的少ない (Clift *et al.*, 1989; Uryvaeva *et al.*, 1995)。マウスを用いる利点は、ラットとの種差の検討、膨大なデータのあるマウ

ス骨髄細胞を用いる小核試験やマウスがん原性試験との比較に有用と思われる。

そこで、今回げっ歯類に肝がん原性を示す変異がん原物質4化合物と非変異がん原物質2化合物について、マウス肝細胞での小核誘発性の有無について検討した。

実験材料と方法

1. 試薬

N-nitrosodiethyl amine (DEN, CAS No. 55-18-5) 並びに Clofibrate (CPIB, CAS No. 637-07-0) は、和光純薬株式会社より購入した。*N*-nitrosomorpholine (NMOR, CAS No. 59-89-2), *N*-nitrosodi-*n*-butylamine (DBN, CAS No. 924-16-3) 及び Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP, CAS No. 117-81-7) は、東京化成工業株式会社より購入した。*N*-nitrosopiperidine (NPIP, CAS No. 100-75-4) は、Sigma Chemical Co. より購入した。

溶媒は、DEN では生理食塩水、NMOR 並びに NPIP では蒸留水、DBN, CPIB 及び DEHP では、オリブ油をそれぞれ用いた。

2. 使用動物

日本エスエルシー株式会社より購入した ddY 系雄マウスの 10~14 週齢を用いた。飼育は温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ の空調下の SPF 動物室で、固型飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社) 並びに水を自由に摂取させる条件で行った。

3. 簡易単回投与毒性試験

各化合物の LD₅₀ 値を求めるため Lorke の方法 (1983) による単回経口投与毒性試験を行った。

すなわち、10, 100 及び 1000 mg/kg を各用量当たり 3 匹投与し、3 日間の死亡状況を観察した。その結果より、文献により指示される 4 用量を各 1 匹ずつに投与し、3 日間の死亡状況を観察した。その死亡状況により、各検体の LD₅₀ 値を算出した。

4. 標本作製方法

各検体の LD₅₀ 値の 1/2, 1/4 及び 1/8 量を経口投与後、翌日肝の部分切除 (PH, partial hepatec-

Table 1. The composition of the perfusion solutions (1000 ml).

Reagents	Pre-perfusion solution (g)	Collagenase solution (g)
KCl	0.4	0.4
KH ₂ PO ₄	0.06	0.06
NaCl	8.0	8.0
NaHCO ₃	0.35	0.35
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.12	0.12
D-glucose	1.0	1.0
HEPES ^a	2.38	2.38
EGTA	0.19	—
Collagenase	—	0.5
Trypsin inhibitor	—	0.05
CaCl ₂	—	0.56

^a N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid.

tomy) を行った。すなわちマウスをエーテル麻酔下、肝の外側・内側左葉並びに内側右葉を切除し、PH 4 日後に標本を作製した。まず、マウスをエーテル麻酔下、前灌流液 (Table 1) で 2~3 分間肝臓内を灌流し、その後 0.05% コラゲナーゼ溶液 (Table 1) で約 10 分間再び灌流した。次に消化され单離された肝細胞をリン酸緩衝液 [phosphate buffered saline, PBS(-)] 中に浮遊させ、ガーゼ 3 枚でろ過後、500 rpm, 1 分間遠心し上清を除去した。続いて、新しい PBS(-) を加えて再び遠心する操作を 3 回繰り返した。上清を除去後ウシ胎児血清を少量加えてピペットで攪拌し、その細胞浮遊液の少量をスライドグラス上に取り、スメアして風乾した。

5. 標本染色方法

核酸のフォイルゲン反応を利用して標本を染色した (Uryvaeva and Delone, 1995)。まず、10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) で 10 分間固定した。次いで、4N HCl で 37°C 、15 分間加水分解を行った。蒸留水で洗浄後、Schiff 試薬で 1 時間染色して標本を作製した。

6. 標本の観察、評価法

標本スライドは、すべてコード化して観察した。単核・2核細胞を対象としてスライド上の 2 領域を各 500 個観察した (600 倍)。観察する肝細胞は、正常な形態を示すもののみを対象とし、小

Table 2. The LD₅₀ values of test compounds.

Compound	LD ₅₀ (mg/kg)
DEN ^a	177
NMOR ^b	290
DBN ^c	3800
NPIP ^d	180
CPIB ^e	1250
DEHP ^f	>5000

^a *N*-nitrosodiethyl amine.

^b *N*-nitrosomorpholine.

^c *N*-nitrosodi-*n*-butylamine.

^d *N*-nitrosopiperidine.

^e Clofibrate.

^f Di(2-ethylhexyl)phthalate.

Table 3. Frequency of micronucleated hepatocytes in mice treated with hepatocarcinogens.

Compound	Dose (mg/kg)	No. of animals	Frequency of micronucleated hepatocytes (%)
			Mean \pm S.D.
DEN	0	5	0.70 \pm 0.44
	22.5	5	2.34 \pm 1.59**
NMOR	45.0	5	2.10 \pm 0.76**
	90.0	4 ^a	3.15 \pm 0.55**
DBN	0	5	0.26 \pm 0.24
	37.5	5	1.44 \pm 0.95*
NPIP	75.0	5	1.10 \pm 0.59**
	150	4 ^b	0.03 \pm 0.05
CPIB	0	5	0.16 \pm 0.11
	500	5	1.76 \pm 1.13*
DEHP	1000	5	1.28 \pm 0.90**
	2000	— ^c	—
NPIP	0	5	0.14 \pm 0.17
	22.5	5	1.58 \pm 1.14*
CPIB	45.0	5	1.60 \pm 0.99*
	90.0	4 ^a	2.00 \pm 1.00*
DEHP	0	5	0.42 \pm 0.31
	150	5	0.40 \pm 0.23
CPIB	300	5	0.28 \pm 0.08
	600	5	0.30 \pm 0.30
DEHP	0	5	0.54 \pm 0.18
	500	5	0.54 \pm 0.40
DEHP	1000	5	0.52 \pm 0.15
	2000	5	0.62 \pm 0.29

^a One mouse specimen was not observed for the defective one.

^b One mouse was died.

^c All specimens were not observed for the defective ones.

*:p < 0.05, **:p < 0.01.

結 果

Lorke の方法による各検体の LD₅₀ 値を Table 2 に示した。DEHP では LD₅₀ 値が 5000 mg/kg 以上であったため 2000 mg/kg を高用量群とし、以下 1000 並びに 500 mg/kg 群を設けた。各検体の LD₅₀ 値の 1/2, 1/4, 及び 1/8 量 (高, 中, 低用量) を 1 回経口投与後、PH 4 日後に標本作製を行いその観察結果を Table 3 に示した。

各検体の試験ごとに同時溶媒対照群を設けたが、全例 (30 例) の平均小核出現率は 0.37 \pm 0.32% であった。最小 0%, 最大 1.3% でその出現頻度の分布を Fig. 1 に示した。そのうち、0.5% 以下の出現範囲のものが 73% を占め、0.5~1% のものが 23% を占めていた。また、Fig. 2 にフォイルゲン反応によって染色された正常な肝細胞像を、Fig. 3 に小核を有する肝細胞像を示した。

各検体処理群のうち、DEN では溶媒対照の 3~4.5 倍、NPIP では 11~14 倍の出現率を示し、いずれの投与群においても有意な誘発が認められ陽性と判定された。また、用量依存的な傾向も見

られた。NMOR・DBN では、低・中用量群に有意な誘発が認められ陽性と判定された。NMOR では溶媒対照の 4.2~5.5 倍、DBN では 8~11 倍の出現率を示した。NMOR の高用量群では、標本作製時までに 1 匹死亡し有意な小核の誘発は認められなかった。DBN の高用量群では、全例肝細胞が損傷しており標本観察ができなかった。

一方、CPIB 並びに DEHP では、いずれの投与群でも有意な小核の誘発は認められず陰性と判定された。

考 察

げっ歯類で肝発がん性の知られている 6 種の肝

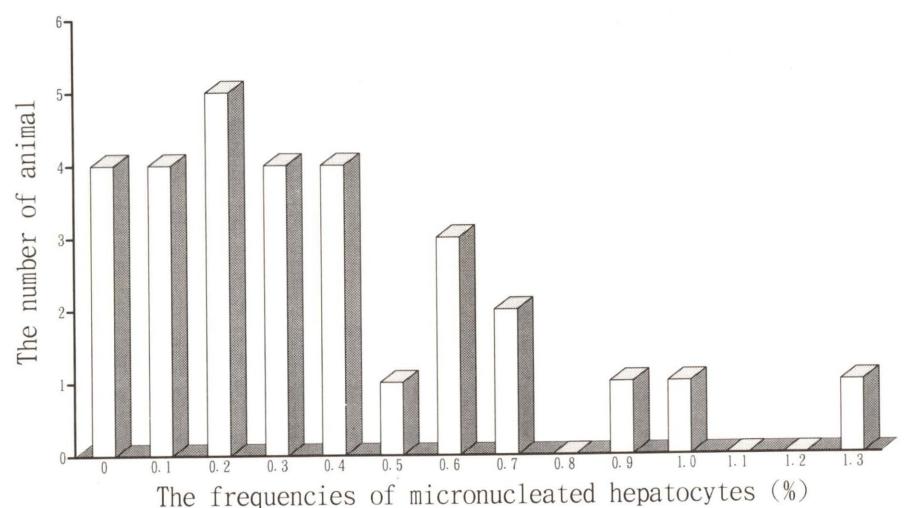


Fig. 1. Distribution of micronucleated hepatocytes frequencies (%) in the concurrent solvent control groups.

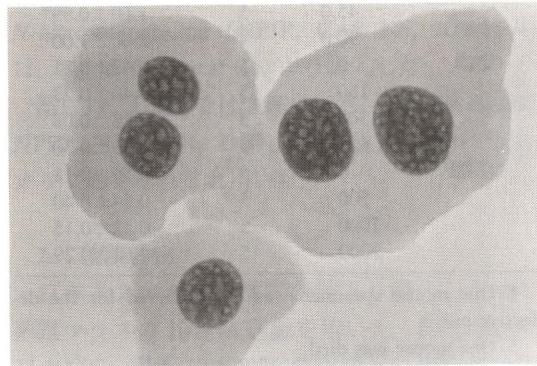


Fig. 2. The mouse mono- and bi-hepatocytes stained by the Feulgen reaction in solvent control group.

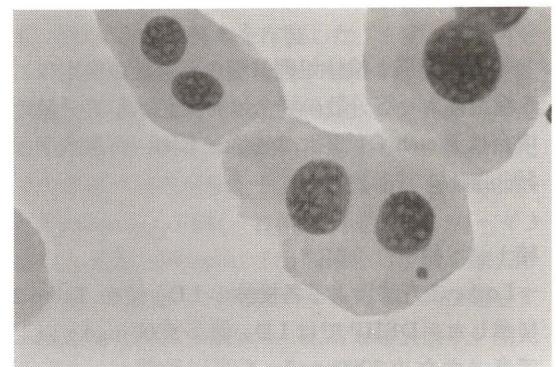


Fig. 3. The micronucleated hepatocytes stained by the Feulgen reaction in DEN 22.5 mg/kg treated group.

がん原物質について *in vivo* での染色体異常誘発性を肝細胞での小核誘発を指標に検討した。溶媒対照群(蒸留水、生理食塩水、オリブ油)30例の平均小核出現率は $0.37 \pm 0.32\%$ であった。他の報告例では CD1/CR マウスの場合、 $0.33 \sim 0.39\%$ (Clift et al., 1989), CBA × C57BL/6 マウスの場合、 0.66% (Uryvaeva and Delone, 1995) と報告されている。溶媒対照群の小核出現率は、マウスの系統や週齢、PH 後の標本作製時期などにより変動するものと考えられており (Tates et al., 1980), 単純な比較はできない。しかし、他の報告例と同等かそれ以下の出現率であり、妥当な出現率であることが推測される。ただ、1% 以上の出現率のも

のも少数例見られた。今後、試験の妥当性を評価するためには、更に背景データとして蓄積していく必要があると思われる。

次に、4種の *N*-ニトロソアミン類では溶媒対照群と比べて有意な小核の誘発が認められた。ラット肝細胞を用いる小核試験においても DEN・NMOR で有意な小核の誘発が報告されている (Tates et al., 1980; Ashby and Lefevre, 1989)。ただ、明確な用量依存性が見られなかったり、高用量群では細胞毒性が認められた。この結果は、LD₅₀ 値を基に用量を設定したこと、PH 後に標本作製するまでの時間などと関連しているものと考えられる。これら4化合物の標的発がん部位は

Table 4. Summary of mutagenicity test results for the hepatocarcinogens and non-hepatocarcinogens.

Compound	Micronucleus		Gene mutation		UDS	RDS	Hepatocarcinogenicity
	Bone marrow	Hepatocyte	Ames	TM			
DEN	-(+) ^a	+	+ (S9)	+	+ (v) ^b	NT	+
NMOR	-	+	+ (S9)	NT	+	NT	+
DBN	-	+	+ (S9)	NT	NT	NT	+
NPIP	-	+	+ (S9)	NT	NT	NT	+
CPIB	NT	-	-	NT	- (v) ^b	+	+
DEHP	-	-	-	-	-	+	+
MMS	+	+	+	-	+	-	-

^a Both results of positive and negative one are reported.

^b In vitro test, TM: Transgenic mouse mutation test, NT: Not tested.

The reference quoted with Table 4, as follows., Ashby et al., 1989; Budroe et al., 1993; Butterworth et al., 1984; Goldworthy et al., 1994; Gunz et al., 1993; Heddle et al., 1983; Higashikuni et al., 1994; IARC vol 17 (1978), vol 24 (1980) and vol 29 (1982); Mirsalis et al., 1993; Miyamae et al., 1994; Morrison et al., 1994; Suzuki et al., 1994; Tates et al., 1989; The collaborative study Group, 1986; Uno et al., 1994; Williams et al., 1989; Yoshikawa, 1995.

肝・呼吸器・消化管などであり (IARC, 1978), 肝細胞での染色体異常誘発作用との関連性が考えられる。また4化合物の各種変異原性試験の結果は、Table 4 に示すように Ames 試験では代謝活性化系 (S9mix) を加えた時に陽性となり、骨髓を用いる小核試験では陰性のものが多い。肝発がん性の知られている同じニトロソアミン類の *N*-nitrosodiethanolamine, *N*-nitrosodi-*n*-propylamine でも陰性の結果が報告されている (Satake et al., 1994; Noguchi et al., 1994)。従って、*in vitro* の変異原性試験において代謝活性化した場合に陽性を示す化合物では、肝細胞を用いる小核試験は *in vivo* での染色体異常誘発性を評価する際に有効な方法の一つとなり得るものと考えられる。そのためにはまず、多くの化合物を用いて適切な試験条件を設定した上で評価して行くことが重要である。

次に、CPIB 並びに DEHP について試験を行った。両化合物はペルオキシゾーム増殖作用があり (田村, 1995), げっ歯類において肝発がん性が知られている (IARC, 1980; IARC, 1982)。このような化合物は、Ames 試験陰性の非変異発がん物質と言われている (Budroe and Williams, 1993)。その発がんのメカニズムは、レセプターを介してペルオキシゾームの増殖が起こり、それに伴う脂質代謝により過剰の過酸化水素が産生され、DNA 損傷が誘発されるという説である。そのほかにも

薬物代謝酵素の誘導やがん原遺伝子の活性化などの関与も考えられている (Bentley et al., 1993)。*In vitro* の試験系では、シリアンハムスター培養細胞にラット肝 S9mix を添加した時に DEHP で染色体異常が見られたという報告もある (Tsutsui et al., 1993)。

そこで、*in vivo* での DNA 損傷の結果、肝細胞に染色体異常が誘発されるか否かを小核を指標に検討したが陰性の結果であった。多くのペルオキシゾーム増殖作用を有する化合物は、DNA 合成や細胞分裂促進作用を持っている (Bentley et al., 1993)。陰性の結果は、CPIB や DEHP の単回投与では染色体異常に至るような DNA 損傷は誘発されず、連続投与により細胞分裂・細胞増殖が持続され DNA の変異が固定されなければ染色体異常として検出できないことを反映している可能性も考えられる (高沢ら, 1994; Melnick et al., 1993)。従って、連続投与による肝細胞での小核誘発性の検討も重要な評価方法と考えられる。DEHP では、単回、14日及び30日投与でのラット肝 *in vivo/in vitro* 不定期 DNA 合成 (UDS) 並びにアルカリ溶出法試験では陰性と報告されている (Butterworth et al., 1984)。

肝細胞小核試験の結果と肝がんの関連性については、Table 4 に示すように *N*-ニトロソアミン類のように相関の認められる場合、小核の誘発が認められる methylmethane sulfonate (MMS) で肝発

がん性がない場合、小核の誘発が認められない CPIB や DEHP で肝発がんの認められる場合などいろいろなケースがある。MMS の場合には、肝がんが誘発されない一因として肝細胞増殖性がなく、そのため発がんに至る mutation に結びつかず結果として肝がんが誘発されないという仮説を考えられている (Goldworthy *et al.*, 1994)。また、CPIB や DEHP の場合には、肝細胞の増殖性が肝がん誘発の重要な因子と考えられている (高沢ら, 1994)。よって、肝発がん性について予測する場合は、Table 4 の各種変異原性試験の結果に見るように肝細胞小核試験のみでなく、いろいろな指標を用いた多角的な検討が必要と考えられる。

以上述べたように、マウス肝細胞を用いる小核試験は、ラット肝を用いる場合と同様に評価が可能であることが示唆された。

参考文献

- Angelosanto, F. A. (1995) Tissues other than bone marrow that can be used for cytogenetic analyses, *Environ. Mol. Mutagen.*, **25**, 338–343.
- Ashby, J. and P. A. Lefevre (1989) The rat-liver carcinogen *N*-nitrosomorpholine initiates unscheduled DNA synthesis and induces micronuclei in the rat liver *in vivo*, *Mutat. Res.*, **225**, 143–147.
- Bentley, P., I. Calder, C. Elcombe, P. Grasso, D. Stringer and H. J. Wiegand (1993) Hepatic peroxisome proliferation in rodents and its significance for humans, *Food Chem. Toxicol.*, **31**, 857–907.
- Braithwaite, I. and J. Ashby (1988) A non-invasive micronucleus assay in the rat liver, *Mutat. Res.*, **203**, 23–32.
- Budroe, J. D. and G. M. Williams (1993) Genotoxicity studies of peroxisome proliferators, in: G. Gibson and B. Lake (Eds.) *Peroxisomes: Biology and Importance in Toxicology and Medicine*, Taylor and Francis Ltd., pp. 525–568.
- Butterworth, B. E., E. Bermudez, T. Smith-Oliver, L. Earle, R. Cattley, J. Martin, J. A. Popp, S. Strom, R. Jirtle and G. Michalopoulos (1984) Lack of genotoxic activity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in rat and human hepatocytes, *Carcinogenesis*, **5**, 1329–1335.
- Cliet, I., E. Fournier, C. Melcion and A. Cordier (1989) *In vivo* micronucleus test using mouse hepatocytes, *Mutat. Res.*, **216**, 321–326.
- Goldworthy, T. L., L. Recio, K. Brown, L. A. Donehower, J. C. Mirsalis, R. W. Tennant and I. F. H. Purchase (1994) Symposium overview Transgenic Animals in Toxicology, *Fund. Appl. Toxicol.*, **22**, 8–19.
- Gunz, D., S. E. Shephard and W. K. Lutz (1993) Can not genotoxic carcinogens be detected with the *lac I* transgenic mouse mutation assay?, *Environ. Mol. Mutagen.*, **21**, 209–211.
- Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salamone (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.*, **123**, 61–118.
- Higashikuni, N., T. Morita and S. Sutou (1994) *N*-nitrosodiethylamine induces micronuclei at doses below the maximum tolerated dose, *MMS Com.*, **2**, 1–6.
- Hwang, J. J., M. T. Stephen Hsia and R. L. Jirtle (1993) Induction of sister chromatid exchange and micronuclei in primary cultures of rat and human hepatocytes by the peroxisome proliferator, Wy-14,643, *Mutat. Res.*, **286**, 123–133.
- IARC (1978) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, **17**, Some *N*-Nitroso Compounds, Lyon.
- IARC (1980) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, **24**, Some Pharmaceutical Drugs, Lyon.
- IARC (1982) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, **29**, Some Industrial Chemicals and Dyestuffs, Lyon.
- Lorke, D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing, *Arch. Toxicol.*, **54**, 275–287.
- Melnick, R. L., J. Huff, J. C. Barrett, R. R. Maronpot, G. Lucier and C. J. Portier (1993) Cell proliferation and Chemical Carcinogenesis: Symposium Overview, *Environ. Health Perspect.*, **101** (Suppl 5), 3–8.
- Mirsalis, J. C., G. S. Provost, C. D. Matthews, R. T. Hamner, J. E. Schindler, K. G. O'Loughlin, J. T. MacGregor and J. M. Short (1993) Induction of hepatic mutations in *lac I* transgenic mice, *Mutagenesis*, **8**, 265–271.
- Miyamae, Y. and O. Hirai (1994) No induction of micronuclei in the peripheral reticulocytes of *N*-nitrosopiperidine-treated mice, *MMS Com.*, **2**, 45–47.
- Morrison, V. and J. Ashby (1994) A preliminary evaluation of the performance of the MutaTM Mouse (*lac Z*) and Big BlueTM (*lac I*) transgenic mouse mutation assays, *Mutagenesis*, **9**, 367–375.
- Müller, K., P. Kasper and L. Müller (1993) An assessment of the *in vitro* hepatocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.*, **292**, 213–224.
- Noguchi, T., M. Asakura, T. Sugiyama and T. Matsushima (1994) *N*-nitrosodi-n-propylamine induces micronuclei in partially hepatectomized rat liver but not in mouse bone marrow cells, *MMS Com.*, **2**, 79–82.
- Satake, K., Y. Hayakawa and M. Watanabe (1994) *N*-nitrosodiethanolamine is not a clastogen as revealed by the mouse bone marrow micronucleus test, *MMS Com.*, **2**, 13–14.
- Suzuki, T., M. Hayashi and T. Sofuni (1994) Initial experiences and future directions for transgenic mouse mutation assays, *Mutat. Res.*, **307**, 489–494.
- 高沢博修, 杉山明男, 馬場 博, 宇野芳文, 宮川 誠, 吉川邦衛 (1994) 変異原性試験の役割と限界—RDS 試験による非変異・肝がん原性物質の検出—, Roles and limitations of mutagenicity tests—Detection of non-mutagenic hepatocarcinogens by means of RDS test—, 環境変異原研究, **16**, 113–126.
- 田村 浩 (1995) ベルオキシソーム増殖薬と発肝がん, 生化学, **67**, 1044–1047.
- Tates, A. D., I. Neuteboom, M. Hofker and L. den Engelse (1980) A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*, *Mutat. Res.*, **74**, 11–20.
- Tates, A. D., I. Neuteboom, N. de Vogel and L. den Engelse (1983) I. Time-dependent changes of the clastogenic effects of diethylnitrosamine, dimethyl-nitrosamine and ethyl methanesulfonate, *Mutat. Res.*, **107**, 131–151.
- Tates, A. D. and L. den Engelse (1989) The role of short-lived lesions in the induction of micronuclei in rat liver by ethylnitrosourea and methyl methanesulphonate: the importance of experimental design, *Mutat. Res.*, **210**, 271–279.
- The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1986) Sex difference in the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **172**, 151–163.
- Tsutsui, T., E. Watanabe and J. C. Barrett (1993) Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster cells, *Carcinogenesis*, **14**, 611–618.
- Uno, Y., H. Takasawa, M. Miyagawa, Y. Inoue, T. Murata and K. Yoshikawa (1993) An *in vivo*–*in vitro* replicative DNA synthesis (RDS) test using rat hepatocytes as an early prediction assay for nongenotoxic hepatocarcinogens screening of 22 known positives and 25 noncarcinogens, *Mutat. Res.*, **320**, 189–205.
- Uryvaeva, I. V. and G. V. Delone (1995) An improved method of mouse liver micronucleus analysis: an application to age-related genetic alteration and polyploidy study, *Mutat. Res.*, **334**, 71–80.
- 若田明裕, 大内昭信, 鈴木 洋 (1993) マウス小核試験の問題点, 環境変異原研究, **15**, 97–101.
- Williams, G. M., H. Mori and C. A. McQueen (1989) Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals, *Mutat. Res.*, **221**, 263–286.
- Yoshikawa, K. (1995) Early induction of *in vivo*–*in vitro* hepatocyte replicative DNA synthesis (RDS) by nongenotoxic and genotoxic hepatocarcinogens in male F 344 rats and B6C3F1 mice, *J. Toxicol. Pathol.*, **8**, 291–302.

Distribution of Mutagenic Polycyclic Aromatic Compounds in Leaves of a Woody Plant Growing under Various Traffic Conditions

Daisuke Nakajima, Tsuyoshi Teshima, Masaki Ochiai, Masako Tabata,
Junzo Suzuki and Shizuo Suzuki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo,
12, Ichigaya Funagawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan

(Received: June 13, 1995; Accepted: December 12, 1995)

Summary

Benzo[a]pyrene (B[a]P) and 1-nitropyrene (1-NP) concentrations in leaves of a woody plant (azalea, *Rhododendron oomurasaki*) growing under various road traffic conditions, and the mutagenicity of ethyl acetate extracts from leaves, were determined (*Salmonella typhimurium* YG 1020, YG 1021 and YG 1024 without S9). The leaves of azaleas planted by the edge of an arterial road with heavy traffic retained significantly more mutagens, including B[a]P and 1-NP, than those planted in the center of a park, surrounded by trees in an urban area, and in the suburbs. The mutagen concentration in the leaves steeply decreased with distance from the arterial road, and that in a garden or a square 350 m away reached the level in trees in the suburbs. The mutagen concentration in the azalea leaves shielded from the road by bushes (Chinese juniper, *Juniperus chinensis* var. *kaizuka*) was about half that in azaleas planted on the border of the road. These results indicate that planting roadside trees effectively reduces the exposure levels of pedestrians to mutagenic compounds and also prevents the spread of air pollution caused by heavy traffic mutagen emissions.

Keywords: plant leaves, benzo[a]pyrene, 1-nitropyrene, mutagen, car exhaust

Introduction

Ambient air contains mutagenic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitro derivatives derived from combustion emission (Pitts *et al.*, 1977; Wang *et al.*, 1980; Tokiwa *et al.*, 1983; Nakagawa *et al.*, 1983; Morita *et al.*, 1983). They may be an important factor in human lung cancer, especially in urban areas (Wynder and Hoffmann, 1965; Menck *et al.*, 1974; Walker *et al.*, 1982). Since vehicle exhaust appears to be one of the major generators of carcinogenic and mutagenic PAH in urban area, the ambient air near arterial roads with heavy traffic might be highly polluted with mutagenic PAH. Accordingly, in estimating the risk of exposure to mutagens for inhabitants, it is necessary to monitor air pollution in detail with mutagens in populated areas.

Mutagenic compounds in the air are generally determined as particulate matter collected by high- or low-volume air samplers. However, this takes

much time and care, and it is very difficult to collect samples at many points at the same time.

On the other hand, vegetation absorbs atmospheric PAHs and chlorinated hydrocarbons by spraying or deposition on leaves with subsequent partition into cuticles or by entering stomata (Thomas *et al.*, 1984, 1985; Edwards, 1986; Paterson *et al.*, 1990). We showed that extracts from leaves of woody plants growing by the roadside exhibit mutagenicity, indicating that roadside trees retain mutagenic nitroarenes from automobile exhaust (Suzuki *et al.*, 1992). Additionally, the concentration of non-volatile PAH in leaves is approximately proportional to that in suspended particulate matter in the atmosphere (Nakajima *et al.*, 1995). Accordingly, it should be possible to monitor the extent or the spread of air pollution with mutagens derived from car exhaust, by determining the concentration of mutagenic compounds in plant leaves.

This paper describes the distribution of 1-

nitropyrene (1-NP), benzo[a]pyrene (B[a]P) and mutagenicity toward *Salmonella typhimurium* YG strains of ethyl acetate extract from azalea leaves growing under various traffic conditions in Tokyo.

Materials and Methods

Chemicals

1-NP and B[a]P were purchased from Tokyo Kasei Co., and sodium hydrosulfide from Katayama Chemical Co. All other chemicals were of high quality commercial grade.

Sampling of plant leaves

Leaves were collected 1 m above the ground surface from azaleas (*Rhododendron oomurasaki*) growing at seven urban and three suburban sites in Tokyo under various traffic conditions during November 1990 (Fig. 1). These consisted of the median strip (L7-MS) and the roadside (L7-RD) of Loop 7, an arterial road that runs through the Tokyo metropolitan area, at Koenji located about 10 km west of the center of Tokyo (traffic volume, 49,000 cars/12 hr in the daytime); two squares about 70 m and 750 m away from Loop 7 (L7-S1, L7-S2, respectively); a garden about 360 m away from Loop 7 (L7-GD); the roadside of Sotobori street at Ichigaya (SB-RD) in the center of Tokyo (traffic volume, 30,000 cars/12 hr in the daytime); the center of Shinjuku Gyo-en National Garden (SG-GD), which is a public park located in the center of Tokyo; the roadside of a mountain path in Takimoto (M1-RD) located about 60 km west of the center of

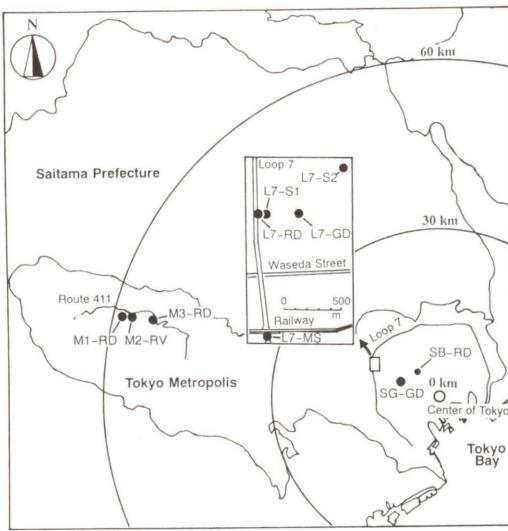


Fig. 1. Sampling locations of azalea leaves.

Tokyo; the river bank in Mitake ravine (M2-RV), which is a mountain resort, located a few km east of Takimoto; and the roadside of Route 411 at Shinmeibashi (M3-RD) located about 55 km west of the center of Tokyo. Unless otherwise noted, all the roadside azaleas were not shielded from roadway by other trees.

Determination of mutagenic compounds in leaves

B[a]P and 1-NP in leaves and the mutagenicity of the ethyl acetate extract from leaves were determined as described previously (Suzuki *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1994, 1995). Fresh leaves (7.5 g) were first ultrasonically extracted with ethyl acetate (10 ml/g) for 20 min without washing and drying. Leaves and other insoluble materials were removed by decantation and filtration through a membrane (PTFE, pore size 0.2 μ m, Advantec Toyo Co.). The filtrate was evaporated to about 20 ml, to which 1 g of silica gel (Merck Kieselgel 60) was added, and the suspension was evaporated to dryness under reduced pressure below 45°C. The silica gel/extract mixture was placed at the top of an aluminum foil-covered silica gel-packed column (2 cm i.d. \times 25 cm) and eluted with the following solvents.

To determine the B[a]P concentration and to assay mutagenicity, the compounds on the silica gel column were eluted with 250 ml of benzene. The eluate was concentrated under reduced pressure, dried under a nitrogen stream, then dissolved in 1 ml of methanol for HPLC or in dimethyl sulfoxide (DMSO) for the mutation assay.

To determine the 1-NP concentration, the compounds were eluted with 100 ml of cyclohexane/benzene (1/2, v/v). The eluate was evaporated to a few ml, placed in a small centrifuge tube and dried under a nitrogen stream. Ethanol (0.5 ml) was added and the eluate was dissolved by ultrasonication. Sodium hydrosulfide (10%, 0.5 ml) was added to the solution and 1-NP was reduced to 1-aminopyrene (1-AP) by refluxing for 90 min at 90°C (Tanabe *et al.*, 1986). After termination of the reaction, 2 ml of NaOH (0.15 N) was added and 1-AP was extracted three times with 1 ml of benzene. The extracts were combined, evaporated to dryness and dissolved in 1 ml of methanol for HPLC.

HPLC

The HPLC system was a Shimadzu LC-9A equipped with a fluorescence detector (Shimadzu RF-550). A 10 ml aliquot of the sample solution

was injected on a MERCK Lichrospher 100 RP-18 column (4.0 mm i.d. \times 250 mm). The solvent system used to determine 1-NP and B[a]P levels was acetonitrile/50 mM-pH 6.5 Tris-HCl buffer (65/35) at a flow rate of 1 ml/min. The eluate was monitored by fluoroscopy for 1-NP and B[a]P with excitation and emission at 281 and 427 nm, and at 376 and 405 nm, respectively.

Mutation assay

Mutagenicity was assayed according to the Ames' method with preincubation of the test samples (0.1 ml of test materials in DMSO and 0.5 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) with the test strain (0.1 ml overnight cultured solution) for 20 min at 37°C (Maron and Ames, 1983). The test strains were *Salmonella typhimurium* YG 1020 (TA98 containing pBR322-Ap^r), YG 1021 (TA98 containing pYG216, a nitroreductase-overproducing strain) and YG 1024 (TA98 containing pYG 219, an O-acetyltransferase-overproducing strain) without rat liver S9. Ampicillin (25 μ g/ml) and tetracycline (6.25 μ g/ml) were added to the overnight culture medium. Each sample was assayed in triplicate.

Results and Discussion

The mutagenicity of the ethyl acetate extract and the concentration of B[a]P and 1-NP in azalea leaves growing under various traffic conditions are shown in Fig. 2. The mutagenesis data show that the extracts from leaves of azalea, especially collected in urban areas, were significantly more mutagenic toward *S. typhimurium* YG 1021 and YG 1024 strains than YG 1020. YG 1021 and YG 1024 are specifically sensitive to some nitroarenes in the absence of S9, particularly to 1-NP and to dinitropyrenes respectively (Watanabe *et al.*, 1989, 1990; Einisto *et al.*, 1991). Accordingly, the results in Fig. 2(A) imply that the leaf extracts contained mutagenic nitroarenes. However, these data did not always correlate with the concentration of 1-NP, a representative atmospheric nitroarene, in the leaves. This suggested that the contribution of 1-NP to the mutagenicity of the leaf extracts was not so large.

The leaves collected from the median strip of Loop 7 which has the largest traffic volume, had the highest concentrations of B[a]P and 1-NP and high mutagenicity. The mutagenic contents of the leaves by the roadside of Loop 7 was comparable to those in the median strip. The leaves from the roadside of

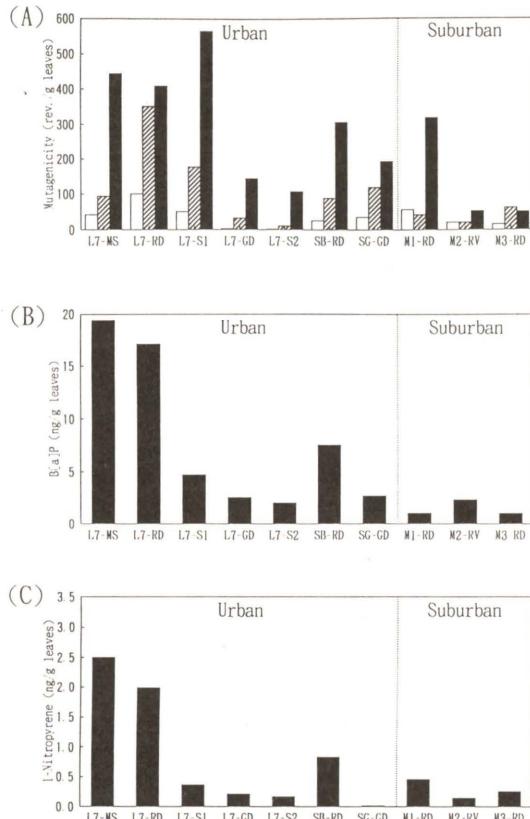


Fig. 2. Distribution of mutagenic compounds retained in azalea leaves growing under various traffic conditions. (A) Mutagenicity of ethyl acetate extracts from azalea leaves assayed using *S. typhimurium* in the absence of S9; (□) YG 1020, (▨) YG 1021, (■) YG 1024. (B) B[a]P concentration in azalea leaves. (C) 1-NP concentration in azalea leaves. L7-MS, the median strip of Loop 7; L7-RD, the side of Loop 7; L7-S1, a square 70 m distant from Loop 7; L7-GD, a garden 360 m distant from Loop 7; L7-S2, a square 750 m distant from Loop 7; SB-RD, the side of Sotobori street; SG-GD, Shinjuku Gyo-en National Garden; M1-RD, the side of a mountain path in Takimoto; M2-RV, river bank at Mitake ravine (a mountain resort); M3-RD, the side of Route 411 at Shinmeibashi.

Sotobori street in the center of Tokyo had also significantly high values, reflecting the traffic volume at this site.

The leaves in suburban area tended to have low values. Among the leaves collected in suburban areas, however, those of the roadside of a mountain

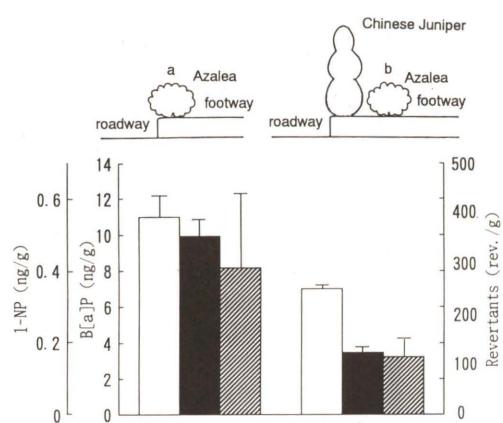


Fig. 3. The concentrations of mutagenic compounds in roadside azaleas with and without shielding by a bush (Chinese juniper) from the roadway (see upper figure). 1-NP (open column), B[a]P (closed column), and mutagenicity to *S. typhimurium* YG 1024 (shaded column). Values represent the means \pm SD of data for three samples.

path (M1-RD) were quite mutagenic towards YG 1024 strain and had a high concentration of 1-NP. This may be because the sampling site was a slope.

The L7-S1, L7-GD and L7-S2 are azalea leaves collected from sites various distances away from Loop 7 to understand the extent of diffusion of mutagenic compounds emitted from car exhaust in heavy traffic. Loop 7 had the most traffic among the sampling sites. The leaves in the square 70 m away from the road (L7-S1) exhibited relatively high values, particularly in mutagenicity, indicating that some mutagenic compounds derived from car exhaust are transported to sites at least 70 m away. However, in the garden 360 m away and the square 750 m away, the contents decreased to a level comparable with those in the suburban area. This suggested that most of the B[a]P and nitroarenes emitted from car exhaust were not transported far.

The leaves collected in Shinjuku Gyo-en National Garden (SG-GD) showed also low mutagenicity and B[a]P and 1-NP concentrations, although the garden is situated in the center of Tokyo and adjacent to an arterial road, the Koshu Road, with much traffic. The garden is about 1 km across (about 58 hectare in area) and has many trees and the sampling site was about the center of the garden. Accordingly, the results suggested that the mutagenic compounds derived from car exhaust were captured

and removed by leaves of peripheral trees in the garden. This seems to be because B[a]P and 1-NP are non-volatile and are adsorbed to suspended particulate matter.

To understand the shielding effect of a roadside tree on mutagenic compounds derived from car exhaust, azalea leaves were collected from the neighboring two stubs planted at the Koenji site of Loop 7 (in September 1991), one of which was planted in the roadside abutting the roadway and the other was shielded from the roadway by a roadside bush (Chinese juniper, *Juniperus chinensis* var. *kaizuka*) of about 2 m height and 0.7 m width. Fig. 3 shows the mutagenicity of leaf extract and the concentrations of B[a]P and 1-NP in the two azalea stubs. The amounts of mutagenic compounds in the azalea without shield were about half those of that shielded. These results indicated that the leaves of the Chinese juniper shielded a significant amount of mutagenic compounds released from car exhaust. This seemed to be owing to the highly dense leaves of the Chinese juniper which is an acicular tree. This shielding effect of roadside trees against mutagenic compounds must play a very important role in reducing the exposure level of pedestrians.

These experimental results demonstrated that the leaves of roadside trees are highly polluted with mutagenic compounds derived from car exhaust. We also found that roadside trees effectively shield mutagenic compounds. Planting roadside trees seems to be very effective for reducing the exposure levels of pedestrians to mutagenic compounds and to prevent the spread of air pollution with mutagenic compounds. However, further studies are required to define the shielding efficacy of various plants.

References

- Einisto, P., M. Watanabe, M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1991) Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitro-reductase or *O*-acetyltransferase activities, *Mutat. Res.*, **259**, 95–102.
- Edwards, N. T. (1986) Uptake, translocation and metabolism of anthracene in bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Environ. Toxicol. Chem.*, **5**, 659–665.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173–215.
- Menk, H. R., J. T. Casagrande and B. E. Henderson (1974) Industrial air pollution: possible effect on lung cancer, *Science*, **183**, 210–212.
- Morita, K., K. Fukamachi and H. Tokiwa (1983) Studies on airborne nitro compounds in air. III. Determination of 1-nitropyrene in airborne particulate matter and automobile emissions, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **29**, 199–205.
- Nakagawa, R., S. Kitamori, K. Horikawa, K. Nakashima and H. Tokiwa (1983) Identification of dinitropyrenes in diesel exhaust particles: Their probable presence as the major mutagens, *Mutat. Res.*, **124**, 210–211.
- Nakajima, D., T. Teshima, M. Ochiai, M. Tabata, J. Suzuki and S. Suzuki (1994) Determination of 1-nitropyrene retained in leaves of roadside trees, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **53**, 888–894.
- Nakajima, D., Y. Yoshida, J. Suzuki and S. Suzuki (1995) Seasonal changes in the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in azalea leaves and relationship to atmospheric concentration, *Chemosphere*, **30**(3), 409–418.
- Paterson, S., D. Mackay, D. Tam and W. Y. Shiu (1990) Uptake of organic chemicals by plants: a review of processes, correlations and models, *Chemosphere*, **21**, 297–331.
- Pitts, J. N., D. Grosjean, T. M. Mischke, V. F. Simon and D. Poole (1977) Mutagenic activity of airborne particulate organic pollutants, *Toxicol. Lett.*, **1**, 65–70.
- Suzuki, J., K. Kuwayama and S. Suzuki (1992) Mutagenicity assay for nitroarenes of air pollutants held in leaves of woody plants, *Mutat. Res.*, **271**, 89–96.
- Tanabe, K., H. Matsushita, Ching-Tang Kuo and S. Imai-ya (1986) Determination of carcinogenic nitroarenes in airborne particulates by high performance liquid chromatography, *J. Jpn. Soc. Air Pollut.*, **21**, 535–544.
- Thomas, W., A. Ruhling and H. Simon (1984) Accumulation of airborne pollutants (PAH, Chlorinated hydrocarbons, heavy metals) in various plant species and humus, *Environ. Pollut. Ser. A*, **36**, 295–310.
- Thomas, W. and H. Simon (1985) Classification of plant species by their organic (PAH, PCB, BHC) and inorganic (heavy metals) trace pollutant concentrations, *Sci. Total Environ.*, **46**, 83–94.
- Tokiwa, H., S. Kitamori, R. Nakagawa and L. Matamala (1983) Demonstration of a powerful mutagenic dinitropyrene in air borne particulate matter, *Mutat. Res.*, **121**, 107–116.
- Walker, R. D., T. H. Connor, E. J. MacDonald, N. M. Trieff, M. S. Legator, K. W. MacKenzie Jr. and J. G. Dobbins (1982) Correlation of mutagenic assessment of Houston air particulate extracts in relation to lung cancer mortality rates, *Environ. Res.*, **28**, 303–312.
- Wang, C. Y., M. S. Lee, S. M. King and P. O. Warner (1980) Evidence for nitro aromatics as direct acting mutagens of airborne particulates, *Chemosphere*, **9**, 83–88.
- Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1989) A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitro-reductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strain TA 98 and TA 100, *Mutat. Res.*, **216**, 211–220.
- Watanabe, M., M. Ishidate Jr. and T. Nohmi (1990) Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase levels, *Mutat. Res.*, **234**, 337–348.
- Wynder, E. L. and D. Hoffmann (1965) Some laboratory and epidemiological aspects of air pollution carcinogenesis, *J. Air Pollut. Control Ass.*, **15**, 155–159.

マウス腸上皮細胞を用いる小核試験法

An *in vivo* micronucleus test using colonic epithelial cells of mice

大山ワカ子, 徳光 崇

Wakako Ohyama and Takashi Tokumitsu

(株) ヤクルト本社中央研究所
186 東京都国立市谷保 1796

Yakult Central Institute for Microbiological Research, 1796 Yaho, Kunitachi-shi, Tokyo 186, Japan

(受付: 1995年6月29日; 受理: 1995年12月28日)

Summary

An *in vivo* micronucleus assay system was developed using mouse colonic epithelial cells. The epithelial cells of colon, isolated by EDTA treatment, were fixed in methanol containing 0.5% acetic acid and dropped onto slides. Micronuclei were easily recognized with acridine orange staining. Dose-dependent induction of micronuclei was observed in the colonic epithelial cells of mice treated with a single intraperitoneal injection of 1,2-dimethylhydrazine or mitomycin C. Thus, the colonic micronucleus assay can detect colon mutagens/carcinogens.

Keywords: micronucleus, colon, epithelial cells, 1,2-dimethylhydrazine, mitomycin C

緒 言

腸は活発な細胞分裂が上皮細胞の窪みであるクリプト(陰窩)内に認められる臓器であり、細胞動態が詳しく報告されている(Cameron, 1971)。また、腸のうち、大腸は上皮細胞由来の癌の多発する部位である。

大腸の上皮細胞を利用する変異原性試験は、単離細胞を用いた染色体観察法(Tokumitsu, 1976)のほか、姉妹染色分体交換(Blakey, 1985; Couch *et al.*, 1987), 組織標本での核異常の検出法(Wargovich *et al.*, 1983)の報告がある。核異常にについては、細胞分裂と無関係に発現するものであるとの報告もある(Duncan *et al.*, 1985)。

我々は大腸を標的とする変異原物質の検出を目的として、腸上皮の単離細胞を用いた染色体異常試験の開発を試みてきた(Ohyama *et al.*, 1991, 1992, 1993)。さらに、染色体試験に比べて、異常の識別が容易で、短時間の観察で実施可能な小核試験法の開発を試みた。今回、既知変異原物質で

ある 1,2-dimethylhydrazine, あるいは mitomycin C をマウスに投与した結果、結腸上皮の単離細胞を用いる小核試験が実施可能と判断したので報告する。

実験材料および方法

1. 使用動物

ICR (CD-1) マウス、雄(日本エスエルシー(株))の8週令(6匹/群)を用いた。飼料はMF(オリエンタル酵母(株)製)、飲料水は水道水を用い、それぞれ自由摂取させた。

2. 試験物質

1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride [306-37-6] (DMH) は東京化成工業(株)製を、mitomycin C [50-07-7] (MMC) は協和発酵(株)製(マイシン協和 S, 2 mg 力値/瓶)を用いた。

3. 試験物質の調製および投与

DMH は 1 mM EDTA に溶解した後、NaOH で pH 6.5 に調整し、0, 10, 20, 30, 40 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に 1 回投与した。

MMC は 0.4 mg/ml の濃度で局方注射用蒸留水で溶解した後、局方注射用生理食塩液で希釈し、0, 0.5, 1, 2, 4 mg/kg b.w. (以下、b.w. は省略) の用量で腹腔内に 1 回投与した。

4. 結腸上皮の単離細胞の小核標本作製

小核標本は、DMH 投与の 3 日および 4 日後、MMC 投与の 3 日後に作製した。

マウスの結腸下部を摘出し、内容物を PBSA (pH 6.8) で除去した後、腸管をガラス棒（直径 4~5 mm, 長さ 12~13 cm）に裏返した。ガラス棒の他端にシリコン栓を付け、そのシリコン栓を、マイクロプレートミキサーに取り付けた板の穴に入れ、裏返した腸管が試験管中の EDTA 液に浸るようにした (Tokumitsu, 1976)。腸管を、30°C の 1 mM EDTA 液中に 15 分間静置した後、3 分間振動させ、クリプトを採取した。さらに、ピペッティングにより、細胞解離を行った。

遠心後、細胞を集め、2~3 mL の PBSA に懸濁し、ピペッティング後、氷冷したメタノールに酢酸を 0.5% の割合で混合した液で固定した。固定液を 2 度交換し、少量の固定液に細胞を再浮遊させ、air dry 標本を作製した。

7. 小核標本観察

アクリジンオレンジ (40 µg/mL) による簡易染色法 (林, 1991) で結腸上皮細胞を観察した。マウス 1 個体あたり 2000 個程度の細胞を観察し、小核細胞の頻度を算定した。

観察対象とする細胞の観察基準は、下記の 4 項目とした。①細胞質を保持しており、②楕円形から長方形である、③主核の核膜が明瞭である、④細胞が重なっていない。また、小核の判定基準は、①主核と同じ黄色い蛍光を発している、②直径が主核の 1/2 以下である、③主核と接しているものやピンホールほど極小のものは小核に数えない、とした。

8. 「クリプト標本」の作製、観察

小核標本作製時に採取したクリプトの一部を

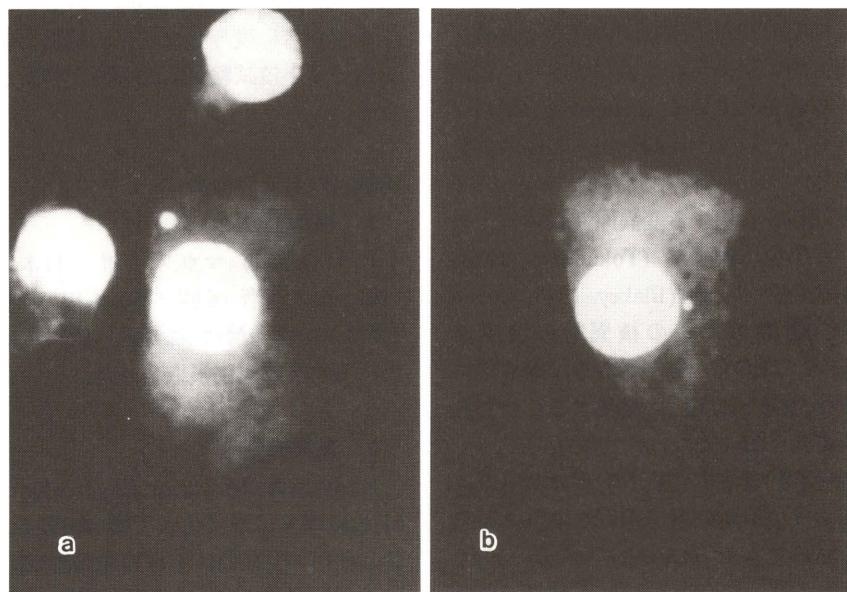


Fig. 1. Micronuclei induced in the colon epithelial cells of mice.

(a): A micronucleus induced by DMH (30 mg/kg b.w.) 4 days after a single ip injection. (b): A micronucleus induced by MMC (4 mg/kg b.w.) 3 days after a single ip injection.

45% 酢酸で 30 分固定し、1% アセトオルセインで染色してクリプトの標本（クリプト標本）を作製した。1 個体あたり 100 個前後のクリプトを観察し、クリプトあたりの分裂細胞数を算定することにより、小核標本作製時の結腸上皮細胞の分裂活動の状態を観察した。

結果

1. 小核標本作製時の固定液の酢酸濃度の検討

固定液の酢酸濃度は、細胞質の形態保持に影響することが報告されている (Matsuoka *et al.*, 1993)。これをもとに、通常用いる酢酸濃度 25% から徐々に濃度を下げ、細胞への影響を検討した。

酢酸濃度が 25~5% の場合、細胞質の消失または著しい膨潤が認められた。酢酸 2~1% の場合、細胞により、膨潤の程度が異なり、安定した標本が得られなかった。酢酸濃度を 0.5% にした場合、細胞の膨潤は少なく、上皮細胞の形態が保持された細胞標本が得られた。メタノールのみでは、細胞塊となつた。以上の結果から、酢酸濃度 0.5% の固定液を標本作製に用いた。

2. DMH 投与による小核頻度の用量依存性

小核細胞頻度は投与の 3 日、4 日後共に、0~30 mg/kg で用量依存性が認められた (Figs. 2, 3)。

DMH (4 day)

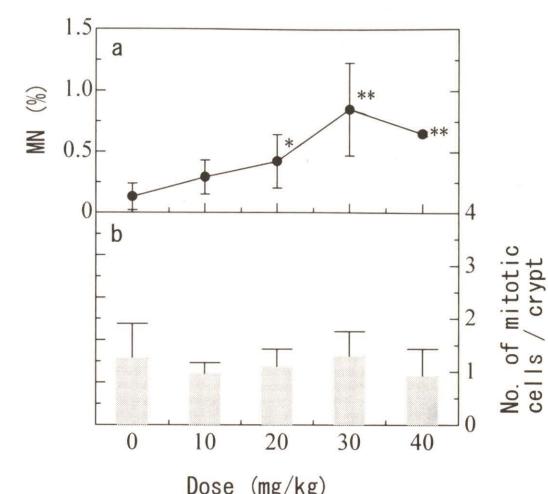


Fig. 3. Effect of a single dose of DMH, 4 days after treatment, on the percentage of MN in the epithelium (a) and the number of mitotic cells per colonic crypt (b). Vertical bars, S.D. *p < 0.05, **p < 0.01

DMH (3 day)

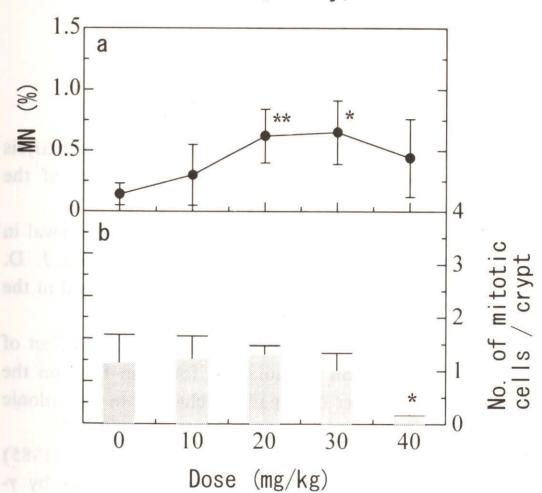


Fig. 2. Effect of a single dose of DMH, 3 days after treatment, on the percentage of MN in the epithelium (a) and the number of mitotic cells per colonic crypt (b). Vertical bars, S.D. *p < 0.05, **p < 0.01

MMC (3 day)

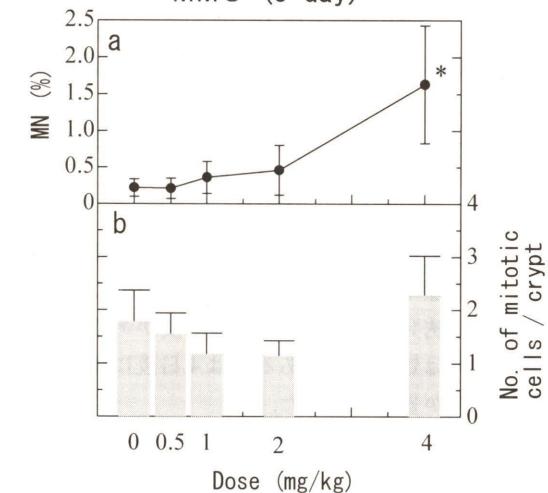


Fig. 4. Effect of a single dose of MMC, 3 days after treatment, on the percentage of MN in the epithelium (a) and the number of mitotic cells per colonic crypt (b). Vertical bars, S.D. *p < 0.05, **p < 0.01

投与3日後には20, 30mg/kg投与群が、4日後にはさらに40mg/kg投与群も、対照群に対して有意に高い値を示した。しかし、40mg/kg投与群の小核頻度は、30mg/kg投与群より低かった。

また、クリプト標本の観察から、投与3日後の40mg/kg投与群における、クリプト当たりの平均分裂細胞数は、30mg/kg投与群に比べ、有意に低かった(Fig. 2)。

3. MMC投与による小核頻度の用量依存性

MMC投与では、4mg/kg投与群の小核頻度が、対照群に対して有意に高い値を示し、用量依存性が認められた(Fig. 4)。

クリプト内の分裂細胞数から、各群共に細胞分裂の抑制は認められなかった(Fig. 4)。

考 察

小核は細胞分裂の際に形成されるため、小核試験では試験物質の影響を受けた後に分裂を終えた細胞を観察対象とする。

腸上皮細胞の分裂は、上皮細胞の「窪み」であるクリプト(陰窩)の底部にある増殖帯のみで認められ、分裂後の細胞はクリプト内を上部(管腔側)に向かってエスカレーター式に押し上げられる(幹細胞は底部に留まる)。マウス大腸の上皮細胞の場合、一部の細胞を除き、分裂後約3日でクリプト上端に到達し、管腔内に脱落する(Cameron, 1971)。

従って、マウスを変異原物質で処理すると、細胞分裂の抑制がない場合は、処理3日後の大腸上皮細胞は、ほとんどが投与後に分裂したもの、すなわち観察対象となる細胞であるといえる。しかし、小核標本を作製する場合、細胞分裂の抑制による小核誘発の遅延を考慮する必要があることから、我々は処理後3日あるいは4日後に標本を作製するのが妥当と考えた。

この考えに基づき、今回DMHとMMC投与の3日あるいは4日後に結腸上皮細胞を観察した結果、小核の誘発が検出され、その頻度の用量依存性が確認された。

DMH、およびMMC投与により、マウス結腸上皮細胞に染色体異常が誘発されることは既に確

認している。すなわち、DMH投与後、30時間で結腸の染色体異常頻度のピークおよび用量依存性(0~30mg/kg、最高頻度12%)を認め、MMC投与では、20時間後に異常頻度のピークおよび用量依存性(0~2mg/kg、最高頻度15%)を認めた(Ohyama et al., 1992, 1993)。染色体異常と小核は検出される時期は異なるが、染色体異常試験の結果は、今回の小核試験の結果を支持するものといえる。

また、小核頻度は細胞分裂活動の程度に影響される。すなわち、DMH投与3日後の40mg/kg投与群では、分裂細胞数の減少が見られ、小核頻度も30mg/kg投与群に比べて低かったが、これは細胞分裂の抑制が原因で小核の誘発が遅延したためといえる。また、投与4日後の40mg/kg投与群の分裂細胞数はコントロールレベルに近づいており、小核頻度は3日後に比べると増加している。しかし依然として30mg/kg投与群よりは低い。これは細胞の分裂活動は回復したが、分裂後の細胞はまだ増加していないことを示すと推測される。

大腸発癌物質であるDMHでは、結腸の染色体異常試験と同時に実施した骨髄の小核試験で陰性の結果を得ている(Ohyama et al., 1993)ことも考え合わせると、結腸を標的とする変異原物質の検出に、マウス結腸の単離細胞を用いる小核試験法が利用可能であるといえる。

参考文献

- Blakey, D. H. (1985) Sister chromatid exchange analysis in the colonic and small intestinal epithelium of the mouse, *Cancer Lett.*, **28**, 299-305.
- Cameron, I. L. (1971) Cell proliferation and renewal in the mammalian body, In: I. L. Cameron, and J. D. Thrasher (Eds.), *Cellular and molecular renewal in the mammalian body*, Academic Press, pp. 45-85.
- Couch, D. B., E. Stuart and A. Heddle (1987) Effect of oral administration of mutagens found in food on the frequency of sister chromatid exchanges in the colonic epithelium of mice, *Env. Mol. Mut.*, **10**, 205-209.
- Duncan, A. M. V., J. A. Heddle and D. H. Blakey (1985) Mechanism of induction of nuclear anomalies by γ -radiation in the colonic epithelium of the mouse, *Cancer Res.*, **45**, 250-252.
- 林 真 (1991) 第4章 標本の作製法、小核試験(林真著), サイエンティスト社, pp. 44-48.
- Matsuoka, A., N. Yamazaki, T. Suzuki, M. Hayashi and T. Sofuni (1993) Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test, *Mutat. Res.*, **272**, 223-236.
- Ohyama, W. and T. Tokumitsu (1991) Chromosome observation of mouse intestinal epithelial cells, *Mutat. Res.*, **252**, 101.
- Ohyama, W., M. Urakawa and T. Tokumitsu (1992) Chromosome aberrations induced by MMC in the intestinal epithelial cells of mice, *Mutat. Res.*, **272**, 278.
- Ohyama, W., M. Urakawa and T. Tokumitsu (1993) Chromosome aberrations in the intestinal epithelial cells of mice treated with 1,2-dimethylhydrazine, *Mutat. Res.*, **292**, 287.
- Tokumitsu, T. (1976) Chromosomal study on mouse intestinal mucosal cells, with a note on aberrations induced by a carcinogen, MNNG, *Proc. Japan. Acad.*, **52**, 513-516.
- Wargovich, M. J., A. Medline and W. R. Bruce (1983) Early histopathologic events to evolution of colon cancer in C57BL/6 and CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine, *JNCI*, **71**, 125-131.

日本放射線影響学会・日本環境変異原学会 合同シンポジウム
「生体リスク評価の現状と未来：動物モデルから人へ」

遺伝子多型と発癌リスク

Genetic polymorphism and human cancer risk

川尻 要

Kaname Kawajiri

埼玉県立がんセンター研究所生化学部
362 埼玉県北足立郡伊奈町小室 818

Department of Biochemistry, Saitama Cancer Center Research Institute,
818 Komuro, Inamachi, Kitaadachi-gun, Saitama 362, Japan

(受付：1995年9月30日；受理：1995年9月30日)

Summary

A close association of smoking-associated lung cancer incidence with the *Msp* I and *Ile-Val* polymorphisms of *CYP1A1* gene was found in a Japanese population in terms of genotype frequency comparison and cigarette dose response. A synergistic increase in susceptibility to lung cancer was observed when the susceptible genotypes of *CYP1A1* were combined with a deficient *GSTM1* genotype. Individual difference in expression levels of *Ahr* and *Arnt* mRNAs was observed, and the expression levels of *CYP1A1* appeared to associate with those of transcriptional factors. The *Ahr* protein has two different structures, ascribed to one amino acid replacement at codon 554 of Arg by Lys. However, this germ line polymorphism did not show a significant association with AHH inducibility nor lung cancer incidence. The *p53* gene alterations in lung cancer tissues were more frequently observed among the patients with a susceptible allele of *CYP1A1* gene.

Keywords: CYP1A1, genetic polymorphism, lung cancer, cancer susceptibility, *p53* mutations

1. はじめに

化学発癌物質の代謝は Phase I の薬物代謝酵素である P450 による活性化反応と Phase II のさまざまな転移酵素による解毒化反応により構成されており、この代謝バランスが発癌感受性の個人差に重要な役割をはたしていると指摘されている (Ernster *et al.*, 1991)。P450 は還元型で一酸化炭素と結合し、450 nm に吸収極大を示す一群のヘムタンパク質の総称であり、多くの分子種が存在し、外来性の化学物質の代謝だけでなく、内因性のステロイドホルモンや胆汁酸などの重要な生理活性物質の合成、代謝に関与している (Omura *et al.*, 1993)。ヒトの P450 については現在までのところ 13 種のファミリーが同定されているがこれらの中で CYP1A, CYP2, CYP3 などに属する特定の P450 分子種がさまざまな化学発癌物質の活性化代謝に関与していることが知られている (Kawajiri *et al.*, 1991)。

最も典型的な化学発癌と考えられる肺癌はその罹患へのリスク要因として喫煙があるが、最近の分子疫学的な研究の結果、肺癌発症においてはタバコ煙中に含まれている発癌物質を代謝する酵素の遺伝的な個人差と喫煙量との相互作用の結果として発癌へのリスクが規定されているものと考えられている。タバコ煙中にはさまざまな発癌物質が含まれており活性化に関与する P450 も異な

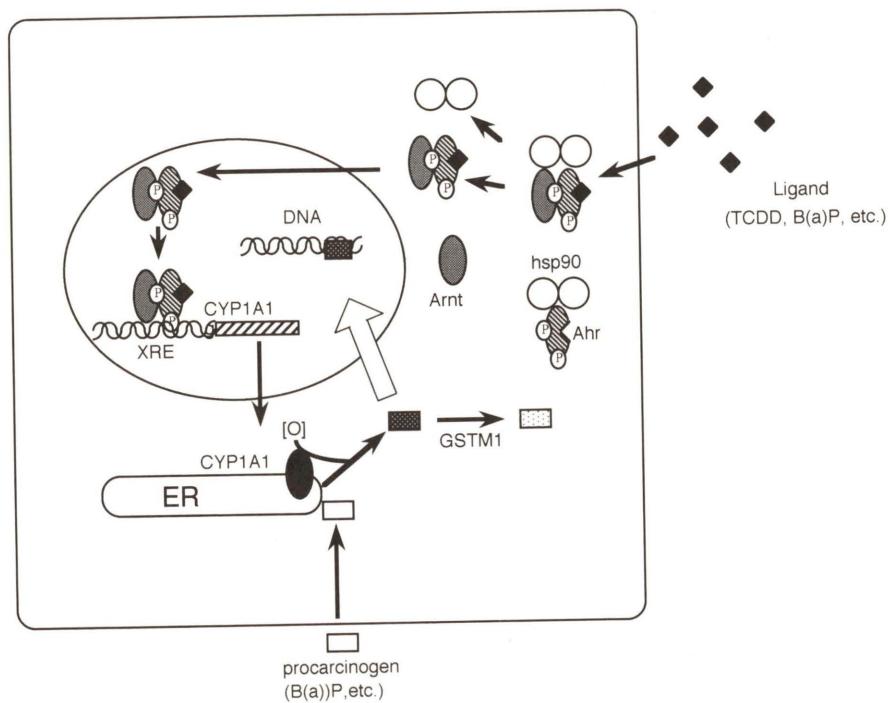


Fig. 1. Schematic representation of benzo(a)pyrene metabolism.

る。ここでは主に筆者らが行っている芳香族炭化水素（ベンゾピレンなど）の活性化に関与しているCYP1A1を中心として喫煙との相互作用の視点より肺癌への遺伝的感感受性を論じたい。Fig. 1にはベンゾピレン代謝の細胞内での概略を示してある。

2. 薬物代謝酵素の遺伝子多型と肺癌感受性

(a) CYP1A1 遺伝子多型と肺癌感受性

芳香族炭化水素は古くより研究が行われている代表的な化学発癌物質でありタバコ煙中に含まれているベンゾピレンは重要な肺癌誘発物質の一つである。CYP1A1はヒトをふくめ多くの動物種に存在しており、ヒトにおいてはextrahepaticに発現している。ヒトの肺で発現しているCYP1A1はベンゾピレン代謝において主に中間代謝体である7,8-ジヒドロキシ-7,8-ジヒドロベンゾピレンからgenotoxicな代謝体の形成に関与している(Shimada et al., 1992)。ヒトCYP1A1遺伝子は7個のエクソンの512のアミノ酸から構成されている(Jaiswal et al., 1985; Kawajiri et al., 1986)。この

遺伝子のpoly A付加シグナルより約250塩基下流にTからCへの突然変異があり(Hayashi et al., 1991)。その結果、制限酵素Msp Iでの多型が出現する。また、P450のヘムが配位するのに必要なCysのごく近傍にアミノ酸がイソロイシン(Ile)からバリン(Val)に置換する多型が存在し、この二つの多型は遺伝的に強くassociateしている(Hayashi et al., 1991)。これらの多型に基づく遺伝子型はPCRを使うことにより容易に同定できる。

健常者集団におけるCYP1A1遺伝子型の分布と肺癌患者中の遺伝子型の分布を比較した(Kawajiri et al., 1990, 1993)。一般住民コホートの約2500名の健常者の白血球より単離したDNAより無作為に選んだ375名のDNAについて遺伝子型の判別を行い、Msp I多型でのA型(m1/m1), B型(m1/m2), C型(m2/m2)の分布を調べたところそれぞれ166, 169, 40名であった。これから計算されたm1, m2の遺伝子頻度はそれぞれ0.67, 0.33でありHardy-Weinbergの法則を満たしている。尚、m1はMsp I siteをもたないalleleであり、

m2はsiteの存在するalleleである。同様にIle-Val多型についても解析したところ358名中、Ile/Ile型233名、Ile/Val型108名、Val/Val型17名であり、Ile-Val型の遺伝子頻度はそれぞれ0.80, 0.20であった(Hayashi et al., 1992)。健常者での分布を基本にして各種癌患者における遺伝子型の分布を調べたところC型、Val/Val型が肺癌(327名)でのみ有意に高い分布を示していることが明らかになった。また、肺癌ではその組織型により喫煙との因果関係が異なると考えられているので組織型別によるCYP1A1の遺伝子型分布を検討したところ喫煙と最も関連する扁平上皮癌において高感受性の遺伝子型が有意に健常者集団の分布に比べ高いことが示された。

(b) CYP1A1, GSTM1 遺伝子多型の組み合わせによる肺癌感受性

CYP1A1により生じたベンゾピレンの活性代謝体はMu型グルタチオン-S-転移酵素(GSTM1)によりその一部は解毒されるが、この遺伝子にも欠損(変異)による多型が存在し、両方のalleleが欠損しているヒトの酵素活性は非常に弱いことも知られている(Seidegård et al., 1988)。PCRをもちいての遺伝子型判定の結果、健常者においては少なくとも一方は正常なGSTM1遺伝子を持つGSTM1(+)のヒトは53.4%, GSTM1(-)は46.6%であった。一方、肺癌全体ではGSTM1(-)は55.6%，扁平上皮癌では65.7%を占め、ともに健常者の遺伝子型分布とは異なることが示された。

CYP1A1とGSTM1の代謝反応は細胞内では連続した酵素反応であるので二つの遺伝子の多型を組み合わせて発癌へのリスクを検討した(Fig. 2)。健常者におけるGSTM1多型の分布状態はCYP1A1の遺伝子型別でみてもほぼ等しいことが示されたのでこの二つの遺伝子の多型は完全に独立した現象である。しかしながら喫煙由来のKreyberg I型、特に扁平上皮癌においてはCYP1A1のC型、Val/Val型においてはGSTM1多型の分布状態が大きく変動していることが明らかになった。すなわち、GSTM1(-)の方が(+)に比べ5倍以上も多い分布を示した。健常者では

2.2%しかみられないVal/ValでGSTM1(-)の遺伝子型は扁平上皮癌では10.6%をしめた。Ile/IleでGSTM1(+)に比べVal/ValでGSTM1(-)の組み合わせの遺伝子型を持つヒトは約7倍ほどオッズ比で高い発癌リスクをもつことが明らかになった。組み合わせによるリスクの増加はそれぞれの遺伝子型単独における場合よりもsynergisticに作用していることは明らかであり、これら二つの遺伝的肺癌危険因子がetiologicalに関連していることを示唆している(Hayashi et al., 1992)。Val型のCYP1A1の方がIle型よりも高いベンゾピレン活性化能を持つことを考慮すると(Kawajiri et al., 1993)、synergisticなリスクの増加は、発癌物質代謝の活性化と解毒化のバランスが遺伝的にアンバランスであることに起因することを示唆している。

(c) 転写因子Ahr遺伝子多型の肺癌感受性への影響

Fig. 1に示したように細胞内にベンゾピレンなどの芳香族炭化水素がとりこまれると細胞質にhsp90と結合して存在しているaryl hydrocarbon receptor(Ahr)にリガンドが結合する。その際にhsp90はAhrより解離し、リガンドが結合したAhrは核に移行し、aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator(Arnt)と呼ばれる因子とheterodimerを形成しCYP1A1遺伝子のXRE領域(Xenobiotic Responsive Element)に結合してCYP1A1の誘導的発現に関与すると考えられている(Swanson et al., 1993)。従って、もし転写因子Ahrの発現量が個人間で大きな差があったり、リガンドとのaffinityが異なるようなAhrがヒト集団中に遺伝子多型として存在しているならば重要な肺癌感受性に関与する遺伝的素因である。単離したヒトAhr, Arnt遺伝子の遺伝情報によりRT-PCR法を利用してmRNAの組織内分布、及び発現量の個人差を検討した(Hayashi et al., 1994)。Ahr, Arntは肺、腎臓、肝臓、血液など様々な組織で発現しており、特に肺で顕著であった。また、発現量の個人差を見るために、健常人の末梢血よりRNAを単離しGAPDHをinternal controlとして比較したところ、Ahr, Arntはすべてのヒト

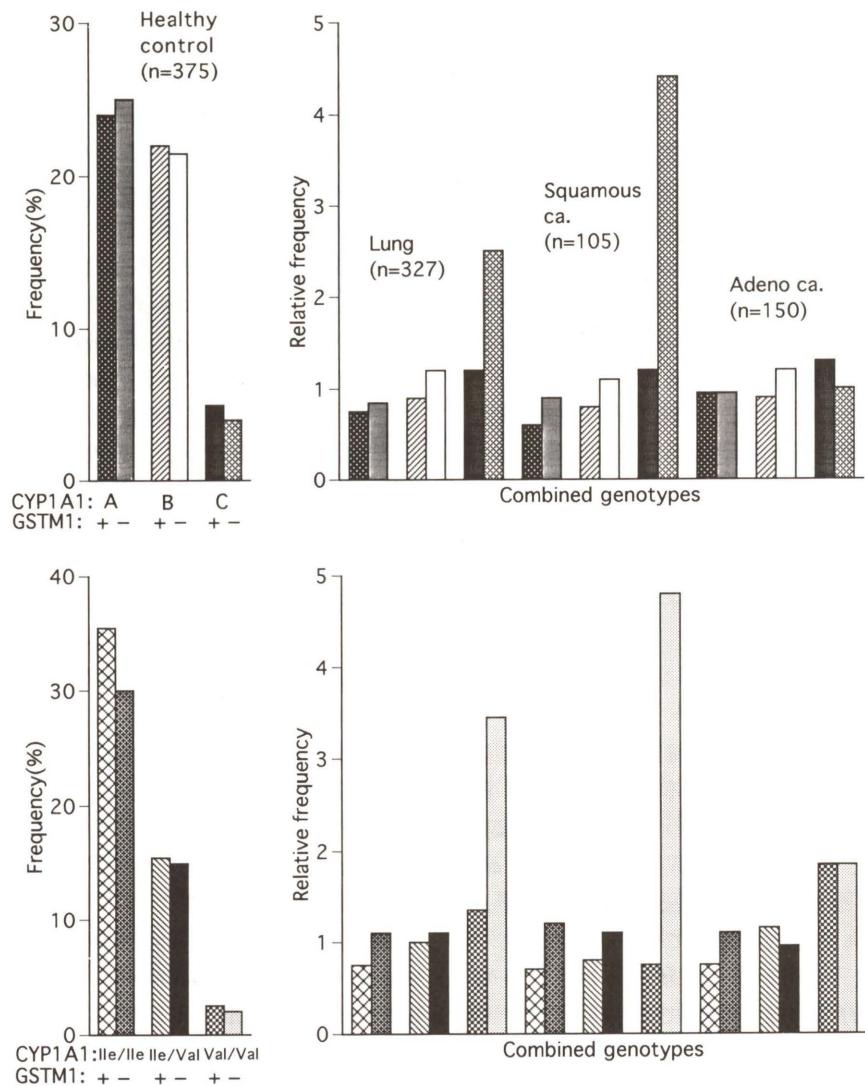


Fig. 2. Distribution of combined genotypes of *CYP1A1* and *GSTM1* genes in lung cancer patients and healthy controls.

の末梢血で発現しており約5倍の発現量の個人差が見られた。Ahr, Arnt, 及び *CYP1A1*との発現量の関連性は Ahr と Arnt との間で最も強く、相互に heterodimer として機能する事と関係するものと考えられる。また、転写因子の発現量の多いヒトほど *CYP1A1* の発現量も多いこと、喫煙により Ahr, Arnt の発現量が影響を受けることも明らかになった。以上の結果は転写因子 Ahr, Arnt の発現量も肺癌感受性のリスク要因として関与していることを示唆している。

一方、TCDD やベンゾピレンなどに応答しやす

い系統 (C57BL など) のマウスの Ahr は応答にくい系統 (DBA など) の Ahr に比べてアミノ酸が 43 残基少なく、さらに 375 残基目の Val が Ala に置換されている。これらの相違がリガンドに対する親和性を高め *CYP1A1* の誘導能などに影響を与えていていると考えられている (Ema *et al.*, 1994)。変更したヒト Ahr cDNA を用いての発現タンパクと TCDD との affinity においても同様な結果が示されている。報告されているヒト Ahr のアミノ酸残基数は DBA と同様に 848 であり 375 残基目の Val に相当する 381 残基目のアミノ酸は

Val である。そこで PCR-SSCP 法を用いてこの領域の遺伝子多型を検討した結果、少なくとも日本人の集団中にはマウスの系統差で観察された部位での多型は存在しないことが明らかになった (Kawajiri *et al.*, 1995)。

PCR-SSCP での多型の全 coding region に及ぶ解析の結果、新たに 554 残基目の Arg が Lys に置換している多型が見いだされた。健常者 DNA library を用いて遺伝子型の分布を調べたところ Arg/Arg, Arg/Lys, Lys/Lys 型はそれぞれ 34, 46, 20% をしめ、Hardy-Weinberg の法則を満たしている。しかしながら約 320 名の肺癌患者の遺伝子型の分布を調べたところ統計的に有意な差は健常者との間で見られなかった。また、*CYP1A1* の遺伝子型とも無関係であることが明らかになった。これらの結果は Ahr の遺伝子型と AHH 活性の誘導能との間にも相関性はないことからも裏づけられた。従って、ヒト Ahr 遺伝子においてはリガンドとの affinity に影響を与えるような遺伝子型多型はないものと考えられる。

3. 喫煙量と遺伝子型の相互作用からみた肺癌感受性

(a) 発症までの喫煙量と遺伝子型との関係

タバコ煙中に含まれる発癌物質の代謝的活性化に関する *CYP1A1* のある特定の遺伝子型が肺癌発生に高い感受性を示すということから、遺伝子型により肺癌発症までの喫煙量に差があることが考えられる。この点を明らかにするために、喫煙との因果関係が最も強い肺扁平上皮癌の患者について遺伝子型と生涯喫煙本数との関係を調べた (Nakachi *et al.*, 1991, 1993)。その結果、85 名の患者の *CYP1A1* の Msp I 多型の遺伝子型は A 型 33 名、B 型 33 名、C 型 19 名であり、遺伝子型ごとの発症年齢はほぼ等しかったにもかかわらず平均生涯喫煙本数はそれぞれ 44, 41, 32 万本であった。すなわち、感受性の高い C 型は統計的に有意に少ない喫煙量で発症しており、患者の分布も喫煙量が少ない方にシフトしていた。同様なことが Ile-Val 多型でも観察された。以上の結果は *CYP1A1* で代謝されるベンゾピレンの代謝産物の質的、量的相違が遺伝子型によってあることを示唆している。

次に *CYP1A1* と *GSTM1* の二つの遺伝子の多型を組み合わせて喫煙量との関係を解析した。その結果、A 型で *GSTM1*(+) の遺伝子型の患者 (12 名、平均年齢 65 才) は 48 万本で発癌しているのに対し、C 型で *GSTM1*(-) の場合は (12 名、平均年齢 67 才) 32 万本であった。これらの遺伝子型の組み合わせと喫煙量との関係は患者数が十分ではないにしても、明らかな grading、すなわち発癌高感受性の遺伝子型の組み合わせほど少ない喫煙量で発症しており、薬物代謝酵素の遺伝的に規定された代謝バランスと喫煙との相互作用が発癌感受性の個人差を決めている重要な因子であることを示している。

(b) 遺伝子型と喫煙量の相互作用からみた肺癌リスク

遺伝子型による肺癌への相対危険を定量的に評価するためにケース・コントロール研究を行い喫煙量を考慮して解析した。すなわち肺扁平上皮癌患者 1 名につき、性・年齢を一致させた健常者を前述した 2500 名のコホート集団より選んで 170 名の対照群を設定し、遺伝子型及び生涯喫煙本数を比較した。対照群では当然のことながら遺伝子型による喫煙量の差ではなく平均生涯喫煙量は 22 万本であった。また、遺伝子型分布は Hardy-Weinberg の法則を満たしており集団遺伝学的にも対照群が適切に設定されていることを示している。C 型の発症までの平均生涯喫煙量である 32 万本を喫煙量の区切り値とし、それ以下および以上の喫煙レベルでのリスクをオッズ比で求めた。32 万本以下の喫煙量における A 型で *GSTM1*(+) の人の発癌リスクを基準にすると C 型で *GSTM1*(-) という遺伝子型の組み合わせを持つ人は 16 倍もの高いリスクを示したにも関わらず、高い喫煙レベルでは 2.2 倍であった。同様な結果が Ile-Val 多型と *GSTM1* 多型との組み合わせにおいても明らかになった。これらの結果より *CYP1A1* や *GSTM1* の遺伝子型による肺癌の感受性は低い喫煙量で顕著であり、ヘビースモーカーにおいては遺伝的差異は少くなり、むしろ環境要因としての喫煙の影響が支配的になることが示

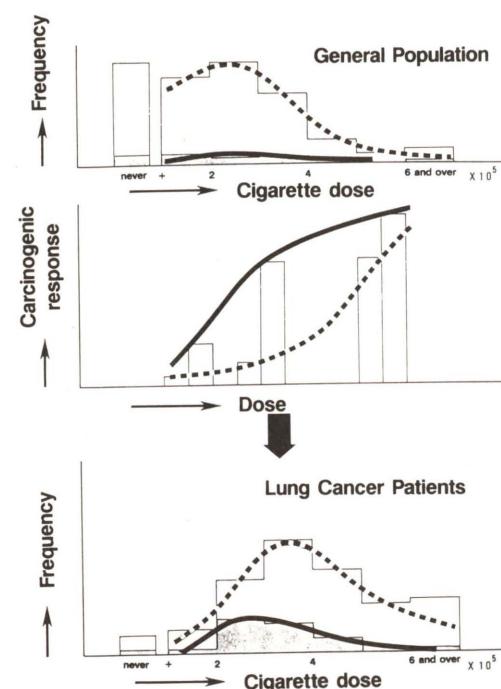


Fig. 3. Summary of the genotype-environment interaction in terms of genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and cigarette dose. Upper graph demonstrate the distribution of genotypes in general population as functions of cigarette dose. Solid and dashed lines show a susceptible and non-susceptible genotypes, respectively. Middle graph shows dose-response relations by the genotypes obtained by a case-control study. The observed cigarette distribution among patients by the genotypes is a mathematical product of the cigarette distribution among general population and the dose-response relations.

された。遺伝子型と喫煙量との相互作用については Fig. 3 に模式的に示した。

4. 喫煙と p53 遺伝子の突然変異

ヒトの肺癌においてもその発生、進展に複数の癌抑制遺伝子の不活性化、癌遺伝子の活性化が必要であることが明らかにされている。癌抑制遺伝子の不活性化としてはクロモソーム 3p, 13q (RB 遺伝子), 17p (p53 遺伝子) の欠失や突然変異が、癌遺伝子としては Ki-Ras, c-myc 遺伝子などの突然変異や異常発現が知られている。そのような肺癌の標的遺伝子の中で p53 遺伝子変異は最も高頻

度に見られる遺伝子変化のひとつであり、扁平上皮癌で 50%, 腺癌で 30% 程度の患者で観察されている (Takahashi *et al.*, 1989)。p53 遺伝子は細胞周期に関連する遺伝子の発現を調節する転写因子として知られており、p53 遺伝子異常の肺癌における重要性は他の遺伝子異常を持つ肺癌の細胞株に正常な p53 を加えると細胞の増殖が抑えられることよりも示唆されている。

現在までのところ喫煙由来の肺癌発生のメカニズムは以下のようである。正常気管支、肺胞において committed stem cell は分化、増殖をして正常な気管支上皮や肺胞上皮を構築している。喫煙中のベンゾピレンのような様々な環境発癌物質にさらされることにより癌抑制遺伝子に突然変異が誘発され機能不活性化が生じる。このような初期の遺伝子変化が引き金となりクローリング増殖をもたらし、さらに多くの遺伝子に変異が誘発されるようになる。その結果、細胞は次第に悪性度を増し転移能をもった肺癌を形成するものと考えられる。

しかしながら、肺癌への遺伝的敏感性と標的遺伝子の変異との関係については未だ不明の点が多い。おそらく CYP1A1 や GSTM1 多型などの発癌の initiation に関する遺伝的素因は初期に生じる標的遺伝子の突然変異の発生頻度に影響を与えていた可能性があると考えられる。現在までのところ、p53 遺伝子の変異は肺癌の前癌病変と考えられている dysplasia の段階でも観察されており、肺癌発生の初期に生じる遺伝子変化の一つと思われる (Sozzi *et al.*, 1992)。また、肺癌における p53 遺伝子変異は生涯喫煙量と正の相関性が見られる報告されており (Suzuki *et al.*, 1992), G : T transversion 型の変異が高頻度に見られるのが特徴である。これらの結果は喫煙中のベンゾピレンが p53 遺伝子に作用する発癌物質であることを示唆している。従って、肺癌組織の p53 遺伝子の突然変異の発生頻度に CYP1A1 や GSTM1 多型などの遺伝的素因が関連しているかどうかを調べることは、肺癌の発生機構を理解する上で重要と思われる (Kawajiri *et al.*, 1996)。

(a) p53 遺伝子変異と喫煙

原発性非小細胞肺癌患者 187 名 (扁平上皮癌 75

Table 1. Mutations of the p53 gene related to smoking dose

Smoking status	p53 gene		(OR)
	Normal	Mutated	
Never smokers	27	7	(1.0)
Smokers ^a	92	56	(2.35)
B.I. \leq 500	8	2	(0.96)
500 < B.I. \leq 1000	52	23	(1.71)
B.I. \geq 1000	32	31	(3.74) ^b

^a Current or ex-smokers.

^b P < 0.01; 95%CI, 1.46–9.56.

Table 2. Aberrations of the p53 gene in combined genotyping of the CYP1A1 and the GSTM1 polymorphisms

Combined genotypes	p53		(OR)	
	CYP1A1	GSTM1		
I) MspI polymorphism				
A	(+)		21	5 (19.2) ^a
	(–)		20	11 (35.5)
B	(+)		17	14 (37.8)
	(–)		20	12 (37.5)
C	(+)		3	3 (50.0)
	(–)		5	11 (68.8)
II) Ile-Val polymorphism				
Ile/Ile	(+)		28	12 (30.0)
	(–)		29	19 (39.6)
Ile/Val	(+)		18	8 (30.8)
	(–)		14	8 (36.4)
Val/Val	(+)		1	2 (66.7)
	(–)		2	7 (77.8)

^a Numbers in parentheses, percentage.

^b P < 0.05; 95%CI, 1.07–11.21.

^c P < 0.005; 95%CI, 2.38–35.93.

^d P < 0.01; 95%CI, 1.74–38.47.

としていた。

次に p53 遺伝子の変異を CYP1A1 と GSTM1 多型の組み合わせの視点より解析してみると最も低感受性型の A 型で GSTM1(+) では 19% (5/26) に対し高感受性型の C 型で GSTM1(–) の組み合せの人の場合は 69% (11/16) であった。これをオッズ比であらわすと約 9 倍のことになる。同様な結果が Ile-Val 多型と GSTM1 の組み合せでも見られた (Table 2)。すなわち、CYP1A1 で観察された肺癌組織での p53 遺伝子の遺伝子型ごとの突然変異頻度が解毒酵素の多型と組み合わせることにより変異の頻度の差が増幅された。PCR-SSCP 法の実験結果を確認すると同時に代謝酵素の遺伝子型により突然変異のパターンに差があるかどうかを調べる目的で p53 の変異部位を PCR direct sequencing で確認した。その結果、transversion 型は 57%, transition 型は 43% であり transversion 型の中でも G から T への変異が major (23%) であり、肺癌でみられていた従来からの特徴が確認された。この変異を遺伝子型ごとに分類したところ有意な差は見られなかった。

5. おわりに

肺癌の多くは喫煙と密接に関連しておりタバコ煙中に含まれているベンゾピレンが誘発物質の一つであると考えられている。ベンゾピレンを代謝的に活性化、解毒化する *CYP1A1, GSTM1* の遺伝子多型を指標として肺癌感受性を遺伝子型分布の比較、及び喫煙量との関係の視点より明らかにした。また、化学発癌の initiation 関与する遺伝的素因である代謝酵素の多型の視点より肺癌組織での *p53* 遺伝子の突然変異との関係を検討したことから発癌高感受性の遺伝子型を持つ患者ほど高い頻度で変異が観察された。遺伝的肺癌感受性に関与する *CYP1A1*を中心とする代謝酵素の遺伝子多型が肺癌標的遺伝子の突然変異の発生頻度に影響を与えるという我々の研究結果は肺癌発生のメカニズムが遺伝的バックグラウンドで異なるという可能性を示唆するとともに予後との関連性を詳細に検討することの重要性を示していると思われる。

引用文献

- Ema, M., N. Ohe, M. Suzuki, J. Mimura, K. Sogawa, S. Ikawa and Y. Fujii-Kuriyama (1994) Dioxine-binding activities of polymorphic forms of mouse and human Ah receptors. *J. Biol. Chem.*, **269**, 27337–27343.
- Ernster, L., H. Esumi, Y. Fujii-Kuriyama, H. V. Gelboin, R. Kato and T. Sugimura (eds.) (1991) Xenobiotics and cancer, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 1–368.
- Hayashi, S.-I., J. Watanabe and K. Kawajiri (1992) High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 866–870.
- Hayashi, S.-I., J. Watanabe, K. Nakachi, H. Eguchi, O. Gotoh and K. Kawajiri (1994) Interindividual differences in expression of human Ah receptor and related P 450 genes. *Carcinogenesis*, **15**, 801–806.
- Hayashi, S.-I., J. Watanabe, K. Nakachi and K. Kawajiri (1991) Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA 1 gene. *J. Biochem.*, **110**, 407–411.
- Jaiswal, A. K., F. J. Gonzalez and D. W. Nebert (1985) Human P-450 gene structure and correlation of mRNA with genetic differences in benzo(a)pyrene metabolism. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4503–4520.
- Kawajiri, K., H. Eguchi, K. Nakachi, T. Sekiya and M. Yamamoto (1996) Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the *p53* gene in lung cancer. *Cancer Res.*, in press.
- Kawajiri, K. and Y. Fujii-Kuriyama (1991) P450 and cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1325–1335.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, K. Imai, J. Watanabe and S.-I. Hayashi (1993) The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **14**, 77–87.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, K. Imai, A. Yoshii, N. Shinoda and J. Watanabe (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Letter*, **263**, 131–133.
- Kawajiri, K., J. Watanabe, H. Eguchi, K. Nakachi, C. Kiyohara and S. Hayashi (1995) Polymorphisms of human Ah receptor gene are not involved in lung cancer. *Pharmacogenetics*, **5**, 151–158.
- Kawajiri, K., J. Watanabe, O. Gotoh, Y. Tagashira, K. Sogawa and Y. Fujii-Kuriyama (1986) Structure and drug inducibility of the human cytochrome P450c gene. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 219–225.
- Nakachi, K., K. Imai, S.-I. Hayashi and K. Kawajiri (1993) Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.*, **53**, 2994–2999.
- Nakachi, K., K. Imai, S.-I. Hayashi, J. Watanabe and K. Kawajiri (1991) Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res.*, **51**, 5177–5180.
- Omura, T., Y. Ishimura and Y. Fujii-Kuriyama (eds.) (1993) Cytochrome P450, Kodansha, Tokyo, Japan, pp. 1–292.
- Seidegård, J., W. R. Vorachek, R. W. Pero and W. R. Pearson (1988) Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7293–7297.
- Shimada, T., C.-H. Yun, H. Yamazaki, J. C. Gautier, P. H. Beaune and F. P. Guengerich (1992) Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol. Pharmacol.*, **41**, 856–86.
- Sozzi, G., M. Miozzo, R. Donghi, S. Pillotti, C. T. Cariani, U. Pastorino, G. P. Porta and M. A. Pierotti (1992) Deletion of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res.*, **52**, 6079–6082.
- Suzuki, H., T. Takahashi, T. Kuroishi, M. Suyama, Y. Ariyoshi, T. Takahashi and R. Ueda (1992) p53 Mutations in non-small cell lung cancer in Japan: Association between mutations and smoking. *Cancer Res.*, **52**, 734–736.
- Swanson, H. I. and A. Bradfield (1993) The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics*, **3**, 213–230.
- Takahashi, T., M. M. Nau, I. Chiba, M. J. Birrer, R. K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A. F. Gazdar and J. D. Minna (1989) p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 1989, **246**, 491–494.

Environ. Mut. Res. Commun., **17**: 279–283 (1996)

日本放射線影響学会・日本環境変異原学会 合同シンポジウム
「生体リスク評価の現状と未来：動物モデルから人へ」

食事由来のフィトエストロゲンとがん予防

Phytoestrogens and cancer prevention

渡辺 昌¹, 高橋東生², Adlercreutz, H.³Shaw Watanabe¹, Tosei Takahashi² and Herman Adlercreutz³¹国立がんセンター研究所 104 東京都中央区築地 5-1-1²東京農業大学 156 東京都世田谷区桜 1-1-1³ヘルシンキ大学 Haartmainkatu 4, SF-00290, Helsinki, Finland¹National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104²Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakura, Setagaya-ku, Tokyo 156³University of Helsinki, Haartmainkatu 4, SF-00290, Helsinki, Finland

(受付：1996年1月5日；受理：1996年1月5日)

Summary

Occurrence of hormone-related cancers are also influenced by the exogenous hormones. Phytoestrogens are groups of chemicals which originate from plant and more than 50 substances are extracted and confirmed their estrogen like activities. Correlation analyses between standardized mortality ratio by prefecture and various food consumption by prefecture in Japan revealed that the colon, breast and ovary cancer was inversely related with consumption of tofu (soy bean curd) and tofu products (Watanabe and Koessel, 1993). Analyses of urinary, feces and serum phytoestrogens were performed with the nutritional survey in Nagano prefecture. Total amount of phytoestrogens excreted in the 24 hr urine was 3.7 μmole equol, 1.1 μmole O-desmethylangolensin, 1.6 μmole enterolactone. Daidzein and genistein were 11 and 6 nmole, respectively. Serum concentration of daidzein and genistein showed a good correlation with urinary excretion. Tofu and natto (typical soybean products) intake attributed to the amount of isoflavonoid. Concentration of isoflavonoids among Japanese were 8 times higher than those of Finnish men, and these difference may explain the different cancer incidence between two countries.

Keywords: diet and cancer, phytoestrogens, isoflavonoid, lignan, epidemiology

緒 言

緑黄色野菜の摂取が多い人はがんの危険性が少ないということは多くの疫学研究の一貫するところであったが、Shekellら(1981)による肺がん予防効果を示唆する論文によってベータカロチンが予防効果をもつとみなされた。がん予防という夢のような話であった時代から、発がん抑制物質をとることによって積極的にがん予防ができる道筋が見えてきたからである。現在がん予防の可能

性のある化合物は600以上もあるが、少なくともその内数10種が検討対象になっている。数年前に始まった米国のデザイナーフードプログラムにより植物性食品中のがん予防効果のあるものの研究が大規模に進められ、ニンニク、甘草、柑橘類、セリ科やウリ科の野菜や果実、大豆やお茶が集中的に調べられた。現在、発がん予防作用のあるものを大別すると、カロテン類、テルペン類、ポリフェノール類、フラボン類、含硫化物などに分

けうる (Huan et al., 1994)。我々は大腸がんの地域差を研究しているうちに豆腐など大豆食品の摂取量が多いほど大腸がんや乳がん、卵巣がんの死亡率が低いことを発見し、大豆中の genistein や daidzein のような isoflavanoid ががん抑制効果をもつと考えるに至った。本論文は長野県の食事調査とともに行った食品摂取状況と各種 phytoestrogen の血中、尿中、糞便中の濃度について報告し、代謝状態について考察した。

方 法

長野県民栄養調査の一環として、大腸がんの頻度の異なる中野保健所、上田保健所、小諸保健所、伊那保健所管内の 30 世帯程度の集落をランダムに選び、全世帯の栄養調査をおこなった。食事調査は 3 日間の秤量法により個人単位で摂取量を記録し栄養士が面接により確認した。食品は日本食品標準成分表(4訂)により 1624 品目に分け、栄養素を計算した。多変量解析に際しては似通った食品をほぼ似た重量になるように集計し 90 項目にまとめた。各世帯メンバーは 2 日目、または 3 日目に朝第 2 尿から早朝第 1 尿までの 24 時間の蓄尿を行ったが、蓄尿ボトルにはビタミン C 1 g と防腐剤として 1% アザイドを 1 ml 加えた。各世帯の男性は尿を持参する際に当日朝の大便も採取し、持参した。便は重量測定後、ただちにドライアイスで凍結した。検診時に 20 ml の血液を採取し、一般生化学検査とともに血中 phytoestrogen 測定に供した。phytoestrogen はマスクベクトロメトリー法によりヘルシンキ大学で測定した (Adlercreutz et al., 1994)。各種データ解析は SPSS プログラムパッケージを用いておこなった。

結果

本研究への参加者と参加率、年齢分布を表 1 に示すが、各地域共 80% 以上の参加率であった (Table 1)。24 時間尿中の phytoestrogen は isoflavanoid として daidzein, genistein, equol, O-desmethyl angolensin (O-DMA) の 4 種、lignan として enterolactone, enterodiol, matairesinol を測定した (Table 2)。尿中濃度は最終代謝産物の equol がもっとも多く 3.7 μmole であった (Fig. 1)。4 地域間の差よりも個人間の差の方が大きく、以後の分析は全例をまとめておこなった。

Table 1. Number of the participants and age distribution.

	n	Participation rates (%)	Age	n
Komoro	27	90.0	20-29	5
Ueda	26	86.7	30-39	23
Ina	26	86.7	40-49	17
Nakano	25	83.3	50-59	18
Total	104		60-69	28
			70-79	10
			Total	100

Table 2. Excreted amount of phytoestrogens in the 24 hr urine.

	Average ± SD	Min~max
Isoflavonoids (nmole)		
Daidzein	11.52 ± 9.08	0.45 ~ 47.13
Genistein	5.88 ± 5.51	0.15 ~ 38.39
Equol	3748.98 ± 5145.04	0.0 ~ 25124.01
O-DMA	1091.15 ± 1384.01	0.0 ~ 7364.30
Lignans (nmole)		
Enterolacton	1639.15 ± 3380.55	0.0 ~ 28021.61
Enterodiol	240.80 ± 381.76	0.0 ~ 3114.57
Matairesinol	60.51 ± 49.96	7.65 ~ 367.10

Table 3. Principal components analysis of phytoestrogens.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Daidzein	.89712	-.38934	-.03449
Genistein	.82297	-.37221	-.29337
Equol	.31317	.60465	-.33048
O-DMA	.49028	.01865	.57037
Enterolacton	.35166	.68177	.06014
Enterodiol	.29123	.70462	-.05839
Matairesinol	.12943	.09375	.71155

Initial statistics in principal component analysis showed that cumulative percent of daidzein, equol and enterodiol was 67.2%.

enterolactone が多く平均 1.7 μmole であった (Fig. 1)。4 地域間の差よりも個人間の差の方が大きく、以後の分析は全例をまとめておこなった。

各 phytoestrogen 間の関係を主成分分析でみると、daidzein と genistein は第 1 主成分に、enterodiol と enterolactone, equol は第 2 主成分に、matairesinol と O-DMA は第 3 主成分になった (Table 3)。これら尿中排泄量と、摂取された食品の関係をみると daidzein は豆腐、納豆、にんにく、genistein はきのこ、豆腐、納豆、O-DMA はにんにく、ねぎ、小豆、ほうれん草等の緑色野菜、ヨーグルトなどと、enterolactone や enterodiol はこんにゃくやさばや鮭、乳製品などと有意な関係を示した (Table 4)。equol は羊肉、ヨーグルトや鮭による寄与を示した。

尿中排泄量と血中濃度の比較をすると、活性型の遊離、あるいは硫酸抱合型と有意な相関を示したのは daidzein のみであったが、グルクロン酸抱合型の genistein は活性型の遊離型と有意な相関を示さなかった。

Urinary Phytoestrogens per Day

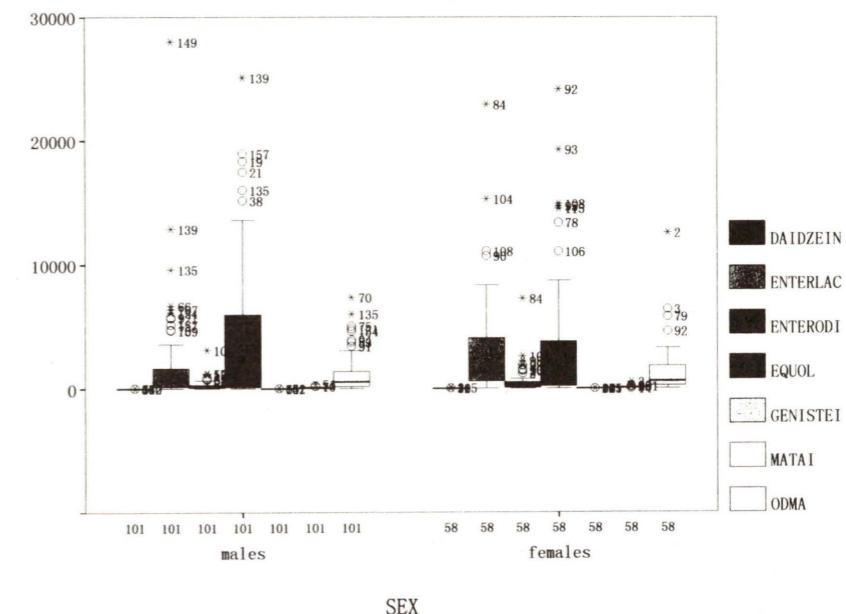


Fig. 1. Urinary excretion of phytoestrogens per day. Each column represents daidzein, enterolacton, enterodiol, equol, genistein, matairesinol, and o-desmethylangolensin from the left to right. Samples are 101 males and 58 female spouses. SPSS box-plot graph.

Table 4. Regression analyses for food items which related to the urinary phytoestrogen.

	R square		p
Daidzein:	.33779	bean curd	.0023
		fermented soy bean	.0020
		garlic	.0285
Genistein:	.3378	mushroom	.0000
		bean curd	.0002
		fermented soy bean	.0045
Equol:	.2689	mutton	.0028
		yogurt	.0001
		salmon	.0275
O-DMA	.4398	garlic	.0055
		leek	.0000
		white gourd-melon	.0007
		red beans	.0012
		spinach, etc.	.0151
		yogurt	.0186
Enterolacton	.1310	devil's tongue	.0034
		yogurt	.0414
Enterodiol	.1766	milk, cream	.0115
		blue skin fishes, like sardin, mackerel	.0085
Matairesinol	.1788	red bean	.0616
		green-yellow vegetable	.0030
		milk, cream	.0047
		spinach shungiku	.0461

Table 5. Relationship between urinary phytoestrogens and serum phytoestrogens.

Urine\serum	Free-sulph	Glucuronide
Daidzein	.6812**	.7361**
Genistein	.5174	.6695**
Equol	.3963	.5395*
O-DMA	.3278	.8673**
Enterolacton	.0367	.2753
Enterodiol	-.0889	.0414
Matairesinol	-.2526	.9143**

Pearson's association coefficient.

*p < 0.05, **p < 0.01.

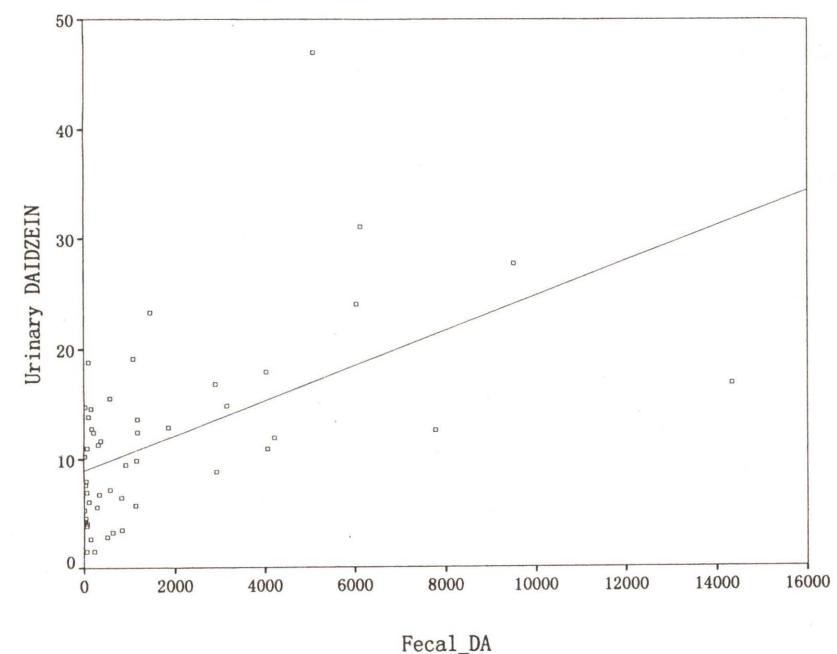


Fig. 2. Correlation between urinary and fecal daidzein excretion (nmole/day).

合型は enterolactone, enterodiol を除くすべての phytoestrogen で有意な関係を示した (Table 5)。糞便中の排泄量との関係をみると lignan の関係は有意な相関を示さないが、isoflavonoid は直線回帰を示し、0.5% 程度が吸収されているという可能性を示した (Fig. 2)。

考 案

大豆製品摂取と大腸がん、乳がん、卵巣がん等、estrogen が関与するとおもわれるがんの県別死亡率が有意な相関を示したことから、大豆中の isoflavonoid がこれらがんの発生に抑制的に働いていると思われる (Watanabe and Koessel, 1993)。日本人とフィンランド人の前立腺がん、乳がん、卵巣がんの死亡率は、フィンランド人のほうが日本人の二倍、あるいは、それ以上に高い。phytoestrogen の尿中排泄量をみると日本人の尿中 isoflavonoid 濃度は、フィンランド人の約四十倍も高い値を示した。血中濃度も日本人の方が数 10 倍高かった (Adlercreutz *et al.*, 1993)。大豆に豊富に含まれる isoflavonoid である daidzein や genistein が estrogen receptor と結合する為、性ホルモンの

結合を阻害し、乳癌、大腸癌の発生を抑えると考えられる (Adlercreutz *et al.*, 1995)。phytoestrogen は構造が女性ホルモンである estrogen に似ているため、estrogen receptor と結合して、競合的に estrogen 作用を抑制すると考えられている。genistein にはその後 protein tyrosine kinase という発がんに関係の深い酵素の阻害作用や血管新生を抑える作用も発見されているので、単純にホルモンレセプターを介する作用のみではなく、複合的な薬理作用が働いていると思われる。

日本食に多い野菜などの食物繊維中の lignan という物質の代謝産物である diphenol なども同様に estrogen レセプターと結合する。lignan の生理作用は濃度により異なることが知られていて、10 万分の 1 から百万分の 1 モル濃度では抗 estrogen 作用を現すが、10 万分の 1 モル濃度以上では逆に弱い estrogen 作用を現す。estrogen 作用以外にも百万分の 1 モル濃度で androgen から estrogen に変える aromatase という酵素を阻害するし、1000 分の 1 から 1 万分の 1 モル濃度では細胞分裂をとめたり、さまざまな酵素作用を障害することによって細胞死をおこす。多くの植物中のが

ん抑制化学物質のように、細胞や身体にとってかならずしも良い影響ばかりとはいえず、適正濃度についての研究が今後必要であろう。

また、isoflavonoid についていえば、食品中では配糖体の形で存在し、消化管内のグルコシダーゼにより糖の部分が切れて吸収されることになる。吸収された大部分はグロクロン酸抱合されて尿中に排泄されるが、胆汁中へ排泄され、腸内細菌によって抱合部が切断され、また再吸収されている可能性もある。フリーの形や硫酸エステル化された形が活性型であるが、硫酸抱合も腸内細菌の酵素によって行われている可能性がある。

調理後の状態、摂取されたものの消化管内での動態、吸収状態、吸収された後の代謝状態や生体の高分子との相互作用、排泄の状態などが、総合的に明らかにされねばならない。

謝 辞

本論文の要旨は原爆被爆 50 周年、日本放射線学会・環境変異原学会合同シンポジウムで講演した。世話人の秋山寛利博士および関係各位に深謝する。

参考文献

- Adlercreutz, H., H. Markkanen and S. Watanabe (1993) Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet*, **342**, 1209–1210.
- Adlercreutz, H., T. Fotsis, S. Watanabe, J. Lampe, K. Wahala T. Makela and T. Hase (1994) Determination of lignans and Isoflavonoids in plasma by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Cancer Detect. Prevent.*, **18**, 259–271.
- Adlercreutz, H., B. R. Goldin, S. L. Gorbach, K. A. V. Hockerstedt, S. Watanabe, E. K. Hamalainen, M. H. Markkanen, T. H. Makela, K. T. Wahala, T. A. Hase and T. Fotsis (1995) Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.* **125**, 757s–770s.
- Huan, M-T., T. Ferraro and C-T. Ho (1994) Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables. In: M. T. Huan, T. Osawa, C. T. Ho and R. T. Rosen (Eds.) *Food Phytochemicals for Cancer prevention, I. Fruit and Vegetables*. ACS Symposium Series 546, Amer. Chemical Soc., Washington DC, pp. 2–16.
- Shekell, R. B., M. Lepper, S. Lin *et al.* (1981) Dietary vitamin A and risk of cancer in the western electric study. *Lancet*, **2**, 1185–1189.
- Watanabe, S. and Y. Kobayashi (1993) Exogenous hormones and cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **23**, 1–13.
- Watanabe, S. and S. Koessel (1993) Colon cancer: approach from molecular epidemiology. *J. Epidemiol.*, **3**, 47–61.

第24回大会ミニシンポジウム-4
「環境変異原と生殖細胞の変異」

ショウジョウバエ卵母細胞のガス環境と染色体不分離

Gaseous micro-environment of oocytes and chromosomal non-disjunction in *Drosophila melanogaster*

藤川和男
Kazuo Fujikawa

近畿大学原子力研究所
577 東大阪市小若江3-4-1

Atomic Energy Research Institute, Kinki University,
Kowakae 3-4-1, Higashiosaka, Osaka 577, Japan

(受付: 1996年1月29日; 受理: 1996年1月29日)

Summary

Exposure of *D. melanogaster* females to pure CO₂ could lead to enhanced incidence of non-disjunctional mutants in the progeny, when oocytes were treated as metaphase I cells. On the other hand, treatment of metaphase I oocytes with X-rays was virtually ineffective in producing non-disjunctional mutants. The former finding supports Gaulden's (1989) idea that an oxygen deficit and a concomitant increase of CO₂ tension in the microenvironment of metaphase I oocytes is a major cause of trisomy 21 in the newborn human. The negative X-ray effect confirms the empirical rule that chromosome damage induced in metaphase I oocytes can hardly alter segregation patterns of chromosomes. Possible causes of the significant increase of trisomy 21 in West Berlin, nine months after the Chernobyl reactor accident (Sperling *et al.*, 1994), are discussed in the light of these results and other data.

Keywords: Drosophila, CO₂, non-disjunction, X-rays, oocyte

1. はじめに

ヒトの遺伝的障害の中で最も高頻度で出現するのは、第21染色体を過剰に有するダウントン症で、その出現頻度は13歳以降の母体年齢の増加に対してJ字型をなす(Erickson, 1978)。DNA多型マークを利用した最近の研究(Chakravarti *et al.*, 1992; Buraczynska *et al.*, 1992)は、トリソミー21の過剰染色体の大部分は母親の卵母細胞の第1還元分裂における染色体不分離によることを明らかにしている。しかし、染色体不分離の成因それ自体は未だに分かっていない。いろいろな仮説が提

唱されて盛んに論議されているのが現状である(Hassold and Epstein, 1992参照)。

いろいろな仮説の中で、私は、卵母細胞の環境を重視しているという点で、Gaulden(1989)の「毛細血管形成不全」説(compromised microcirculation hypothesis)に興味をもった。この仮説はヒト卵母細胞における染色体不分離は次のような一連の過程を経て起きると唱えている: ①ホルモンのアンバランス→②滤胞毛細血管の形成不全→③卵母細胞への酸素供給量の低下と④細胞外二酸化炭素の増加→⑤細胞内pHの低下→⑥紡錘体

障害→⑦染色体不分離。私は、ゴールデン説の根幹部分—「酸欠・炭酸ガス環境の第1還元分裂中期細胞への影響」—が本当にあるかどうかをショウジョウバエを用いて調べた。その結果は問題の部分に実験遺伝学的根拠を与えるものであった。

本稿ではこのような私の実験結果を紹介した後、チェルノブイリ原発事故の9ヶ月後（1987年1月）西ベルリンで多発したトリソミー21（Sperling et al., 1994）の原因について私見を述べる。

2. 炭酸ガス・酸欠環境の異数変異誘発効果

1) 効果は第1還元分裂中期細胞に特異的 劣性変異 yellow (y^- , 黄体色) と white-ivory (w^i ,

象牙色眼) で標識されたX染色体をもつキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ハエ) の羽化後4日目の未交配雌 [$X(y^- w^i)$ / $X(y^- w^i)$] を99.99%のCO₂ガスに120分暴露した後、野生型X染色体をもつ羽化後3~4日目の雌 [$X(y^+ w^+)/Y$] と一緒にして、6日間自由交配・自由産卵の状態においていた。最初の1日の産卵で処理時に成熟卵母細胞（第1還元分裂中期細胞）であった細胞を、2日目以降の産卵で処理時

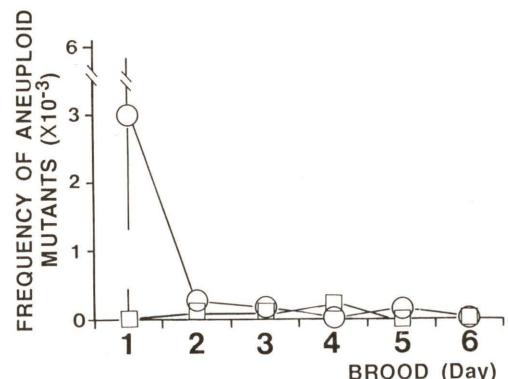


Fig. 1. Frequencies of X-chromosomal aneuploid mutants among F_1 adults of *D. melanogaster* females exposed to pure carbon dioxide for 120 min in relation to the sampling time of eggs. Symbols ○ and □ show the data from treated series and those from the control series, respectively. Eggs sampled in day-1 brood represent mature primary oocytes (metaphase I cells) and those in day-2 and latter broods immature primary oocytes (prophase I cells) at the time of the treatment.

に未熟卵母細胞（第1還元分裂前期細胞）であった細胞を、受精卵として順次採取した。各産卵群の受精卵が成虫になるのを待って、 $[X(y^- w^i)] / [X(y^- w^i)/Y]$ 雌と $[X(y^+ w^+)/O]$ 雌を異数変異体として検出した。

Fig. 1に示しているように、CO₂ガス処理後1日以内の産卵群からの成虫において、異数変異体の頻度が対照頻度以上に著増したが、2日目以降の産卵群からの成虫においては、変異体頻度は対照レベルであった。これらの結果は、炭酸ガス・酸欠環境は第1還元分裂中期にあった卵母細胞に限って影響を与え、X染色体の数的異常を誘発したこと示す。

2) 効果の大部分は染色体の不分離事象による
処理後の交配・産卵期間を最初の1日に限定して、CO₂ガスの処理（15~120分）実験を繰り返し行い、総数66956個体の成虫を観察してXXY型変異体を88個体、XO型変異体を117個体得た。無処理対照群では87650個体の成虫を観察して、4個体のXXY型変異体と17個体のXO型変異体を得た。対照群における頻度で補正すると、CO₂ガス処理によって誘発されたXXY型変異体は85個体、XO変異体は104個体となる。XXY型は染色体不分離が起きた証拠である。染色体不分離が起きるとXO型も同頻度で生ずるので、第1還元分裂中期にある卵母細胞を炭酸ガス・酸欠環境においていた結果、誘発された異数変異体のなかで、染色体の不分離事象による変異体が占める割合は90% (=85×2/189)と推定する。

Table 1. Types and frequencies of X-chromosomal aneuploid mutants detected after treatment of mature oocytes of *D. melanogaster* with X-rays and CO₂.

Treatment	No. of F_1 progeny	No. (freq., $\times 10^{-3}$) of aneuploid mutants	
		XXY	XO
Control	87650	4 (0.05)	17 (0.19)
CO ₂ (15 min)	34673	38 (1.1)*	46 (1.3)*
X-rays (4 Gy)	7530	1 (0.1)	73 (9.7)*

* $p \leq 0.01$.

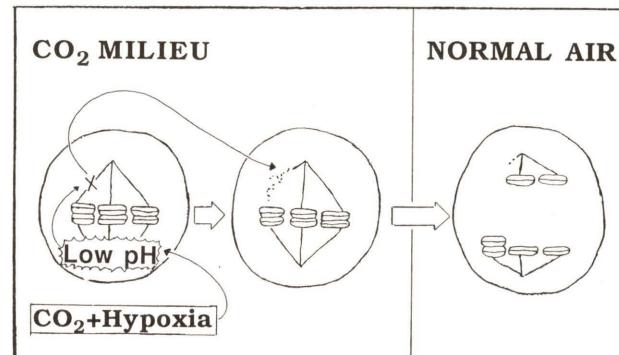


Fig. 2. A model that explains chromosomal non-disjunction in *D. melanogaster* oocytes treated at metaphase I with pure carbon dioxide. Mark × represents spindle damage.

3) 染色体不分離は紡錘体障害の結果

X線を成熟卵母細胞に4Gy照射すると、次世代で約1% (=74/7530)の高頻度で異数変異体が出現した。Table 1に示しているように、検出された異数変異体の中で、XXY型はわずか1個体で他はすべてXO型であった。XXY型変異体の誘発に関して得られた陰性結果は、過去の研究で導かれた結論「第1還元分裂中期にある卵母細胞に対する放射線照射は染色体不分離を誘発しない」(Parker and Williamson, 1976)を確認したものである。この結論は、第1還元分裂中期に生じた染色体損傷は相同染色体の正常分離に影響しないことを意味する。XXY型の増加を伴わないでXO型変異体が多発したのは、X線の染色体損傷効果による染色体欠損が多発した証拠である。Table 1には、比較のためCO₂ガスの15分間処理群で得られたデータも示しているが、炭酸ガス・酸欠環境の卵母細胞に対する効果はXXY型を誘発するという点で、X線の効果と決定的に異なる。これは、炭酸ガス・酸欠環境下で障害を受けた細胞内構造は染色体以外の構造であることを示す。

培養細胞を用いた研究から、高分圧の炭酸ガスは紡錘体障害を起こし、同様な障害が低pH培地中でも生ずることが知られている(Gaulden, 1992)。これらの知見も勘案して、炭酸ガス・酸欠環境におかれた卵母細胞における染色体不分離の機構に関して、Fig. 2に示しているような細胞内pH低下による紡錘体障害説を提唱する。

3. チェルノブイリ原発事故と旧西ベルリンにおけるトリソミー21の大量発生

かつて、医療放射線や高レベル自然放射線の被曝がダウン症の発生に関係しているという報告が相次いだ（例えば、Uchida and Curtis, 1961; Kochupillai et al., 1976）。しかし、再検討の結果、いずれのケースも、ヒト卵母細胞における微量放射線の不分離誘発効果を証明するものではなかった(UNSCAER, 1977; Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation, 1980)。マウスの成熟卵母細胞のX線照射実験でも、ハエの場合と同様に、染色体欠損が多発したにも関わらず、不分離変異体の誘発は認められていない(Cattanach et al., 1984)。不分離変異は継代遺伝性の染色体突然変異のなかで最も誘発しにくいタイプの一つである。

ところが、驚いたことに、チェルノブイリ原発事故の9ヶ月後（1987年1月）、西ベルリンでトリソミー21が同月の例年並以上に多発した(Sperling et al., 1994)。これを報告した研究者達は、この増加は原発事故で放出され、風に乗って西ベルリンに達した放射性核種からの放射線に成熟期卵母細胞が体内被曝した結果だと言っている。上で述べた事情から、私はそうは思わない。

報告によれば、問題のトリソミー21の過剰染色体のほとんどすべてが卵母細胞の第1還元分裂後期における染色体不分離の結果である。ヒト卵母細胞は排卵時に第1還元分裂を完了し、輸卵管内で（第2還元分裂中期の状態で）受精する。し

たがって、染色体不分離を起こした細胞内損傷は、成熟濾胞内にあって排卵を待っている第1還元分裂中期の卵母細胞期の細胞で生じていたはずである。不分離損傷の原因は成熟濾胞あるいは成熟過程にある濾胞内で生じたにちがいない。

私は、1987年1月、西ベルリンにおけるトリソミー21の多発を、懷妊直前の女性が放射線恐怖症に陥った結果ではないかと考えている。すでに紹介したゴールデン説に則れば、過度の恐怖による心理的ストレスが濾胞毛細血管の形成に関わるホルモンの分泌異常をきたし、第1還元分裂中期にある卵母細胞の環境を炭酸ガス・酸欠状態にしたと推察できる。

4. おわりに

ゴールデン説に触発されてハエの炭酸ガス処理実験を行った。その結果、メンデルの分離の法則を保障する細胞機構に意外と脆い面があることを知った。ダウントン症の局所的な増加の原因を考える場合、こうした脆さを無視すると、眞の原因を覆い隠すおそれがある。西ベルリンの事例に対する私の解釈は、この点を指摘するために提唱した。

謝 辞

私の研究は Mary Esther Gaulden 博士が近藤宗平博士に贈った1編の論文別刷りに始まる。両先生から実験結果に対して有益なコメントを頂いた。実験は松原正裕氏に負うところが大きい。ヒト卵母細胞における染色体異数性の発生に心理的ストレスを含む生体内要因が深く関わっている可能性は美甘和哉博士から教わった。一ツ町晋也博士と瀧谷徹博士にはシンポジウムで話題を提供する機会を与えて頂いた。本研究は私学振興財団および近畿大学環境科学研究所研究助成金等によった。記して深謝する。

文 献

Buraczynska, M., G. D. Stewart, S. Sherman, V. Freeman, M. Grantham, I. Uchida, T. Hassold and D. M. Kunit

- (1992) Studying nondisjunction of chromosome 21 with cytogenetic markers on the short arm and DNA markers encompassing the long arm, in: T. J. Hassold and C. J. Epstein (Eds.), *Molecular and Cytogenetic Studies of Non-Disjunction*, Alan R. Liss, New York, pp. 101–113.
- Chakravarti, A., P. P. Majumder, S. A. Slaugenhoupt, R. Deka, A. C. Warren, U. Surti, R. E. Ferrell, and S. E. Antonarakis (1992) Gene-centromere mapping and the study of non-disjunction in autosomal trisomies and ovarian teratomas, in: T. J. Hassold and C. J. Epstein (Eds.), *Molecular and Cytogenetic Studies of Non-Disjunction*, Alan R. Liss, New York, pp. 45–79.
- Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation (1980) *The Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation*, BEIR-III Report, National Academy Press, Washington, D. C.
- Erickson, J. D. (1978) Down syndrome, paternal age, maternal age and birth order, *Ann. Hum. Genet. Lond.*, **41**, 289–298.
- Gaulden, M. E. (1989) A model that explains the varying frequency of aneuploid children with maternal age (J-shaped curve) as well as aneuploidy of paternal origin, in: M. A. Resnick and B. K. Vig (Eds.), *Mechanisms of Chromosome Distribution and Aneuploidy*, Alan R. Liss, New York, pp. 253–257.
- Gaulden, M. E. (1992) Maternal age effect: The enigma of Down syndrome and other trisomic conditions, *Mutation Res.*, **296**, 69–88.
- Hassold, T. J. and C. J. Epstein (Eds.) (1992) *Molecular and Cytogenetic Studies of Non-Disjunction*, Alan R. Liss, New York.
- Kochupillai, N., I. C. Verma, M. S. Grewal and V. Ramawingswami (1976) Down's syndrome and related abnormalities in an area of high background radiation in coastal Kerala, *Nature*, **262**, 60–61.
- Parker, D. R. and J. H. Williamson (1976) Aberration induction and segregation in oocytes, in: M. Ashburner and E. Novitski (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*, Academic Press, London, Vol. 1c, pp. 1251–1268.
- Sperling, K., J. Pelz, R.-D. Wegner, A. Dories, A. Gruters and M. Mikkelsen (1994) Significant increase in trisomy 21 in Berlin nine months after the Chernobyl reactor accident: temporal correlation or causal relation?, *Br. Med. J.*, **309**, 158–162.
- Uchida, I. A. and E. J. Curtis (1961) A possible association between maternal irradiation and mongolism, *Lancet*, ii, 845–850.
- UNSCEAR (Ed.) (1977) *Sources and Biological Effects of Ionizing Radiation*, United Nations, New York.

Environ. Mut. Res. Commun., **17**: 289–291 (1996)

第24回大会ミニシンポジウム-4
「環境変異原と生殖細胞の変異」

メダカ生殖細胞突然変異実験系からわかったこと

What we learned from the Medaka specific-locus test system

嶋 昭絵

Akihiro Shima

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 放射線生物学研究室
113 東京都文京区本郷 7-3-1

Lab. of Radiation Biology, Faculty of Science, University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113

(受付: 1996年1月5日; 受理 1996年1月8日)

Summary

Ten years' study on the Medaka germ-cell mutagenesis was briefly reviewed.

Keywords: Medaka (*Oryzias latipes*), germ-cell mutagenesis, environmental mutagens

1. これまでの経緯

快晴の1989年5月19日(金)、松島泰次郎先生と祖父尼俊雄先生のお世話を東京大学医科学研究所で日本環境変異原学会第1回公開シンポジウムが開かれた。当時、メダカ生殖細胞突然変異実験系を手掛けて間もなく、そのうえ日本環境変異原学会員でもなかった私共に研究発表の機会が与えられたことは、その後の私共の研究の発展にとって大きな励ました。改めて両先生はじめ日本環境変異原学会関係各位に感謝したい。

さて、その時の講演要旨は学会誌「環境変異原研究」11巻13~17ページ(1989)に掲載させていただいた。そこでは、「メダカで特定座位法が使えるか否かの検討を1986年5月に開始した。約37万個のメダカ胚を使った3年間の研究の結果、メダカ生殖細胞での劣性突然変異を検出するのに特定座位法が使える見通しがついた。」と述べた。

1995年10月3日までに、902,340個の胚、遺伝

子座数にして2,383,860遺伝子座を調べた。このうち、対照群は195,554胚であり、10,901個が発生途中で死亡した。また19個の総突然変異を得ているが、うち2個のみが生存突然変異であった。この研究を始めて以来足掛け10年がたち、メダカ生殖細胞突然変異実験系といつてもよさそうなものの基盤が出来上がりつつあるように思われる。

2. メダカ生殖細胞突然変異実験系と今後の展望

メダカ生殖細胞突然変異実験系の概略を、Fig. 1に示す。手本になったのは、Russellにより開発されたマウス特定座位法である(Russell and Kelly, 1982)。特定座位法の基礎は、出来るだけ多くの標識遺伝子座を持つテスター系統を、交配により樹立することである。

メダカでは富田英夫により約70の自然突然変異が同定されていたので、これらの中から最終的には b , If , gu という3つの自然突然変異を標識遺

Medaka specific-locus test system

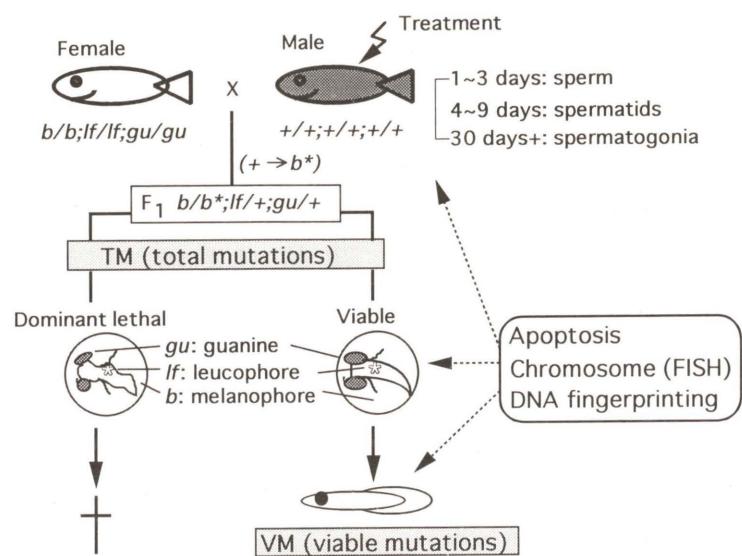


Fig. 1. Scheme for the Medaka specific-locus test system.

In this scheme, detection and mechanistic analysis of mutations are shown for male germ cells.

伝子座として選び、*b/b; If/If; gu/gu* という遺伝子型のテスターメダカを作った。ちなみにマウスでは、7 標識遺伝子座が使われた。このテスターメダカで兄妹交配を繰り返し、現在は F24 を得ている。マウスでの定義に則れば、近交系が出来上がったことになる。この系統を AA2 系統と名付け、欧米からの分譲依頼にも応えられるようになっている。一方、変異原で処理する野生型のメダカとしては、研究開始時に選んだ Sakura 系統を今日までクローズド・コロニーとして繁殖維持してきた。

差し当たり、雄生殖細胞の突然変異を調べるために、野生型雄メダカを γ 線、中性子、ENU で処理し、処理翌日からテスター雌メダカと交配する。得られる受精卵の突然変異表現型をつぶさに観察し、発生過程で識別される突然変異を総突然変異 (total mutation) と呼ぶ。孵化した突然変異体が持つ生存突然変異 (viable mutation) を特徴けるために、適当な交配を繰り返し、新しい突然変異を同定する。これらの誘发生存突然変異は、特に発生過程に関わる遺伝子群を研究するのに絶好の材料である。一方優性致死突然変異 (domi-

nant lethal) は、総突然変異と生存突然変異の中間に位置付けられる (Shima and Shimada, 1988; Shima and Shimada, 1991; Shima and Shimada, 1994)。

表現型に基づいた生殖細胞突然変異に関するデータが蓄積されるに従い、さらに mechanistic な手段で生殖細胞突然変異の機構を解明する段階へ歩を進めることができた。当面の課題は 1) AP-PCR (Welsh and McClelland, 1991) を使って、優性致死胚と外見上正常な同胞胚のゲノム DNA の出来るだけ広い範囲を走査し、生殖細胞突然変異の分子機構を解明すること (Kubota et al., 1992; Kubota et al., 1995; Wada et al., 1995), 2) 胚発生過程における apoptosis とこれに関する突然変異を調べること、3) 個々の胚から染色体核板を調整し fluorescence in situ hybridization (FISH) 法で染色体損傷を調べること、である。

参考文献

- Kubota, Y., A. Shimada and A. Shima (1992) Detection of γ -ray-induced DNA damages in malformed dominant lethal embryos of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using AP-PCR fingerprinting, Mutation Res., 283, 263–

270.

Kubota, Y., A. Shimada and A. Shima (1995) DNA alterations detected in the progeny of paternally irradiated Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 92, 330–334.

Russell, W. L. and E. M. Kelly (1982) Mutation frequencies in male mice and the estimation of genetic hazards of radiation in men, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 79, 542–544.

Shima, A. and A. Shimada (1988) Induction of mutations in males of the fish *Oryzias latipes* at a specific locus after γ -irradiation, Mutation Res., 198, 93–98.

Shima, A. and A. Shimada (1991) Development of a possible nonmammalian test system for radiation-

induced germ-cell mutagenesis using a fish, the Japanese medaka (*Oryzias latipes*), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 88, 2545–2549.

Shima, A. and A. Shimada (1994) The Japanese medaka, *Oryzias latipes*, as a new model organism for studying environmental germ-cell mutagenesis, Environ. Health Perspect., 102(Suppl 12), 33–35.

Wada, H., K. Naruse, A. Shimada and A. Shima (1995) Genetic linkage map of a fish, the Japanese medaka *Oryzias latipes*, Mol. Marine Biol. Biotech., 4, 269–274.

Welsh, J. and M. McClelland (1991) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Res., 18, 7213–7218.

第24回大会ミニシンポジウム-4
「環境変異原と生殖細胞の変異」

化学物質によるマウス始原生殖細胞の突然変異誘発

Chemical mutagenesis in mouse primordial germ cells

瀧谷 徹, 堀谷 尚吉, 加藤 基恵[†]
Tohru Shibuya, Naoko Horiya and Motoe Katoh[†]

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所遺伝学研究室
257 神奈川県秦野市落合 729-5

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

(受付: 1996年1月16日; 受理 1996年1月16日)

Summary

Primordial germ cells (PGC) are the ancestors of both male and female gametes. The development of PGC in mouse and in human embryos is very similar. Therefore, studying the effect of various chemical mutagens on mouse PGC is important for the evaluation of their genetic effects in humans.

A specific locus test (SLT) was carried out to examine whether *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) induces recessive mutations in mouse PGC. Embryonic C3H/He mice were treated transplacentally with ENU on development days 8.5, 10.5 or 13.5 (G 8.5, G 10.5 or G 13.5). The males were mated with tester strain PW females. ENU induced recessive mutations in PGC at a relatively high rate and in a dose-dependent manner, at all three developmental stages. The most sensitive stage was G 10.5. Cluster mutations were more frequently induced in the earlier developmental stage. The induced mutation rate per unit dose of ENU was higher for PGC than for the spermatogonial stem cells.

The induced mutant frequency in testis cells of male mice transplacentally treated with ENU was also assayed, using the MutaMouse positive selection system (MM/PS). Although the mutant frequency was about half to one-third of that obtained in the SLT, the same stage-specificity and dose-dependency was observed. The correlation between the mutation frequencies obtained from SLT and MM/PS is very high ($r^2=0.895$).

It is necessary to investigate the induction of mutations in mouse PGC by various mutagens using a convenient test system such as the transgenic mouse test, because the results could predict the genetic effects of various mutagens on human PGC.

Keywords: mouse primordial germ cells, *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, recessive mutations, *lacZ* mutations, cell death

1. はじめに

1979年に W. L. Russell らは特定座位試験によって *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) がマウス精祖細胞 (spermatogonial stem cells, SG) に高頻度に

劣性突然変異を誘発することを発表した (Russell et al., 1979)。この発見を契機として、ENUを用いて、マウス生殖細胞における突然変異誘発の研究が行なわれ、多くの成果が上がっている (Shibuya

[†] Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santos Dumont 964 Casilla 1903 Santiago, Chile

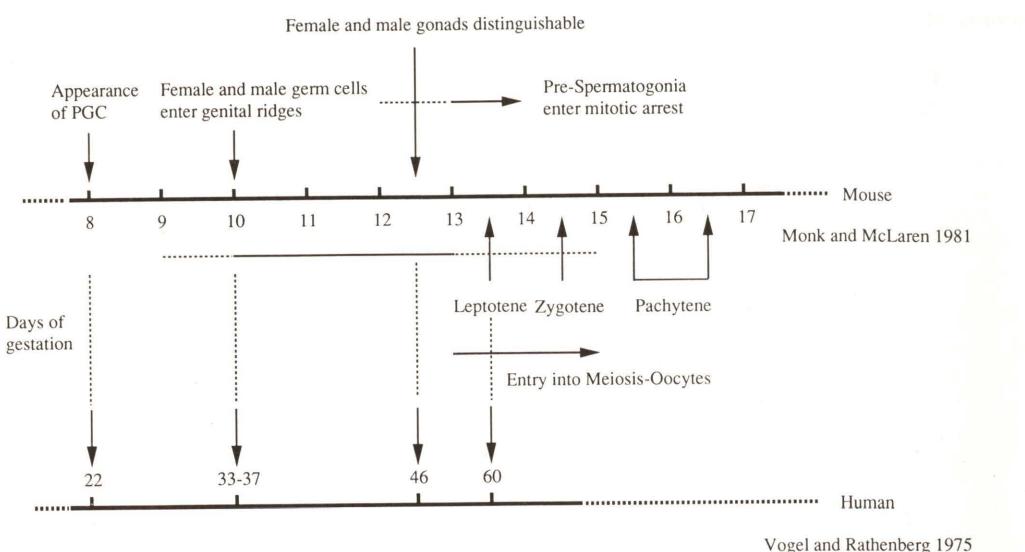


Fig. 1. Stages of germ cell development in mouse and human embryos.

and Morimoto, 1993 の総説). しかし、これらのはとんどの研究は、マウス成体の生殖細胞に対して、ENU を作用させた結果であった。

マウスの生殖細胞は胎児期の 8 日頃にすでに少數の始原生殖細胞 (primordial germ cells; PGC) として、卵黄嚢の背部に出現し、盛んに増殖を繰り返しながら、10 日頃から生殖巣に向かって移動を開始し、13 日にはその移動を完了する。その後の発生過程は、雌雄間で大きく異なり、雌ではただちに減数分裂前期に入るが、雄では休止期となる (Mintz, 1960; Heath, 1978)。PGC の発生過程の概略については、Fig. 1 に示した。

このように、PGC は雌雄を問わず、すべての生殖細胞の根幹に位置する細胞であるので、これらに突然変異が誘発されれば、それに由来するすべての生殖細胞にその突然変異が伝達され、その結果、子孫に大きな遺伝的影響を与える可能性がある。また、これらの生殖細胞の形成過程は、ヒトとマウスではほとんど同様であるため (Monk and McLaren, 1981; Vogel and Rathenberg, 1975)，化学変異原物質のヒト PGC に与える遺伝的影響について考慮するためには、マウスの PGC での実験結果が利用出来る可能性がある。

私達は、経胎盤投与された ENU が用量依存的に PGC に細胞死を誘発することを、マウスス

ポットテストにより見出した (Shibuya *et al.*, 1982)。そこで、まず、ENU のマウス PGC に対する突然変異誘発能を調べるために、胎児期の 8.5 日から 13.5 日の PGC を経胎盤的に処理し、生まれた雄について特定座位試験 (SLT) によって調べた。

しかし、多くの化学物質について、PGC における誘発突然変異を調べるために、SLT によることは實際には不可能である。そのため、より簡便な試験系が望まれていた。近年、開発されたトランスジェニックマウス (TGM) を用いる突然変異検出系は、どの臓器でも DNA が回収出来れば、突然変異率が調べられる。また、TGM で PGC における突然変異を調べるには、SLT と異なり、経胎盤投与された雄の生殖細胞そのもので調べることが可能なので、SLT よりも簡便な試験法となる。そこで、TGM を用いる試験系の中で最も簡便な、MutantMouse のポジティブセレクション法 (MM/PS) によって、SLT と同様の試験を実施した。それらの結果を比較し、今後、マウス生殖細胞の突然変異誘発の試験研究に TGM 試験が使用出来るかどうかについての検討を加えた。

2. 特定座位試験

1) 試験方法

この試験の方法はすでに瀧谷ら (1989) に記載したので、ここでは簡単に記述する。マウスは雌雄 C3H/He (A/A, B/B, C P/C P, D Se/D Se) を用いた。妊娠 8.5, 10.5 あるいは 13.5 日目の雌に、種々の用量の ENU (nakarai tesque) を腹腔内投与することで、マウス胎児の PGC を経胎盤処理した。ENU を複数回投与する場合には、PGC の細胞分裂周期が 14–17 時間である (橋本, 1989) ことが知られているので、それに近い 18 時間間隔で投与した。

出産された雄マウスは、テスター系統の PW 雌マウス (Tutikawa *et al.*, 1985; a/a, b/b, c^{ch} p/c^{ch} p, d se/d se) と交配した。交配には 1 匹の雄に 2 匹の雌を常時用いた。得られた F1 の毛色および外耳の形態によって、PGC における突然変異の有無を調べた。突然変異が疑われる個体は、交配実験により、変異遺伝子座を確定し、その一部についてはホモ接合体での生存性を調べた。

ENU による誘発突然変異率は、群ごとに、クラスター突然変異を含めた突然変異体の合計を、全調査個体数で割り、さらに調査した遺伝子数の 6 倍で割った値を誘発突然変異率とした。同一雄から同一遺伝子座の変異体が複数匹得られた場合、それらは共通の変異した PGC 由来の精子に由來したクラスター突然変異と判定した。

また、比較のために用いた、精祖細胞の ENU による突然変異誘発については、Murota and Shibuya (1983) のデータを使用した。

2) 結果

i) 妊性

ENU を経胎盤処理して得られた F1 雄についての妊性を Fig. 2 に示した。F1 雄の妊性は ENU による、PGC の細胞死を反映するものと考えられる。出生後の精巣の重量および組織像からも、妊性は ENU の同一用量では、PGC の発生時期が進むにつれて低下する傾向を示した。すなわち、50 mg/kg の用量では G 8.5 および G 10.5 胚の妊性は無処理の場合と比較して、ほとんど低下していないが、G 13.5 では、約 60% にまで低下した。

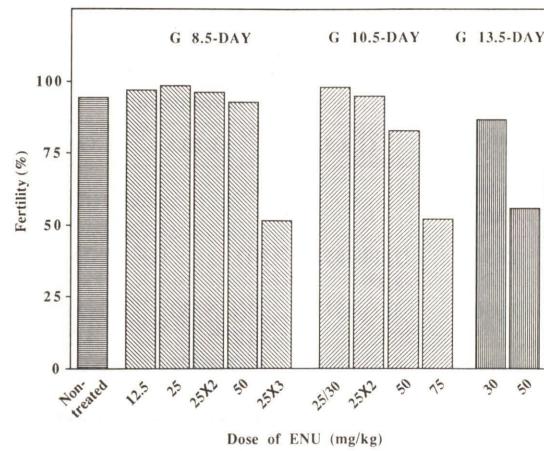


Fig. 2. Fertility of male mice with ENU.

しかし、G 8.5 および G 10.5 でも、投与総量が 75 mg/kg の場合には、それぞれ約 50% にまで低下した。ENU の経胎盤投与による細胞死が時期特異性を持って、用量依存的に起きていることはすでに認められている (Shibuya *et al.*, 1989)。

ii) 誘発突然変異率

ENU 投与による誘発突然変異率を PGC および精祖細胞については、Table 1 および Fig. 3 に示した。無処理対照群については、これまでに 18881 匹の F1 について調べたが、変異体は得られていない。そのため、自然突然変異率は 0.0×10^{-5} (以下 $\times 10^{-5}$ は省略) であり、各実験群の突然変異率がそのまま誘発突然変異率となる。ENU の 25 mg/kg (G 10.5 および G 13.5 では 30 mg/kg での結果も含む) では、G 10.5 では 15.7, G 8.5 では 10.9, さらに G 13.5 では 4.4 であった。一方、ENU 50 mg/kg での誘発突然変異率は、G 10.5 が 63.5 で最も高く、G 8.5 が 36.0 でこれに続き、G 13.5 が 11.1 で最も低く、G 10.5 と G 13.5 PGC との間では約 6 倍の違いが認められた。このように ENU による誘発突然変異率には明らかな時期特異性が認められた。

突然変異誘発率を精祖細胞と比較すると、精祖細胞の 150 mg/kg と G 10.5 の ENU 50 mg/kg の誘発突然変異率がほぼ同様の値となり、PGC が約 3 倍、精祖細胞より感受性であることになる。

Table 1. Induced recessive mutation frequency in primordial germ cell of male mice with ENU.

Dose of ENU (mg/kg)	Developmental stage of PGC (day of development)		
	G 8.5	G 10.5	G 13.5
Non-treated control	0/18,881 0.0		
12.5	1(1)/3857 ^a 4.3 ^b	ND	ND
25/30 ^d	3(2)/4573 10.9	9(6)/9530 15.7**	2(2)/7782 4.2
25×2	4(2)/2268 29.4*	11(8)/6279 29.2**	ND
50	31(13)/13,906 37.1**	60(24)/15,491 64.6**	4(4)/6024 11.1
25×3	3(1)/742 67.4**	ND	
75	ND	1(1)/478 34.9**	

^a Number of mutants obtained (number of independent mutational events)/number of offspring observed.

^b Induced mutation rate $\times 10^{-5}$ /locus.

^c Data are combined with the results from 25 and 30 mg/kg ENU in G 10.5 and G 13.5 day.

* or **: Significantly different from the non-treated control at 95 or 99% confidence limits, respectively.

ND: not done.

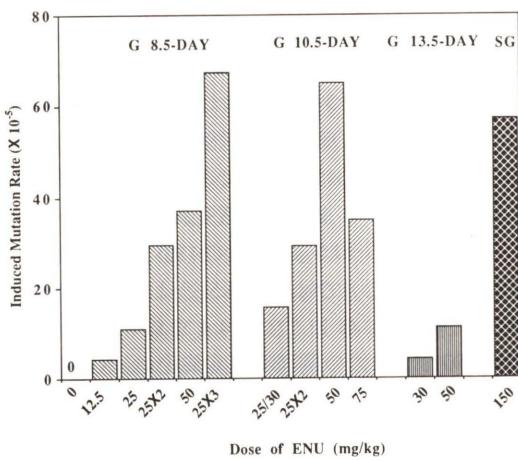


Fig. 3. Dose-dependent induction of recessive mutations with ENU in PGC and SG of male mice.

また、G 8.5 および G 10.5 PGC のいずれにおいても、25 mg/kg ENU を反復投与することによって誘発突然変異率は二次関数的に上昇したが、その効果は G 8.5 PGC においてよりいちじる

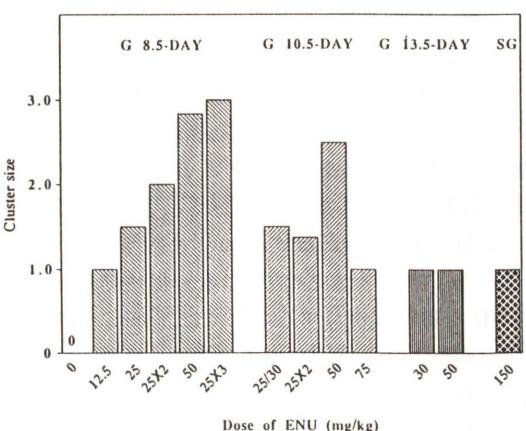


Fig. 4. Cluster size of mutations induced with ENU in PGC and SG of male mice.

しかった。

iii) クラスター突然変異

ENU によって誘発された突然変異のクラスターサイズを Fig. 4 に示した。いずれの用量においても、クラスターサイズは、発生日齢に伴って小さくなる傾向を示した。すなわち、50 mg/kg 群では、G 8.5 では 2.8、G 10.5 では 2.5 さらに G 13.5 では 1.0 であった。しかし、25 mg/kg 群では発生日齢に伴う低下は顕著ではなかった。G 8.5 では、25 mg/kg の反復投与によって、クラスターサイズの増加が認められたが、G 10.5 では明らかでなかった。さらに、G 13.5 では 30 および 50 mg/kg のいずれの群においても、クラスター突然変異は認められなかった。精祖細胞においても、これまでにはクラスター突然変異は認められていない。

G 8.5 PGCにおいては、誘発突然変異率とクラスター突然変異のサイズとの間には高い相関性が認められたが、G 10.5 PGC ではそれほど明らかではなかった。

iv) 突然変異体の特性

ENU によって誘発された突然変異の遺伝子座について Fig. 5 に示した。3つの発生日齢を集計した結果では、突然変異は d 遺伝子座に最も多発し、次いで、b, p および c 遺伝子座で多く認めら

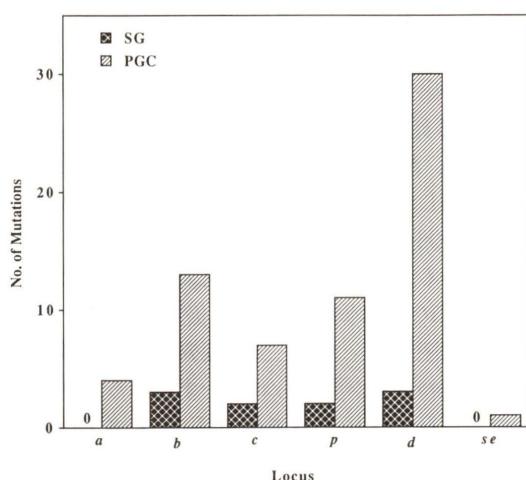


Fig. 5. Distribution of recessive mutations among specific loci induced with ENU in PGC and SG of male mice.

れた。しかし、a および se 遺伝子座においては、突然変異はほとんど認められなかった。

以上の結果から、PGC ではその発生時期による違いは認められないと考えられた。また、精祖細胞における 150 mg/kg ENU 处理によって誘発された突然変異については、変異体の総数が少ないが、ほぼ同様の傾向が認められた。

変異体のホモ接合体の生存性については、PGC では、28 の変異体について調べたが、d 遺伝子座の 12 例が共通の神経症状を示し、離乳前に死亡したので、これらを致死として分類した。これ以外には、変異した遺伝子座に関わらず、すべての変異体はホモ接合体が生存性であった。精祖細胞における変異体については、調べた 9 例のうち、b 遺伝子座の 1 例以外はすべて、ホモ接合体が生存性であった。このように、ENU による突然変異体の特性は、生殖細胞の発生時期が異なっていても、減数分裂前の生殖細胞では、異なることが認められた。

v) O⁶-methylguanine の前処理効果

誘発突然変異率の O⁶-methylguanine (MG) の前処理の効果についての実験は、Pegg ら (1984) の報告に従い、110 mg/kg の MG (東レリサーチセンター) を蒸留水に加え、加温して溶解したものを、

Table 2. Effect of O⁶-methylguanine pretreatment on the induction of recessive mutations with 25 mg/kg ENU in G 8.5 day PGC.

Group	No. offspring observed	No. mutants obtained ^a	Mutation rate ^b ($\times 10^{-5}$)
O ⁶ -Methylguanine (110 mg/kg × 2)	3626	0	0.0
ENU (25 mg/kg)	4303	6 (3)	23.2
MG + ENU	3450	4 (3)	19.3
ENU (Historical data)	8876	9 (5)	16.9

^a Number of mutants obtained (Number of mutational events).

^b Calculated from Number of mutants obtained/Number of offspring observed/6.

ENU 投与の 1 および 2 時間に腹腔内投与した。この用量は Pegg ら (1984) の報告によると雌マウス肝の O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 活性を約 50% にまで低下させるものである。MG 前処理が、25 mg/kg ENU の 8.5 日 PGC の突然変異誘発に与える効果についての実験結果を Table 2 に示した。MG 単独では 3626 匹の F1 を調べたが、変異体は得られなかった。ENU の 25 mg/kg 単独群では 4303 匹中に 6 匹の変異体が得られ、誘発突然変異率は 23.2×10^{-5} であった。また、これまでの G 8.5 日 PGC の 25 mg/kg 群を合計した誘発率は、 16.9×10^{-5} であった。一方、MG 前処理群では、3450 匹の F1 に 4 匹の突然変異体が得られ、誘発突然変異率は 19.3×10^{-5} であった。これらの結果から、MG 前処理の効果は認められないと結論された。

3. ミュータマウスポジティブセレクション法 (MM/PS)

日本医科大学を経由して購入した lambda DNA (rambda gt10) を導入された MutaMouse (strain 40.6) を 9 から 10 週齢で交配した。得られた妊娠 8.5, 10.5 あるいは 13.5 日目の雌に 25 あるいは 50 mg/kg の用量の ENU を腹腔内投与し、胎児の PGC を絞り盤処理した。得られた雄マウスは性成熟に達した後、精巣を摘出し、-84°C で凍結保存した。以下の実験方法は Dean and Myer (1994) に従い、ポジティブセレクション法によって突然

Table 3. Induced mutant frequency in testis cells of MutaMouse with ENU.

Stage (days)	Dose of ENU (mg/kg)	No. plaques analysed	No. mutants obtained	Mutant frequency ($\times 10^{-5}$)
Non-treated	0	714,000	17	2.4
G 8.5	25	314,000	17	5.4
	50	650,000	56	8.6
G 10.5	25	2,766,000	178	6.4
	50	2,188,500	629	28.7
G 13.5	25	462,000	12	2.6
	50	1,045,000	55	5.4

変異率を求めた。すなわち、DNAをproteinase Kとphenol: ethanolを用いて抽出した後、Guntherらの方法(1993)によって自家作製したパッケージングキットを用いて、*in vitro*でラムダーファージにパッケージングし後、*E. coli C lac⁻galE⁻*に感染させた。これをP-galactoseを含む寒天平板上にまき、一晩培養後変異plaquesを得た。同時に希釈した感染液をP-galactoseを含まない寒天平板上にまきタイマーを求めた。突然変異体と見なしたplaquesは回収し、X-galactoseと*E. coli C lac⁻*を含む寒天上で、真の変異体であることを判定した。得られた変異plaques数と希釈したP-galactoseを含まないプレートで得られたタイマーから変異体率(mutant frequency)を群ごとに算定した。

2) 結果

MM/PS法による、ENUの突然変異率をTable 3に示す。無処理対照群における、変異体率は 2.4×10^{-5} であった。実験ではENUの25あるいは50mg/kgを用いたが、調べた3つの発生時期のいずれにおいても、明らかな用量依存性が認められた。G 10.5 PGCにおいては、50mg/kg群での値が、25mg/kg群の4倍以上に上昇した。この値は無処理対照群の約12倍であった。50mg/kg群の値は3つの発生時期で比較すると、G 10.5が最も高く、G 8.5がこれに続き G 13.5が最も低かった。

4. 考 察

化学物質によるマウス生殖細胞の突然変異誘発

の研究は、そのほとんどが成体の生殖細胞を対象としたものであった。私達は、マウスの胎生期に出現し、出生後には、すべての生殖細胞の根幹細胞となる始原生殖細胞(primitive germ cells, PGC)に、N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)を経胎盤的に投与し、雄についてSLTによって、突然変異の誘発を調べた。その結果、Russell(1979)らが報告している、精祖細胞での誘発突然変異率と比較して、PGCでは同用量で約3倍高く誘発されることを確認した。また、突然変異の誘発には明らかな時期特異性が認められた。すなわち、誘発突然変異率は、G 10.5日で最も高く、G 8.5がこれに続き、G 13.5日で最も低かった。

次に、ENUの用量依存性について、SLTによって検討を行なった。誘発突然変異率は用量に依存して増加した。しかし、8.5日および10.5日胚における誘発突然変異率の間には、大きな差が認められた。これらの結果については、ENUの投与時にPGCの絶対数が少なく、さらにENUによる細胞死が加わるために、誘発突然変異率が複雑に表現されることになったものと考えられる。今後、これらの発生時期のPGCの細胞死を含めた、細胞動態についての詳細な解析が必要である。

また、ENUの25mg/kgの複数回投与による突然変異の加算効果が明瞭に認められた。しかし、PGCでは、SGの突然変異誘発のいき値とされる、34–39mg/kg(Favor et al., 1990)よりも低い用量の25mg/kgで誘発突然変異率の加算効果が認められた。このことは、すでにRussellら(1982a; 1982b)が、ENUの分割あるいは反復投与実験の結果から指摘しているように、精祖細胞では、アルキル化DNAに対する修復酵素のMGMTが充分に存在するが、PGCでは多量には存在しないことを示唆するものである。

このことをさらに検討するために、MGMTの弱い基質となり、それと結合することにより、存在するMGMTを不活化することが知られているO⁶-methylguanine(MG)を前処理し、その後に25mg/kg ENUを投与して、MG前処理の誘発突然変異率に与える影響について検討を行なったが、MG前処理の効果は認められなかった。

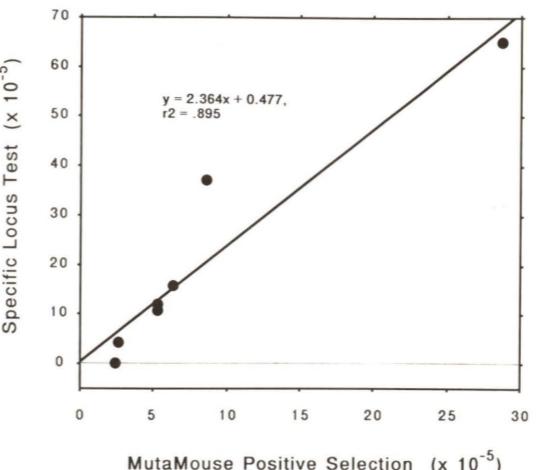


Fig. 6. Correlation of mutation frequency in male PGC induced with ENU by SLT and MM/PS.

しかし、今後このような分析的な実験において、膨大な労力を要するSLTを実施することは困難であるので、MM/PS法の導入を検討した。この試験では、SLTのように、PGCを経胎盤処理をして、出生した雄をさらにテスター系統の雌と交配し、生まれたF1について観察する必要はなく、経胎盤処理後得られた雄の精巣そのものについて、試験をすることが可能であるので、実験に要する時間と労力が大いに削減出来ることになる。

PGCのENUによる突然変異誘発率について、SLTとMM/PSでの結果を比較した(Fig. 6)。その結果、いずれのENU処理群においても、SLTの方が2倍以上高い誘発率を示した。2つの誘発率は $y=2.364x+0.477$ の直線に近似し、その相関係数は、 $r^2=0.895$ と高かった。突然変異率が、SLTの方がMM/PSよりも2倍以上高いことに関しては、標的となる遺伝子の大きさがSLTの場合の方が大きいことがまず考えられる(van Delft et al., 1995)。さらにSLTでは、本来マウスゲノムに存在している遺伝子についての結果であるが、MM/PSではtransgeneについての結果であるので、遺伝子のメチル化などの違いが関与していることが考えられる。その詳細は、得られた変異体の塩基配列の分析等によって、今後解明されるべき問題である。

PGCでのENU処理による誘発突然変異について、SLTとMM/PSの間に高い相関性が認められた。SLTは生殖細胞における突然変異を次世代の子孫で調べるすぐれた試験系であるが、その実施には多大な時間と労力を要する。そのため、多くの化学物質についての試験を実施することは非常に困難である。

しかし、MM/PSがSLTでの結果を予測することが出来れば、その実用性は大きい。すでに、ENUのSGにおける誘発突然変異については、Oak Ridge国立研究所でのSLTの結果とBigBlue(*lacI*遺伝子)での結果の間に高い相関性が認められたことが報告されている(van Delft et al., 1995)。このように、塩基置換を主に誘発するENUの様な化学物質の減数分裂前での生殖細胞の誘発突然変異については、今後、MutaMouseやBigBlueのようなTGMによる試験結果が大きな情報を提供することになるうる。

5. おわりに

マウスPGCの突然変異誘発についての実験は、これまでにほとんど実施されていない。1960年から1970年にかけて、Harwell(英国)の研究者たちによるX線や中性子を用いた報告があるが、その結果では、誘発突然変異率は精祖細胞に比べて、かなり低いものであった。今回、直接エチル化剤のENUによって、劣性突然変異が精祖細胞よりも高い頻度で誘発されたという結果は、これまでの、マウスPGCは変異原に対して抵抗性であるという概念を覆すものであった。

ヒトPGCの発生はマウスとほとんど同一過程をたどることが知られている。そのため、マウスPGCでの結果は、そのままヒトPGCの結果に外挿できる可能性が高い。今後、精祖細胞で突然変異を誘発することが知られている、他の強力な変異原物質を始めとして、多くの化学物質で、マウスPGCでの突然変異誘発能について、MM/PS法によって、スクリーニングすることが必要である。そして、これらの化学物質がヒトPGCに突然変異を誘発する危険性についての充分な考察を加え、長い世代にわたって存続するヒトの遺伝子を突然変異から守ることが我々に与えられた使命

であると考えられる。

今後、発生工学的手法によって、化学物質の生体内での代謝過程やDNA修復に関して、ヒトの正常および変異遺伝子を導入したTGMが種々作製されるものと考えられる。そして、これらのマウスを用いて、多くの化学物質についての実験が実施されることが望まれる。それらの結果から、ヒトの遺伝に与えるリスクの推定が、より正確に実施されることがそれほど遠くない将来に可能となろう。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、ご協力いただきました、原巧、松田洋（秦野研究所）小泉淳、鹿嶋崇幸（麻布大学）の諸氏に感謝の意を表します。

参考文献

- Dean, S. W. and B. Myer (1994) Measurement of gene mutation *in vivo* using Mutamouse and positive selection *LacZ*⁻ phage, *Mutagenesis*, **9**, 183–185.
- Favor, J., M. Sund, A. Neuhäuser-Klaus and U. H. Ehling (1990) A dose-response analysis of ethylnitrosourea-induced recessive specific-locus mutations in treated spermatogonia of the mouse, *Mutat. Res.*, **231**, 47–54.
- Gunther, E. J., N. E. Marry and P. M. Glazer (1993) High efficiency restriction-deficient *in vitro* packaging extracts for bacteriophage lambda DNA using a new *E. coli* lysogen, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3903–3904.
- 橋本有弘 (1989) 哺乳類の始原生殖細胞、細胞, **20**, 551–554.
- Heath, J. K. (1978) Mammalian primordial germ cells, in: M. H. Johnson (ed.), *Development in Mammals*. North-Holland, Amsterdam, pp. 551–554.
- Mintz, B. (1960) Embryological phases of mammalian gametogenesis, *J. Cell. Physiol.*, **56**, (Suppl. 1), 31–47.
- Monk, M. and A. McLaren (1981) X-chromosome activity in foetal germ cells on the mouse, *J. Embryo. Exp. Morph.*, **63**, 75–84.
- Murota, T. and T. Shibuya (1983) Genetic analysis of mutants in mouse induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, *Jpn. J. Genet.*, **58**, 263–267.
- Pegg, A., D. Scicchitano and M. E. Dolan (1984) Comparison of the rates of repair of O⁶-alkylguanines in DNA by rat liver and bacterial O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, *Cancer Res.*, **44**, 3806–3811.
- Russell, W. L., E. M. Kelly, P. R. Hunsicker, J. W. Bangham, S. C. Maddux and E. L. Phipps (1979) Specific locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5818–5819.
- Russell, W. L., P. R. Hunsicker, G. D. Raymer, M. H. Steele, F. K. Stelner and H. M. Thompson (1982a) Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific locus mutations in mouse spermatogonia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3589–3591.
- Russell, W. L., P. R. Hunsicker, D. A. Carpenter, C. V. Corett and G. M. Quinn (1982b) Effect of fractionation on the ethylnitrosourea induction of specific-locus mutations in mouse spermatogonia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3592–3593.
- Shibuya, T., T. Murota and K. Tutikawa (1982) Mouse spot test with alkylnitrosoureas, *Mutation Res.*, **103**, 311–315.
- Shibuya, T., N. Horiya, H. Matsuda, T. hara, M. Katoh and T. Murota (1989) *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea induces recessive mutations in mouse primordial germ cells (Abstract), *Environ. Mol. Mutagens.*, **14**(S15), 185.
- 瀧谷徹、室田哲郎、堀谷尚古、松田洋、原巧 (1989) *N*-Ethyl-*N*-nitrosoureaによるマウス始原生殖細胞の突然変異の誘発、環境変異原研究, **11**, 65–72.
- Shibuya, T., T. Murota, N. Horiya, H. Matsuda and T. hara (1993) The induction of recessive mutations in mouse primordial germ cells with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, *Mutation Res.*, **290**, 273–280.
- Shibuya, T. and K. Morimoto (1993) A review of genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea, *Mutation Res.*, **297**, 3–38.
- Tutikawa, K., Y. Harada and K. Moriwaki (1985) Origin and genetic background of three substrains in inbred PW mouse, *Annu. Rep. Inst. Natl. Genet. Japan*, **36**, 68–69.
- van Delft, J. H. M. and R. A. Bean (1995) Germ cell mutagenesis in rambda lacZ transgenic mice treated with ethylnitrosourea: Comparison with specific-locus test, *Mutagenesis*, **10**, 209–214.
- Vogel, F. and R. Ratherberg (1975) Spontaneous mutations in man, *Adv. Hum. Genet.*, **71**, 1–6.

Environ. Mut. Res. Commun., **17**: 301–306 (1996)

第24回大会ミニシンポジウム-4
「環境変異原と生殖細胞の変異」

原爆被爆者の生殖細胞突然変異をDNAレベルで子供にモニターする Monitoring of germ line mutations in A-bomb survivors by DNA-level examination of their children

高橋規郎、佐藤千代子、浅川順一、小平美江子

Norio Takahashi, Chiyoko Satoh, Jun-ichi Asakawa and Mieko Kodaira

放射線影響研究所・遺伝学部
732 広島市南区比治山公園5番2号

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

(受付: 1996年1月12日; 受理 1996年1月18日)

Summary

For 50 years after the atomic bombings, the genetic effects of radiation have been studied using various indicators of possible genetic damage. No statistically significant increase in the genetic effects was observed in the children of A-bomb survivors compared to a control population. Thus, we have started studies to see if any effects can be detected at the DNA level. To ensure the availability of samples, we have obtained B lymphocytes from about 800 families consisting of trio of mother-father-child, and have prepared permanent cell lines. We have first conducted a pilot study to develop techniques necessary for the detection of mutation. In the pilot study, we examined DNA obtained from 50 exposed families and 50 control families, which are a subsample of the above 800 families. The mean dose of the exposed gametes was 1.9 sieverts. We examined six types of minisatellites and six types of microsatellites in the study, and observed 28 mutations in the former and 6 in the latter. There was no significant difference in the mutation rates of these repeat sequences between the exposed and non-exposed gametes. To detect deletion/insertion/rearrangement mutations in single copy genes, we introduced 1) two-dimensional electrophoresis (2-DE) approach and 2) quantitative analysis of bands on a Southern filter. We improved these techniques, and made them more suitable for our purpose. We are presently conducting examination on the above pilot study population using these techniques.

Keywords: atomic bomb, DNA, germ line, mutation

1. まえがき

放射線影響研究所(RERF)は、その前身である昭和22年(1947年)にアメリカ合衆国政府により設立された、原子爆弾(原爆)傷害調査委員会(ABCC)で行われてきた調査・研究事業を継承するために、昭和50年(1975年)に日米両国政府の合意により設立された財団法人である。

当研究所では、直接原爆に被爆した人及び被爆

者の子供の、大きく分けて二つの集団について調査が行われている。前者においては、疫学(寿命)調査、成人健康調査、胎内被爆者調査などの放射線の直接的影響に関する調査が、後者においては、放射線の遺伝的影響の調査が行われている。これらの調査により得られた危険度は国際放射線防護委員会(ICRP)により決定され、世界各国で放射線障害防止法により、原子炉の労働者、研究

所や大学の研究者、X線技師などの放射線作業従事者の被曝線量の限度として定められている。また、国際機関〔国連世界保健機関(WHO)、国際原子力機関(IAEA)等〕にも報告され、世界各地で起った放射線事故の調査・研究に重要な情報及び経験を提供している。

2. 線量推定

前項で述べた調査研究で最も重要なことは被爆者個々人の浴びた線量の正確な推定である。この線量推定には多くの困難が伴い、今まで幾多の改良が加えられてきた。現在は1986年線量評価体系(DS86)が用いられている。この方法は、より詳細に被曝線量を推定するために、放射線が人体各臓器に到達するまでの複雑な過程を、物理的因子ごとに分解し、その各々についてコンピュータ計算により推定する方式である(Roesch, 1989a, b)。被爆者一人一人の面接調査により得られた被爆時に居た場所、姿勢、爆心に対する体の方向などを基に、DS86を用いて個々人の線量を推定している。従って、爆発時に遮蔽物の効率が正確に推定できない人、例えば長崎の三菱兵器工場に居た従業員等については調査集団より除かれた。一方、被爆者個々人についての体細胞突然変異率及び染色体異常率を基に、いわゆる生物学的線量測定法の確立に向けて努力がなされている。これら2種の推定法により得られた線量に矛盾が生じる場合があることも事実である。この問題をいかに解決するか、また推定システムをより良いものに変更する努力は、現在も続けられている。

3. 今まで行われた遺伝学調査

遺伝学調査とは、放射線によって被爆者の生殖

細胞に生じた変化(突然変異)をその子供を調べることにより推定しようとするものである。放射線照射により突然変異率が増加することがショウジョウバエの実験において確認されて以来、多くの生物において研究されてきた。特にRussellら及びその他のグループのマウスについての大規模な実験より、放射線により誘発される突然変異率は 2.5×10^{-5} ／グレイ／世代であると報告された(Ehling 1984)。同様に、ヒトにおいても被爆者の子供達に突然変異率の増加が考えられ、種々の調査が行われてきた。

その調査及び結果は、Table 1にまとめた。A) まず最初に異常妊娠終結頻度調査が、広島・長崎の妊娠登録被爆者15,410名、対照者55,870名について行われた。被爆した親の次の世代に相当する胎児の流早産や死産の増加の有無、乳児死亡の増加の有無、及び胎児・新生児における奇形の増加の有無、出生時性比が調べられたが、何れの項目においても統計学的に有意な放射線の影響は認められなかった。B) 性比は47,624名の広島・長崎の被爆者の子供に対して再調査が実施されたが、同じ結果であった。C) 原爆被爆者の子供について、染色体異常調査が広島9828名、長崎6470名を対象として行われた。その構成は被爆群8322名、対照群7976名であった。両親には認められない構造異常が被爆群に1例、対照群に1例認められたが、その間に統計学的に有意な差は認められなかった。また、性染色体における数的構造異常、常染色体の構造異常数においても、被爆群と対照群の間に有意な差は認められなかった。染色体トリソミー(21トリソミー)の被爆者の子供における増加傾向は認められなかった。D), E) 原爆投下後の妊娠(胎内で被曝した児は直接被曝者なの

Table 1. Genetic studies of the children of A-bomb survivors.

	Study	Period	References
A	Frequency of untoward outcomes of pregnancy ^a	1948-1954	Neel <i>et al.</i> (1990)
B	Sex ratio	1948-1962	Schull <i>et al.</i> (1966)
C	Chromosomal aberrations	1967-1984	Awa <i>et al.</i> (1987)
D	Malignant tumor frequency	1960 to date	Yoshimoto <i>et al.</i>
E	Mortality rate	1960 to date	Yoshimoto <i>et al.</i>
F	Gene mutation frequency at protein level	1977-1984	Neel <i>et al.</i> (1988)

^a abortions, stillbirths, deformities, infant mortality, and sex ratio.

Table 2. Mutations altering protein charge in children of atomic bomb survivors.

	Exposed	Control
No. of children examined	11,364	12,297
Equivalent locus tests	544,779	589,506
Mutations	2	4
Mutation rate per locus per generation	0.37×10^{-5}	0.68×10^{-5}

で、含まれない)により出生した子供について、発癌率調査(対象者72,216名)及び死亡率調査(対象者67,586名)が行われた。親の被曝線量の増加に伴う致死的癌の増加やその他の疾患による死亡率の有意の増加は認められていない。しかし、調査対象となった子供は平均年齢が調査時点まで20歳未満と若いため、いわゆる癌年齢、成人病年齢に達していない。今後の継続的追跡調査が最終的結論を得るために必要である。F) 被爆者(両親合計の生殖腺被曝線量が0.01シーベルト以上)の子供及び対照群(両親の合計線量が0.01シーベルト未満)の子供の、血漿及び溶赤血球液中のタンパク質について、電気泳動法を用いて変異タンパク質を検出し、親の生殖細胞突然変異の結果生じたものか否かを調査した。Table 2に示すように、被爆群の11,364名について約54万遺伝子座が、また対照群の12,297名について約59万遺伝子座が調べられ、被爆群で2例、対照群で4例の突然変異が検出された。この両群間の突然変異率に有意差は認められなかった。赤血球中の酵素活性を指標とした調査が、被爆群、対照群のそれぞれについて約6万遺伝子座について行われたが、両群間に差は認められなかった(Satoh and Neel, 1988; Neel *et al.*, 1988)。

4. DNA レベルでの研究

今日まで行われてきた調査に用いられた各種の指標の突然変異率に関して、被爆群と対照群との間に統計的有意差は認められず、原爆放射線の遺伝的影響は検出されていない。しかし、これによって遺伝的影響が完全に否定されたわけではない。近年における分子生物学の急激な発展は、遺伝子をDNAもしくはRNAレベルで検索することにより、従来では検出できなかった突然変異を

極めて効率良く検出する可能性をもたらした。そこで、我々は遺伝的影響をDNAレベルで調査することを試みている。

この調査を行うための試料として、父-母-子の1組から成る1000家族からB-リンパ球を得て、Epstein-Barrウィルス処理によって細胞株を作製することが計画された。その構成は、被曝群500家族、対照群500家族である。現在まで約800家族の株化を終了した。

放射線に特別に感受性の高いDNA配列は知られていない。また、我々が目的とする大規模な集団調査に使用可能なほど効率の良い技法も知られていない。そこで我々は、突然変異検出に必要な技法を開発し、それらの技法の効率を検討するとともに、標的として使用可能な種々のDNA配列を比較する目的で、試行調査を行っている。試行調査においては、子供64人を含む被曝50家族と、子供60人を含む対照50家族の合計100家族から得たDNAを検査する。被曝群の子供64人のうち、1人は両親被曝、63人は片親被曝であった。従って、64人の子供を検査することにより、被曝配偶子65個と非被曝配偶子63個を検査することになる。一方、対照群60人の子供においては120個の非被曝配偶子を検査することになる。従って、両群で合計183個の非被曝配偶子を検査することになる。被曝配偶子の平均線量は1.9シーベルトであった。この100家族について、反復配列(ミニサテライト及びマイクロサテライト)を有するDNA領域を検査するとともに、シングルコピー遺伝子の検査法を導入した。

a) 反復配列を有するDNA領域を標的とした調査

ミニサテライトとは、数個から数十個のヌクレオチド反復配列単位が繰り返して、約100塩基対から約20キロ塩基対の長さになったDNA領域である。反復配列の外側でDNAを切断するような制限酵素を用いてDNAを消化した後、通常のアガロースゲル電気泳動を行い、次いでSouthernプロット法を用いてミニサテライト領域のバンドを検出することができる。ミニサテライト領域では、ヘテロ接合性が高いため、通常、子供に検出された2本のミニサテライトバンドが、各々両親

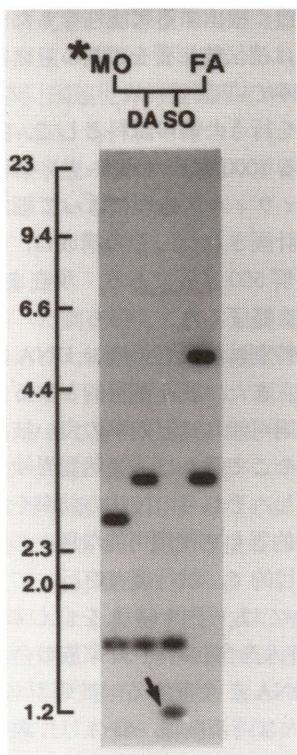


Fig. 1. New-length mutation at *CEB-1* locus. DNAs were digested with *Hinf*I and electrophoresed. Separated DNA fragments were analyzed by Southern hybridization. Arrow indicates mutant allele. The asterisk (*) indicates the exposed mother.

のどちらに由来するものであるかを特定することが可能である。Fig. 1 には、*CEB-1* 領域において突然変異の検出された 1 家族の実際の泳動像を示した。娘 (DA) の 2 本のバンドは、同じ移動度のバンドが父または母に存在するため、突然変異ではない。一方、息子 (SO) の 2 本のバンドのうち 1 本は、被爆者である母親より遺伝しているが、矢

印で示したバンドは両親の何れにも存在しないため、父親に生じた突然変異と考えられる。このように、子供と両親の泳動像を比べることにより突然変異を同定した。今までに、Table 3 に示す 6 種のミニサテライトの検査を行った。このうち *pλg 3*, *λMS-1*, *CEB-1* の 3 領域においては突然変異が観察された。*CEB-1* にみられた 15 の突然変異は全て父親由来であった。*Pc-1* 領域は、*Pc-1* というマウスのミニサテライト検出用プローブを用いた時に検出されるヒトのミニサテライト領域である。マウスの *Pc-1* 領域では、自然突然変異率が高いだけでなく、*spermatogonia* の時期に放射線の照射を受けると突然変異が誘導されることが報告されている (Sadamoto *et al.*, 1994)。しかし、試行調査で検査したヒトの *Pc-1* 領域では、自然突然変異も、放射線誘導突然変異も検出されなかつた。ヒトとマウスの *Pc-1* 領域の反復配列単位は同一であるが、その近傍の塩基配列は異なっている。マウス *Pc-1* 領域の不安定性にこの塩基配列の違いが寄与しているのかもしれないが、詳細は不明である。6 種の遺伝子座において、被曝配偶子と非被曝配偶子の間で突然変異率に有意差は認められなかった。

2–6 bp の反復単位が 10–15 回繰り返して生じる短い反復配列であるマイクロサテライトについても検査した (Satoh *et al.*, 1995)。X 染色体上に存在する 3 種と、常染色体上の 3 種の合計 6 種のマイクロサテライトについて調べた。被曝配偶子では合計 363 個、非被曝配偶子では合計 939 個の対立遺伝子を検査したことになるが、非被曝配偶子にのみ 6 個の突然変異が検出された。6 種のマイクロサテライトを平均すると、遺伝子座当り、配偶子当りの突然変異率は被曝配偶子で 0%，非被

曝配偶子では 0.6% であり、両群間で突然変異率に有意差は認められなかった。

b) シングルコピー遺伝子を標的とした調査

シングルコピー遺伝子の欠失／挿入／再配列型突然変異検出を目的として、1) DNA 断片の二次元電気泳動法 (2-DE) (Asakawa *et al.*, 1994, 1995; Kuick *et al.*, 1995) と、2) Southern プロット法で検出されるバンドの定量法 (Takahashi *et al.*, 1995) を導入し、その有効性について検討した。2-DE 法は、Hatada ら (1991) が報告した制限酵素切断片をランドマークとするゲノム分析法を我々の目的に応じて改良したものである。2-DE ゲル上のスポット及び Southern フィルター上のバンドは、常染色体上の DNA 断片に由来するものであれば、通常は 2 個の対立遺伝子の DNA 断片から成っている。しかし、一方の対立遺伝子に、欠失／挿入／再配列型突然変異が生じて DNA 断片の長さが変化すると、本来の位置には正常対立遺伝子に由来する DNA 断片だけが残り、そのスポットまたはバンドの量は 1/2 になる。従って、スポットまたはバンドの量が 50% に減少したことを正確に検出できる定量法が必要となる。

2-DE 法では、DNA を *Not*I と *Eco*RV を用いて消化した後、*Not*I サイトをラジオアイソトープ (³²P) で標識し、アガロースゲル中で一次元目の電気泳動を行った。分子量に従って分離した DNA 断片を、ゲル中で *Hinf*I を用いて消化した後、一次元ゲルをそのまま平板上のポリアクリルアミドゲル上にのせて二次元目の泳動を行った。1 枚のゲルで約 2000 個の DNA 断片を、プローブを使わずに検出できる。*Not*I の切断配列は CpG アイランドに多く存在するため、検出される DNA 断片は CpG アイランドを含む場合が多い。CpG アイランドは遺伝子と遺伝子発現に関与する領域に多いことが知られている。従って、2-DE で検出されるスポットの多くは、機能を持つ遺伝子由来の DNA 断片である可能性が高い。3 組の父-母-子の DNA について 2-DE を行った。得られた泳動像の解析は、ミシガン大学で開発されたコンピュータプログラムを搭載した画像解析装置を用いて行った。検出された 2000 個以上の DNA 断片 (スポット) のうち約 800 個について定量を

行った。そのうち約 500 個に関しては、スポット量の 50% 減少を正確に再現性良く検出できた。突然変異の生じた DNA 断片の特性解明のため、2-DE ゲル上で検出される 2000 個のスポットをほぼカバーするヒトゲノム DNA の *Not*I/*Eco*RV 断片のライブライ化を行った。また、2-DE ゲル上の特定のスポットを取り出して直接クローニングする方法も確立した。近い将来、この方法を用いて試行調査集団に対する調査を行う予定である。

Southern フィルター上のバンドの定量法では、非ラジオアイソトープ (non-RI) プローブとしてシゴキシゲニン標識プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った後、化学発光で生じた光子を高感度光子カメラを備えた画像解析装置で測定する。この間の一連の反応について最適条件を決定した。β-グロビンと、I 型プロコラーゲン α-2 鎮をプローブとした予備実験によって、この方法は欠失／挿入／再配列型突然変異がもたらすバンドの量的变化を、正確に再現性良く検出できることが判明した。今後は、Russell ら (1951) が放射線誘導突然変異研究に用いた 7 種のマウス特異遺伝子座に相当するヒト遺伝子、またはその近傍に存在する遺伝子に関し、この方法を用いて試行調査を行う予定である。

5. あとがき

種々のマーカーを用いて、今までに行われた遺伝学調査において、原爆放射線が被爆者の子供において、統計的に有意な遺伝的影響を示したという事実はない。しかし、英国のセラフィールドの核処理施設従業員の子供に見られた白血病群で一時問題になったように (Neel, 1994; Tawn, 1995)，放射線被曝のもたらす継世代的影響は重大な科学的、社会的問題として注目を集めている。我々は、DNA レベルの研究から得られるデータが、この問題に寄与できることを期待して、研究を行っている。

参考文献

- Asakawa, J., R. Kuick, J. V. Neel, M. Kodaira, C. Satoh and S. M. Hanash (1994) Genetic variation detected by

Table 3. Mutation rates at six minisatellite loci.

Locus	Mutation rates		
	Exposed parents	Unexposed parents	Total parents
<i>Pc-1</i>	0/65 (0%)	0/183 (0%)	0/248 (0%)
<i>λTM-18</i>	0/65 (0%)	0/183 (0%)	0/248 (0%)
<i>ChdTC-15</i>	0/65 (0%)	0/183 (0%)	0/248 (0%)
<i>pλg 3</i>	1/65 (1.5%)	0/183 (0%)	1/248 (0.4%)
<i>λMS-1</i>	1/65 (1.5%)	11/183 (6.0%)	12/248 (4.8%)
<i>CEB-1</i>	4/65 (6.2%)	11/183 (6.0%)	15/248 (6.0%)

- quantitative analysis of end-labeled genomic DNA fragments, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 9052–9056.
- Asakawa, J., R. Kuick, J. V. Neel, M. Kodaira, C. Satoh and S. M. Hanash (1995) Quantitative and qualitative genetic variation in two-dimensional DNA gels of human lymphocytoid cell lines, Electrophoresis, **16**, 241–252.
- Awa, A. A., T. Honda, S. Neriishi, T. Sofuni, M. Itoh, H. B. Hamilton, H. Shimba, K. Ohtaki, M. Nakano and Y. Kodama (1987) Cytogenetic studies of the offspring of atomic bomb survivors, In: G. Obe, A. Basler (Eds.), Cytogenetics: basic and applied aspect, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 166–183.
- Ehling, U. H. (1984) Methods to estimate the genetic risk, In: G. Obe (Ed.), Mutations in Man, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 292–318.
- Hatada, I., Y. Hayashizaki, S. Hirotsune, H. Komatsubara and T. Mukai (1991) A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 9523–9527.
- Kodaira, M., C. Satoh, K. Hiyama and K. Toyama (1995) Lack of effects of atomic bomb radiation on genetic instability of tandem-repetitive elements in human germ cells, Am. J. Hum. Genet., **57**, 1275–1283.
- Kuick, R., J. Asakawa, J. V. Neel, C. Satoh and S. M. Hanash (1995) High yield of restriction fragment length polymorphisms in two-dimensional separations of human genomic DNA, Genomics, **25**, 345–353.
- Neel, J. V., C. Satoh, K. Goriki, J. Asakawa, M. Fujita, N. Takahashi, T. Kageoka and R. Hazama (1988) Search for mutations altering protein charge and/or function in children of atomic bomb survivors: final report, Am. J. Hum. Genet., **42**, 663–676.
- Neel, J. V., W. J. Schull, A. A. Awa, C. Satoh, H. Kato, M. Otake and Y. Yoshimoto (1990) The children of parents exposed to atomic bombs: estimates of the genetic doubling dose of radiation for humans, Am. J. Hum. Genet., **46**, 1053–1072.
- Roesch, W. C., US-Japan joint reassessment of atomic bomb radiation dosimetry in Hiroshima and Nagasaki, final report, Vol. 1. Hiroshima: Radiation Effects Research Foundation, 1987. または邦訳、田島英三, 重松逸造監修, DS86 翻訳事業会監訳, 原爆線量再評価, 広島および長崎における原子爆弾放射線の日米共同再評価, 産興株式会社, 1989.
- Roesch, W. C., US-Japan joint reassessment of atomic bomb radiation dosimetry in Hiroshima and Nagasaki, final report, Vol. 2. Hiroshima: Radiation Effects Research Foundation, 1987.
- Russell, W. L. (1951) X-ray-induced mutations in mice, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **16**, 327–336.
- Sadamoto, S., S. Suzuki, K. Kamiya, R. Kominami, K. Dohi and O. Niwa (1994) Radiation induction of germline mutation at a hypervariable mouse minisatellite locus, Int. J. Radiat. Biol., **65**, 549–557.
- Satoh, C. and J. V. Neel (1988) Biochemical mutations in the children of atomic bomb survivors, Gann Monograph on Cancer Res., **35**, 191–208.
- Satoh, C., N. Takahashi, J. Asakawa, M. Kodaira, R. Kuick, S. M. Hanash and J. V. Neel (1996) Genetic analysis of children of atomic bomb survivors, Environmental Health Perspectives, in press.
- Schull, W. J., J. V. Neel and A. Hashizume (1966) Some further observations on the sex ratio among infants born to survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki, Am. J. Hum. Genet., **18**, 328–338.
- Takahashi, N., J. Kaneko and C. Satoh (1996) Quantitative analysis of bands on a Southern filter using non-radioactive (Digoxigenin)-labeled probes, J. Hiroshima Med. Assoc., in press.
- Tawn, E. J. (1995) Leukaemia and Sellafield: is there a heritable link?, J. Med. Genet., **32**, 251–256.
- Yoshimoto, Y., J. V. Neel, W. J. Schull, H. Kato, M. Soda, R. Eto and K. Mabuchi (1990) The frequency of malignant tumors during the first two decades of life in the offspring of atomic bomb survivors, Am. J. Hum. Genet., **46**, 1041–1052.
- Yoshimoto, Y., W. J. Schull, H. Kato and J. V. Neel (1991) Mortality among the offspring (F1) of atomic bomb survivors, 1946–85, J. Radiat. Res., **32**, 327–351.

Environ. Mut. Res. Commun., **17**: 307–308 (1996)

第24回大会ミニシンポジウム-4
「環境変異原と生殖細胞の変異」

ミニシンポジウム「環境変異原と生殖細胞の変異」のまとめ

一つ町晋也（武田薬品工業）
瀧谷 徹（食品薬品安全センター）

「環境変異原と生殖細胞の変異」というテーマで4名のスピーカーと指定討論者の5名の先生に発表いただいた。この顔ぶれは1989年の第1回の本学会の公開ミニシンポジウムとほとんど同じであった。しかし、その発表内容には、約5年間でのこの分野の研究の進歩が認められた。

藤川和男氏（近大原子力研）は、ヒトのダウン症の発生機序に関連して、ショウジョウバエの卵母細胞の第一還元分裂(1stM)中期にCO₂を処理することにより、X染色体の不分離変異体が著しく増加することを認めた。しかし、4GyのX線では不分離の増加は認められなかった。これらの結果は、卵母細胞の1stM中期の細胞外酸素の低下とCO₂の増加が、細胞内pHを低下させ、染色体の不分離体を誘発するという、Gauldenの説を実験的に支持するものである。ショウジョウバエを用いて、ヒトの遺伝の大きな問題に明確な回答を示したことになる。さらに、 Chernobyl原発事故後のダウン症の増加は、妊婦の放射線恐怖によるホルモンバランスの乱れに起因するとの考えを述べた。

嶋 昭経氏（東大理学部）は、10年間にわたる、メダカを用いた生殖細胞突然変異の実験の膨大な成果を発表した。まず、特定座位試験系を確立した。この系は胚発生の早期でも変異体を識別出来る。さらに、発生過程での優性致死も区別出来る利点がある。ガンマ線での急照射実験では、生存突然変異は、マウスの実験結果とほぼ一致した。しかし、ENUを用いた実験結果では、マウスとは異なる知見も得られた。また、分子遺伝学的な手法を導入することにも努力し、AR-PCR法やDD-RT-PCR法が可能となった。メダカは、日本独自の実験系であり、今後の研究の発展が期待される。

瀧谷 徹氏（食品薬品安全センター）はマウスの発生中に出現し、すべての生殖細胞の根幹細胞となる、始原生殖細胞(PGC)がENUによって、容易に突然変異が誘発されることを、特定座位試験で確認した。突然変異の誘発には時期特異性と用量依存性が認められている。さらに、この結果は、トランジェニックマウス試験でも確認された。これまで、マウスPGCは、放射線を用いた実験から、放射線に対して感受性が低いとされている。今後、多くの変異原物質について実験し、ヒトの遺伝的影響に資することが期待される。

高橋規郎氏（放影研）は、原爆被爆者の遺伝的影響の、DNAレベルでの調査の方法に関する発表をした。これまでに、放影研では多数の被爆家族について、タンパク質などの変異を電気泳動によって調査したが、被爆によって突然変異が増加したとの結果は得られていない。そのため、さらに被爆の影響について、DNAレベルでミニサテライトなどでの突然変異を調査したが、現在までに、その影響は認められていない。そこで、さらにシングルコピー遺伝子の欠失、挿入および再配列型突然変異の検出に着手している。原爆被爆の影響については、世界的にも大きな問題であり、この結論を得るために、大変な努力を続けておられるに敬意を表したい。

指定討論者の美甘和哉氏（旭川医大）はヒトの生殖が実験動物や家畜とは大きく異なっていることを、豊富なデータを用いて指摘した。特に、ヒト精子は、染色体の構造異常の頻度が非常に高いという報告

は、ヒトの遺伝的リスクを考える上で重要な点であろう。

生殖細胞を用いる変異原試験の最大の目的は、ヒト生殖細胞での突然変異のリスクを把握することにある。今回、原爆被爆者の子孫では、これまでに突然変異が誘発されていないという結果と、逆に、ヒト精子の染色体には構造異常が多発しているとの報告があり、ヒトの生殖細胞が変異原物質に対して、どのような感受性を持っているかについての議論があった。そのためには、実験生物を、化学物質の代謝やDNA修復過程がよりヒトに近似したものになるように改良し、それらを用いた実験結果から、ヒトでの遺伝的リスクを正確に推定することが必要となるものと思われる。

変異原性が認められた化学物質の取扱いについて

労働省労働者労働基準局では、従来から、労働安全衛生法(安衛法)に基づき、新規および既存の化学物質について、有害性の調査を行ってきた。

この度、労働省より、日本化学工業品輸入協会宛に下記通知があったため、参考資料として紹介する。

基発第348号の2

平成7年6月1日

労働者労働基準局長

これまで、労働安全衛生法(以下「法」という。)第57条の2の規定に基づき事業者が行う新規化学物質の有害性調査の結果、強度の変異原性が認められた合計133の新規化学物質及び法第57条の4の規定に基づき国が自ら実施する既存化学物質の有害性調査の結果、強度の変異原性が認められた合計69の既存化学物質については、これら化学物質を製造し、又は取り扱う事業者が、平成5年5月17日付け基発第312号の2の別添「変異原性が認められた化学物質による健康障害を防止するための指針」(以下「指針」という。)に定める措置を講ずるようその周知をお願いしているところです。

このたび、法第57条の2の規定に基づき有害性の調査の結果が届け出られた別紙1に掲げる24の新規化学物質及び法第57条の4の規定に基づき国が有害性の調査を実施した別紙2に掲げる7つの既存化学物質について、それぞれ有害性の調査に関し、学識経験者から「変異原性の結果、強度の変異原性が認められる」旨の意見を得ましたので、これらの化学物質を指針に基づく措置が必要な化学物質とすることとし、別紙1に掲げる新規化学物質を届け出た事業者に対しては、指針に基づく措置を講ずるよう要請したところです。

つきましては、貴会傘下会員に対し、別紙1に掲げる新規化学物質又は別紙2に掲げる既存化学物質を製造し、又は取り扱う際には、指針に示された措置を講ずるよう周知指導方御配慮頂きますようお願いいたします。

なお、指針は、多くののがん原性物質(ヒト又は動物に対してがんを生じさせることが確認されている物質)が強度の変異原性が認められる化学物質であることに鑑み、予防的な観点から必要な措置を定めているものであることを念のため申し添えます。

別紙1

変異原性が認められた新規化学物質

番号	名称公表 通し番号	名称公表年月日 名称公表告示番号	名 称
1	4578	平成3年12月25日 労働省告示第86号	3,5-ジクロロ-4-メトキシニトロベンゼン
2	5223	平成5年3月25日 労働省告示第21号	(5R)-5-[(2R)-1,4-ジオキサスピロ[4,5]デカン-2-イル]3,4-ジヒドロキシ-2,5-ジヒドロフラン-2-オン
3	5632	平成5年12月24日 労働省告示第128号	N-[1-[(3-[(2R,3S)-3-[(R)-1-(トリメチルシリルオキシ)エチル]-4-オキソ-2-アセチジニルメチルカルボニルチオ]-1-ピロリジニル]エチリデン]カルバミド酸=p-ニトロベンジル
4	5633	平成5年12月24日 労働省告示第128号	4-ニトロ-1H-インダゾール

番号	名称公表 通し番号	名称公表年月日 名称公表告示番号	名 称
5	5637	平成5年12月24日 労働省告示第128号	(5R,6S)-3-[<i>S</i>]-[<i>N</i> -(<i>p</i> -ニトロベンジルオキシカルボニル)アセトイミドイル]-3-ピロリジニルチオ]-7-オキソ-6-[<i>(R)</i> -1-(トリメチルシリルオキシ)エチル]-1-アザビシクロ[3.2.0]ヘプタ-2-エン-2-カルボン酸= <i>p</i> -ニトロベンジル
6	5640	平成5年12月24日 労働省告示第128号	2,5-ビス(クロロメチル)-1,4-ジチアン
7	5727	平成6年3月28日 労働省告示第25号	3-(2,3-エポキシプロピルオキシ)-1,2-エポキシプロパンと 3-[ビス(2-メトキシ-1-メチルエトキシメチル)メトキシ]-1,2-エポキシプロパンと 1,3-ビス(2-メトキシ-1-メチルエトキシ)-2-プロパノールと 3-(2-メトキシ-1-メチルエトキシ)-1,2-エポキシプロパンの混合物
8	5736	平成6年3月28日 労働省告示第25号	1-(2-クロロベンジル)-3-(α,α -ジメチルベンジル)尿素
9	5737	平成6年3月28日 労働省告示第25号	[3-(クロロメチル)フェネチル]トリメトキシシランと [4-(クロロメチル)フェネチル]トリメトキシシランの混合物
10	5761	平成6年3月28日 労働省告示第25号	3-[1-(2-ジメチルアミノエチル)-1 <i>H</i> -1,2,3,4-テトラゾール-5-イルチオメチル]-7-(4-ニトロフェニルチオアミノ)-8-オキソ-5-チア-1-アザビシクロ[4.2.0]オクタ-2-エン-2-カルボン酸
11	5843	平成6年3月28日 労働省告示第25号	ジベンジル=フェニルスルホニウム=ヘキサフルオロアンチモナート
12	5873	平成6年3月28日 労働省告示第25号	3-(2-メトキシ-1-メチルエトキシ)-1,2-エポキシプロパン
13	5926	平成6年6月24日 労働省告示第57号	<i>N</i> -[(6 <i>R</i>)-5-オキソ-2-(2-チエニル)ペルヒドロ-1,4-チアゼピン-6-イル]カルバミド酸= <i>tert</i> -ブチル
14	5942	平成6年6月24日 労働省告示第57号	2-クロロ-2-(2-クロロフェニル)エタノール
15	5944	平成6年6月24日 労働省告示第57号	2-クロロ-5-(トリクロロメチル)ビリジン
16	5964	平成6年6月24日 労働省告示第57号	3,5-ジニトロ安息香酸=2-(メタクリロイルオキシ)エチル
17	5979	平成6年6月24日 労働省告示第57号	(<i>R</i>)-2-トシリオキシプロピオン酸メチル
18	6004	平成6年6月24日 労働省告示第57号	<i>N</i> -(<i>tert</i> -ブтокシカルボニル)- <i>S</i> -[2-ニトロ-1-(2-チエニル)エチル]-L-시스ティン
19	6045	平成6年9月26日 労働省告示第93号	アクリル酸ヒドロキシプロピルとエチレンイミンの反応生成物
20	6097	平成6年9月26日 労働省告示第93号	(クロロメトキシ)エタン
21	6148	平成6年9月26日 労働省告示第93号	<i>p</i> -トルエンスルホン酸=2,3-エポキシプロピル
22	6149	平成6年9月26日 労働省告示第93号	5-ニトロ-2-インドールカルボン酸エチル
23	6223	平成6年12月26日 労働省告示第116号	(2 <i>Z</i>)-2-(5-アミノ-1,2,4-チアジアゾール-3-イル)-2-(メトキシミノ)アセチル=クロリド
24	6295	平成6年12月26日 労働省告示第116号	1-(4-ニトロフェノキシ)-2-プロパノン

別紙2
変異原性が認められた既存化学物質

番号	名 称 (別 名)	官報公示整理番号	CAS 番号
1	2'-(4-クロロ-3-シアノ-5-ホルミル-2-チエニルアゾ)-5'-ジェチルアミノアセトアニリド	8-(6)-145 (労)	104366-25-8
2	2'-(4-クロロ-3-シアノ-5-ホルミル-2-チエニルアゾ)-5'=ジェチルアミノ-2-メトキシアセトアニリド	8-(6)-146 (労)	122371-93-1
3	<i>N,N</i> -ジフェニルニトロアミン (<i>N</i> -ニトロソジフェニルアミン)	3-431 (化)	86-30-6
4	5'-[ビス(2-アセトキシエチル)アミノ]-2'-(2-プロモ-4,6-ジニトロフェニルアゾ)-4'-メトキシアセトアニリド	4-(13)-201 (労)	3618-72-2
5	<i>o</i> -フェニレンジアミン (<i>o</i> -ジアミノベンゼン)	3-185* (化)	95-54-5
6	<i>p</i> -フェニレンジアミン (<i>p</i> -ジアミノベンゼン)	3-185* (化)	106-50-3
7	1-プロモ-3-クロロプロパン	2-(13)-64 (労) 9-1247 (化)	109-70-6

注1) 名称は五十音順に配列している。

注2) 官報公示整理番号とは、労働安全衛生法第57条の2第1項の規定に基づく同法施行令第18条の2第4号に定める化学物質及び同法第57条の2第3項の規定によりその名称が公表された化学物質について、官報公示の際に付けられた番号である。

注3) 官報公示整理番号の右肩に付した*は、当該番号が、2種以上の異性体、同族体等を含めたものとして付けられていることを示すものである。

注4) 官報公示整理番号の後に付した(労)は、当該番号が労働安全衛生法に基づき官報公示された際に付けられたものであること、(化)は、当該番号が昭和54年6月29日までに「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」に基づき官報公示された際に付けられたものであることを示すものである。

注5) CAS番号とは、米国化学会のケミカル・アブストラクト・サービス(CAS)において化学物質検索を容易にするために付けられた番号のことであり、国際的に文献調査等の際に広く利用されているものである。

(編集委員長記)

講演要旨

——原爆被爆 50 周年——

日本放射線影響学会・日本環境変異原学会 合同シンポジウム

生体リスク評価の現状と未来

——動物モデルから人へ——

主催: 日本放射線影響学会, 日本環境変異原学会

後援: 放射線影響協会

司会: 秋山實利, 伊藤千賀子, 鎌田七男

開催: 1995 年 5 月 29 日 広島国際会議場

基調講演

ゲノム不安定性とがん

寺田 雅昭

国立がんセンター研究所

正常細胞が転移能、浸潤能のある臨床的に問題となるがんになるには多くの発がん段階が必要である。この多段階の発がん過程においては夫々の臓器や組織型に特異的な複数の遺伝子変化がおきることも明らかとなり、我々の研究室を含めて詳細なシナリオが個々のがんで追求されている。発がん過程で変化する個々のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の産物の機能及びその相互作用としてのシグナル伝達の機構や細胞回転の制御機構が明らかになってきている。

発がん過程における遺伝子変化は全発がん過程において同じ確率でおきるのではなく、発がんの後期にはいわゆるゲノムの不安定性がおき、より迅速に多くの遺伝子変化がおきると考えられる。臨床的に問題となるがんになるために重要な役割をしているこのゲノムの不安定性の機構については、ミスマッチ DNA 修復酵素の遺伝子の変異が原因の一つとして明らかにされているがその機構の全容については不明である。我々は発がん過程の後期にゲノムの不安定性の結果おきると考えられる遺伝子増幅を中心にゲノムの不安定性について研究を行ってきた。その結果、一つのがん細胞には頻々異なった染色体位置に多くの増幅ユニットがあり、その個々の増幅ユニットは数百 Kb および、複数個の遺伝子が存在することを明らかにした。また、これらの増幅ユニット上に存在するがん関連遺伝子を数種類分離・同定している。さらにこれらの増幅ユニットの研究の過程で Exon Trapping 改良法、cDNA の直接ハイブリダイゼーション法など巨大 DNA 断片上の遺伝子の同定法、ゲノムサブトラクションによる未知増幅ユニットの分離法、さらには遺伝子の機能の個体レベルにおける新しい解析法を開発した。ヒトがんにおける複数遺伝子変化とゲノムの不安定性について我々の研究室の成果を中心に他の研究室からの成果も加えてまとめて述べ、これらの研究成果のがん診療及び予防における意義について述べる。

Preferential repair of DNA damage in transcriptionally active DNA: human vs. rodent cells

Steven A. Leadon

Department of Radiation Oncology, University of North Carolina

DNA is subject to damage produced by environmental agents, such as radiation and reactive chemicals, and by endogenous events occurring naturally in the cellular environment. Risk assessment for human carcinogenesis requires determining effective levels of DNA damage for producing malignancy. These levels of damage will be modulated by the repair responses of the target tissue, and hence it is of obvious importance to understand the mechanisms available to normal human cells for repairing damage produced by different agents. The consequences of unrepaired DNA damage is illustrated by the extreme cancer-proneness of patients suffering from human genetic repair deficiency diseases, such as xeroderma pigmentosum, ataxia telangiectasia, and Fanconi's anemia. Since studies of experimental induction of carcinogenesis must of course be performed with animals, usually rodents, it is equally important to consider differences in DNA repair between rodent and human cells in order to permit effective extrapolation of carcinogenic potency data to humans. It is now clear that the organization of DNA into the complex structures of chromatin and functional domains affects the efficiency of excision repair. A large body of evidence has shown that damage produced by ultraviolet (UV) light or by some chemical carcinogens is repaired more rapidly in transcriptionally active DNA than in the genome as a whole and that this preferential repair is due to a faster repair of damage in the transcribed strand. Although the original demonstration of such strand-specific repair of UV damage was for mammalian cells, it has now also been demonstrated in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* and hence appears to be a highly conserved pathway for excision repair. We have recently shown that preferential repair of UV damage in active genes is specifically defective in Cockayne syndrome cells, with a complete absence of selective repair on the transcribed strand of active genes. In addition, we have found that damage induced by ionizing radiation is also preferentially repaired in the transcribed strand of active genes in normal human cells. Perhaps significantly for carcinogenesis, the functional application of cellular repair capacity to different regions of the genome appears to be quite different in rodents versus human cells. While the latter repair UV-induced pyrimidine dimers much faster in the transcribed strands, eventually the entire genome is repaired. In contrast, rodent cells perform essentially no repair of this damage in nontranscribed regions of the genome. Failure to repair nontranscribed DNA sequences such as developmentally regulated proto-oncogenes could have consequences for carcinogenesis by mutational activation of these sequences. Our recent evidence suggests that such differences may be equally important considerations for ionizing radiation carcinogenesis.

tools for assessment of the effects of radiation exposure in populations and individuals. The power of aberration frequency analysis has been increased significantly by the development of fluorescence *in situ* hybridization (FISH), chromosome-specific probes and computer assisted microscopy. Aberrations may be made visible in metaphase spreads by FISH with whole chromosome probes (WPCs) specific for or one or a few chromosomes^{2,3)} or in interphase nuclei by FISH with probes to normally contiguous regions of repeated sequences⁴⁾ and scored rapidly using semi-automated digital imaging techniques⁵⁾. These technologies allow practical analysis of large numbers of stable chromosome aberrations such as translocations so that analyses can be carried out at long times after exposure. Indeed, it now appears that these technologies will allow analysis of the tens of thousands of cells needed to detect and quantify the changes in aberration frequency produced by low radiation exposure (<0.3 Sv). This is a major step forward but is only of several steps required for accurate risk assessment (especially if this is to be attempted in individuals⁶⁾). Also necessary is detailed information about the impact on translocation frequency of (a) radiation exposure rate, (b) the biology of the hemopoietic system (assuming that translocation are measured in peripheral lymphocytes), and (c) individual variation in susceptibility to translocation frequency formation (possibly a function of the efficiency of DNA repair and/or in genetic damage surveillance). Cancer risk assessment also requires careful consideration of the incremental increase above background in translocation frequency and individual susceptibility to cancer induction. Molecular cytogenetic techniques are important tools for development of this information. One of the large uncertainties in cancer risk assessment derives from our poor understanding of the genetics of cancer susceptibility. A few genes (e.g. p53, BRCA1, hMSH2) have been discovered that, when mutated, significantly increase cancer risk. However, it is likely that numerous other genes will be discovered that are equally important, especially for non hereditary cancers. Most such genes are likely to be of the tumor suppressor type and loss of one normal allele is an important step toward gene inactivation. Comparative genomic hybridization (CGH) is an important tool for identification of allelic loss through physical deletion⁷⁾. This technique is particularly powerful since it can be applied to spontaneous tumors and requires no culture. Indeed it can be applied to material isolated from archived, paraffin embedded material. CGH already has been applied to analysis of most common solid tumors and numerous regions of common deletion have been localized that may harbor genes that when mutated, increase genetic susceptibility to cancer. It now remains to identify the involved genes and to determine which are susceptibility genes (likely to be those that are found in early tumors) and which contribute to progression.

- 1) Bender, M. et al., Mutation Research, **196**, 103–159, 1988.
- 2) Pinkel, D. et al., PNAS (USA), **85**, 9138–9142, 1988.
- 3) Lucas, J. et al., Int. J. Radiat. Biol., **62**, 53–63, 1992.
- 4) Rupa, D. et al., Cancer Res., **55**, 640–645, 1995.
- 5) Piper, J. et al., Cytometry, **16**, 7–16, 1994.
- 6) Gray, J. W. et al., in *Biomarkers and occupational health*, M. Mendelsohn, J. Peeters, and M. J. Normandy, Editor. 1995, Joseph Henry Press: Washington, D.C., pp. 194–214.
- 7) Kallioniemi, A. et al., Science, **258**, 818–821, 1992.

Molecular cytogenetics and the assessment of cancer risk

Joe Gray

Division of Molecular Cytometry, Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco

Studies of exposed populations during several decades have demonstrated that the frequency of chromosome aberrations increases with increasing exposure to ionizing radiation as does the risk of developing cancer¹⁾. As a result of these studies, aberration frequency analysis has become one of the most important

SCID-hu マウスモデルを用いたヒト放射線リスクの解析

京泉誠之

放射線影響研究所

人体組織に対する放射線の影響を研究するためにヒトを実験的に放射線照射することは倫理的に認められない。しかし、もしヒトの正常組織を動物に移植できれば放射線の影響を直接観察できるだろう。

SCID マウスは機能的な T 及び B リンパ球をもたず、ヒト組織の移植効率はヌードマウスより優れているため、この目的に適した動物である。ヒト正常組織を移植された SCID マウス (SCID-hu マウス) を用いた放射線照射モデルは、原爆被爆者などヒトの調査で得られた知見と動物実験により得られた知見との間を橋渡しするデータを提供することが期待される。

ヒトに対する放射線の影響は急性効果と晩発効果に分けられるが、現在までのところ SCID-hu マウスを用いて少なくとも急性効果を再現できることが示されている。つまり、SCID マウスにヒト皮膚や骨髄組織を移植することによりヒトの代表的な急性症状である、脱毛と骨髄抑制が観察されその線量効果や組織変化などを詳細に解析することが可能となった。また、急性症状の 1 つである腸障害に関しても小腸を移植することにより検討中である。本シンポジウムではこれら急性放射線障害を中心にお話ししたい。

放射線被曝はヒト体細胞に突然変異や染色体異常を誘導するが、それらの *in vivo* の Dose response やメカニズムについては不明な点が多い。これらの問題にも SCID-hu マウスモデルを用いたアプローチが有効と考えられ、その可能性について論じたい。

ところで、最も関心が持たれているのは晩発効果としてのヒト放射線発癌を SCID-hu マウスモデルを用いて再現することであろう。もし、それが可能になれば発癌プロセスの追跡や線量効果の検討が可能となりその有用性は計り知れない。しかし、原爆被爆者の調査では固形癌の発症は潜伏期 10 年以上を経て初めて放射線の影響が確認されており、かなり長期の観察が必要となろう。そのためには放射線照射したヒト組織を SCID マウス間で何代も植継ぐことになるかもしれない。また腫瘍プロモーターや放射線照射を工夫することにより発癌時期を早めることも可能かもしれない。本シンポジウムではこれら SCID-hu マウスを用いた発癌モデルの可能性についても言及する予定である。

S-2

トランスジェニックマウスを用いた新しい生体リスク評価システム

勝木 元也

九州大学生体防御医学研究所

がんは体細胞突然変異に起因する細胞の異常増殖である。したがって、発がんのリスク評価には、哺乳動物の体細胞突然変異が、いつ、どの細胞で、どのような頻度で生じるかを測定することが評価の基礎となる。しかし、われわれのもつゲノム遺伝子数の莫大さと体細胞突然変異率の低さとから、哺乳動物体細胞遺伝子に生じる突然変異を鋭敏かつ迅速に体系だって検出することは難しい。一方、単細胞系では、バクテリア細胞での突然変異誘発率を簡便に検定する方法がある (Ames ら)。そこで、哺乳動物細胞における突然変異を検出するために、原核細胞、真核細胞の両方での複製できるシャトルベクターを哺乳動物細胞内に導入し、突然変異誘発の後、ベクターを回収し、バクテリア細胞に導入し突然変異を検出するという方法が近年開発された。さらにこの方法が哺乳類個体内の各組織で生ずる突然変異を鋭敏かつ迅速に分子レベルで解析する方法に適用された。それは、トランスジェニックマウスを用いる方法である。哺乳動物個体内で生じた真の意味での「生体内」での突然変異を解析するには、大腸菌などで簡単に突然変異の有無を検出できるシャトルベクターを導入したトランスジェニックマウスを用いればよいからである。

われわれは、モニター遺伝子として大腸菌で Sm 感受性／耐性を支配するリボゾームタンパク質小サブユニット L (rpsL) の野性型遺伝子をもつプラスミド pML4 を組み込んだトランスジェニックマウス (HITEC マウス) を作成した。このマウスは、その体の全細胞に rpsL 遺伝子をもち、他の内在性の遺伝子と同様且つ同程度に頻度は低いけれども体細胞突然変異を生じるものと考えられる。rpsL に突然変異が生じると、Sm 感受性は、耐性に転換する。測定の結果、どの臓器でも自然変異率は約 10^{-5} であり、また、化学発がん剤の投与により、その率が 5 倍以上にあがることが解り、この系の有効性が示唆された。

S-3

マウスミニサテライト配列における高頻度の生殖細胞突然変異とリスク評価

丹羽 太貴

広島大学原爆放射能医学研究所

放射線による遺伝的影響とそのリスク評価には、従来マウスにおける特定遺伝子座テストが用いられてきた。しかしこの系での突然変異率は 10^{-5} レベルであり、放射線の遺伝的影響について統計的に有意なデータを得るには数多くのマウスを用いなければならない。一方、マウスやヒトで広く分布している種々の反復配列には、自然突然変異率が高いものがあり、放射線の遺伝的影響の解析に有用であると思われる。本研究ではマウスミニサテライト配列の Pc-1 遺伝子座について、放射線誘発生殖細胞突然変異を解析した。

Pc-1 遺伝子座は GGGCA 反復配列よりも、C3H マウスでは約 3 kb の、C57BL マウスでは約 8 kb のバンドとして検出される。C3H 雄マウスにガンマ線を照射ののち、C57BL 雌マウスと交配して、生まれた F1 マウスについて Pc-1 遺伝子座の解析を行った。交配は、精子期、精細胞期、精原細胞期に対する放射線の影響を見るため、照射直後、2~3 週後、10~11 週後にそれぞれ行った。生まれた一腹の F1 のマウスについて両親マウスの DNA を比較して、異なる長さの Pc-1 遺伝子座をもつものを突然変異個体とした。

Pc-1 遺伝子座は生殖細胞突然変異率が非常に高く、非照射群での突然変異頻度は 10% にもおよぶ。照射雄マウスにより生まれた F1 マウスにおいてこの突然変異頻度はさらに上昇する。Pc-1 遺伝子座における生殖細胞突然変異誘発で見た放射線感受性は、特定遺伝子座テストにおけるものと同様に、精子期で低く、精細胞期で高く、精原細胞期で低いというパターンを示す。精細胞期照射については、比較的少数の F1 マウスの解析により統計的に有意な線量効果関係を得ることができ、直線的に上昇する突然変異頻度は 2 Gy で 28% にも達した。これは、倍加線量が約 1 Gy であることを示している。精子期および精原細胞期の照射については統計的に有為なデータを得ることはできなかったが、計算上の倍加線量は両者ともに 6 Gy であった。統計的には有意ではなかったものの、精子期の照射で生まれた F1 マウスでは、雄側の allele 以外に、雌側の allele の突然変異頻度の上昇が見られたのは興味深い。

本研究で見られた高い突然変異頻度は、Pc-1 遺伝子座における突然変異が放射線による DNA 損傷の直接の結果では無く、放射線によりなんらかの誘導機構が働いた結果生じたことを示している。従来知られていなかったこのような突然変異の誘発機構とそのリスク評価における意義は今後の課題である。

マウスモデルにおける継世代的影響リスク

野村 大成

大阪大学医学部

人類において、遺伝性を疑わせる疾患は、約 10% (100 万人中 105,900 人) あるとされ、その中でも大多数 (90,000 人) を先天異常、晩年にあらわれる異常、体质的、退行性疾患などの遺伝性の低いとされる多因子性疾患が占めている (UNSCEAR, 1982)。この中にはがんは入っていない。

一方、マウスを用いた膨大な実験で、親マウスへの放射線照射により、 F_1 に致死 (いわゆる優性致死、ヒト流・死産に相当)、遺伝子欠失による突然変異 (塩基置換による血性蛋白の変異は誘発されない) が明確に誘発される他、ヒトによくみられるがんと奇形が有意に増加し、次世代に伝わっていく可能性が示された (Nature, 1982)。従って、放射線の継世代的 (遺伝的) 影響のリスク評価の中で多因子性疾患の取り扱い (がんを含めてより広範囲の疾患が遺伝性を示すのでは?) が問題となり、1986 年以降の UNSCEAR 等国際委員会の報告でもこの部分は未解決のまま残されている。1982 年来、マウスの継世代的のがん実験について寄せられた問題点を列举し、生体リスク論議の材料としたい。

1. 致死: 減数分裂後の精細胞の被曝 (被曝直後の授精) に高率に誘発。精原細胞期被曝 (被曝後月日がたったもの) では極小→ヒトには応用しにくい。
2. 奇形: 優性骨格突然変異の 4~10 倍。但し、全ての異常を観察のため、多くの追試確認あり。精原細胞期照射では低い→ヒトには応用しにくい。
3. がん: 通常のマウス突然変異の 100 倍以上の頻度。但し、自然発生率も同じように高い。倍加線量等は決して低くない。
 - 1) 良性腫瘍のみ誘発? 否、殆どが悪性腫瘍。
 - 2) マウス系統特有の普通の腫瘍が高発。系統差明白。ヒトにみられる小児癌はマウスではない。
 - 3) 追試確認は不十分。但し、ヒトでの観察が容易かつ重要。

体細胞突然変異の検出とリスク評価への応用

秋山 實利

放射線影響研究所

癌の分子生物学的知見の蓄積に伴い、癌リスク評価の分野が注目を集めつつある。癌遺伝子や癌抑制遺伝子の解析は遺伝子 DNA の塩基置換、欠失、組換え、增幅などの突然変異が発癌の引金になっていることを見事に示した。従って、*in vivo* の体細胞突然変異のモニタリングは環境変異原曝露による癌リスクの評価のためのバイオマーカーとなりうるだろう。現在、体細胞突然変異アッセイ法としては赤血球のグリコフォリン A (GPA) 遺伝子及び T リンパ球の HPRT, HLA-A, TCR $\alpha\beta$ 各遺伝子について確立されている。これらは発癌に直接関与している遺伝子の変異を検出・定量するものではないが、それら

を間接的に反映していると思われる。このうち GPA 法は主に長寿命の骨髄幹細胞に蓄積される突然変異を検出しているために、生涯に渡る変異原曝露のバイオマーカーとして使えるだろう。本シンポジウムでは原爆被爆者の GPA 突然変異を例に癌リスク評価への応用の可能性を論じてみたい。

原爆被爆者集団はその被曝線量が比較的はっきりしており、癌リスクの Dose response もよく調べられているので、体細胞突然変異と癌リスクの関係を調べるには適した集団である。今回 1,226 名の広島と長崎の原爆被爆者について欠失型 GPA 突然変異体頻度 (Mf) はわずかではあるが有意に測定時年齢あるいは喫煙タバコ本数にともない上昇した。また、Mf は喫煙の影響を補正後でも男性の方が女性よりも有意に高く、さらに広島の方が長崎よりも高かった。これらすべての background GPA Mf の特徴は以前の原爆被爆者の疫学的調査から得られた固型癌発症率の特徴と一致した。Mf の線量効果に関する解析により倍加線量は約 1.20 Sv で、一方、Mf の有意な上昇を検出できる最低線量は約 0.24 Sv であることが分かった。線量効果については性差、市間差及び被曝時年齢の有意な影響は見い出されなかった。興味あることに、GPA Mf の倍加線量は原爆被爆者の固型癌発症率のそれ (1.59 Sv) と近い値であった。また、最低検出線量も固型癌発症率のデータ (0.20~0.49 Sv 群ではじめて有意なリスクの上昇が検出される) と矛盾しなかった。これらの知見は体細胞突然変異が放射線被曝による癌の過剰リスクの主要な原因になっているという仮説と一致する。さらに、線量効果は測定前あるいは測定後に癌と診断された者の方が癌の既往歴のない者よりも有意に高かった。これは Mf が上昇したために癌の発症が早まったか、あるいは癌グループでは放射線感受性が高いことを示唆しているのかもしれないが、癌グループにおける線量推定の過小評価可の能性も考慮に入れなければならない。以上の結果は GPA Mf は放射線被曝者の癌リスク評価を行うための生物学的マーカーになりうることを示唆している。

染色体異常からみた発癌リスクとその応用

田中公夫・鎌田七男

広島大学原爆放射能医学研究所

放射線被曝によってヒト体細胞には安定型ならびに不安定型染色体異常が生じる。不安定型染色体異常は細胞分裂を数代経るうちに消滅するが、安定型異常は 50 年以上の長期にわたって存続する。本シンポジウムでは、この安定型染色体異常がどの程度発癌リスク評価になりうるかについて、原爆被爆者資料をもとに討議したい。

染色体異常頻度からみたリスク評価:

原爆被爆者は被曝線量に相応して染色体異常を保有しており、これまでに T リンパ球、B リンパ球、骨髄細胞、線維芽細胞でその異常性が証明されている。他の組織においても線量依存性に染色体異常が存在することは間違いない。T リンパ球に関しては、染色体異常率 = $3.0 + 9.1 \times \text{被曝線量 (ABS93D)}$ で表すことができる。すなわち、染色体異常率を観察することにより各個人の被曝した線量が推定できる (推定可能な下限値は 0.1 G)。

被曝線量が 1 Gy 以上のグループでは白血病、乳癌、肺癌などの発生率が明らかに高くなっている、発癌 high risk group と言える。一方、白血病細胞の染色体側からみた場合、1 Gy 以上被曝した被爆者白血

病では100%に染色体異常が見出され、*de novo* 白血病とは異なった種々の染色体異常を示す。すなわち、1 Gy以上の被爆者白血病細胞は被曝当時直接に放射線損傷をうけた幹細胞由来であると考えられる。このように染色体異常頻度は当時の被曝線量の推定を可能にすると共に、ある程度のリスク評価に役立つ。

染色体異常型からみたリスク評価：

原爆被爆者のTリンパ球にみられる染色体異常は約60%が転座、20%が欠失、残りが逆位、重複あるいはこれらを含む複雑異常である。骨髄細胞、TおよびB細胞リンパ球を詳細に観察したが、白血病に特異的な転座型異常（たとえば8;21, 15;17転座など）はこれまで1個も見出されていない。1 Gy以上の被爆者白血病細胞には5番、7番の異常が有意に多い。

白血病化にはむしろ欠失型異常が強く関与している可能性がある。

染色体異常の経時的变化からみたリスク評価：

骨髄細胞染色体を経時的に観察した10名の被爆者のうち5名が癌／白血病で死亡した（胃癌3.6 Gy, 乳癌3.9 Gy, 脳腫瘍3.6 Gy, 急性白血病2.6 Gy, 慢性骨髓性白血病2.4 Gy）。慢性骨髓性白血病発症前の6～11年における経時的観察では骨髄細胞染色体異常クローニングの交替現象がみられた。急性白血病例では不応性貧血期にみられた異常クローニングが増加の一途をたどった。固形癌症例では骨髄細胞に染色体異常があるもののリスク評価にはなり得なかった。

染色体異常は放射線被曝線量の推定を通じ、また骨髄細胞における経時的観察を通してある程度リスク評価に役立てると考える。

S-8

人差を定量的(mRNAの発現)及び定性的(遺伝子多型)にArntと共に解析し、遺伝的素因の可能性を検討した。その結果、肺での高発現と5倍程度の発現量の個人差、CYP1A1との発現量との相関性が見られた。又、PCR-SSCP法を利用してAhr遺伝子の多型を全てのエクソンについて検討したところマウスで観察されたリガンドとのaffinityに影響を与えるような多型はヒト集団中では見られなかった。

肺癌などの化学発癌においては、ベンズピレンなどの活性型代謝体とDNAとのadduct形成がイニシエーションとして必要であり、一方、p53遺伝子などの突然変異が肺癌発生に本質的であると考えられている。そこで、CYP1A1, GSTM1の多型と肺癌の標的遺伝子と考えられているp53, Ki-Ras遺伝子の突然変異との関連性を喫煙を考慮して解析した。喫煙経験のある扁平上皮癌(72名)及び腺癌(76名)においてCYP1A1の肺癌高感受性型であるC型、Val型はA型、Ile型に比べそれぞれp53遺伝子で2倍、Ki-Ras遺伝子型で3倍の突然変異が生じていることが明らかになった。これらのCYP1A1遺伝子型ごとの標的遺伝子の変異はGSTM1多型との組合せで増幅された。

本シンポジウムではGYPIA1とその発現を調節している転写因子を含めて肺癌感受性の遺伝的素因について論じたい。

食事由来の植物化学物質によるがん予防の可能性

渡邊 昌

国立がんセンター研究所

長年の食事の影響ががんにおよぼす影響はがん化のみならず、がん予防効果もあることが分かってきた。がんの3分の1は食事の影響を受けているとみなされる。一生のあいだに20トン程の食べ物を食べる所以あるから、その中の物質が影響をもつのは当然といえる。

栄養学は炭水化物、たんぱく質、脂肪の3大栄養素の時代から、ビタミンや微量元素の重要性が認識された時代になり、更に最近はフラボノイドや含硫化化合物など今まで栄養素とは無関係とおもわれていた物質の生体への作用が脚光をあびるようになった。第3世代の栄養学といえる。

これらの植物由来の化学物質(フィトケミカル)のなかで、エストロゲン作用をもつ物質があり、フィトエストロゲンと総称される。イソフラボノイド、リグナンは女性ホルモンである17 β エストラジオールとの構造類似性から生体内でエストロゲン作用を持つと考えられていたが、その中でゲニスタインという物質は発がんに関係するチロシンキナーゼの抑制や血管新生もおさえることが発見された。

日本人の尿や血清中のフィトエストロゲンレベルを調べると欧米白人に比べイソフラボノイド由來のものが非常に高値であることが分かった。これが日本人の乳癌や前立腺癌を低くしている可能性がある。

食事(栄養)と健康が密接なものであるにも関わらず、摂取量ばかり重視する栄養学のみでは情報が不足していることは自明の理である。消化・吸収におよぼす調理法の影響や食品中の化学物質の相互作用、個人の代謝状態の差異や腸内細菌叢の構成など、総合的に考えねばならない。とくに食物繊維のように腸内細菌によって分解された後に初めて吸収されるような物質についてあてはまる。これはフィトケミカルのがん予防効果を考える際に必要な過程と思われる。このような観点から、私達の体験も加味してがん予防を考えたい。

遺伝子多型と発癌リスク

川尻 要

埼玉県立がんセンター研究所

化学発癌のイニシエーションである発癌物質の活性化及び解毒化の代謝バランスは重要な発癌感受性の遺伝的素因の一つであると考えられている。我々は、P450を中心とする薬物代謝酵素の遺伝子多型と肺癌との関連性を環境因子との相互作用を含めて解析する事により個人の発癌へのリスクを評価することを研究目的としている。タバコ煙中の芳香族炭化水素(ベンズピレンなど)を活性化するCYP1A1及び活性型代謝体を解毒化するCSTM1の遺伝子多型に注目し、健常者集団と肺癌患者群における遺伝子型分布の比較、遺伝子型と喫煙量との関係を解析することにより喫煙由来の肺癌に遺伝的に高い感受性を持つグループを明らかにした。遺伝的にassociateしている二つのCYP1A1多型(Msp I, Ile-Val)のrare homozygote(C型, Val型)とCSTM1の欠損しているGSTM1(-)の遺伝子型を同時に持つヒトはpredominant homozygoteであるA型(Ile)でGSTM1(+)のヒトにくらべ約7倍ほどの肺扁平上皮癌へのリスクが高いこと、これらの遺伝子型の患者は少ない喫煙量で発癌しており、遺伝子型の影響は喫煙量の少ない範囲で顕著であった。一方、CYP1A1の誘導的発現は転写因子Ah receptor(Ahr)とAh receptor nuclear translocator(Arnt)との相互作用で調整されている。細胞内にベンズピレンなどのリガンドが取り込まれるとHsp90と結合していたAhrにリガンドが結合しArntとheterodimerを形成してCYP1A1のXRE(Xenobiotic responsive element)上で転写が促進されると考えられる。従って、Ahrの個

環境化学物質の発癌リスク評価の現状と問題点

松下秀鶴

静岡県立大学

近年、環境化学物質の発癌リスク評価に対して大きな社会的関心が寄せられつつある。これは、a) 我が国を含む世界主要国において癌死亡者数が増大しつつあり、癌対策は保健上の最重要課題の一つとなっていること、b) 痘学研究により人癌の発生に環境発癌因子の寄与は極めて大きいことが明らかにされていること、c) 現在、比較的大量に生産・消費されている化学物質の数は約10万種にのぼり、これらは生活の利便性の向上に役立つ反面、環境汚染にも強く関与しており、これらの中には発癌性の疑われているものも種々存在していること、さらには、d) 各種燃焼行為や光化学反応等の環境中での諸反応は新たな環境汚染物質を生成させ、それらの中にも発癌性の疑われているものが多種含まれていること、したがって、e) 我々は日常生活を通じて発癌関連の環境化学物質を体内に取込んでおり、その曝露実態の解明や発癌リスクの評価ならびに適切な抑制対策が、国内的にも国際的にも緊急を要する課題となっていることなどに基づいている。

化学物質の発癌リスク評価は、まず、取り上げるべき化学物質に関するプライオリティリストを作成したのち、取り上げるべき各化学物質について、a) 有害性の確認 (Hazard Identification), b) 量・反応アセスメント (Dose-Response Assessment) c) 曝露アセスメント (Exposure Assessment) に関する評価を行い、これらを総合して、d) リスクの判定 (Risk Characterization) を行うやり方で一般に行われている。

ここで Hazard Identification の評価過程は定性的リスクアセスメントともいわれており、IARC や米国 EPA を中心にすでに数百種類の化学物質の評価がなされており、評価手法に関してもあまり問題がないように思われる。しかしながら Dose-Response Assessment や Exposure Assessment に関しては解決すべき問題が種々残されている。特に、前者に関しては、高濃度投与動物実験結果から低濃度曝露のヒトへの発癌リスクを推定するための数学モデルや、種差の影響評価等に関して多くの問題があり、後者に関しては、潜伏期間の長さやライフスタイルの変化を考慮に入れて、問題とする地域環境での発癌関連物質の環境濃度や日常生活を通じての曝露量を正確に評価する手法に多くの問題が残されている。ライフスタイルとの関連において発癌関連物質への高濃度曝露集団を見出すこともリスク評価や癌予防対策の一環として重要であり、このための個人曝露評価手法の確立も急がれている。

さらに、我々は日常生活を通じて数千～数万種類の物質を同時に体内に取り込んでいることを考えると、このような複合物質に対するリスク評価手法を確立するための研究が必要である。

いうまでもなく、リスク評価は科学的事実に基づく総合判断であるが、科学的知見は絶えず更新されるため、リスク評価も時代と共に変化する。しかし、リスク評価は癌予防対策策定の一環としてなされるべきものであり、当該対策に関与する人々に正確な情報を科学的不確実性をも含めて提供し、時代時代に適応した適切な癌予防対策が施行されるために役立つ必要がある。この意味でリスク評価は実践的総合科学ということが出来るかと思う。

宇宙放射線の遺伝的影響

池永満夫

京都大学放射線生物研究センター

21世紀は宇宙の時代とも言われている。化石燃料への依存から脱却するための太陽発電衛星計画からも伺えるように、今後人類が宇宙へ進出する機会は益々増えることが予想される。しかし、ここで避けられないのが宇宙放射線の被曝である。放射線影響の立場から見た宇宙放射線の特徴は、高エネルギー重荷電粒子などの高LET（電離密度）放射線が多い、低線量率長期被曝、微小重力下での被曝、の3点である。なぜこれらの特徴が問題となるのかは、講演の中で簡単に述べる。

さて、宇宙放射線の遺伝的影響を実験的に調べるために、我々は1992年に毛利衛博士も搭乗したスペースシャトル・エンデバー号にショウジョウバエを積み込んで、帰還後に突然変異を観察した。調べたのは、精子などの雄の生殖細胞に生じる伴性劣性致死突然変異と、翅の表面に生えている翅毛が変化する体細胞突然変異の2種類である。前者は、雄の生殖細胞のX染色体上に存在するハエの生育に重要な遺伝子に起こる致死性の突然変異である。このために、野生株と放射線に高感受性のmei-41株の雄成虫をそれぞれ200匹搭載した。そして、地上に帰還した雄を交配し、孫の世代で黒っぽい体色の雄が生まれてこない突然変異として検出した。一方、翅毛の体細胞突然変異を解析するためには、野生株とmei-41株のそれぞれ約6,000匹の幼虫を搭載した。帰還後に羽化したハエの翅について、翅を構成する細胞の表面に生えている直毛の数や形態の突然変異を検出した。

解析の結果、宇宙飛行群に生じた伴性劣性致死突然変異の頻度は、地上対照群よりも野性株では2倍、放射線高感受性のmei-41株では3倍高いことが明らかになった。また、X染色体上の突然変異が起きた位置は、地上対照群ではほぼランダムであったのに対して、飛行群では染色体の末端に集中していた。このことは、宇宙飛行で生じた致死突然変異は、単に頻度だけではなく質的にも異なることを示唆する。しかし、8日間の飛行中にショウジョウバエが被曝した放射線は約2mSvとごく微量であった。従って、宇宙飛行群で致死突然変異頻度が高かったのは、放射線が唯一の原因ではないことは明らかである。推測ではあるが、微小重力のもとでは放射線の影響が著しく増強される可能性が考えられる。

これに対して、翅毛突然変異に関しては野性株およびmei-41株とともに、宇宙飛行群と地上対照群の間にそれ程大きな頻度の差は認められなかった。

以上の結果は、宇宙放射線と微小重力という特殊なストレスが、これも特殊な細胞である「生殖細胞」に対しては、より強く影響を及ぼす可能性を示唆するものとして興味深い。

原爆被爆 50 年における発ガン・リスク

馬淵清彦

放射線影響研究所

広島・長崎の原爆被爆者による放影研・寿命調査集団の追跡調査は、ヒトの放射線被曝による健康影響の研究とリスク評価における最も貴重なものとされ、その疫学データは世界各国での放射線防護基準の設定に用いられてきた。これには、男女と広範な年齢層を含む 12 万人の対象者からなる、大きな集団、精度の高い個人線量体系 (DS86)、長期にわたる信頼性の高い死亡およびガン罹患データ等が、その理由となっている。国際放射線防護委員会 (ICRP) は、原爆被爆者調査による最近の結果に基づき、1990 年勧告で、1 シーベルト (Sv)あたりのガン死亡生涯リスクを全年齢を対象とした場合、5% としている。このようなリスク推定値は種々の不確定要素を伴い、固定したものではない。被爆者追跡調査が進行中である現時点では、リスク値が未完了の追跡データにもとづいていることがもっとも大きな不確定因子である。原爆投下数年後に白血病が出現しピークに達したが、その後固形ガンのリスクが増加し、それは未だに下降の傾向をみせていない。原爆投下後、半世紀にいたる現在、寿命調査集団対象者の約半数が生存している。特に、被爆時年齢が 30 才以下の若年被爆者の 85% が生存し、今やガン年齢に入りつつあることは、今後のリスク評価に特に大きな影響を与える。原爆は、急性、高線量被曝を特徴とするが、寿命調査集団は多数の遠距離被爆者も含み、そのデータは、他の被爆状況に見られる低線量リスクの推定に適用できることもわかっている。ガンのリスクは多くの要因に影響されるが、放射線リスクを評価するに際して、放射線以外のガン要因を考慮にいれるための種々の手法が開発され、更にリスク評価が改善されつつある。さらに寿命調査研究においては、死因に加え、より精度の高いガン罹患データの解析が近年可能となり、予後のよいガン病変も含み、広範なリスク評価が可能となった。放射線影響の疫学的評価は、リスク評価の分野でその先駆を成し、そこでの発展は他の分野のそれにつながるものである。被爆後 50 年、発ガン・リスク研究はより大きな飛躍が望まれる。

MMS Communications 掲載論文要旨

(Vol. 3, No. 1, 1995)

In vivo and in vitro cytogenetic studies of four sex hormones
(pp. 1-13)Sugiyama, C.¹, H. Kobayashi¹, N. Asano², A. Ohuchida³, Y. Kimura⁴ and S. Hitotsumachi⁴
(¹Safety and Analytical Research Center, Shiseido Co., ²Toxicological Research Division, Nitto Denko Corporation, ³Drug Safety Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., ⁴Drug Safety Research Laboratories, Takeda Chemical Industries)

Four naturally occurring or synthetic sex hormones—hexestrol (HEX), 17 β -estradiol (ES), testosterone (TE), and medroxyprogesterone acetate (MPA)—which are well-known rodent carcinogens, were examined for clastogenic potential using the mouse micronucleus test and an *in vitro* chromosomal aberration test. TE increased the frequency of Chinese hamster lung cells (CHL) with structural chromosome aberrations only at a high dose with S 9 mix. HEX and ES were confirmed to induce polyploidy in CHL. None of the four chemicals tested, however, induced micronucleated reticulocytes (MNRETs) in peripheral blood and/or micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in bone marrow in ddY, CD-1, or BDF1 mice.

The in vivo mutagenic potential of hydrazine and its derivatives
(pp. 15-23)Ohuchida, A.¹, Y. Kouchi¹, C. Sugiyama², M. Mori², H. Atai³ and Y. Hatakeyama³ (¹Drug Safety Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., ²Shiseido Safety and Analytical Research Center, ³Pre-clinical Research Laboratories Inc.)

As part of the 6th collaborative study of CSGMT/JEMS.MMS, micronucleus tests of hydrazine monohydrochloride (HZ·HCl), 1,1-dimethylhydrazine (UDMH), and 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (SDMH·2HCl) were carried out using mouse peripheral blood and acridine orange staining. Each compound was administered intraperitoneally with single dosing or quadruple dosing at 24 h intervals. The ranges of HZ·HCl, UDMH, and SDMH·2HCl administered in the single dosing tests were 25-100 mg/kg, 25-100 mg/kg, and 5-20 mg/kg, respectively,

and in the quadruple dosing tests they were 12.5-100 mg/kg, 20-80 mg/kg, and 2.5-10 mg/kg, respectively. In the single dosing tests, UDMH was negative while HZ·HCl and SDMH·2HCl were positive. With quadruple dosing, all three compounds were positive. These results suggest that the multiple dosing protocol can detect the mutagenic potential of HZs more effectively than the single dosing protocol. HZs, which are classified as possible human carcinogens, were confirmed to have *in vivo* mutagenic potential.

The induction of micronuclei in mice by dimethylsulfate and diethylsulfate
(pp. 25-32)Miyamae, Y.¹, O. Hirai¹, H. Yamada², M. Sakaguchi², Y. F. Sasaki², H. Kojima³, A. Sato³, N. Higashikuni⁴ and S. Sutou⁴ (¹Toxicology Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., ²Hachinohe National College of Technology, ³Biochemical Research Institute, Nippon Menard Cosmetic Co., ⁴Itoham Central Research Institute)

The induction of micronuclei by dimethylsulfate (DMS) and diethylsulfate (DES) was evaluated using male BDF1, CD-1, and MS/Ae mice. Bone marrow (BM) and/or peripheral blood (PB) were sampled at 0, 24, 48, and 72 h after ip or po administration. Increased frequencies of micronucleated young erythrocytes (MNRETs) were observed in CD-1 and BDF1 mice treated twice with DMS, but not always with clear dose-response relationships and reproducibility. The MNRET frequency increased in CD-1 mice treated twice, but not once, with DMS. In MS/Ae mice, double doses of DMS increased the frequency of MNRETs significantly and dose-dependently. DES markedly increased the frequency of MNRETs in the BM and PB of BDF1 mice given a single ip injection and increased the frequency of MNRETs in the PB of MS/Ae mice at low double doses. We concluded that both DMS and DES are *in vivo* clastogens, and that DES is more clastogenic.

Diethylnitrosamine is mutagenic in liver but not in bone marrow of lacZ transgenic mice (MutTM Mouse) (pp. 33-39)

Suzuki, T.¹, M. Hayashi¹, B. Myhr² and T. Sofuni¹ (¹National Institute of Health Sciences, ²Molecular and Cellular Toxicology, Hazleton Washington, Inc.)

Diethylnitrosamine (DEN) was tested concomitantly for micronucleus induction and mutagenicity *in vivo* using transgenic mice (MutTM Mouse), in which eighty copies of a lambda phage vector containing an *E. coli* lacZ gene exist homologously. Mice were treated intraperitoneally with DEN once or subchronically. Induction of micronucleated reticulocytes was analyzed with a small amount of peripheral blood using acridine orange supravital staining methods. After an appropriate expression period, mice were killed and their tissues were collected. Genomic DNA was isolated from liver and bone marrow for the analysis of mutations in the lacZ gene. The lambda phage vector was excised from genomic DNA and packaged into lambda phage by *in vitro* packaging. Packaged phages were allowed to infect *E. coli* C (lac⁻ strain), and mutations on the lacZ gene were detected as colorless or pale blue plaques on agar plates containing X-gal. No micronucleus induction was observed following DEN treatments, which is in accordance with previous reports. Spontaneous lacZ mutant frequencies (MF) were 37 and 29×10^{-6} in bone marrow and liver, respectively. After DEN treatment, 3-5 fold increases in MF ($100-150 \times 10^{-6}$) were detected in liver, whereas no significant increase was observed in bone marrow. These results clearly show tissue-specific mutation induction by DEN, corresponding to its strong carcinogenicity in liver. The peripheral blood micronucleus assay, which failed to detect the clastogenicity of DEN, can be supplemented by the transgenic mouse mutation assay.

The enhancement of chemically-induced sister chromatid exchanges by three bio-anticlastogenic fatty acids, docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid, in cultured Chinese hamster cells (pp. 41-49)

Sasaki, Y. F., A. Hosokawa and M. Sakaguchi (Hachinohe National College of Technology)

The effects of the unsaturated fatty acids *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA), *cis*-7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid (DPA), and

cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA) on chemically induced sister-chromatid exchanges (SCEs) were studied in cultured Chinese hamster cells. None of these three fatty acids showed any SCE-inducing activity by themselves. The induction of SCEs, however, by mitomycin C (MMC), cisplatin (DDP), *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG), methyl nitrosourea (MNU), ethyl nitrosourea (ENU), and ethyl methanesulfonate (EMS), but not by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and methyl methanesulfonate (MMS), was increased by post-treatment with DHA, DPA, and EPA. Considering that the three fatty acids have been demonstrated to suppress the induction of chromosome aberrations by MMC, DDP, ENNG, MNU, ENU, and EMS (but not by MNNG and MMS), the potentiation of clastogen-induced SCEs was accompanied by bio-anticlastogenesis.

Alkaline elution of DNA from hairless mouse epidermis treated with skin carcinogens (pp. 51-60)

Kobayashi, H., M. Mori and C. Sugiyama (Shiseido Safety and Analytical Research Center)

DNA damage in the epidermal cells of the dorsal skin of female HOS: HR-1 hairless mice was evaluated by alkaline elution after topical application of skin carcinogens. *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine at $25-100 \mu\text{g}$ per 113 mm^2 revealed a 3- to 7-fold increase in the elution rate constant 2 h after application. 4-Nitroquinoline 1-oxide at the same dose levels induced a 5- to 9-fold increase. 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene at $62.5-250 \mu\text{g}$ increased the elution rate up to 3-fold 24 h after treatment. 12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, a promoter of skin carcinogenesis but not a skin carcinogen, at $0.0125-1.25 \mu\text{g}$ revealed no DNA damage 16 h after treatment. These results suggest that the genotoxic potency of skin carcinogens indexed as DNA single-strand breaks can be assessed by the alkaline elution assay using the hairless mouse epidermis.

No micronucleus induction by phenobarbital-sodium as revealed in mouse bone marrow and peripheral blood tests (pp. 61-67)

Shimada, Y.¹, S. Ono¹, S. Kobayashi¹, X. Cui² and S. Sutou² (¹Central Research Laboratories, Hokko Chemical Industry Co., ²Itoham Central Research Institute)

Phenobarbital-sodium was examined in the mouse bone marrow and peripheral blood micronucleus

tests. ICR mice given phenobarbital-sodium once or four times ip showed no increase of micronuclei. Neither CD-1 mice given phenobarbital-sodium ip twice nor MS/Ae mice given phenobarbital-sodium po twice showed dose-dependent increases of micronuclei, indicating that phenobarbital-sodium was not a micronucleus inducer under the present experimental conditions.

Comparative study of micronucleus induction by nitrogen mustard in the peripheral blood and bone marrow of mice and rats (pp. 69-75)

Cui, X., N. Higashikuni and S. Sutou (Itoham Central Research Institute)

Nitrogen mustard was given ip to CD-1 and MS/Ae mice once or twice and micronucleus frequencies in the peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) were examined. More micronuclei

were induced in MS/Ae than in CD-1 mice in both assays, and double dosing induced more micronuclei than single dosing in both mouse strains. In MS/Ae mice, PB micronucleus frequencies were higher than BM micronucleus frequencies at the two lower doses, and lower at the highest dose. The most sensitive testing system for nitrogen mustard was MS/Ae mice treated twice and sampled 24 after the second treatment. Nitrogen mustard was also given ip twice to Wistar rats; PB and BM samples were collected from the same animals 24 h after the second dosing. The BM showed markedly higher micronucleus frequencies. These results with nitrogen mustard suggest that both PB and BM can be used in mice with similar results; MS/Ae mice and double-dosing provided the greatest sensitivity. For rats, however, the BM assay seemed more sensitive.

Author Index (Vol. 17)

Adlercreutz, H.	17; 279	Matsui, S.	17; 161	Suzuki, S.	17; 259
Akimoto, S.	17; 99	Matsumoto, H.	17; 99, 135	Suzuki, T.	17; 93
Akiyama, M.	17; 151	Matsushima, T.	17; 47		
Araki, A.	17; 47	Miyamura, R.	17; 57	Tabata, M.	17; 259
Arimochi, H.	17; 99	Mohri, S.	17; 179	Takahashi, K.	17; 35
Asakawa, J.	17; 301	Mori, H.	17; 127	Takahashi, N.	17; 301
		Morimoto, K.	17; 143	Takahashi, T.	17; 135, 279
Bailey, G.S.	17; 1	Nagaoka, N.	17; 169	Takebe, H.	17; 161
Fujikawa, K.	17; 285	Nakajima, D.	17; 259	Takeshita, T.	17; 143
		Nakamura, Y.	17; 107	Tanaka, T.	17; 127
Handa, H.	17; 203	Nakatani, H.	17; 135	Tarumoto, Y.	17; 251
Hasegawa, R.	17; 83	Nishino, H.	17; 123	Teshima, T.	17; 259
Hatanaka, Y.	17; 231	Nozaki, K.	17; 47	Tokumitsu, T.	17; 265
Hayashi, M.	17; 93			Tomita, I.	17; 107
Higashimoto, M.	17; 99	Ochiai, M.	17; 259	Toyoda, Y.	17; 231
Hikage, S.	17; 187	Oda, Y.	17; 179	Uchida, H.	17; 217
Hiraku, Y	17; 75	Odagiri, Y.	17; 217	Umeki, S.	17; 151
Hirano, N.	17; 251	Ohe, T.	17; 237	Urano, K.	17; 191
Horiya, N.	17; 293	Ohnishi, Y.	17; 99		
		Ohshima, T.	17; 251	Vinitketkumnuen, U.	17; 99
Ikawa, N.	17; 47	Ohta, T.	17; 23		
Isoda, S.	17; 169	Ohyama, W.	17; 265	Watanabe, S.	17; 279
Ito, N.	17; 83	Oikawa, S.	17; 75		
		Ono, Y.	17; 179	Yagi, T.	17; 161
Kanazawa, K.	17; 115	Oya, K.	17; 135	Yajima, N.	17; 203
Kataoka, K.	17; 99			Yamane, T.	17; 135
Kato, F.	17; 47	Purintrapiban, J.	17; 99	Yoshimi, N.	17; 127
Kato, M.	17; 169			Yoshino, H.	17; 191
Kato, T.	17; 187	Saito, H.	17; 169		
Katoh, M.	17; 293	Sasaki, Y.F.	17; 65	Zhu, J.H.	17; 143
Katoh, T.	17; 57	Satoh, C.	17; 301		
Kawajiri, K.	17; 271	Shaheduzzaman, S. M.	17; 99		
Kawanishi, M.	17; 161	Shibuya, T.	17; 293		
Kawanishi, S.	17; 75	Shima, A.	17; 289		
Kikugawa, K.	17; 187	Shimoi, K.	17; 57		
Kikuoka, N.	17; 135	Shirai, T.	17; 83		
Kinae, N.	17; 57, 65	Sofuni, T.	17; 93		
Kinouchi, T.	17; 99	Somiya, I.	17; 179		
Kitagawa, Y.	17; 231	Sugie, S.	17; 127		
Kodaira, M.	17; 301	Sugimura, T.	17; 7		
Kyoizumi, S.	17; 151	Suwa, Y.	17; 231		
		Suzuki, H.	17; 251		
Matsuda, T.	17; 161	Suzuki, J.	17; 259		

Keyword Index (Vol. 17)

aberrant crypt foci	17; 99
active oxygen species	17; 75
adaptive response	17; 35
additivity	17; 93
aflatoxin B1	17; 1
alkylating agents	17; 99
Ames test	17; 191
anti-tumorigenicity	17; 143
antimutagen(s)	17; 23, 107, 115
antimutagenesis	17; 23
antimutagenic activity	17; 99
antipromoters	17; 107
atomic bomb	17; 301
benzo[a]pyrene	17; 259
biodosimetry	17; 151
blue rayon	17; 237
bone marrow	17; 47
cadmium	17; 35
cancer chemoprevention	17; 123
cancer prevention	17; 115
cancer susceptibility	17; 271
car exhaust	17; 259
carbon-centered radical	17; 187
carcinogen(s)	17; 7, 75
α -carotene	17; 123
carotenoids	17; 123
cell death	17; 293
cell proliferation	17; 127
chemical mixture	17; 83
chemoprevention	17; 1, 127, 135
chlorinated by-products	17; 169
chlorinated organo compounds	17; 161
chlorophyllin	17; 1
chromosomal aberration	17; 203
chromosome aberration(s)	17; 65, 231
chromosome break	17; 217
chromosome loss	17; 217
cinnamaldehyde	17; 23
co-clastogenic effect	17; 65
co-mutagenic	17; 57
CO2	17; 285
COD	17; 237
intercalator	17; 57
isoflavanoid	17; 279
colon	17; 265
combination effect	17; 93
CYP1A1	17; 271
desmutagen	17; 115
o-dianisidine	17; 231
5-diazouracil	17; 187
diet and cancer	17; 279
1,2-dimethylhydrazine	17; 265
DNA	17; 301
DNA damage	17; 75
DNA excision repair	17; 57
DNA strand breaks	17; 161
Drosophila	17; 285
EGCG	17; 135
environmental mutagens	17; 289
epidemiology	17; 279
epithelial cells	17; 265
erythropoietin	17; 203
N-ethyl-N-nitrosourea	17; 293
exhaust gas	17; 191
flavonoid	17; 115
flavorings	17; 23
fucoxanthin	17; 123
gastrointestinal cancer	17; 135
genetic polymorphism	17; 271
genotoxicity	17; 179, 237
germ line	17; 301
germ-cell mutagenesis	17; 289
ginsenoside	17; 143
green tea extract	17; 135
GST-P positive foci	17; 83
halogenated compounds	17; 169
hepatocarcinogens	17; 251
heterocyclic amines	17; 7, 57, 83
human fibroblast cells	17; 161
4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt	17; 187
indoor swimming pool water	17; 169
organosulfur compounds	17; 127
organotin	17; 65
ornithine decarboxylase	17; 135

Keyword Index (Vol. 17)

kinetochore	17; 217	ozonation	17; 179
lacZ mutations	17; 293	p53 mutations	17; 271
lignan	17; 279	Panax ginseng	17; 143
liver carcinogenesis	17; 83	peripheral blood	17; 47
liver micronucleus test	17; 251	peroxisome proliferator	17; 251
lung cancer	17; 271	phenols	17; 127
Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	17; 289	phytoestrogens	17; 279
mercuric	17; 35	plant leaves	17; 259
metal ions	17; 75	rats	17; 83
methyl bromide	17; 47	recessive mutations	17; 293
methyl iodide	17; 35	S. typhimurium NM2009	17; 237
S-methyl methane thiosulfonate	17; 107	sampling method	17; 191
O6-methylguanine	17; 99	saponin	17; 143
O6-methylguanine-DNA methyl-transferase	17; 35	sister-chromatid exchange	17; 231
micronucleated polychromatic erythrocyte	17; 203	somatic mutation	17; 151
micronucleated reticulocyte	17; 203	spice	17; 99
micronucleus	17; 93, 217, 265	sub-chronic inhalation test	17; 47
micronucleus test	17; 47, 187	synergism	17; 83, 93
mitomycin C	17; 265	T-cell receptor gene	17; 151
molecular dosimetry	17; 1	tea aqueous nondialysates	17; 107
mouse primordial germ cells	17; 293	temporarily blocking enzyme	
multiple carinogetic steps	17; 7	sulphydryl groups	17; 107
multiple genetic alterations	17; 7	trout	17; 1
municipal waste incineration	17; 191	Trp-P-1	17; 57
mutagenic activity	17; 169	Trp-P-2	17; 115, 179
mutagenic compounds	17; 191	umu-test	17; 179, 237
mutagen(s)	17; 7, 259	mutation	17; 301
MX	17; 169	NADH	17; 75
		night soil	17; 179
		1-nitropyrene	17; 259
		N-nitroso compounds	17; 251
		non-disjunction	17; 285
		oocyte	17; 285
		water pollutants	17; 65
		X-rays	17; 285
		XAD-2 resin	17; 237

日本学術会議だより No. 39

高度研究体制の早期確立についての要望が採択される

平成7年11月 日本学術会議広報委員会

今回の日本学術会議だよりでは、10月に開催された日本学術会議第122回総会の概要と、総会初日に採択された「高度研究体制の早期確立について（要望）」の内容を紹介します。

日本学術会議第122回総会は、平成7年10月25日（水）から3日間にわたり開催されました。

総会初日は、まず、報告が行われ、会長経過報告及び科学技術会議報告に続き各運営委員会、各部、複数領域研究連絡委員会運営協議会、各常置委員会及び各特別委員会の報告がそれぞれの委員長・部長等から行われました。

この中で、利谷広報委員会委員長から、①日本学術会議月報の充実に伴い、会員各位からの原稿執筆の協力要請、②平成8年度の公開講演会の企画の募集を2月連合部会時に行なうので、会員各位への事前検討要請、③日学選書の出版件数の拡大のための企画募集、④前日に開催した広報委員と地区会議代表幹事との連絡会議の議事から、地区会議の抱える問題点の紹介、の4点について付言がありました。

また、第7常置委員会、学術と産業特別委員会及び阪神・淡路大震災調査特別委員会からは、それぞれ、総会報告に付して、①国際対応の目的や役割をまとめ、それに対する日本学術会議内外からの意見を集約することで、日本学術会議としての国際対応の立場の構築をめざしてまとめられた「日本学術会議と国際対応（仮題）」、②学術の新たに進むべき方向に指標を与える、より高度な産業への貢献の方向を定めるのに必要な価値判断の基準を与えることの第一歩を踏み出すための端緒となるべくまとめられた「歴史的転換期における学術と産業のかかわりについて」、③事態の緊急性にかんがみ、意見のまとまつたものから順次これを報告したいとの趣旨から「強震観測網の充実と強震研究体制の整備について」と「災害医療体制の整備について」の2件についてをその第一段階として位置付けてまとめられた「阪神・淡路大震災調査特別委員会第一次報告」が会員に配布されました。

この後、会員推薦管理会報告及び各研究連絡委員会報告に統いて、アジア学術会議実行委員長報告があり、西島委員長から、明年3月に開催予定の第3回アジア学術会議を中心とした今後の進め方について発言があ

りました。

続いて、提案事項の説明・討論・採決に入り、「内科系科学」と「外科学系」に分かれている第7部の専門を見直して統合すること及び第17期に向けて、研究連絡委員会を見直し、改廃、統合、名称変更を行うことを内容とした①「日本学術会議法施行令」の一部を改正する手続きを進めること、②「日本学術会議規則」の別表の一部改正、③「日本学術会議の推薦による研究連絡委員会の指定等に関する規則」の別表の一部改正、④複数の研究連絡委員会にまたがる専門委員会の設置を認めることを内容とした「日本学術会議の運営の細則に関する内規」の一部改正、⑤会員推薦管理会が学術研究団体の登録を審査するに際して、資料を得る必要があると認められる場合には、日本学術会議の意見を聴取できるようにするための「学術研究団体の登録に関する規則」の一部改正、⑥今後における日本学術会議の組織、機能、施設等のあり方について、中・長期的観点から検討することを任務とした「運営審議会附置将来計画委員会」の設置についてを、それぞれ賛成多数で可決しました。

さらに、⑦21世紀を目前に控え、我が国の学術研究の飛躍的発展を図る観点から、研究費、研究者及び研究機関について抜本的な改善充実を図り、我が国の学術研究体制を一挙に高度の水準に引き上げ、高度研究体制の早期確立の実現を目指した「高度研究体制の早期確立について（要望）」を賛成多数で採択しました。

引き続いて、⑧「脳の科学とこころの問題」を脳科学の視点からまとめた脳の科学とこころの問題特別委員会の対外報告案について討議を行いました。会員から活発な意見が出されたため、審議を2日目に持ち越して検討した結果、運営審議会で一部修正を行うことを条件として、賛成多数で対外報告とすることを了承しました。

2日の最後に、前日配布された第7常置委員会の「日本学術会議と国際対応（仮題）」に基づき会員の間で自由討議が行われ、活発な意見交換がありました。

伊藤会長が村山総理に要望書を手交

平成7年10月30日（月）の午後3時に伊藤会長及び利谷、西島両副会長が内閣総理大臣官邸に村山総理大臣を訪ね、総理府の担当大臣である野坂内閣官房長官の立会いの下、平成7年10月25日（水）の第122回日本学術会議総会で採択された「高度研究体制の早期確立について」の要望書を手渡し、その趣旨等について説明を交えながら、懇談を行いました。

村山総理は、「要望の趣旨については、大変よく理

解でき、貴重なご意見を賜ったものと思う。しかし、例えば、研究費の倍増についての要望などは、シーリングの枠もあり、容易ではない。補正予算で配慮したりして、政府もいろいろ努力はしている。今後とも期待に沿うよう努力する。」と語り、要望書について理解を示しました。

なお、要望書の内容は以下のとおりです。

高度研究体制の早期確立について（要望）

学術研究が我が国はもちろん、世界全体にとってもその将来を左右する重要な役割を担うという認識が政・官・産を通じて最近とみに高まってきたことは喜ばしいことである。しかしその一方、我が国の学術研究体制にはなお制度的、構造的な多くの問題が顕在化している。

日本学術会議では、平成元年4月20日付け「大学等における学術研究の推進について－研究設備等の高度化に関する緊急提言－」の勧告を提出し、政府関係機関においても、このような現状を踏まえ、学術研究体制の改善のための様々な施策が講じられている。しかしながら、21世紀を目前に控え、我が国の学術研究の飛躍的発展を図る観点から、研究費、研究者及び研究機関について抜本的な改善充実を図り、我が国の学術研究体制を一挙に高度の水準に引き上げ、高度研究体制を早期に確立することが不可欠である。科学者の代表機関として、日本学術会議は以下の点を早急に実現することを要望する。

1. 研究費について

我が国の研究費の政府による負担割合、政府負担研究費の対GDP比を欧米先進諸国並みに引き上げ、政府の研究開発投資額を早期に倍増させることが必要である。

その際、基礎研究、応用開発研究に加えて、将来における応用の潜在力に注目した「戦略研究」のそれについて助成を強化するとともに、国費による投資的経費としての研究費の支出、民間の研究助成財団の活動の促進などにより、多元的な研究資金源を確保することが必要である。

2. 研究者について

優秀な研究者を確保する観点から、研究費、研究施設等について劣悪な状況にある研究環境を早急に改善することが必要である。

また、ポストドクトラルフェローシップの飛躍的拡充など研究者の雇用形態の多様化を図るとともに、若手研究者の支援施策の改善充実、公正で多角的な評価システムの確立、外国人研究者の任用も含めた研究者の国際的な交流の促進などにより、研究者がその研究能力を最大限に發揮する条件を整えることが必要である。

3. 研究機関について

大学、研究所（国公立試験研究機関、民営研究機関、大学共同利用機関及び大学の附置研究所をいう。）、企業の3セクターの調和のとれた発展、規模的に不十分な研究所セクターの拡充を図るとともに、これらの間の人的交流や研究協力を促進することが必要である。

また、急速に進展する学問の最前線に立って常に高い研究活動を維持するため、研究組織に安定性と流動性の二重性を導入するとともに、我が国の学術研究体制の重大な問題となっている研究支援者の不足について、所要の対策を講じる必要がある。

4. 国際的連携について

世界に開かれた共同研究の拠点の整備、研究助成を目的とする基金の設定など、研究者の国際交流、共同研究等の促進のため、所要の措置を講じる必要がある。その際、アジアの一員として、アジア地域に対しては特段の配慮が必要である。

日学双書の刊行案内

日本学術会議主催公開講演会の記録をもとに編集された次の日学双書が刊行されました。

日学双書No.23「歴史的転換期における学術と産業の在り方をめぐって」

〔定価〕 1,000円（消費税込み、送料別途）

※問い合わせ先

財団日本学術協力財団 ☎ 03-3403-9788

日本環境変異原学会会則

- 第1条 本会は日本環境変異原学会 (The Environmental Mutagen Society of Japan) と称する。
- 第2条 本会は人間環境における突然変異原、とくに公衆の健康に重大な関係を有する突然変異原の研究を推進することを目的とする。
- 第3条 本会の会員は、正会員、学生会員、賛助会員および購読会員とする。正会員は本会の趣旨に賛同し、環境変異原の研究に必要な知識と経験を有し、定められた会費を納入した者とする。学生会員は、大学、または大学院に在籍し、毎年所定の手続を経て、定められた会費を納入した者とする。賛助会員はこの学会の事業を後援し、定められた会費を納入した個人または法人とする。購読会員は学会誌「環境変異原研究」の購読のみを行うものとする。
- 第4条 本会に入会を希望するものは、1名以上の評議員の推せん書とともに所定の申込書に記入の上、本会事務所に申込むものとする。
- 第5条 会員は毎年会費を納入しなければならない。次年度の年会費の額は評議員会において審議し総会において定める。
- 第6条 本会はその目的を達成するために次の事業を行う。
1. 年1回大会を開催し、学術上の研究成果の発表および知識の交換を行う。
 2. 学会賞を設け、環境変異原の分野ですぐれた研究を行った会員および将来の成果が期待される会員（原則として個人）に授与する。
 3. Mutation Research 誌を特価で購入配付する。
 4. 国際環境変異原学会連合に加入し、国際協力に必要な活動を行う。
 5. 学会誌「環境変異原研究」を発行する。
 6. その他本会の目的を達成するために必要な活動を行う。
- 第7条 本会に次のとおり役員および評議員を置く。
- 会長 1名 庶務幹事 1名
- 会計幹事 1名 國際交流幹事 1名
編集幹事 1名 会計監査 2名
および評議員若干名
評議員は正会員の投票により選ぶ。
会長は評議員の互選によって定める。
庶務幹事、会計幹事、國際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。
役員および評議員の任期は2年とする。
役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。
- 第8条 評議員会は会員を代表し、事業計画、経費の收支、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 本会の事務は曆年による。
- 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 8 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	松島泰次郎 (委員長)
	木苗直秀
	島田弘康
	葛西宏
	菊川清見
	長尾美奈子
	後藤純雄
編集委員	石館基 (委員長)
	鈴木潤三
	瀧谷徹
	太田敏博
	下位香代子
	西富保
	降旗千恵
企画委員	秋山實利
	能美健彦
	森秀樹
	早津彦哉

日本環境変異原学会平成 8~9 年度 評議員名簿

氏名	所属	(五十音順)
荒木明宏	日本バイオアッセイ研究センター	
石館基	オリンパス光学工業(株)・染色体研究センター	
太田敏博	東京薬科大学・生命科学部	
大西克成	徳島大学・医学部	
葛西宏	産業医科大学・産業生態科学研究所	
菊川清見	東京薬科大学・薬学部	
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	
坂本京子	(財)食品薬品安全センター・秦野研究所	
瀧谷徹	(財)食品薬品安全センター・秦野研究所	
島田弘康	第一製薬(株)・開発研究所	
清水英佑	東京慈恵会医科大学・医学部	
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・変異遺伝部	
田中憲穂	(財)食品薬品安全センター・秦野研究所	
長尾美奈子	国立がんセンター研究所・発がん研究部	
西富保	(株)三菱化学安全科学研究所・鹿島研究所	
能美健彦	国立衛生試験所・変異遺伝部	
林眞	国立衛生試験所・変異遺伝部	
早津彦哉	岡山大学・薬学部	
松島泰次郎	日本バイオアッセイ研究センター	
山添康	東北大学・薬学部	
吉川邦衛	三菱化学(株)・横浜総合研究所	
若林敬二	国立がんセンター研究所・生化部	
渡部烈	東京薬科大学・薬学部	

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」、「論説」、「資料・情報」などを掲載する。なお、投稿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。原則として編集委員会より寄稿を依頼する。

「一般論文」は、変異原に関する独創的研究の原著報文で、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、新しい技術の紹介や価値あるデータを含む短い報告とする。

「論説」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、会員からの投稿によるものとする。

「資料・情報」は、環境変異原に関する調査の結果などをまとめたものおよび公開シンポジウム、分科会の要旨などとする。

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. 論文原稿の書き方

論文原稿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、一般論文、論説は、写真・図表を含めて刷り上がり8頁以内、短報は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. 論文原稿の送り先

論文原稿は正1部コピー2部の計3部を、日本環境変異原学会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(3.5インチ、使用した機種とソフト名を明記)を送付すること。

論文原稿の送付、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

日本環境変異原学会編集委員長

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

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(一般論文、短報、論説)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場合、超過頁分についての実費は著者負担とする。資料・情報については原則として無料扱いとするが、頁数の削減を求めることがある。

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) 別刷りは招待寄稿の場合も含め、すべて著者負担とする。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(フルネーム)、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。原稿は著者の責任において英語の添削訂正を受けたものに限る。

なお、各頁は左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

貴学会に入会いたたく評議員の推薦を添えて申し込みます。

フ リ ガ ナ		
氏 名	(印)	
ローマ字つづり		
生年月日、性別	年 月 日	男 女

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

学歴	学 部	学部学校名	卒業年次 年	
	大学院	課程学校名	修了年次 年	
学 位			取 得 年 年	
研究領域 (下記にあてはまる項の 2, 3 を○で囲んでください)				
1. 変 異 原 2. 検 出 系 3. 毒 性 4. 発 生 異 常 5. 汚 染 6. 疫 学 7. 遺 伝 8. が ん 9. 微 生 物 10. 高 等 動 物 11. 高 等 植 物 12. 食 品 13. 気 体・粉 じ ん 14. 医 薬 品 15. 農 薬 16. 代 謝 17. 分 子 機 構 18. そ の 他 ()				
研 究 歴 (現在行っている研究の動向や興味の点について数行記入のこと)				
加入学会名 (本学会以外の)				
推 薦 者 (日本環境変異原学会評議員)				
氏 名 (署名) (印)				
入会申込者との関係 (数行ご記入ください)				

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	(印)
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

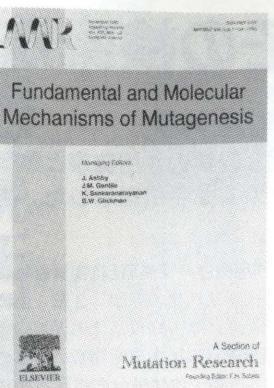
送付先: 〒105 東京都港区新橋 5-23-7
三造写真工業株式会社内 学会事務局

贊助会員名簿（五十音順）

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

家田貿易株式会社
エスピー食品株式会社 中央研究所
株式会社化合物安全性研究所
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
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 研究開発統括部
日本バイオアッセイ研究センター
ハウス食品株式会社 ソマティックセンター
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
株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所
明治製菓株式会社 製品総合研究所

環境変異原関連雑誌
の決定版!!



Mutation Research

Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

International journal on mutagenesis, chromosome breakage and related subjects

Audience:

Mutageneticists, General Toxicologists, Molecular Geneticists, Cancer Researchers, Radiobiologists

Set of Journals:

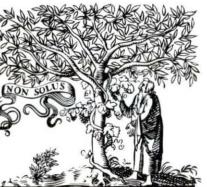
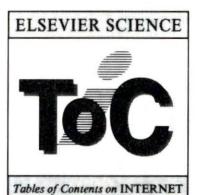
- Mutation Research/DNAging
- Mutation Research/DNA Repair
- Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects
- Mutation Research/Genetic Toxicology
- Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology
- Mutation Research Letters

Abstracting/Indexing

Biological Abstracts, Chem. Abstracts, Current Contents (Life Sciences), EMBASE, Index Medicus, PASCAL M, Reference Update

☞ コンテンツはインターネットを通じてご覧いただけます

URL: <http://www.elsevier.nl/locate/estoc>



見本誌のご請求、ご購読に関するお問い合わせは、
エルゼビア サイエンス ジャパン
〒113 東京都文京区湯島 3-20-12
フリーダイヤル : 0120-383-608 ファックス : 03-3839-4344
E-mail : KYF04035@niftyserve.or.jp

◎講談社の自然科学専門書

抗変異原・抗発がん物質とその検索法

黒田 行昭 編 A5・470頁・定価12,000円(税込)

新刊

制がん研究に注目される知識・方法の集大成。抗変異原・抗発がん物質の作用機序と数多くの例を集め整理し、動物や各種の細胞を用いて新しい物質を検索する手法を示した。遺伝学・分子生物学・創薬関係者必携の書。

主な内容：第Ⅰ編 抗変異原・抗発がん物質とその作用機序 1章 抗変異原物質の作用機序 変異原と抗変異原物質 2章 変異原不活化物質 変異原の化学的不活化／変異原の酵素的不活化／変異原の代謝活性化の抑制 3章 生物的変異原作用 突然変異の誘起と抑制／SOS応答と突然変異の誘起／組換え修復活性の促進／除去修復活性の促進 4章 植物中の抗変異原物質 野菜・果物の抗変異原物質／香辛料の抗変異原物質／天然香料の抗変異原物質／緑茶の抗変異原物質／ビタミン類の抗変異原性／葉草の抗変異原物質／食物繊維の抗変異原性 5章 生体成分の抗変異原性 血液中の抗変異原物質／唾液中の抗変異原物質 6章 抗発がん物質とその作用 抗過酸化物質／発がんプロモーションの抑制／がんの化学予防 第Ⅱ編 抗変異原・抗発がん物質の検索法 7章 微生物による検出法 細菌を用いる方法／酵母を用いる方法 8章 植物による検出法 染色体異常を検出する方法／突然変異を検出する方法 9章 昆虫による検出法 ショウジョウバエを用いる方法／カイコを用いる方法 10章 培養細胞による検出法 遺伝子突然変異を検出する方法／染色体異常を検出する方法／姉妹染色体分体交換を検出する方法／小核を検出する方法／DNA鎖切断を検出する方法／DNA修復の検出／不定期DNA合成を検出する方法／トランスポーメーションを検出する方法 11章 実験動物による検出法 染色体異常を検出する方法／小核を検出する方法／不定期DNA合成(UDS)を検出する方法／DNA変異を検出する方法／遺伝子突然変異を検出する方法／発がん性を検出する方法／付表

東京都文京区音羽2-12-21
振替 東京8-3930

講談社

編集部 03(3235)3701
販売部 03(5395)3624

BIOSCOOP® DNA損傷画像解析システム

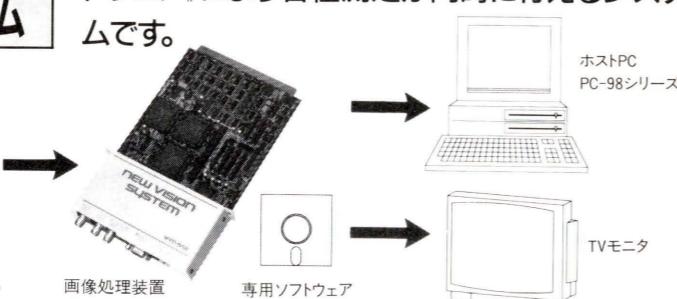
測定内容

- Tail Length
- Shape Factor
- Nuclear Diameter
- Tail Intensity
- DNA Migration
- Ratio
- Tail Moment
- 統計データ

システム構成

- 高感度カメラ
- 蛍光顕微鏡

《画像解析装置》と《SCG ASSAY専用ソフトウェア》により各種測定が同時にできるシステムです。



NEW VISION COLOR フルカラー画像解析装置

- 特徴
- フルカラー対応
 - ルックアップデータベース内蔵
 - PLL回路内蔵



《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®



ケイオ一電子工業株式会社

〒567 大阪府茨木市舟木町5番12号 TEL 0726-34-1022
FAX 0726-34-1018

Wako

HPLC用パックドカラム

Wakopak

Wakosil-PAHs

多環芳香族炭化水素分析専用カラム

環境中に広く存在する多環芳香族炭化水素(PAHs)には、発がん性や変異原性を有する物が多く、すでに、各國において規制が行われています。

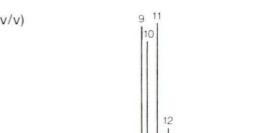
Wakopak WS-PAHsは多環芳香族炭化水素分析に最適設計された専用カラムです。

●多環芳香族炭化水素16成分を迅速分析
(EPA手法610規定物質)

●優れた再現性と卓越した選択性

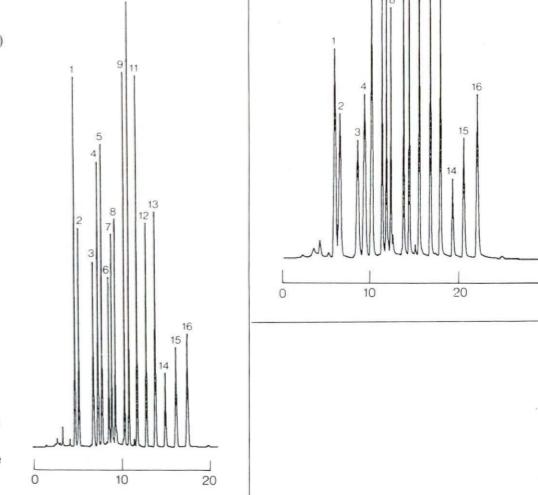
[PAHs16成分の分析 (2.0φ×250mm)]

Eluent : A: Methanol/H₂O = 80/20 (v/v)
B: Acetonitrile
0-4min. Bconc. 10%
4-7min. Bconc. 10-100%
7-25min. Bconc. 100%
Flow rate : 0.2ml/min. at 30°C
Detector : UV254nm, 0.512AUFS



[PAHs16成分の分析 (4.6φ×250mm)]

分析条件
Eluent : A: Methanol/H₂O = 80/20 (v/v)
B: Acetonitrile
0-4min. Bconc. 10%
4-7min. Bconc. 10-100%
7-25min. Bconc. 100%
Flow rate : 1.0ml/min. at 30°C
Detector : UV254nm, 0.128AUFS
Sample : 1) Naphthalene
2) Acenaphthylene
3) Acenaphthene
4) Fluorene
5) Phenanthrene
6) Anthracene
7) Fluoranthene
8) Pyrene
9) Benz(a)anthracene
10) Chrysene
11) Benzo(b)fluoranthene
12) Benzo(k)fluoranthene
13) Benzo(a)pyrene
14) Dibenz(a,h)anthracene
15) Benzo(ghi)perylene
16) Indeno(1,2,3-cd)pyrene



* 資料をご請求下さい。

和光純薬工業株式会社

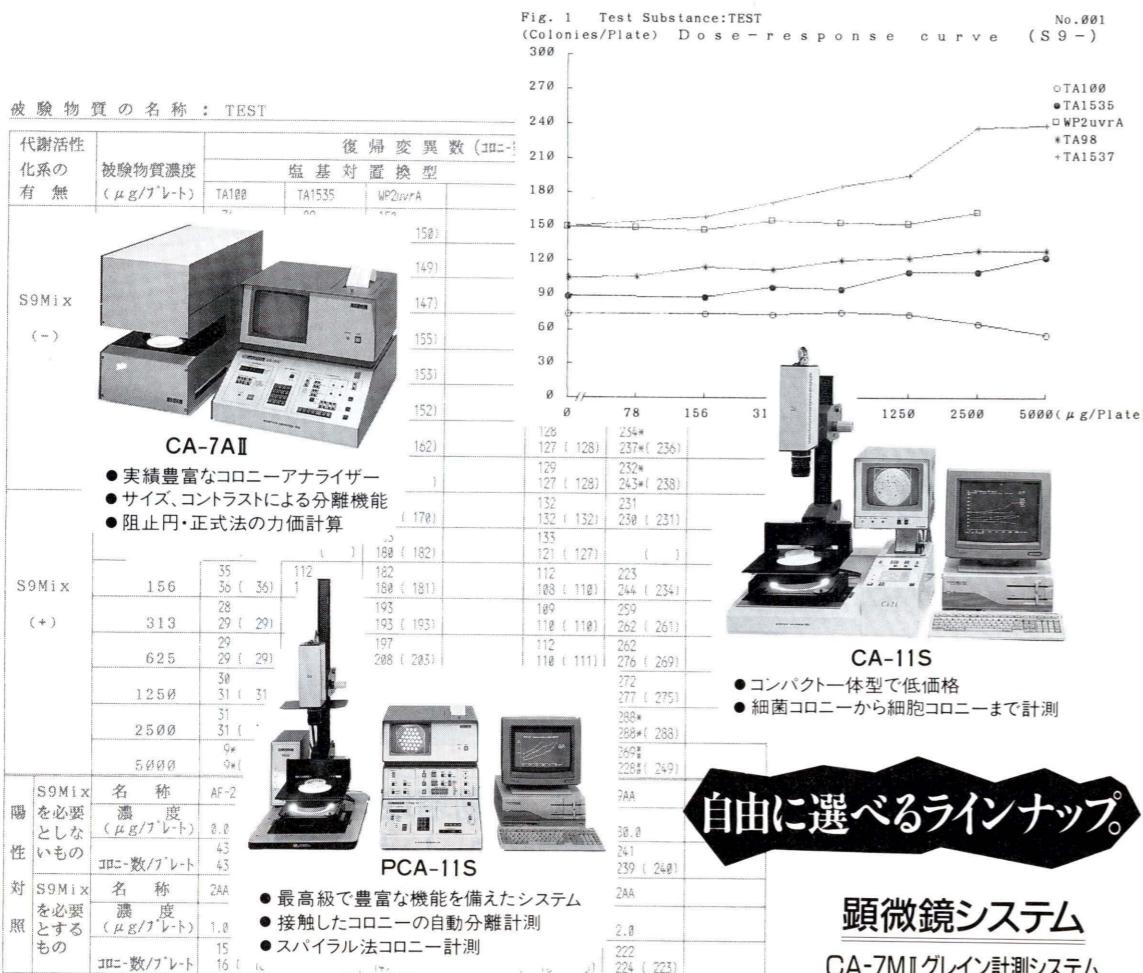
本社：大阪市中央区道修町三丁目1番2号
〒541 電話 大阪(06)203-3741(代表)

問い合わせ先
東日本：東京支店試薬部(営業) tel.03(3270)8121 fax.03(3242)6501
学術部 tel.03(3270)8123 fax.03(3242)6501
西日本：本社 試薬部(営業) tel.06(203)3745 fax.06(201)5964
学術部 tel.06(203)1788 fax.06(201)5964
E-mail address : KYM02031@niftyserve.or.jp

エームス テストシステム CA-11・CA-7II・PCA-11

〈微生物を用いる変異原性試験〉

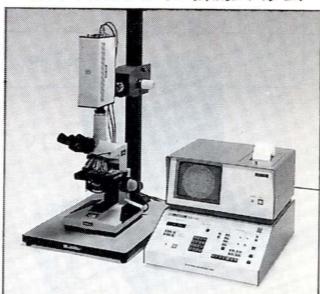
コロニーカウントからデータの保存、試験結果表
濃度別グラフの作成までを自動で高速処理します。



自由に選べるラインナップ

顕微鏡システム

CA-7M II グレイン計測システム



CA-7M II

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

*依託試料の測定を行っております。お気軽にご相談下さい。

製造発売元



システムサイエンス株式会社

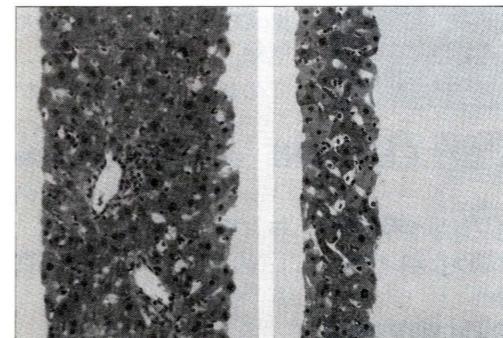
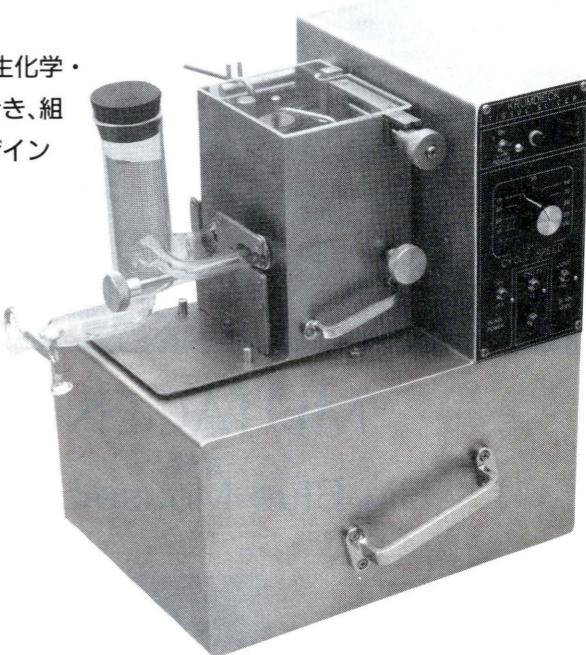
本社・工場／〒197 東京都福生市福生 1253-16
TEL 0425(52)5956(代表)

THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

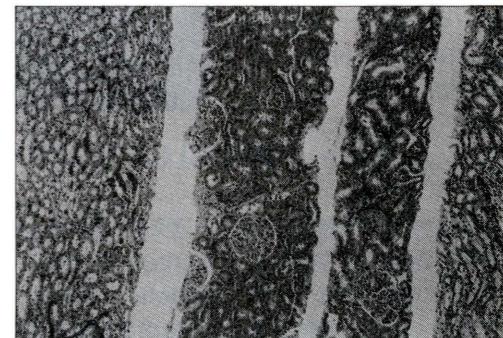
生きた組織の無菌スライスができます。

クルムディーク・ティッシュスライサーは、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60~1000μmの厚さで作成されます。



ラットの肝臓(倍率430×)



ラットの腎臓(倍率100×)

右の写真はラットの肝臓のスライス(厚さ60μmおよび135μm)で、左の写真はラットの腎臓のスライス(135~200μm)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 愛知県岡崎市赤渋町蔵西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

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。

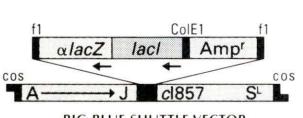
BIG BLUE RODENTS 及び CELL LINE

- 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胚纖維芽細胞による*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ションで行います。DNAシークエンス解析も容易にできます。

BIG BLUE SHUTTLE VECTOR



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

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

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

編集後記

Vol. 17, No. 3をお届けします。次号の Vol. 18, No. 1からは雑誌のサイズをA4版に変えて、装いも新たにする予定です。会員の皆様からの一般論文の投稿をお願いします。また、資料・情報の欄に本学会の公開シンポジウム、各種研究会の発表要旨を随時掲載いたします。原稿とフロッピーディスクをお送りください。詳しくは、編集委員までお問い合わせください。

太田敏博

編集委員

委員長	石館 基
委員	鈴木 潤三 瀧谷 徹 太田 敏博 下位香代子 西富 保 降旗 千恵

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

環境変異原研究 第17巻 第3号 1996年

平成8年3月1日 印刷
平成8年3月5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

恒温振とう水槽**TRH
S2/S3****|特徴|**

- 今までの恒温振とう水槽の機能をさらに充実させ、新タイプで登場。
- デジタル設定・指示の温度調節機構は常温～70°Cまでの温度範囲で正確に温度を管理。
- 振とうスピードは20～120ストローク/分で調節可能。
- 各種設定は簡単なタッチキー方式。
- 自己診断機能による槽内温度過昇防止・水位低下・振とうモーター異常や振とう駆動部のトルクリミッター等、豊富な安全機能を装備。
- 振とうラックは各種サンプルが自由に掛けられる、スプリングネット式。
- 試験環境・設置スペースに合わせ、槽内容量の異なる二機種を用意。

正確な温度管理+安定した環境設定=振とう培養の良きパートナー

多機能型恒温振とう培養機**AT シリーズ****|特徴|**

- 振とう培養機専用設計のマイコンにより温度・振とう数・時間の集中制御。
- 温度・振とう数は高精度のPID制御方式。
- プログラム運転やオートストップ・オートスタート運転等4種類の運転モード。
- 自己診断機能による安全装置や扉開放時のモーター停止等、十分な安全対策。
- 各種設定は使い易いテンキー入力。確認は見易いデジタル表示。
- レシプロ式・ロータリー式の二種類。サイズは各々500ccフラスコ12本架と24本架の2タイプ。



THOMAS[®] トーマス科学器械株式会社

本郷営業所 〒113 東京都文京区湯島4-1-22 ☎03(3815)3121(代) FAX.03(3815)3125