

環境変異原研究

**Environmental
Mutagen
Research**

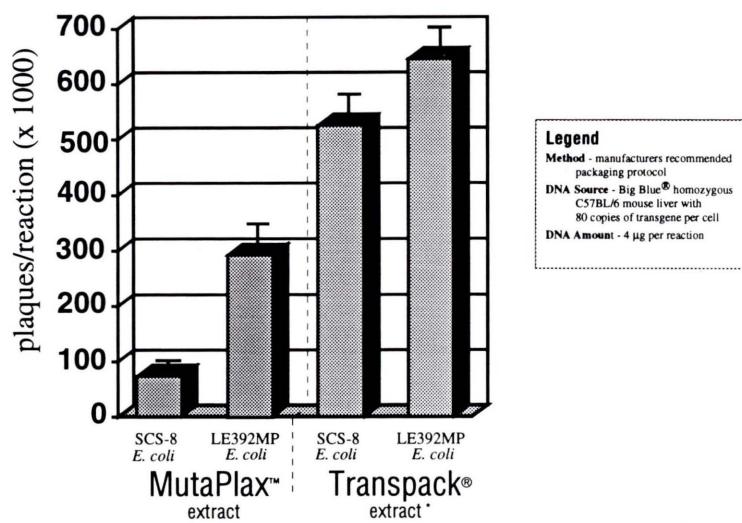
Vol.18 No.1 1996

日本環境変異原学会 第24回大会

1995年 大阪大会 会場風景

Make No Mistake!

Transpack® λ Packaging Extract
outperforms MutaPlax™ extract
5 to 1 for transgene recovery.



Now available to researchers using Muta™ Mouse
with proof of Muta Mouse purchase.

* U.S. Patent No. 5,188,957
◆ Using SCS-8 E.coli host cells

Big Blue® and Transpack® are registered trademarks of Stratagene
Muta™ Mouse is a trademark of HRF Inc.
MutaPlax™ is a trademark of Epicentre Technologies Corp.

「環境変異原研究」Vol. 18 No. 1 正誤表

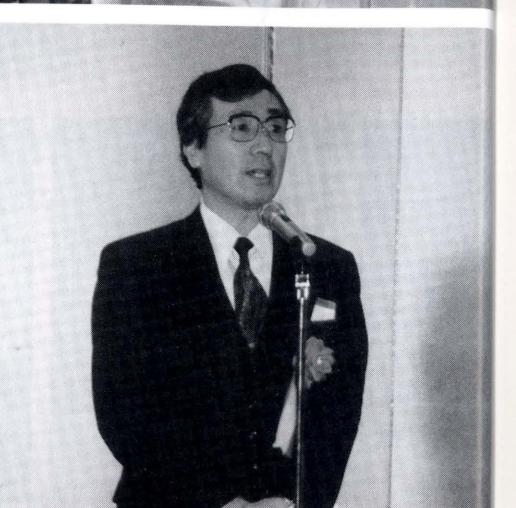
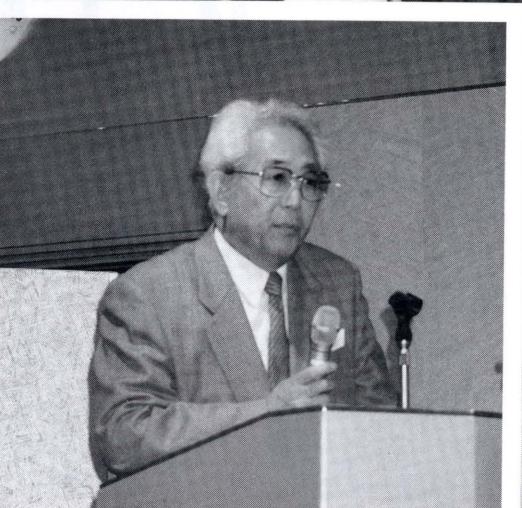
(誤り)

- 表紙 右側の登録番号
ISSN 0305 1048
- 裏表紙 目次 p. 87 著者名
J. Clements and C. Hazleton
- p. 29 一般論文, Suzuki et al.
(Accepted: March 2, 1996)
- p. 35 一般論文, 羽倉ら
(受理 1996年3月15日)

(訂正)

- ISSN 0910-0865 Coden: KHKEEN
- J. Clements
- (Accepted: March 20, 1996)
- (受理 1996年5月7日)





Environ. Mutagen Res., 18: 1-4 (1996)

特別講演

第24回大会特別講演

化学物質のリスク評価—よりよき手法を求めて

Risk assessment of chemicals—present and future

和田 攻

Osamu Wada

東京大学医学部衛生学教室 113 東京都文京区本郷 7-3-1
埼玉医科大学衛生学教室 350-04 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38

Department of Hygiene and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, the University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Department of Hygiene and Preventive medicine, Saitama Medical School,
38 Morohongo, Moroyama-cho, Iruma-gun, Saitama 350-04, Japan

(受理: 1996年1月9日)

Summary

Risk assessment is the scientific evaluation and estimation of adverse health effects resulting from exposure to a chemical, using available scientific information. The original four phases of risk assessment include hazard identification, exposure estimation, dose-response assessment and risk characterization. Recently, risk management and risk communication have been added. At present, however, models for inferring human health effects from animal studies, techniques for estimating risks and predicting health effects with few data, need improvement or development. Fortunately, remarkable advances in biotoxicology and molecular biology have promoted new understanding of the metabolism of chemicals in the body and the mechanisms of disease caused by chemicals. Incorporation of these new data moves the evaluation closer to the goal of estimating actual human risks. Recently developed physiologically-based pharmacokinetic models for the estimation of active chemical levels in critical organs, and their conjugation with biologically-based pharmacodynamic models of the process of poisoning or carcinogenesis, seem to be not only an essential part of a rational approach to quantitative risk assessment, but also raise fundamental questions about the nature of events leading to disease. This scientific progress will accelerate in the development of sound risk assessment, decrease the wide divergency in regulatory decisions in different countries, and lead to better health protection.

Keywords: risk assessment, risk communication, physiologically-based pharmacokinetic model (PBPK), biologically-based pharmacodynamic model (BBDP), molecular epidemiology

緒 言

現在の健康科学は、"後追い究明"から、"予知・予見による予防"へと発展しており、より正確で適切なリスク評価が求められている。科学技術庁の未来予測アンケートでも、2005年までには予防医学が医学の中心となり、それまでには、化学物質の安全性・リスク評価法が確立されるとの結果が得られ、一般社会からも渴望されていることが分かる。

リスクとは、ある状況のもとでの障害、疾病、死亡など望ましくない事柄の起きる確率をいう。

リスク評価とは現在までに知られている知見を総合し

て対象とする化学物質などの要因のヒトに対する有害影響の性格と程度を評価する作業あるいは過程をいう。この手法は、現在、一般生活環境や労働環境中の有害物の評価、医薬品、食品添加物などの安全性評価に用いられている。

1. リスク評価はどのように発展し、現在どのように行われているか

1) リスク評価の歴史と変遷

リスク評価の歴史(和田, 1991)をみても、1500年頃、食品中に添加された重金属による中毒の発生とその規制



ため動物実験法が確立され、第二次大戦後の環境問題から安全性の追及と検出法の鋭敏化によるゼロ志向、その後、通常の食品中の有害物質の普遍的な存在の発見などによる検知から定量的な概念、すなわち、どの位曝露されるとどの位の影響ができるかという考え方、さらにその具体的な手法として動物実験値に更に安全係数をかけて許容量としたり、確率的に低い発癌量は実際に安全とみなす（実質的安全量）などの方法が導入された。さらに今後は、あとで述べるように、より科学的な根拠に基づいたリスク評価手法（生理学的ファルマコカイネティックモデル、生物学的ダイナミックモデルなど）が用いられると思われる。この際の基本命題は、すでに1500年頃に薬師 Paracelsus が断言した“全ての化学物質は有害性があり、有益であるか有害であるかはその量によって決まる”というもので、動物実験による奏効部での有効量を量としたリスク評価が行われつつある。

米国における発癌物質のリスク評価の歴史をみると (Silbergeld, 1993; Albert, 1994; Rodricks, 1994), 1970年代に、発癌は全て環境中の発癌物質によるという誤った考え方が一般の人々に信じられ、環境重視の立場からも、発癌物質ゼロ運動が展開され、一方では人々の不安が作り出された。考え方の基本は、動物の癌は全てヒトの癌と同じとされ、動物実験による発癌物質は、ヒトの発癌物質であり、しかもゼロであるべきであると主張され、また、発癌に閾値はないとの考えも広く信じられた。対策としては、ゼロ志向とともに、極めて過剰安全性が求められた。

やがて、現実の直視も行われ、すべての環境中には多かれ少なかれ、有害物質が存在すること、全ての除去是不可能であることから、定性的よりも定量的な考えが導入され、政策的には、不完全さを補うため、リスクマネージメントが重視され、かつ、リスク評価の手法の問題点も指摘され始め、科学を重視すること、その発展をとり入れること、すなわち、定量的リスク評価に不可欠な奏効部の有効量の推定法や中毒ないし発癌機序の解明による評価法への導入が試みられてきた。

さらに最近では、人々への情報の伝達も重視され（リスクコミュニケーション）、コストや利益もアセスメントするという点も強調されてきた。

2) リスク評価の現行の基本的な手法

まず、有害性があるのかを確認し、その量と有害事象の発生の関係を推定し、実際にどのように曝露されているかを観察しながら、総合的にヒトの有害事象の発生率を推定し、そのデータを基に、現実を眺め行政はマネージメントを行い決定を下す。その決定を広く人々に知らしめ、お互いに情報交換しコミュニケーションを計るという手法が用いられている (Grant and Jarabek, 1990)。

①ハザードの同定・確認（有害性の確認）

ある化学物質が有害な影響を及ぼすか否か、その影響

はどのようなものであるかを解析するもので、リスク評価の最初に行われる。

②量・反応アセスメント（量反応評価）

原因物質に曝される量と健康影響の強さとの関係の解明である。動物実験や疫学調査によってデータを入手する。

③曝露アセスメント

環境中でヒトがその物質に実際に曝露されている濃度の調査をいう。

④リスク判定

その有害物質による健康リスクの種類と大きさを総合的に評価するもので、上記①から③までの各段階の結果をもとに、ヒトに対する健康影響の発生を定量的に解析する。

⑤リスクマネージメント（リスク管理）

以上の結論を基に、対策の立案のために技術的な可能性、また費用と効果の検討、関係者間のコンセンサス、社会経済的要因などを検討、考慮して、政策的な判断を行い、意志決定し、対策を実施する。

⑥リスクコミュニケーション

近年、科学的なリスク評価と人々によるリスクの認知の間に大きな解離が生じ、一般の人々の理解と需要の促進、選択リスクマネージメント手法の有効性の評価と改良などが重視されてきた。もちろん、機関間や国際的ハーモナイゼーションも、これを通して達成すべきである。

3) 高濃度曝露動物実験値の低濃度曝露ヒト推定値への外挿の方法

現在のリスク評価の基本的データ入手法は動物実験であるが、通常、高濃度曝露での健康障害観察であり、動物からヒトへの外挿と、高濃度曝露データから一般環境の低濃度曝露での推定値へ外挿することが必要になる。

現在、外挿法として用いられている手法は、①体重なしし体表面積による換算量に一定の安全係数をかける方法、②主として発癌物質に対して用いられている数学モデル法の二つである。

①一般毒性（非遺伝子毒性）の外挿

一般毒性は、通常、閾値のある毒性とされ、動物実験での無作用量に安全係数（不確定係数）をかけ、ヒトの値とする方法が用いられている。通常、安全係数は、1/100であるが、条件によって種々の値が用いられる。

②遺伝子毒性（発癌）の外挿

発癌には、閾値がないとされることから、発癌のインシデント影響は、閾値がない量反応関係として取り扱われている。一般に最大耐容量を用いた動物発癌実験値の低用量外挿に、種々の数理モデルが用いられる。そして、安全性は、極めて低い確率は安全と考えるという立場をとり、 10^{-6} という確率を実質的安全量とし、それを数理モデルに入れて、その時の曝露量を計算して出している。

2. 現行のリスク評価法にはどんな問題点があるか

安全係数法の問題点のうち、最も重要であるのは、量・反応関係の曲線のスロープを考慮していないこと、すなわち、閾値以上の健康障害の出現が急であり、十分な配慮が必要かどうかなどを配慮していない安心値であるということで、安心値のため、大きな安全帯がとられていることである。

数理モデル法で問題となるのは、①高用量を用いたポジティブな結果のみを用いていること、②現在、数理モデルとして、多段階線形モデルが世界各国で用いられているが、より科学的な二段階モデルなどの使用が期待されていること（これは多段階線形モデルが低用量域では直線となり、しかも95%上限をみているなど過剰安全性に片寄っていること、発癌の機序が十分考慮されていないこと、などによる）、③発癌影響は閾値なしとしてよいかということ、④不確実な事象に対して、容易なコンセンサスが用いられていること、⑤数理モデルによって、低用量域で大きく値が異なること、⑥国際間、国内機関間で考え方の相異によって誘導される基準値が大きく異なること、とくに発癌物質のうち、プロモータ作用を閾値ありとするか無しとするかで、前者では数理モデル、後者では安全係数法が用いられることによる相異が大で、例えば dioxin に対する各国の許容量で大きな相異（10～1000倍）がみられている。手法の不正確さも指摘されており、これらを改善するとリスク評価値は16～10800分の1となるという試算もされている (Gori, 1992; Barnard, 1994)。

また、国際的にみて、一般にヨーロッパ系の国では発癌物質のリスク評価に安全係数法を用い、米国は、閾値なしの方法で基準として実質的安全量を用いるなどの混乱がみられている。

3. 現行のリスク評価の問題点を解決できる正確で適切な方法はあるか

今後のリスク評価、とくにその手法は、近年、次々と解明されつつある科学的知見を導入したものとなりつつある。すなわち、①基本となる正確な量、すなわち、活性物質の奏効部量である生物学的有効量を把握することと、②生物学的な機序に基づいた反応を定め、かつ測定して、①と②で量反応関係を樹立することによって、リスク評価を行うものである。

1) 分子生物学の応用

近年、発癌とその機序の分子生物学的研究の発展は著しく、それを応用したバイオマーカーの曝露指標としての応用は、単なる外部量よりも、より奏効部の量を示すものと考えられ、生物学的指標（DNA 付加体など）として広く応用されている。とくに、これらを曝露指標とした分子疫学の試みがなされつつある (Shore et al., 1992; Moolgavkar, 1986)。

2) 新しい数理モデルの開発

化学物質の生体影響は、奏効部位での活性化された化学物質の量によって決まる。したがって、より正確なリスク評価には、第一に奏効部での活性型の量を把握することである。この分野は、近年、バイオトキシコロジーの発展により大きく進歩した。体内に入った化学物質とその活性型の存在をコンパートメント化し、標的臓器での血流、組織へのとり込み、特殊結合蛋白、代謝活性化、関与活性化学物質およびその奏効部における量を、まず動物実験で詳しく調べ、数学モデルをコンピュータで作り、ついでヒトの入手可能なデータ（血中レベル、組織レベル、代謝速度など）を動物のモデル式に入れ、実際の観察値と一致させるよう係数を設定し、これでヒトの奏効部での活性化の化学物質の量を推定し、これを毒性量として用いる方法で、生理学的ファルマコカイネティックモデルとよばれている。さらにこのモデルで得られた量を発癌物質の数理モデルに結びつける方法 (Andersen et al., 1993, 1994)、発癌機構と結びつける試み（機構モデル）がある。数理モデルも、現在では、多くの国で多段階線形モデルが用いられているが、問題点も多い。近年、注目されているのは、Moolgavkar らの生物学的二段階モデルである (Moolgavkar, 1991)。このモデルは、もともとは、ヒトの網膜細胞芽腫の臨床的、基礎的、遺伝子的研究から、発癌には網膜細胞芽腫のオノコジンの変異と癌抑制遺伝子（p53）の不活性化の二つが必要なことから発し、多くの実験的臨床的観察所見では、発癌は二段階とみなされること、発癌の過程は変異が中心となり、その変異が2回起きることが発癌となること（正常→中間細胞→悪性細胞）を基本にしている。これにより、プロモータの作用は、中間細胞の数を増やし、悪性細胞の発生確率を高めることで説明し、挿入できることなどの利点を有する。これらの手法は、ファルマコカイネティック（奏効部の量）とファルマコダイナミック（作用機序）を結びつけたもので生物学的モデルと呼ばれている (Conolly and Andersen, 1991)。

以上まとめると、

①正確な生物学的有効量の把握を行うには一動物実験により求めたファルマコカイネティックデータに入手できるヒトのデータを挿入しヒトの生物学的ファルマコカイネティック数学モデルを作ることにより達成できる。

②生物学的機序に基づいた反応を導入するためには現在多くの国で発癌物質に対して用いられている多段階線形モデルは、生物学的意味を含まず、生物学的効果量も入らない低用量域での上限安全値を示し、これに対して発癌機序など生物学的知見に基づいた二段階モデルなどのファルマコダイナミックモデル作製の試みがなされつつある。

①と②を合わせて量反応関係を樹立し、それにに基づく生物学的モデルの確立が望まれる。

4. リスク評価の将来—より有用な手法を求めて

以上、主として環境中の化学物質のリスク評価の現状とその問題点、および将来についてまとめた。

近い将来、①上述の生物学モデルによるリスク評価法の確立、②分子疫学の活用—発癌機構の解明に基づく生物学的有効量（DNA付加体などのバイオマーカー）と反応（染色体異常、遺伝子変異・活性化など）を指標とした疫学調査によるリスク評価の推進、③分子生物学を応用した安全性評価のための動物代替法の使用、④リスク集団、リスク個人の検出法の開発と応用、⑤学際的な科学者の共同作業と人々へのコミュニケーション、などによるより正確で適切な科学的手法の確立が望まれる。

リスク評価は、変動期にあるといえる。とくに変異原研究は、発癌などの機序やその指標を提供するものであり、将来のリスク評価に不可欠の学問であり、この方面へのご関心と研究へのご協力を切に望むものである。

参考文献

Albert, R. E. (1994) Carcinogen risk assessment in the US Environmental Protection Agency, *Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 75-85.
Andersen, M. E., D. Krewski and J. R. Withey (1993) Physiological pharmacokinetics and cancer risk assessment, *Cancer Lett.*, **69**, 1-14.
Andersen, M. E. and K. Krishnan (1994) Physiologically based pharmacokinetics and cancer risk assessment, *Environ. Health Persp.*, **102** Suppl. (1), 103-108.
Barnard, R. C. (1994) Scientific method and risk assessment, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **19**, 211-218.
Conolly, R. B. and M. E. Andersen (1991) Biologically based Pharmacodynamic models, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **31**, 503-523.
Grant, L. D. and A. M. Jarabek (1990) Research on risk assessment and risk management, *Toxicol. Industr. Health*, **6**, 217-233.
Gori, G. B. (1992) Cancer risk assessment; The science that is not, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **16**, 10-20.
Moolgavkar, S. H. (1986) Carcinogenesis modeling; From molecular biology to epidemiology, *Annu. Rev. Public Health*, **7**, 151-169.
Moolgavkar, S. H. (1991) Carcinogenesis models; An overview, *Basic Life Sci.*, **58**, 387-399.
Rodricks, J. V. (1994) Risk assessment, the environment, and public health, *Environ. Health Persp.*, **102**, 258-264.
Shore, R. E. V. Iyer, B. Altshuler and B. S. Pasternack (1992) Use of human data in quantitative risk assessment of carcinogens, *Rugul. Toxicol. Pharmacol.*, **15**, 180-221.
Silbergeld, E. K. (1993) Risk assessment, *Environ. Health Persp.*, **101**, 100-104.
和田 攻 (1991) リスクアセスメント, *産医レビュー*, **4**, 10-22.

Environ. Mutagen Res., **18**: 5-13 (1996)

研究奨励賞授賞講演

気相暴露による微生物変異原性試験法の開発とその応用

Development and application of a gas exposure method in microbial mutagenicity test

荒木 明宏

Akihiro Araki

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター 変異原性試験部 微生物試験室
257 神奈川県秦野市平沢 2445

Department of Microbial Mutagenicity Test, Japan Bioassay Research Center,
Japan Industrial Safety and Health Association, 2445 Hirasawa, Hadano, Kanagawa 257 Japan

(受理: 1996年2月20日)

Summary

A simple and safe gas exposure method was developed using a gas sampling bag as an exposure vessel, and a preparation vessel filled with diluted gas. Mutagenicity testing of 1,3-butadiene was carried out using a gas sampling bag for validation of the test method. Following exposure the conditions were assessed and the method standard was established as follows: the amount of S9 in the plate, the volume of gas for the plate, the amount of top agar, the length of the exposure period, and the exposure temperature. Mutagenicity testing of 14 compounds including 1,3-butadiene on *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 and TA1537, as well as *E. coli* WP2uvrA, was carried out using this gas exposure method. 1,3-Butadiene, propene (methyl acetylene), monochlorodifluoromethane, ethylchloride, diborane and silane were mutagenic. 1-Butene, 2-butene, 2-methylpropene, methyl vinyl ether, trichlorodifluoromethane, dichlorodifluoromethane, 1,2-dichloro-1,1,2,2-tetrafluoroethane, 1,1-difluoroethane and phosphine were not mutagenic with or without metabolic activation. Some of these results were compatible with results reported from a previous test using a glass exposure vessel. Mutagenicity testing of chloroform and carbon tetrachloride on *E. coli* WP2/pKM101 was carried out using the pre-incubation method and this gas exposure method. Using the gas exposure method, carbon tetrachloride was found to be mutagenic to *E. coli* WP2/pKM101 without metabolic activation, and chloroform was found to be mutagenic to *E. coli* WP2/pKM101 only when using S9mix supplemented with glutathione. The mutagenicity of chloroform and carbon tetrachloride was not detected by the pre-incubation method, with or without metabolic activation. Thus, this gas exposure method has the advantage that it can be easily and safely used for testing combustible and self-combustible substances such as silane, diborane and phosphine, and for volatile substances such as chloroform and carbon tetrachloride.

Keywords: microbial mutagenicity test; gas exposure method; gas sampling bag; gaseous chemical; volatile chemical

1. はじめに

ガス状物質の微生物変異原性試験は、試験菌株とS9もしくは磷酸緩衝液を最少グルコース寒天平板培地にトップアガード重層して作成したバクテリアプレートをデシケーター等のガラス容器中に入れ、ガスに暴露する方法が用いられてきている。ガスを暴露する方法には濃度調整したガスを暴露容器に連続的に流し込む方法

(Kleindienst *et al.*, 1985; Victorin and Stahlberg, 1988)と一定量の濃度調整したガスを暴露容器に封入する方法 (Bartsch, 1975; Simon *et al.*, 1977; de Meester *et al.*, 1980)が用いられる。濃度調整したガスを暴露容器に連続的に流し込む方法は暴露濃度を常に一定にしておける他、寿命の短い物質を絶えず暴露し続ける利点があるが、暴露容器内に絶えず新しく供給されるガスによって

代謝活性化体が希釈される恐れがある。この方法は、ガスの発生および濃度調整に特殊な装置と技術を必要とする。またこれらの特殊な装置は一般に高価である。一定量の濃度調整したガスを暴露容器に封入する方法はガス状物質の一般的な試験方法として紹介されている (Maron and Ames, 1983)。この方法もガスの濃度調整に真空採気瓶等の特殊な装置を必要とする。また、暴露容器中の空気を濃度調整したガスで置換するのに真空ポンプ等を用いて暴露容器中の空気を抜く操作が必要であり、ガスを常圧下で取り扱う事が難しい。このような理由からか、気相暴露試験の報告の多くはプレート当たりのガス暴露量等のガス暴露条件の一部の記載が不明瞭であると指摘されている (Claxton, 1985)。濃度調整したガスを暴露容器に連続的に流し込む方法と一定量の濃度調整したガスを暴露容器に封入する方法のいずれにおいても試験するガスが可燃性ガスの場合、ガラス容器等の硬い容器を用いると、爆発が生じた場合の爆発力は強く人的、物的被害は甚大である。

以上の事より、ガス状物質の安全で簡便な気相暴露試験方法の開発を実施し、従来のデシケーター等のガラス容器を暴露容器として用いる替わりに作業環境空気の捕集に用いるガス捕集袋をガスの濃度調整容器および暴露容器として用いる方法を考案した (荒木他, 1988; Araki *et al.*, 1993)。

2. ガス捕集袋を用いる気相暴露試験方法

ガス捕集袋は、大気中の汚染物質等を直接捕集する目的で作られている為、多くの化学物質に対して不活性な材質であるフッ素樹脂が使用されている (米元他, 1977)。特にフッ化ビニルポリマーシートでできた Tedlar™ bag は化学物質に対する安定性も良く、価格の上からも物質ごとに使い捨てで使用できるので優れてい

る。この Tedlar™ bag を暴露容器および濃度調整容器として用いる事により、ガスを常圧下で取り扱うことができ、簡便なポンプと流量計 (Fig. 1) で被検物質ガスの濃度調整や容器への充填置換ができるようになった。考案した気相暴露試験方法はガス状物質のみならず揮発性物質の気相暴露試験にも使用できる。

(1) 被検物質ガスの濃度調整

被検物質ガスを希釈し濃度調整する方法を示した (Fig. 2)。シリコン等の圧力容器に入っている被検物質ガスは、大気圧下で取り扱えるようにする為、あらかじめ空気を抜いたガス捕集袋に移し入れる。新しいガス捕集袋 (20l の希釈バッグ) の空気を抜き、ポンプと流量計で被検物質ガスを新しいガス捕集袋にはかりとる。さらに希釈空気 (被検物質ガスが自燃性の場合は窒素もしくはヘリウムを用いる) をはかり入れる。ガス捕集袋を軽くたたき、手で揉むようにして被検物質ガスと空気を良く混合する。被検物質ガスと空気を 1:1 で混合することで 50% 濃度の被検物質ガスが調製できる。

(2) バクテリアプレートの作成

直接法で試験する場合は 0.1 ml の試験菌液 (静止期の初期まで好気的に培養) と 0.5 ml の 0.1 M の磷酸緩衝液 (pH 7.4) を、代謝活性化法で試験する場合は 0.1 ml の試験菌液と 0.5 ml の S9Mix を 2 ml のトップアガー (サルモネラの場合は 0.1 μ mol のヒスチジン、ビオチンを、大腸菌の場合は 0.1 μ mol のトリプトファンを含む) で最少グルコース寒天平板培地に重層してバクテリアプレートを作成する (重層法)。

(3) 暴露

バクテリアプレートは代謝活性化の有無別、濃度別にプレートホルダーに蓋をはずして固定する。プレートホルダーに固定したバクテリアプレートは、あらかじめ袋の一辺を切断したガス捕集袋 (10l 暴露バッグ) に入れ、

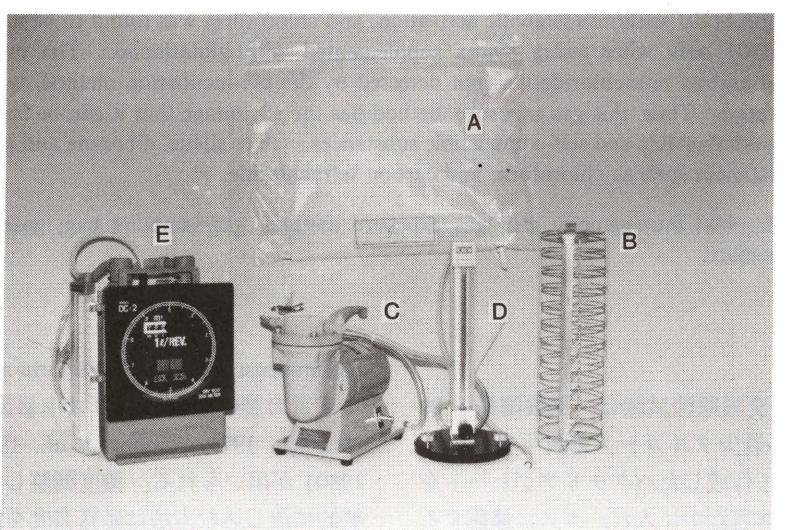


Fig. 1. Equipment and materials for the gas exposure method using a gas sampling bag. A, gas sampling bag (Tedlar™ bag); B, petri dish holder for 10 plates; C, pump; D, flow meter, calibrated gas flow meter E.

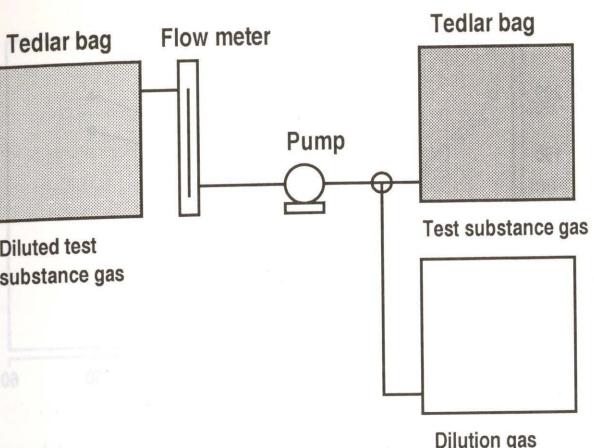


Fig. 2. Preparation and dilution method of test substance gas.

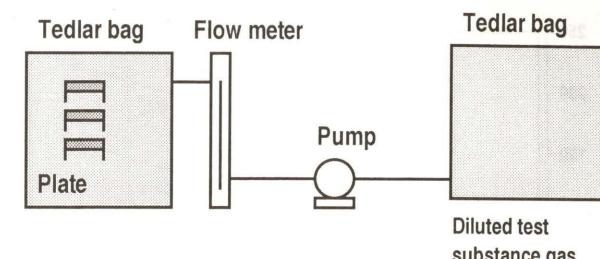


Fig. 3. Filling up method in the exposure bag with prepared gas.

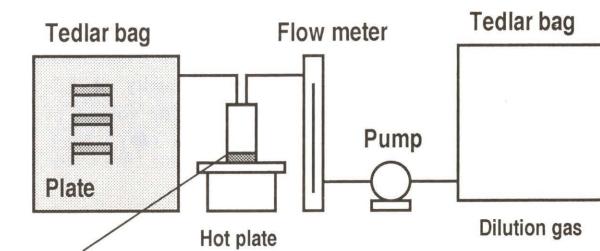


Fig. 4. Filling up method in the exposure bag with vaporized gas.

切断面をビニルテープを用いて二重三重に織り込む様にして止めて封入する。代謝活性化を必要とする変異原物質を試験する場合、代謝活性化法と直接法で試験するバクテリアプレートを一つの暴露容器に入れると S9Mix で代謝された物質が直接法で試験するプレートに飛び込み復帰変異コロニー数が増加し、あたかも直接変異原物質のように見えることがある (de Meester *et al.*, 1980)。暴露バッグへの濃度調整したガスの充填方法を示した (Fig. 3)。バクテリアプレートの入った暴露バッグの空気を抜きポンプと流量計を用いてプレート当たりの暴露するガスの量が一定になるように濃度調整した被検物質ガスをはかり入れる。この時に濃度調整したガスを少量用いて一回暴露バッグ内を置換洗浄し、残っている空気を洗い出しておく。ガスを充填後、孵卵器内に移し 37°C で 24 時間暴露する。暴露後、暴露容器内の被検物質ガスを抜き取りバクテリアプレートを取り出して蓋をする。蓋をしたバクテリアプレートは濃度別、代謝活性別にビニル袋に詰めなおし、さらに 37°C で 24 時間培養する (暴露および培養時間の合計は 48 時間となる)。培養後、出現したコロニー数を計測する。

被検物質が液体の場合のガス化および暴露バッグへの充填方法について示した (Fig. 4)。バクテリアプレートの入った暴露バッグの空気を抜き、空気を抜いたバクテリアプレートの入った暴露バッグと流量計の間に拡散瓶 (ガラス瓶をホットプレート上におく、もしくはガラス管をリボンヒーターで巻いて加熱する) をつなぎ被検物質溶液を入れ氣化させる。氣化した被検物質はバクテリアプレートの入った暴露バッグにポンプを用いて一定量の希釈空気で押し入れる。調製するガスの濃度と量は希釈空気と氣化させた被検物質の体積の量比を変えることにより行う。拡散瓶を用いない場合は、バクテリアプレートの入った暴露バッグの空気を抜きポンプと流量計を用いて希釈空気をはかり入れたのち、被検物質溶液を希釈空気の入った暴露バッグに直接注入し、暴露バッグをホットプレート上に置き被検物質溶液を氣化させる。

3. ガス暴露条件の検討

開発した気相暴露試験方法で変異原性の知られている 1,3-butadiene (de Meester *et al.*, 1980) を用い、トップアガー量、暴露時間、暴露温度、プレート当たりのガス量、プレート当たりの S9 量等のガス暴露条件についてサルモネラ TA1535 を用いて調べた (荒木他, 1988; Araki *et al.*, 1993)。1,3-butadiene は非水溶性であり、変異原性の発現に S9 を必要とする。

トップアガー量の影響について調べた。1,3-butadiene の変異原性は、試験菌株と S9 を最少グルコース寒天平板培地に塗り付けて作成したバクテリアプレートをガスに暴露するよりもトップアガーで試験菌株と S9 を最少グルコース寒天平板培地に重層したバクテリアプレートをガスに暴露した方が強く検出できた (Fig. 5)。S9 は軟寒天中で安定である事より (Nohmi *et al.*, 1981)、S9 が軟寒天中で効率良く 1,3-butadiene を代謝したと考えられた。Bridges は、試験菌株を最少グルコース寒天平板培地に塗り付けて作成したバクテリアプレートを揮発ガスに暴露する方法 (スプレッド法) が感度が良いと報告している (Bridges, 1978)。しかし、1,3-butadiene のように代謝活性化を必要とする物質においては重層法が優れないと考えられる。

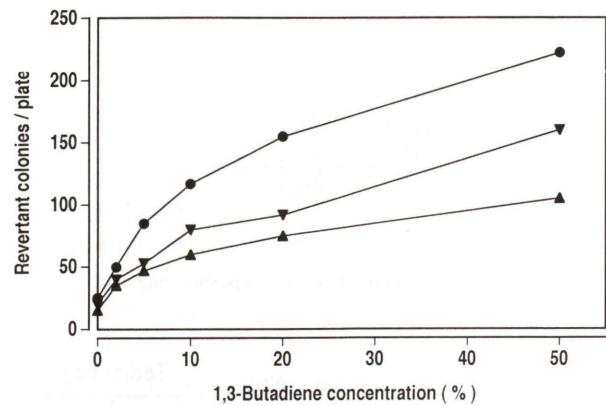


Fig. 5. Effect of top agar on the mutagenicity of 1,3-butadiene in *S. typhimurium* TA1535. The volume of top agar was 0 ml (▲), 1 ml (▼), 2 ml (●). Each point represents the average of four plates.

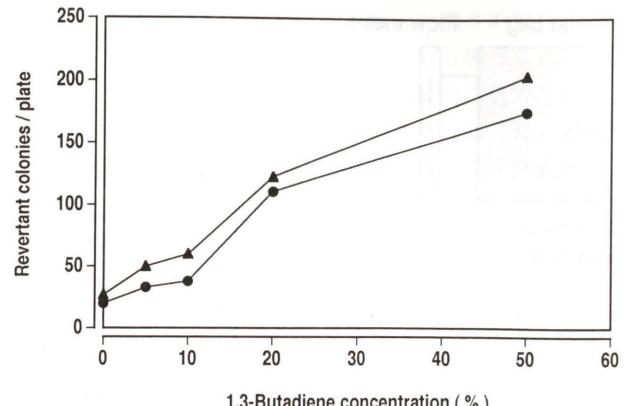


Fig. 7. Effect of exposure temperature on the mutagenicity of 1,3-butadiene in *S. typhimurium* TA1535. Exposure temperatures were 37°C (●) and 30°C (▲). Each point represents the average of four plates.

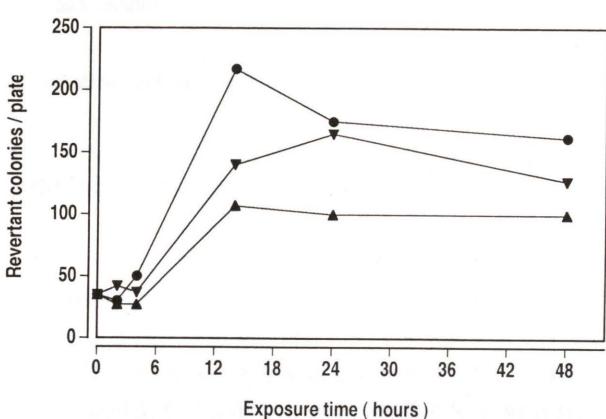


Fig. 6. Effect of exposure time on the mutagenicity of 1,3-butadiene in *S. typhimurium* TA1535. 1,3-Butadiene concentrations were 10% (▲), 20% (▼) and 50% (●). Each point represents the average of three plates.

暴露時間の影響について調べた。1,3-butadiene の変異原性は暴露4時間では検出する事はできず、少なくとも4時間以上の暴露が必要であった (Fig. 6)。この事は1,3-butadiene が4時間以上かけてプレート中のS9により代謝されて変異原性を示したと考えられ、暴露はS9が安定な間はバクテリアプレートを被検物質に暴露し続けた方が良いことを支持した。

暴露温度の影響について調べた。1,3-butadiene の変異原性は暴露30°C、48時間の方が37°C、48時間よりも強く検出する事ができた (Fig. 7)。しかし、その差はわずかであり暴露温度による影響はなかった。暴露温度が30°Cの場合は37°Cに比べて復帰変異した菌の生育が遅れコロニーが小さくなる。また1,3-butadiene の変異原性の検出には14時間以上の暴露が望ましい事より37°Cで暴露する方法は長時間の暴露ができるので優れている。

プレート当たりのガスの量(暴露量)の影響について調べた。プレート当たり357ml(20%の1,3-butadieneガス100ml当たりのS9量は28μlに相当)から1250ml

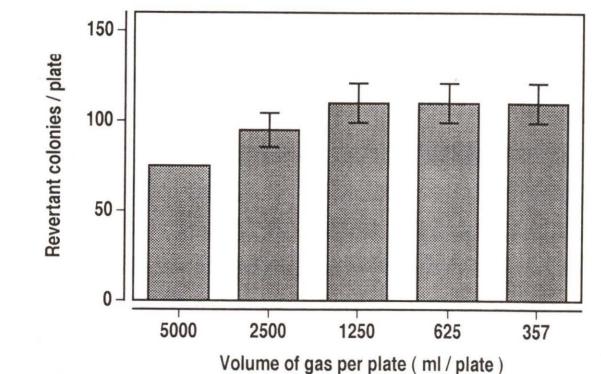


Fig. 8. Effect of exposure gas volume on the mutagenicity of 1,3-butadiene in *S. typhimurium* TA1535. Concentration of 1,3-butadiene gas in the bag was 20%.

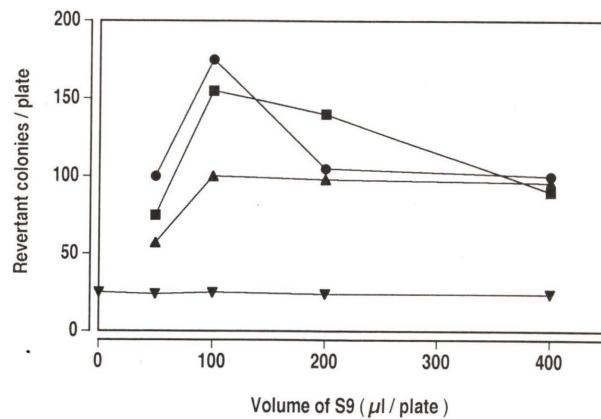


Fig. 9. Effect of S9 concentration in the plate on the mutagenicity of 1,3-butadiene in *S. typhimurium* TA1535. 1,3-Butadiene concentrations were 0% (▼), 10% (▲), 20% (■) and 50% (●). Each point represents the average of three plates.

(20%の1,3-butadieneガス100ml当たりのS9量は8μlに相当)の暴露量では、ほぼ一定の復帰変異コロニー数を示したが1250mlを越えると減少した (Fig. 8)。これは、1,3-butadieneが変異原性を示すのに代謝活性化を必要とし、かつ代謝物が揮発性であることから1,3-butadieneの絶対量に対するS9量が変異原性発現に大きく影響していると考えられた。

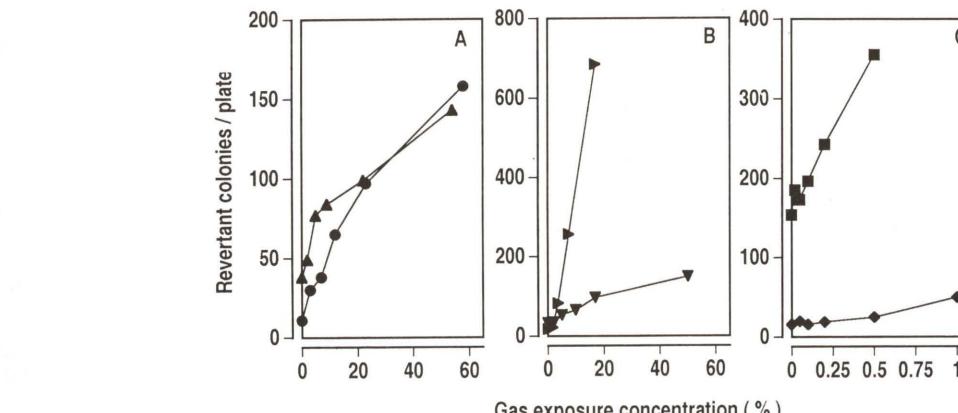


Fig. 10. A: Mutagenicity of 1,3-butadiene (●) and propyne (▲) tested on *S. typhimurium* TA1535 and *E. coli* WP2uvrA using gas exposure method with S9. B: Mutagenicity of monochlorodifluoromethane (▼) and ethylchloride (►) tested on TA1535 without S9. C: Mutagenicity of diborane (■) and silane (◆) tested on TA100 and TA98 without S9.

dieneの絶対量に対するS9量が変異原性発現に大きく影響していると考えられた。

プレート当たりのS9の量の影響について調べた。1,3-butadieneの変異原性発現に必要な最適S9量はプレート当たり100μlであった (Fig. 9)。

以上の結果よりガス暴露試験を再現性よく実施し、その結果を比較検討するには、暴露時間だけでなくプレート当たりの暴露量およびS9量も一定にして試験を実施する必要がある事を明らかとした。

4. ガス状物質の変異原性試験

開発した気相暴露試験方法を用いてガス状物質の変異原性をサルモネラ TA98, TA100, TA1535, TA1537および大腸菌 WP2uvrA を用いて代謝活性化の有無で調べ、従来より実施されているガラス容器等を用いる気相暴露試験の結果報告と比較した (Araki *et al.*, 1993)。

試験を実施した14物質のうち1,3-butadiene, monochlorodifluoromethane, ethylchloride, diborane, silaneの6物質に変異原性が確認された (Fig. 10)。その他の8物質は陰性の結果であった。デシケーター等を暴露容器として用いる試験方法において1,3-butadiene (de Meester *et al.*, 1980)はサルモネラ TA1535に代謝活性化法で、monochlorodifluoromethane (Longstaff and McGregor, 1978)とethylchloride (Zeiger *et al.*, 1992)は直接法でサルモネラ TA1535に変異原性を示すことが、またtrichlorodifluoromethane, dichlorodifluoromethane, 1,2-dichloro-1,1,2,2-tetrafluoroethane, 1,1-difluoroethaneはサルモネラ TA1535およびTA100に代謝活性化の有無にかかわらず変異原性を示さない事が報告されている (Longstaff *et al.*, 1984)。ガス捕集袋を用いる気相暴露試験方法の結果はこれらの試験結果と一致した。また、自燃性ガスであるdiborane, silaneの変異原性はこの方法で新たに検出した。考案したガス捕集袋を用いる気相暴露試験方法は自燃性ガスの試験も安全に実施でき、ガス状物質のスクリーニング試験に用いるのに適している。

5. 挥発性物質の気相暴露試験

揮発性物質の気相暴露による変異原性試験方法は、試験菌株とS9もしくは磷酸緩衝液を最少グルコース寒天平板培地にトップアガードで重層して作成したバクテリアプレートをデシケーター等のガラス容器に入れ、被検物質溶液を容器内で気化させて暴露する方法が用いられている (Bridges, 1978; Simmon *et al.*, 1977; 松下他, 1981)。これらの方法は、暴露容器内の空気を抜かないで被検物質溶液を気化し高濃度のガスを調製する事が困難である。Hugesらは特別製のTedlerTM bagを用いる事により、高濃度のガスを簡便に調製できる気相暴露試験手法を報告している (Hughes *et al.*, 1987)。この方法は2枚もしくは3枚のバクテリアプレートを特別製のTedlerTM bagに入れ被検物質溶液を気化させて暴露する方法である。暴露できるバクテリアプレートの枚数が限られる事によりスクリーニング試験に用いるには操作が煩雑である。我々が考案したガス捕集袋を用いる気相暴露試験方法 (荒木他, 1988; Araki *et al.*, 1993)は市販の10lのガス捕集袋を用いるので、一度に十数枚までのバクテリアプレートが暴露でき、揮発性物質のスクリーニング試験に用いるのに適している。

常温で液体もしくは固体の揮発性物質は主にプレート法 (Ames *et al.*, 1975), もしくはプレインキュベーション法 (Matsushima *et al.*, 1980)で試験が実施されている。しかし、Ashbyは、揮発性が強くかつ水に溶け難い物質はプレート法では変異原性が陰性でも気相暴露法で陽性を示す事を揮発性物質の試験法の問題点として指摘している (Ashby, 1989)。松島は、揮発性物質のプレート法、プレインキュベーション法および気相暴露法の試験結果と試験物質の沸点および水への溶解性を比較した。その結果、揮発性が強く且つ水に溶け難い物質は従来のプレート法、プレインキュベーション法では試験物質が試験系からはじき出されてしまう為、気相暴露法で試験を実施しないと変異原性を正しく評価できない事を指摘している (松島, 1990)。そこで考案した気相暴露試験方法

を用いて水に難溶な揮発性物質の変異原性を調べる事とした。

6. 挥発性塩素化メタン類の変異原性試験

クロロホルムおよび四塩化炭素はラットおよびマウスを用いた長期発癌性試験において癌原性が明らかにされている。この事からクロロホルムおよび四塩化炭素が遺伝子損傷性を持つ事を多くの研究者が予測し、微生物を用いる変異原性試験を実施したにもかかわらず変異原性は確認されていない (Simmon *et al.*, 1977; Barber *et al.*, 1981; Rosenthal, 1987)。これらの変異原性試験における問題点として(1)クロロホルムおよび四塩化炭素の代謝物であるホスゲンが架橋反応性を持つにも係わらず、架橋反応を起こす物質に感度の良い菌株を用いて気相暴露試験が実施されていない。(2)サルモネラ TA98, TA100, TA1535 などの GC 塩基に反応する物質の変異原性を高感度に検出できるサルモネラ菌株が用いられ、AT 塩基に反応する物質の変異原性を検出できる大腸菌を用いて気相暴露試験が実施されていない。(3)代謝活性化系として通常の S9Mix では不十分でありハロゲン化炭化水素の代謝に関連するグルタチオン (van Bladeren *et al.*, 1980) を添加して気相暴露試験が実施されていない、等が考えられる。

以上の事より、考案したガス捕集袋を用いる気相暴露試験方法を用いてクロロホルムおよび四塩化炭素の変異原性を WP2/pKM101 を用いて代謝活性化の有無で調べた (佐々木, 1995)。ガス暴露条件は、バクテリアプレートを 2 ml のトップアガードで重層する方法で作成し、暴露時間を 24 時間、暴露温度を 37°C、プレート当たりのガス量を 500 ml、プレート当たりの S9 量を 50 μl とした。尚、代謝活性化に用いる S9Mix にグルタチオンをプレート当たり 5 μmol 加えた系についても試験を実施した。

その結果、四塩化炭素は直接法で変異原性を示した (Fig. 11)。クロロホルムは S9Mix にグルタチオンをプレート当たり 5 μmol 加えた代謝活性化系で変異原性を示し、直接法およびグルタチオンを加えない代謝活性化系では変異原性を示さなかった (Fig. 12)。

クロロホルムおよび四塩化炭素の変異原性は通常のプレート法およびプレインキュベーション法では検出できず、ガス暴露法でのみ変異原性が検出できる (佐々木, 1995)。クロロホルムおよび四塩化炭素がガス暴露法において変異原性を示す理由については、1990 年に松島が指摘しているようにクロロホルムおよび四塩化炭素のような揮発性が強くかつ水に溶け難い物質は從来のプレート法、プレインキュベーション法では被検物質が試験系からはじき出されてしまう為、気相暴露法で試験を実施する事により変異原性を示したと考えられる。また、クロロホルムがグルタチオン添加により変異原性を示す理由についてはいろいろと異論の多いところではあるが、

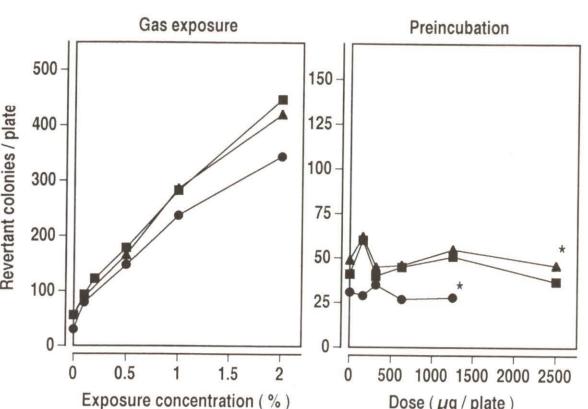


Fig. 11. Dose response curve of carbon tetrachloride on *E. coli* WP2/pKM101 using gas exposure and preincubation method without S9 (●), with S9 (▲) or with S9+glutathione (■). Growth inhibition was observed (*).

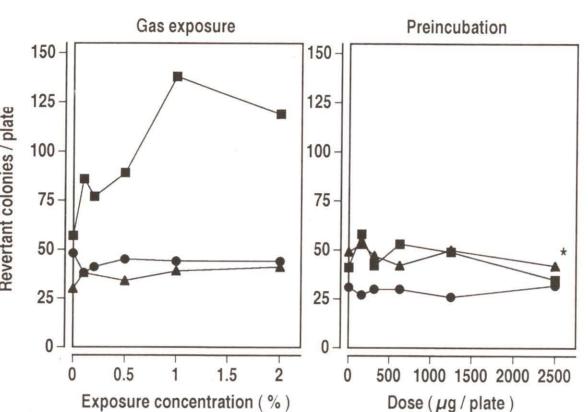


Fig. 12. Dose response curve of chloroform on *E. coli* WP2/pKM101 using gas exposure and preincubation method without S9 (●), with S9 (▲) or with S9+glutathione (■). Growth inhibition was observed (*).

グルタチオンとの反応代謝物により、もしくはグルタチオン添加によりホスゲンによる細胞毒性が弱められ変異原性を示したと推察している。ガス暴露法はプレート法、プレインキュベーション法のように一時的に高濃度の被検物質にさらされない事によりクロロホルムおよび四塩化炭素のように細胞毒性の強い物質の変異原性を調べる上でも有利であると考えられ、さらに気相暴露試験方法は被検物質の調製に溶媒を用いないので加水分解性のある物質や、DMSO と反応する物質を安定な状態で試験菌株に作用させる事ができると考えられる。水への溶解性が悪く揮発性の強い物質は気相暴露試験方法で変異原性を調べ直す必要がある。

7. 終わりに

ガス捕集袋を用いる気相暴露試験方法を開発したことで、トップアガード量、暴露時間、暴露温度、プレート当たりのガス量、プレート当たりの S9 量等のガス暴露条件を 1,3-butadiene を用い簡単に調べる事ができた。この結果をまとめると、変異原性の発現に代謝活性化を

必要とする物質と必要としない物質とでは暴露条件は異なるだろうと議論された。そこで、直接変異原物質である ethylchloride を用いて 1,3-butadiene と同様の試験系 (Araki *et al.*, 1993) で暴露条件を検討した。その結果、ethylchloride は 1,3-butadiene の場合と同様にバクテリアプレートを重層法で作成したほうがスプレット法で作成した場合よりも感度は良かった (Fig. 13)。また、ethylchloride は暴露 2 時間で変異原性を示し暴露時間に比例して変異原性は強く検出された (Fig. 14)。プレート当たりの暴露量は 335 ml から 2500 ml まで暴露量に比例して変異原性は強く検出され 1,3-butadiene の場合とは逆の結果となった (Fig. 15)。これは 1,3-butadiene が代謝活性化を受け、暴露容器内の代謝物の濃度が上がる事により変異原性を示すのに対し ethylchloride はバクテリアプレートに溶解した量に比例して変異原性を示した為と考えられた。暴露温度は 30°C と 37°C では 37°C のほうが変異原性は強く検出された (Fig. 16)。これらの事よりスクリーニング試験のガス暴露条件は、バクテリアプレートを 2 ml のトップアガードで重層する方法で作成し、

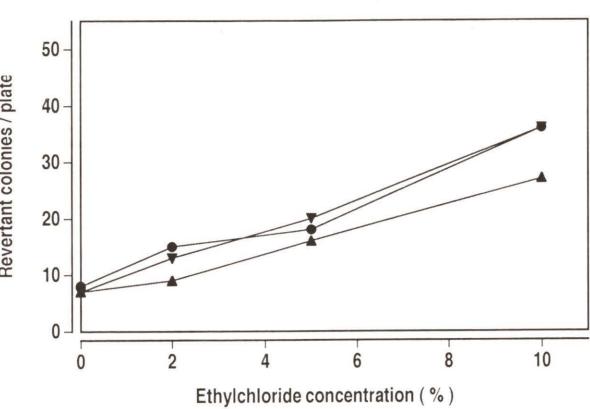


Fig. 13. Effect of top agar on the mutagenicity of ethylchloride in *S. typhimurium* TA1535. The volume of top agar was 0 ml (▲), 1 ml (▼), 2 ml (●). Each point represents the average of four plates.

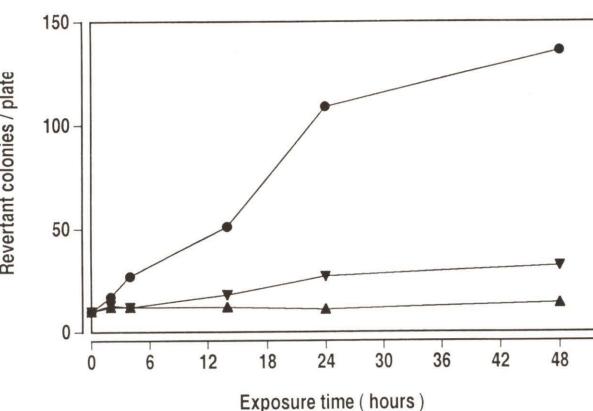


Fig. 14. Effect of exposure time on the mutagenicity of ethylchloride in *S. typhimurium* TA1535. Ethylchloride concentrations were 5% (▲), 10% (▼) and 20% (●). Each point represents the average of three plates.

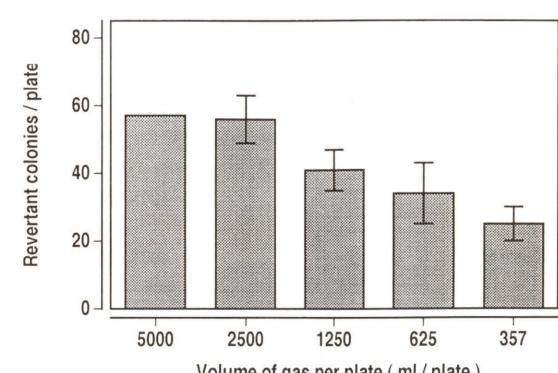


Fig. 15. Effect of exposure gas volume on the mutagenicity of ethylchloride in *S. typhimurium* TA1535. Concentration of ethylchloride gas in the bag was 10%.

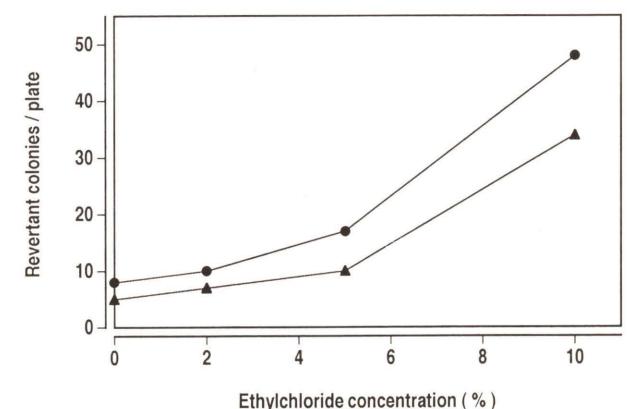


Fig. 16. Effect of exposure temperature on the mutagenicity of ethylchloride in *S. typhimurium* TA1535. Exposure temperatures were 37°C (●) and 30°C (▲). Each point represents the average of four plates.

暴露時間を 24 時間、暴露温度を 37°C、プレート当たりのガス量を 500 ml、プレート当たりの S9 量を 50 μl とする事で多くのガス状物質の変異原性を調べることができますと考えられる。

ガス捕集袋を用いる暴露方法は収縮する暴露袋を用いるのでバクテリアプレートを高濃度のガスに暴露することは容易である。高濃度で暴露を実施した場合、もしくは希釈気体に窒素を用いた場合は暴露バッグ中の酸素分圧が下がり菌の生育がおさえられ陰性対照値等に影響を及ぼす事が推測される。暴露バッグ中の空気量の影響を調べるためにサルモネラ TA98, TA100 を用い代謝活性化の有無で空気と窒素を暴露し復帰変異コロニー数を比較した。暴露条件はバクテリアプレートを 2 ml のトップアガードで重層する方法で作成し、暴露時間を 24 時間、暴露温度を 37°C、プレート当たりの暴露量を 500 ml して試験した。復帰変異コロニー数は TA100 の直接法および代謝活性化法において約 2 割、TA98 の代謝活性化法においても約 2 割ほど減少しただけであった (Fig. 17)。陽性を示したガスの多くは % レベルの暴露が必要であり、バクテリアプレートを 50% の被検物質濃度まで暴露することは被検物質に変異原性を起こす作用があ



Fig. 17. Effect of anaerobic condition on the spontaneous revertant colonies number in *S. typhimurium* TA100 and TA98 with or without metabolic activation. Plates were exposed to air or nitrogen gas for 24 hours.

るかないかを調べる上で重要である。

我々は開発した気相暴露試験方法で揮発性もしくはガス状物質の変異原性を調べてきた。シラン系の化合物を試験した時に近くに置いてあったポリエチレンの袋より静電気が飛び、暴露バッグが爆発したことがあった。ガス捕集袋は大きな音をたてて破裂したが人的的被害はなかった。また、自燃性ガスの試験も安全に実施できる事よりガス捕集袋を用いる暴露方法は爆発に対する安全性の高い方法と考えられる。反面、ガス捕集袋は破れやすいので破れた袋から漏れ出たガスに作業者が暴露される危険性があり、ドラフト等の設備を使用し化学物質に暴露されないように注意する必要がある。

ガス捕集袋を用いる気相暴露試験方法を開発した事で容易にガス状、揮発性物質の変異原性試験が実施できるようになった。従来のプレート法およびプレインキュベーション法で変異原性が陰性の物質が気相暴露試験で陽性の結果を示す事が予想される。しかし現在までに気相暴露による試験報告は少ない、また報告のあるものでも暴露条件が異なっているため陽性を示した物質の強さを定量的に比較することは困難である。気相暴露における変異原性の定量的評価をどのように行うかは今後の課題と考えられる。

謝 辞

今回の受賞の対象となった気相暴露による微生物変異原性試験法の開発とその応用は、東京大学医科学研究所の松島泰次郎博士（現、日本バイオアッセイ研究センター、所長）の指導の下で開始され共同研究者である労働衛生検査センターの野口忠研究員（現、日本バイオアッセイ研究センター、室長補佐）ならびに日本バイオアッセイ研究センターの加藤典代研究員、佐々木俊明研究員ならびに日本バイオアッセイ研究センターの技術スタッフの協力により成し遂げられたものです。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

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

荒木明宏、野口忠、松島泰次郎 (1988) ガス状物質の微生物を用いる変異原性試験、トキシコロジーフォーラム, **11**, 184-193.

Araki, A., T. Noguchi, F. Kato and T. Matsushima (1994) Improved method for mutagenicity testing of gaseous compounds by using a gas sampling bag, *Mutation Res.*, **307**, 335-344.

Ashby, J. (1989) The evaluation of volatile chemicals for mutagenicity, *Mutagenesis*, **4**, 160-162.

Barber, E. D., W. H. Donish and K. R. Muller (1981) A procedure for the quantitative measurement of the mutagenicity of volatile liquids in the Ames *Salmonella*/microsome assay, *Mutation Res.*, **90**, 31-48.

Bartsch, H., C. Malaveille and R. Montesano (1975) Human, rat and mouse liver-mediated mutagenicity of vinyl chloride in *S. typhimurium* strains, *Int. J. Cancer*, **15**, 429-439.

Bridges, B. A. (1978) On the detection of volatile liquid mutagens with bacteria: Experiments with dichlorvos and epichlorohydrin, *Mutation Res.*, **54**, 367-371.

Claxton, L. D. (1985) Assessment of bacterial mutagenicity methods for volatile and semivolatile compounds and mixtures. *Environment International*, **11**, 375-382.

de Meester, C., F. Poncelet, M. Roberfroid and M. Mercier (1980) The mutagenicity of butadiene towards *Salmonella typhimurium*, *Toxicol. Lett.*, **6**, 125-130.

Hughes, J. T., D. M. Simmons, I. G. Monteith and L. D. Claxton (1987) Vapourization technique to measure mutagenic activity of volatile organic chemicals in Ames/*Salmonella* assay, *Environ. Mutagen.*, **9**, 421-441.

Kleindienst, T. E., P. B. Shepson, E. O. Edney and L. D. Claxton (1985) Peroxyacetyl nitrate: Measurement of its mutagenic activity using the *Salmonella*/mammalian microsome reversion assay, *Mutation Res.*, **157**, 123-128.

Longstaff, E. and D. E. McGregor (1978) Mutagenicity of halocarbon refrigerant monochlorodifluoromethane (R22) in *Salmonella typhimurium*, *Toxicol. Lett.*, **2**, 1-4.

Longstaff, E., M. Robinson, C. Bardbrook, J. A. Styles and I. F. H. Purchase (1984) Genotoxicity and chronic exposure in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72**, 15-31.

Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, **113**, 173-215.

Matsushima T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura (1980) Factor modulating mutagenicity in microbial test, In: K. H. Norpeth and R. C. Garner (Eds.), *Short-Term Test System for Detecting Carcinogens*, Springer, Berlin, pp. 273-285.

松下秀鶴、後藤純雄、浜野義夫 (1981) 挥発性化合物の変異原性試験方法、第54回日本産業衛生学会講演集、pp. 280-281.

松島泰次郎 (1990) ガス・蒸気暴露による変異原性試験、環境変異原研究, **12**, 89-91.

Nohmi, T., K. Yoshikawa, R. Miyata, S. Nakamura and M. Ishidate Jr. (1981) Duration of S9 activity in agar overlay, *Mutation Res.*, **91**, 37-39.

Rosenthal, S. L. (1987) A review of the mutagenicity of chloroform, *Environ. Mol. Mutagen.*, **10**, 211-226.

佐々木俊明、石田りえ、小田大、荒木明宏、松島泰次郎 (1995) ガス暴露法による塩素化メタン類の微生物変異原性試験、日本環境変異原学会、24回大会要旨集、pp. 117.

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

murium, *Environ. Mol. Mutagen.*, **11**, 65-77.

米元純三、深堀すみ江、中明賢二、多田治 (1977) 捕集袋を用いる有機溶剤蒸気の捕集について、労働科学, **53**, 435-440.

Zeiger, E., B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor and K. Montelmann (1992) *Salmonella* mutagenicity tests. V. results from the testing of 311 chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, **19**, Suppl. (21), 2-141.

突然変異修飾因子の検索とその作用機構に関する研究

Modifiers of mutagenesis in the environment and their action mechanisms

下位香代子

Kayoko Shimo

静岡県立大学 食品栄養科学部 422 静岡市谷田 52-1

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

(受理: 1996年2月23日)

Summary

Antimutagens and co-mutagens in our living environment, especially in food, were screened by mutation assays using *E. coli*. Polyphenols such as tannic acid and (-)-epigallocatechin gallate suppressed UV-induced mutagenesis in *E. coli*. However, these compounds showed little antimutagenic effect in DNA excision repair-deficient cells and in cells treated with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine. It is suggested that these compounds prolong the pre-replication period, allowing cells to carry out excision repair. On the contrary, 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1) enhanced UV-induced mutations without microsomal activation in *E. coli* at neither toxic nor mutagenic concentrations. The ELISA tests, using monoclonal antibodies against photolesions, demonstrated that Trp-P-1 inhibited the removal of both cyclobutane dimers and (6-4) dimers in UV-irradiated *E. coli*. *In vitro* studies with T4 endonuclease V suggest that Trp-P-1 changes DNA conformation by intercalation and then inhibits the binding of the repair enzyme against UV-damaged DNA.

On the other hand, pre-treatment with antioxidative flavonoids reduced the frequency of micronucleated reticulocytes (MNRETs) in the peripheral blood of γ -irradiated mice. Antioxidative activity of flavonoids against Fenton's reagent-induced lipid peroxidation was examined by thiobarbituric assay. Good correlation ($r=0.717$) was observed between radioprotective and antioxidative activities. Luteolin was most effective and suppressed lipid peroxidation in the bone marrow and spleen of γ -irradiated mice. These results suggest that flavonoids act as antioxidants *in vivo* and may be important for good human health.

Keywords: antimutagen, co-mutagen, DNA excision repair, antioxidative activity catechin, flavonoid, Trp-P-1

1. はじめに

1970年代以来、20年余の間にエームス法をはじめとする種々の変異原性試験法により、生活環境中より多種多様の化学物質や放射線などの変異原の存在が明らかにされた(下位, 1991)。そして、変異原性と癌原性との関連が注目されるようになり、カビ毒のアフラトキシン B₁や紫外線(UV)に関しては、発癌遺伝子上の突然変異について詳細に検討され、ヒトの癌との因果関係が示された。

環境変異原の多くは単独では、実質安全量を越えて存在することは、 Chernobyl原発事故のような非常事態あるいは抗癌剤などの投薬治療などを除きほとんどない。しかし、我々は微量ながら常にそれらに曝露されており、複合的に健康に影響を受けている。そこで、著者は、突然変異が関与する癌等の疾病的化学予防や環境変異原の複合作用を検討する目的で、大腸菌や哺乳動物個体(マウス)を用いて既知発癌物質や放射線(紫外線、 γ 線)によって誘発される突然変異や染色体異常を指標

として、突然変異修飾因子の検索を行い、さらに、それらの作用機序を遺伝学的、生化学的手法で検討した。その結果、抗変異原として、タンニン酸 (Shimoi *et al.*, 1985a), エピガロカテキンガレート (Shimoi *et al.*, 1986), ガロカテキン (Matsuo *et al.*, 1994), ビタミンB₆ (Shimoi *et al.*, 1992a), フラボノイド類 (Shimoi *et al.*, 1994b) を見いだし、突然変異増強因子として、メチルシナペート (Shimoi *et al.*, 1985b, 1989), 紫外線吸収剤 (下位ら, 1988), タバコタール、ヘテロサイクリックアミン類 (Shimoi *et al.*, 1992b) を見いだした。

本稿では、植物成分であるカテキン類、フラボノイド類の抗変異作用、加熱食品由来のヘテロサイクリックアミン類のひとつである 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) の突然変異増強作用およびそれらの作用機序について述べる。

2. 植物中の抗変異原とその作用機序

抗変異原には、変異原が細胞に作用する前に変異原を不活性化してしまうものと変異原が細胞に作用し、DNA損傷が生じた後、DNA修復・複製を通して突然変異が固定化される過程を修飾するものがある (Kada *et al.*, 1986; Kada and Shimoi, 1987; Ohta, 1993; 下位, 1991)。カテキン類は後者に、フラボノイド類は前者に含まれる。

(1) カテキン類

E. coli B/r WP2 株を UV 照射した後、種々のポリフェノール類を作用させ、トリプトファン要求性から非要求性への復帰変異に対する抑制効果を検討したところ、タンニン酸、没食子酸、緑茶の主成分であるエピガロカテキンガレート (EGCg) などに抑制作用が見られた。しかし、カフェイン酸、クロロゲン酸、ケルセチン、ケンフェロールなどには抑制作用が見られなかったことから、抑制作用の発現にはベンゼン環に連続して置換した 3 つの水酸基の存在が重要だと思われた。Fig. 1 にこれら植物成分の DNA 除去修復欠損株 (*E. coli* B/r WP2s *uvrA* お

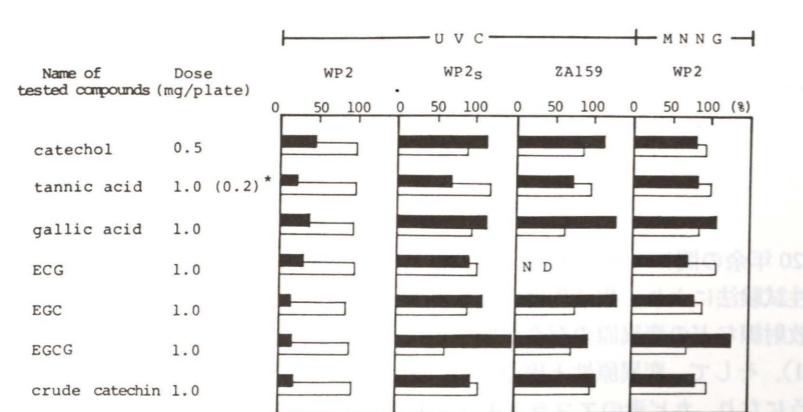


Fig. 1. Effects of plant components on UVC or MNNG-induced mutagenesis in *E. coli* WP2, WP2suvrA, ZA159uvrB. The cells were irradiated by UVC (WP2: 20.4 J/m², WP2s and ZA159: 1.5 J/m²) or treated with MNNG (40 μM, 30 min). Each value represents the mean of two independent experiments with duplicate plates. (a) This concentration was used for WP2s; ■, relative mutagenic activity %; □, survival %; ND, not determined.

よび ZA159 uvrB) における UV 誘発突然変異、メチル化剤である *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) 誘発突然変異に対する影響を示した。いずれに対しても抑制作用はほとんど見られず、従って、EGCg 等は DNA 除去修復を結果的に促進して DNA 損傷を減少させて突然変異を抑制するものと考えられた (Shimoi *et al.*, 1985a, 1986)。

(2) フラボノイド類

生体内で化学物質や放射線、酸化ストレスなどにより生成する活性酸素やフリーラジカルは、細胞の構成成分である DNA やタンパク質、脂質の過酸化を引き起こし、細胞障害、がんや心臓病などの種々の疾患、老化に関与することが明らかになってきている。放射線は生体内で標的分子に直接作用して安定ラジカルを、あるいはエネルギーが水分子に吸収されて間接的に ·OH 等のラジカルを生成して DNA や核内タンパクを損傷し染色体異常を誘発する。そこで、著者は、酸化的損傷因子として放射線 (γ線) を用い、マウスの抹消血中の幼若赤血球に誘発される小核に対する緑茶 (*Camellia sinensis*)、黒茶 (*Camellia assamica*)、南アフリカ産のハーブ茶 (*Aspalathus linearis*) の 3 種の茶葉熱湯抽出物の影響を検討したところ、緑茶とハーブ茶に抑制作用を見いだした (Shimoi *et al.*, 1994a)。ハーブ茶中の抑制成分を分離するため、熱湯抽出液をゲル濾過法により分画し、最終的に水画分、メタノール画分、フラボノイド画分、タンニン画分の 4 画分を得、これら 4 画分についてアクリジンオレンジ超生体染色法による小核試験、フェントン試薬 (Fe²⁺/H₂O₂) を用いる抗酸化試験を行った。小核試験においては、各画分をマウスに経口投与してから 6 時間後に γ 線を全身照射した。抗酸化性については、次式のフェントン反応 $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$ により生成する ·OH によりリノール酸メチルを酸化し、その過酸化度を TBA 法 (OD_{532 nm}) により測定し検討した。その結果、フラボノイド画分に最も強い抗酸化性と小核誘発抑制効果が見られたので、この画分をさらに HPLC

法を用いて活性成分を検索したところ、ルテオリンであることを明らかにした (Shimoi *et al.*, 1996)。ルテオリンはフラボンに属するフラボノイドで、セロリやリンゴなどの野菜や果物にも含まれている。ケルセチンなどと異なり、エームス試験において変異原性を示さない (Nagao *et al.*, 1981)。

次に、ルテオリンを含む 12 種類の既知のフラボノイドの抗酸化性と小核誘発抑制効果を比較検討したところ、両活性の間に正の相関 ($r=0.717, p<0.01$) を認めた (Fig. 2)。ルテオリンが最も強い活性を示したが、フラボノイド骨格の 3, 7, 3', 4' 位の水酸基がメチル化されたケルセチンテトラメチルエーテルや C 環が開環したフロレチンには抑制作用が見られなかった。従って、両活性の発現には、C 環とともに A 環と B 環に存在する水酸基が重要であることが示唆された (Shimoi *et al.*, 1994b)。

ところで、フラボノイドの非常に強力な抗酸化性については、*in vitro* 試験系を用いた多くの報告がある。その

作用機序としては、1) フリーラジカルの捕捉作用、2) 金属イオンとのキレート作用、3) 脂質過酸化連鎖反応の停止作用などが考えられている。しかし、フラボノイドの生体内抗酸化性に関する報告は少ない。そこで、γ 線照射 2 時間前にルテオリンをマウスに経口投与し、照射 24, 48 時間後に骨髓と脾臓を摘出し、両臓器中の過酸化度をルミノール・チトクローム C 増感法を用いる化学発光法により調べた。その結果、Fig. 3 に示すように両臓器において過酸化度は時間の経過とともに増加したが、ルテオリンの前投与により有意に抑制されることがわかった (Shimoi *et al.*, 1996; 下位、木苗, 1995a, b)。

アスコルビン酸や α-トコフェロールなどの抗酸化物質の γ 線誘発小核に対する抑制効果について報告されているが、投与量からするとルテオリンが最も効果があると思われる (下位、木苗, 1995a)。ルテオリンの生体内抗酸化作用の機序としては、·OH の消去作用、生体内でのフリーラジカル生成に関与する金属イオンのキレート作

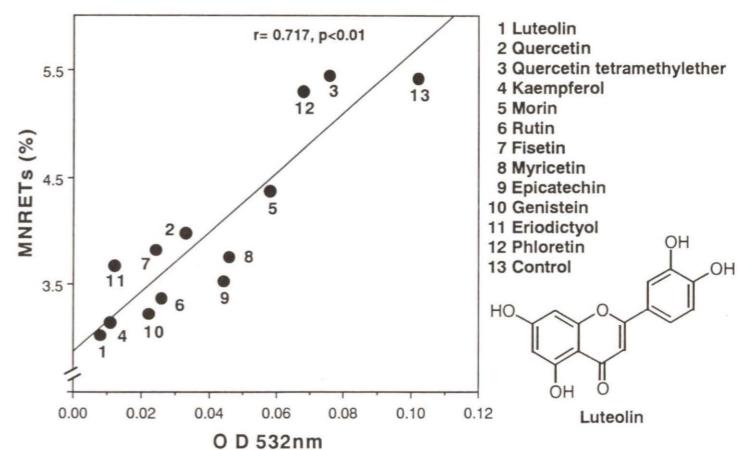


Fig. 2. Relationship between antioxidative activity (OD_{532 nm}) and anticalastogenic activity (MNRETs, %) of flavonoids. The dose of flavonoids used for determination of antioxidative and anticalastogenic activities was 0.2 μmol/ml and 5 μmol/kg, respectively. A simple linear regression analysis was performed on all data. Closed circle represents mean value of each group. Quercetin(OMe)₄: quercetin-3,4',7'-tetramethylether.

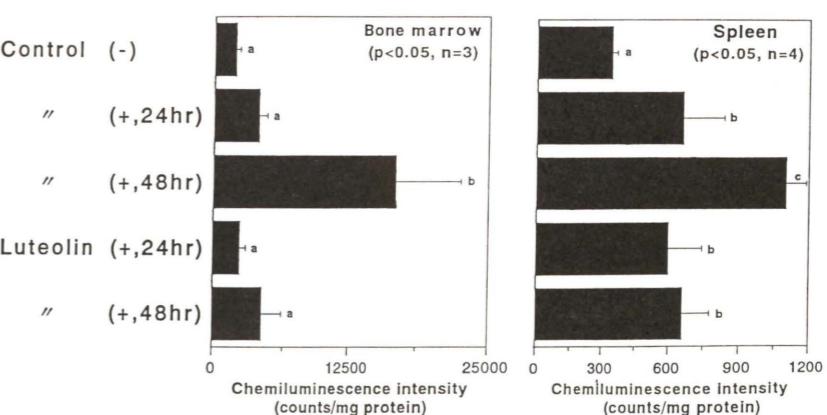


Fig. 3. Effect of luteolin on lipid peroxidation in bone marrow and spleen of γ-ray irradiated mice. Mice received a single gastric intubation of luteolin (10 μmol/kg) 2 hr before γ-ray irradiation (6Gy). 24 and 48 hr after γ-ray irradiation, the bone marrow and spleen were removed and homogenized. Luminol and cytochrome C were added to the mixture and chemiluminescence intensity was automatically measured. Values (mean ± SD) with different letters are significantly different. (-): unirradiated, (+): irradiated.

用による不活性化、酸化ストレスに対する防御機構の誘導などが考えられるが、現時点では明らかではなく今後の詳細な検討が必要である。

3. ヘテロサイクリックアミン類の突然変異増強作用とその機序

E. coli B/r WP2 株に UV 照射した後、タバコタール抽出物を作用させたところ、突然変異増強作用が認められ、活性成分としてノルハルマンを見いだした。そこで、ノルハルマンと化学構造が類似しているヘテロサイクリックアミン類に注目して増強作用を検討した。その結果、代謝活性化酵素非存在下で、それら自身が突然変異を誘発しない濃度において、10 種のヘテロサイクリックアミン類のうち 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]-pyridine (PhIP) を除く 9 種のヘテロサイクリックアミンに増強作用を認めた。それ故、最も強い増強作用を示した Trp-P-1 と増強作用を示さなかった PhIP をモデル化合物として用いて作用機序を検討したが、この研究については、第 23 回大会パネルディスカッション「環境変異原の複合作用とその評価」の特別企画として、環境変異原研究 Vol. 17 (下位ら, 1995c) で述べさせて頂いたので、それを参考して頂けたら幸甚である。

本稿では、大腸菌における研究結果の概略と DNA 除去修復酵素のひとつである T4 エンドヌクレアーゼ V を用いた研究結果を中心に述べる。

(1) 大腸菌における Trp-P-1 の突然変異増強作用とその機序

Trp-P-1 は UV や 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) など DNA 除去修復の対象となる DNA 損傷を生じる変異原によって誘発される突然変異に対しては増強作用を示したが、メチル化剤の MNNG や γ 線によって誘発される突然変異に対して増強作用を示さず、DNA 除去修復欠損株では突然変異増強作用も致死増感も示さなかった。さらに、アルカリショ糖密度勾配遠心法により、DNA 除去修復酵素による DNA の単鎖切断を Trp-P-1 が阻害することがわかった (Shimoi *et al.*, 1992b)。そこで、UV 損傷のシクロブタジマーおよび (6-4) ダイマーに特異的なモノクローナル抗体を用いて ELISA により UV 照射後の DNA 修復動態を量論的に検討したところ、Trp-P-1 は濃度依存的に両損傷の除去を阻害したが、PhIP は同濃度において全く阻害作用を示さなかった (Mori *et al.*, 1993)。

以上の結果から Trp-P-1 が DNA 除去修復を阻害することが明らかとなった。

(2) Trp-P-1 の T4 エンドヌクレアーゼ V に対する影響

T4 エンドヌクレアーゼ V は T4 ファージの denV 遺伝子がコードする DNA 修復酵素で、ピリミジンダイマーの 5' 側ピリミジンとデオキシリボースの間を切断する glycosylase 活性とその結果生じた AP 部位の 3' 側

に 1 本鎖切断を入れる APlyase 活性と二段階の複合活性を有している。

酵素活性に対する Trp-P-1 の影響を pBR322DNA を用いてアガロースゲル電気泳動法により検討したところ、Fig. 4 に示したように、Trp-P-1 は T4 エンドヌクレアーゼ V による DNA 1 本鎖切断を阻害したが、同濃度において PhIP には阻害作用が認められなかった。

次に T:A のくりかえし配列を有する T8-3 EcoRI/HindIII DNA fragment を用いてゲルシフト法により、T4 エンドヌクレアーゼ V の UV 損傷 DNA への認識・結合に対する Trp-P-1 の影響を調べたところ、20 μ g/ml までは結合阻害が見られたが、それ以上の濃度では逆に再結合が見られた。この結果より Trp-P-1 が DNA の立体構造を変化させている可能性が示唆されたので、Trp-P-1 と DNA との相互作用についてトポイソメラ

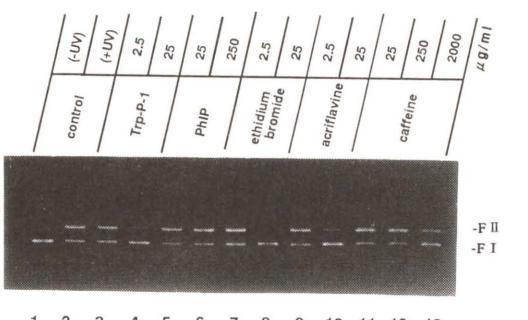


Fig. 4. Effects of Trp-P-1, PhIP and known intercalators on the DNA strand scission by T4 endonuclease V. Non-irradiated and UV-irradiated pBR322 plasmid DNA (40 μ g/ml) were treated with the sample at the indicated concentrations at 37°C for 10 min, and incubated with T4 endonuclease V for 10 min. After phenol extraction, the reacted DNA was analyzed by 0.7% agarose gel electrophoresis. FI: relaxed (open circular) DNA, FII: supercoiled (covalently closed circular) DNA.

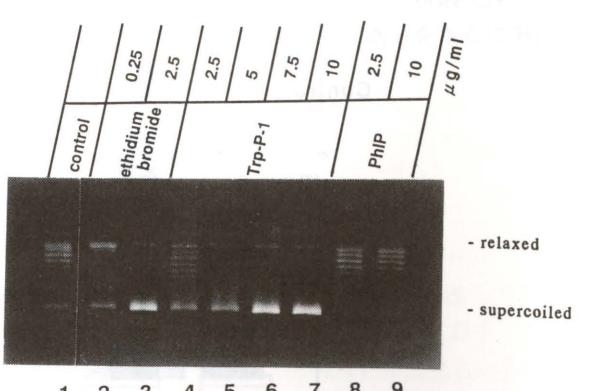


Fig. 5. DNA unwinding by Trp-P-1, PhIP and ethidium bromide with topoisomerase I. Supercoiled pBR322 plasmid DNA was incubated with a calf thymus DNA topoisomerase I and reacted with the samples at 37°C for 15 min. Reactions were stopped and DNA samples were extracted with neutralized phenol and analyzed by 1% agarose gel electrophoresis in TBE buffer.

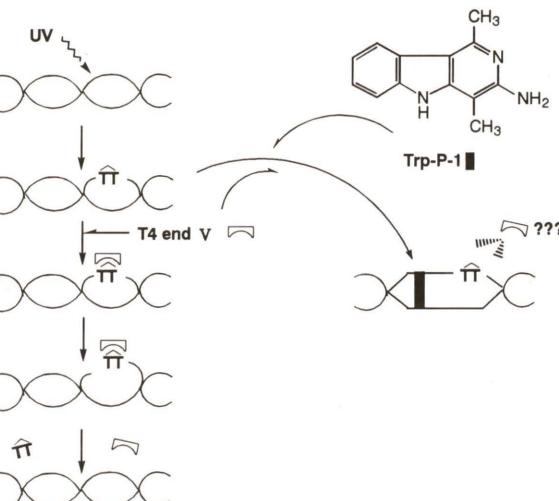


Fig. 6. The action mechanism of Trp-P-1 on DNA excision repair by T4 endonuclease V.

ゼ I および pBR322DNA を用いて DNA 卷き戻し試験を行ったところ、濃度依存的な DNA 卷き戻しが見られた (Fig. 5)。従って、Trp-P-1 が DNA にインタークレートする可能性が示唆されたが、この実験を行っていた頃、CD スペクトルの解析により Trp-P-1 が DNA にインタークレートすることが報告された (Inohara *et al.*, 1993)。

一方、既知のインタークレーターである ethidium bromide や acriflavine も Trp-P-1 と同様、T4 エンドヌクレアーゼ V の酵素活性を阻害すること (Fig. 4)、DNA の巻き戻しが見られなかった PhIP には阻害作用が見られないことがわかった。それ故、以上の結果から、Trp-P-1 が DNA にインタークレートして DNA の立体構造を変化させ、T4 エンドヌクレアーゼ V の UV 損傷 DNA への認識・結合を阻害するものと考えられた (Fig. 6)。

ところで、大腸菌の DNA 除去修復酵素である UvrABC エンドヌクレアーゼの作用様式は、T4 エンドヌクレアーゼ V のそれとは異なるが、シクロブタジマーを認識するのは同じである。UvrABC エンドヌクレアーゼを用いた *in vitro* 試験系でエチジウムプロマイドなどの種々のインタークレーターが UvrA と相互作用して、incision の過程を阻害することが報告されている。これらの結果から、大腸菌において、Trp-P-1 は損傷 DNA にインタークレートすることにより DNA の立体構造を変化させ、修復酵素の損傷 DNA への認識・結合に影響を与える、incision の過程を阻害するのではないかと考えられた。そして、修復されずに残った DNA 損傷が原因となって突然変異が増強されるものと推察した (下位、木苗, 1993; Shimoi *et al.*, in press)。

4. おわりに

研究を進める中、突然変異の抑制、増強と相反する修飾因子を見いだしたが、タンニン酸やカテキン類、

Trp-P-1 などのヘテロサイクリックアミン類いずれも DNA 除去修復を結果的に促進あるいは阻害することが明らかとなった。これら修飾因子の哺乳動物細胞における作用については、佐々木らにより、染色体異常や姉妹染色分体交換を指標として詳細に検討され、同様な機序が推定されている (Sasaki *et al.*, 1989, 1992)。

昨年、麻布大学の黒田行昭教授により「抗変異原・抗発がん物質とその検索法」が出版された。著者も分担執筆させていただいたが、この十数年の間に多くの抗変異原が検出されてきた。また、最近、植物成分によるがんの化学予防について非常に関心が高まっている。著者は野菜、果物、茶などに含まれるフラボノイド類の抗変異原作用を抗酸化性の観点からアプローチした。しかし、フラボノイドは変異原性も発がん抑制作用も報告されており、安全性について議論されてきた化合物である。また、*in vitro* 試験系を用いた非常に多くの抗酸化性に関する報告があるものの、生体内抗酸化性に関する報告はまだ少ない。それ故、今後、著者は食品栄養科学の立場からフラボノイドの摂取量や吸収・代謝を含めた研究を進め、フリーラジカル防御因子として従来注目してきた α -トコフェロールやアスコルビン酸などと同様に、フラボノイドが、生体内で抗酸化的な役割を果たしているのか否か、ヒトにおける評価を注意深く検討していきたいと思っている。

地球的規模の環境汚染と人口増加に伴う食糧問題をかかえた高齢化社会を迎える我々にとって、がんをはじめ種々の成人病を予防し、健やかに老いることは非常に重要である。それ故、そのためにはできる限り、がん原性変異原を排除し、生体のもつ防御機能を高めてゆくことが大切であると思う。抗変異原や突然変異増強因子に関する研究がその一助となることを願っている。

謝 詞

本研究は下記の多くの方々のご協力により成し得たものです。静岡県立大学食品栄養科学部の木苗直秀教授、古郡三千代博士、食品衛生学研究室在校生、および卒業生、国立がんセンター研究所生化学部長の若林敬二博士、奈良県立医科大学の森 俊雄助教授、国立八戸工業高等専門学校の佐々木 有助教授、北海道大学薬学部の大塚栄子教授、京都大学放射線生物研究センターの藤堂剛博士、静岡県立大学薬学部の富田 勲教授、中村好志助教授、佐野満昭講師に深く感謝いたします。また、貴重な御助言と激励をいただきました日本大学農獣医学部の井上 正助教授、東京薬科大学生命科学部の太田敏博助教授、名古屋大学農学部の大澤俊彦教授、名古屋市立大学薬学部の高橋和彦講師に深く感謝いたします。そして、最後に、環境変異原研究の礎を授けてくださいました故賀田恒夫教授 (国立遺伝学研究所) に感謝の意を捧げます。

参考文献

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

Kada, T., T. Inoue, T. Ohta and Y. Shirasu (1986) Antimutagens and their modes of action. In: Shankel, D. M., P. E. Hartman, T. Kada and A. Hollaender (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, Prenum Press, New York, pp. 181–198.

Kada, T. and K. Shimoi (1987) Desmutagens and bio-antimutagens-their modes of action, *BioEssays*, **7**, 113–116.

Matsuo, T., N. Hanamure, K. Shimoi, Y. Nakamura and I. Tomita (1994) Identification of (+)-gallicatechin as a bio-antimutagenic compound in *Psidium guava* leaves, *Phytochemistry*, **36**, 1027–1029.

Mori, T., K. Shimoi, Y. F. Sasaki, K. Wakabayashi, M. Nagao and N. Kinae (1993) 3-Amino-1,4-dimethyl-5-H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) inhibits the removal of both cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts from the DNA of ultraviolet-irradiated *E. coli*, *Carcinogenesis*, **14**, 1475–1478.

Nagao, M., N. Morita, T. Yahagi, M. Shimizu, M. Kuroyanagi, M. Fukuoka, K. Yoshihira, S. Natori, T. Fujino and T. Sugimura (1981) Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds, *Environ. Mutagen.*, **3**, 401–419.

Ohta, T. (1993) Modification of genotoxicity by naturally occurring flavorings and their derivatives, *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**, 127–146.

Sasaki, Y. F., H. Imanishi, T. Ohta, M. Watanabe, K. Matsumoto and Y. Shirasu (1988) Supressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2423–2428.

Sasaki, Y. F., H. Yamada, K. Shimoi, N. Kinae, I. Tomita, H. Mtsumura, T. Ohta and Y. Shirasu (1992) Enhancing effects of heterocyclic amines and β -carbolines on the induction of chromosome aberrations in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.*, **269**, 79–95.

Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita and T. Kada (1985a) Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r, *Mutat. Res.*, **149**, 17–23.

Shimoi, K., Y. Nakamura, T. Noro, I. Tomita, S. Fukushima, T. Inoue and T. Kada (1985b) Methyl cinnamate derivatives enhance UV-induced mutagenesis due to the inhibition of DNA excision repair in *Escherichia coli* B/r, *Mutat. Res.*, **146**, 15–22.

Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara and T. Kada (1986) The pyrogallol related compounds reduce UV-induced muta-

tions in *Escherichia coli* B/r WP2, *Mutat. Res.*, **173**, 239–244.

下位香代子, 中村好志, 富田 熊 (1988) *E. coli* B/r 株における紫外線吸収剤の UV 誘発突然変異に対する影響, *衛生化学*, **34**, 21–24.

Shimoi, K., Y. Nakamura, T. Noro, T. F. Sasaki, H. Imanishi, K. Matsumoto, Y. Shirasu and I. Tomita (1989) Enhancing effects of cinoxate and methyl sinapate on the frequencies of sisterchromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.*, **212**, 213–221.

下位香代子, 富田 熊 (1991) 生活環境中の変異原及び抗変異原, *衛生化学*, **37**, 149–178.

Shimoi, K., E. Akaiawa, N. Mori, M. Sano, Y. Nakamura and I. Tomita (1992a) Bio-antimutagenic activities of vitamin B₆ in *E. coli* and mouse peripheral blood cells, *Mutat. Res.*, **266**, 205–213.

Shimoi, K., H. Kawabata and I. Tomita (1992b) Enhancing effect of heterocyclic amines and β -carbolines on UV or chemically induced mutagenesis in *E. coli*, *Mutat. Res.*, **268**, 287–295.

下位香代子, 木苗直秀 (1993) 生活環境中の DNA 除去修復阻害因子, *放射線生物学研究*, **28**, 60–79.

Shimoi, K., Y. Hokabe, Y. F. Sasaki, H. Yamada, K. Kator and N. Kinae (1994a) Inhibitory effect of Rooibos tea (Aspalathus linearis) on the induction of chromosome aberrations *in vivo* and *in vitro*. In: Ho, C-T., Osawa, T., Huang, M-T. and Rosen, R. T. (Eds.), *ACS Symposium series 547, Food Phytochemicals for Cancer Prevention II Teas, Spices, and Herbs*, American Chemical Society, Washington DC, pp. 105–113.

Shimoi, K., S. Masuda, M. Furugori, S. Esaki and N. Kinae (1994b) Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in γ -ray irradiated mice, *Carcinogenesis*, **15**, 2669–2672.

下位香代子, 木苗直秀 (1995a) ルテオリン (ルイボス茶) の遺伝子障害抑制効果, がん予防食品の開発 (大澤俊彦編), シーエムシー出版, 東京, pp. 250–259.

下位香代子 (1995b) 野菜・果物の抗変異原物質: 抗変異原・抗発がん物質とその検索法 (黒田行昭編), 講談社サイエンティフィク, 東京, pp. 82–93.

下位香代子, 宮村理恵子, 加藤智子, 木苗直秀 (1995c) 細菌および培養細胞におけるヘテロサイクリックアミン類の変異原性増強効果とその作用機序, *環境変異原研究*, **17**, 57–64.

Shimoi, K., S. Masuda, S. Bingrong, M. Furugori and N. Kinae (1996) Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice, *Mutat. Res.*, **350**, 153–161.

Shimoi, K., R. Miyamura, T. Mori, T. Todo, E. Ohtsuka, K. Wakabayashi and N. Kinae (in press) 3-Amino-1,4-dimethyl-5-H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) inhibits the binding activity of T4 endonuclease V to UV-damaged DNA, *Carcinogenesis*.

Environ. Mutagen Res., **18**: 21–27 (1996)

河川の変異原性とその原因物質の検索について

Monitoring and identification of Ames mutagenic compounds in river water

佐々木裕子, 木瀬晴美, 菊地幹夫

Yuko Sasaki, Harumi Kise and Mikio Kikuchi

東京都環境科学研究所 基盤研究部 136 東京都江東区新砂 1-7-5

The Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection, 1-7-5, Sinsuna, Koto-ku, Tokyo 136, Japan

(受付: 1996年2月27日; 受理: 1996年4月4日)

Summary

Samples of river water were collected between May and August 1995 from eight different locations on four rivers and one tributary in Tokyo. Organic extracts were tested with the Ames *Salmonella*/microsome assay. More than half of the samples of river water showed frameshift mutagenicity. Individual pesticides were also evaluated for mutagenicity and their concentrations in river water were measured by GC/MS analysis. Pesticides positive in these tests were shown to be base-pair substitution mutagens. Furthermore, no correlation was observed between the mutagenic potency of river water and 36 kinds of pesticide concentrations. These findings indicate that the mutagenicity of river water is independent of the pesticides tested. The samples collected from the downstream Tama River showed higher, constant, indirect-acting mutagenicity with YG1024, suggesting the possible presence of aromatic amines. The downstream sample collected by using blue rayon, which adsorbed aromatic hydrocarbons efficiently, was analyzed using HPLC. Trp-P-1 and Trp-P-2, which are typical heterocyclic amines, were detected. It seems that Trp-P-1 and Trp-P-2 play some role in the mutagenicity of river water.

Keywords: river water, Ames assay, pesticide, domestic waste water, heterocyclic amines

1. はじめに

われわれを取りまく水環境中に多種多様な有害化学物質の存在が明らかとなり、人の健康への影響が大きな問題となっている。しかし、河川水等に含まれる微量かつ多種類の化学物質の複合的な影響を、個々の化学物質についての分析値や毒性試験結果から明らかにしていくことは限界がある。そのため、河川水などの多成分試料について総括的に検討できる Ames 試験, umu 試験, rec-assay などの変異原性試験が、水の安全性の評価方法として広く試みられてきた。

近年特に、水中の極微量な化学物質の影響把握にも有効な高感受性菌株の研究開発 (Watanabe *et al.*, 1990; Oda *et al.*, 1993) が進む一方、水中変異原物質を選択的に吸着する捕集剤が開発されてきている (Hayatsu *et al.*, 1983; 浦野ら, 1994)。その結果、水の安全性評価法としての変異原性試験は感度、精度、更に効率性も高いものとなり、各地の河川水の変異原性が明らかにされつつあ

る (Sakamoto *et al.*, 1990; Sayato *et al.*, 1990; 内海ら, 1990; Hashizume *et al.*, 1992; 松井ら, 1993; Kusamran *et al.*, 1994; Filipic, 1995)。しかし、今まで河川水の変異原性を十分説明しうる原因物質の同定は進んでいない。

著者らは、東京地域を流れる5つの河川について、Ames 試験による変異原性評価を行うとともに、原因物質の検索を試みた。河川水からは多種多様な化学物質の検出が報告されているが、今回は検出状況や健康影響に関する知見から近年環境基準・要監視項目に追加された農薬と、変異原性の検出菌株の特異性や河川の状況などから存在が推定された芳香族アミンについて検討を行った。

このうち農薬は、河川水の分析値や個々の農薬の変異原性から、河川の変異原性への寄与は殆ど認められなかつた。一方、芳香族アミンでは加熱食品中の変異原物質 (Sugimura, 1986; Wakabayashi *et al.*, 1992) として知られ、人のし尿 (Hayatsu *et al.*, 1985; Wakabayashi *et al.*,

1993) などから検出されているヘテロサイクリックアミンの Trp-P-1, Trp-P-2 が河川水から検出され、河川の変異原性にこれら物質が関与している可能性が示唆されたので報告する。

2. 調査方法

2.1 河川水の採取と調製

東京都内の中川、江戸川、成木川の各 1 地点、多摩川 4 地点とその支川である秋川 1 地点の合計 5 河川 8 地点において、1995 年 5 月から 8 月まで 2 週間ごとに 8 回採水を行った (Fig. 1)。変異原性試験用には、31 の河川水をガラス纖維ろ紙 (1 μm GF/D, Whatman 製) でろ過後、固相抽出を行った。固相カラムには飲料水・環境水等の抽出法 (上水試験法, 1993; 環境水質分析法マニュアル, 1993) で用いられるもののひとつで、C18 に比べ比較的極性の高い物質まで吸着するスチレンジビニルベンゼン共重合体の Sep pak Plus PS-2 (Waters 製) を用いた。河川水をあらかじめ活性化した PS-2 に 1 カートリッジ当たり 0.5 l づつ計 3 l, 流速 15 ml/min で加圧式に通水した。通水後、PS-2 を N_2 ガスで乾燥した後、ジクロロメタンで溶出し、更に DMSO に転溶し、ろ過滅菌 (0.22 μm , ミリポア製) して検体とした。

環境基準項目、要監視項目および水質評価指針対象である農薬 36 種 (Table 1) の分析用には、河川水 200 ml をあらかじめ活性化したエムポアディスク (住友スリーエム製) を用いて固相抽出し、ジクロロメタンで溶出した。抽出液は NaSO_4 カラムで脱水後、 N_2 ガスで定容にし検体とした。

Trp-P-1, Trp-P-2 分析用には、多摩川調布取水堰において、Sakamoto ら (1990) の方法に準じ、三環以上の多環芳香族炭化水素を選択的に捕集するブルーレーション (フナコシ製) 50 g を 24 時間河川水中に懸垂した。ブルーレーションを回収後、超純水で洗浄し、水分を除去後、メタノール/アンモニア (50:1, v/v) で 2 回振とう抽出を行った。抽出液はロータリーエバボレーターで減圧下で濃縮し、更に N_2 ガスで 1 ml まで溶媒を留去した。得られた粗抽出物を、benzo(a)pyrene, 2-aminofluorene など

との分離のため安部ら (1995) の方法に従い、Sep pak Plus Silica (Waters 製) を用いて 5 分画に分け、酢酸エチル/メタノール (1:1, v/v) 画分を検体とした。なお、溶媒には残留農薬試験用試薬 (和光純薬工業製) を用い、その他は特級試薬を用いた。

2.2 変異原性試験

試験菌株は Ames らの *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 株および国立衛生試験所能美博士らから分与された TA100 および TA98 株の高感受性派生株 YG1021, YG1024, YG1026, YG1029 の 4 菌株を用いた。フレームシフト型の変異原性の検出の報告の多い河川水に対しては、TA98 株と YG1024 株を用いて試験を実施した。なお、高い変異原性を示した河川水検体の一部は他の 4 菌株の試験を加え、塩基置換型の変異原物質の存在の有無も検討した。農薬標準品、農薬代謝分解物 (和光純薬工業又はジーエルサイエンス製) は、フレームシフト、塩基置換の両タイプの変異原性の有無を明らかにするため上記 6 菌株全てを用い、試験を実施した。変異原性は試料 0.1 ml, ラット肝 S9mix (phenobarbital+5,6-naphthoflavone 誘導、キッコーマン製) または 0.1 M りん酸緩衝液 0.5 ml, 試験菌液 0.1 ml を混合し、37°C で 20 分間振とう培養後、最小培地上にまき、48 時間培養して測定した。変異原性の有無は、復帰変異コロニー数が自然復帰変異コロニー数の 2 倍以上であり dose-response がある場合を陽性とし、河川水 1 当たり、農薬標準品 mg 当たりの誘発変異コロニー数を算出した。

2.3 農薬の GC/MS 分析

ガスクロマトグラフ質量分析器 (島津製 QP-5000) を用い、選択イオン検出法で 0.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ を検出限界として、下記条件で 36 農薬の一斉分析を行った。

カラム: DB-5 (J&W 製) 30 m \times 0.25 mm \times 0.1 μm
昇温条件: 50°C (2 min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 100°C (0 min) \rightarrow 10°C/min \rightarrow 170°C (0 min) \rightarrow 5°C/min \rightarrow 245°C
注入口温度: 250°C
注入法: スプリットレス
インターフェース温度: 250°C
キャリアーガス: He ガス



Fig. 1. Map of study area (Tokyo).

2.4 ヘテロサイクリックアミンの HPLC 分析

河川水のブルーレーション抽出物の酢酸エチル/メタノール画分についてヘテロサイクリックアミンのうち Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, CAS No. 75104-43-7), Trp-P-2 (3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole, CAS No. 72254-58-1) を、下記 2 条件で分析し、標準品 (和光純薬工業製) で確認を行った。なお、移動相には HPLC 用溶媒 (関東化学製) を用いた。

・条件 1

高速液体クロマトグラフ (HLC-803D, 東ソー製)
蛍光検出器 (F1000, 日立製)
励起波長 266 nm, 蛍光波長 397 nm, 流速 1 ml/min
カラム: ODS 4.6 \times 150 mm (Waters 製)
カラム温度 35°C
移動相 12% $\text{CH}_3\text{CN}/25\text{ mM H}_3\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 2)

・条件 2

高速液体クロマトグラフ (Waters 600)
蛍光検出器 (Waters 470) 流速 1 ml/min
励起波長 266 nm, 蛍光波長 397 nm カラム温度 40°C
カラム: ODS 4.6 \times 250 mm (TSK-GEL, 東ソー製)
移動相 20% $\text{CH}_3\text{CN}/20\text{ mM H}_3\text{PO}_4$ (pH 2)

3. 結 果

3.1 河川水の変異原性

Fig. 2(a)–(d) に都内 8 地点の河川水について、1995 年 5 月 11 日から 8 月 17 日までの TA98, YG1024 \pm S9 の各変異原性を示した。

3.1.1 各河川の変異原性とその変動

多摩川では、上流部の羽村取水堰と支川の秋川では変異原性が見られなかった。中流の拝島原水補給点では 8 回中 3 回 YG1024 \pm S9 で弱い変異原性が見られた。更に下った砧下取水点、調布取水堰の 2 地点の場合は測定期間を通じて YG1024 \pm S9 で変異原性が検出され、YG1024 \pm S9 や TA98 の \pm S9 でも数回変異原性が検出された。しかし、この 2 地点では各測定期点ごとの変異原活性に大きな違いは認められなかった。

中川、江戸川、成木川の 3 河川の場合 TA98 株では全検体不検出であり、YG1024 株の \pm S9 では 8 回中 3~7 回、 \pm S9 では江戸川で 1 回変異原性が検出された。しかし、その変異原活性は多摩川下流 2 地点に比較すると低かった。

測定期間中変異原活性は多摩川下流 2 地点の場合は YG1024 \pm S9 で約 4 倍の変動が見られた。中川、江戸川、成木川、多摩川拝島原水補給点の場合は変異原性の検出は断続的であった。

3.1.2 河川水の変異原性の特性

河川水中には検討した 5 河川中 4 河川からフレームシフト型の変異原物質の存在が認められた。また、その変異原性はいずれも YG1024 株で S9mix 添加時に特に高

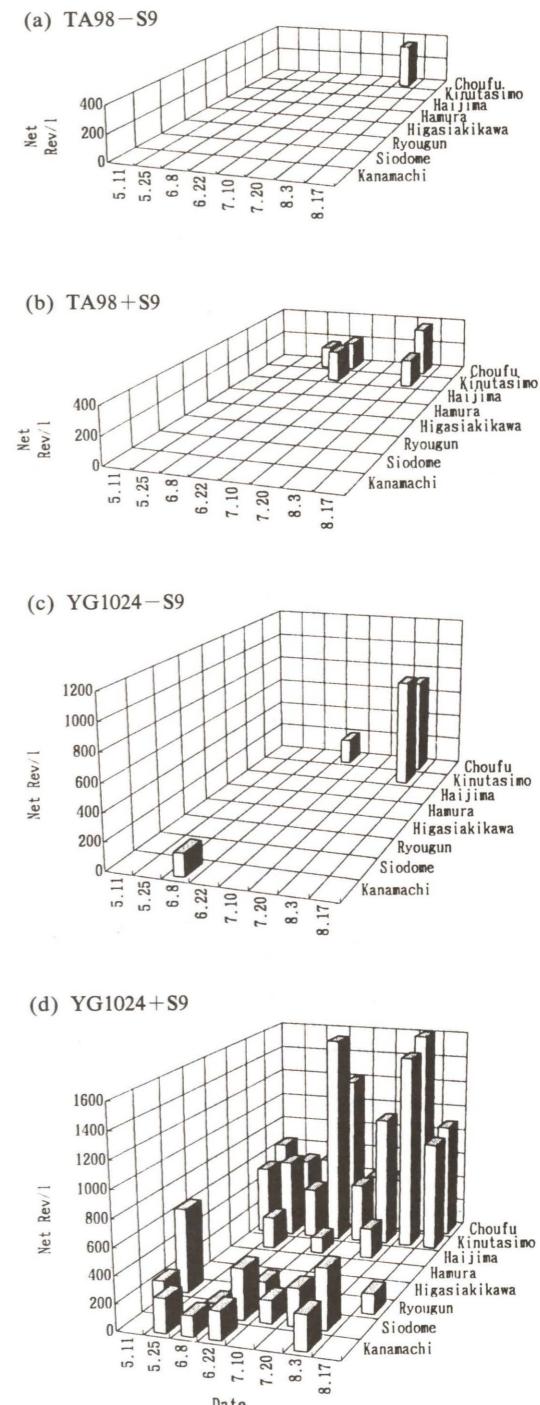


Fig. 2. Mutagenicity of river water in *S. typhimurium* TA98 and YG1024 with and without S9mix.

い検出回数、変異原活性が見られた。

ただし、8 月 3 日の多摩川の結果からは、S9mix 無添加の場合も YG1024 株で砧下取水点、調布取水堰が各々 810 rev/l, 720 rev/l, TA98 株で調布取水堰が 340 rev/l という変異原性が認められた。すなわち、フレームシフト型ではあるが調査期間を通じて検出された変異原物質と異なる直接変異原物質の流入が明らかとなった。

なお、一部検体 (砧下取水点、調布取水堰) について実施した他の 4 菌株での試験のうち YG1021 株の結果

は、TA98 株に比べ変異原活性の上昇は認められなかった。塩基置換型変異原検出株 TA100, YG1026, YG1029 の結果では、いずれも変異原性は不検出であった。

3.2 河川水から検出された農薬とその変異原性

河川水について変異原性試験を行うと同時に、36 種の農薬を分析し、 $0.1 \mu\text{g/l}$ 以上の濃度が検出された 19 種の

農薬についてその検出状況を Table 1 に示した。上流部に広い農耕地を有する中川が検出回数、検出濃度から最も農薬汚染が著しく、江戸川がこれに続き、多摩川の検出数は少なかった。Table 2 に環境基準や、要監視項目等に設定されている農薬の 6 菌株±S9 での変異原性を示した。また、農薬には代謝分解によって変異原性が増強

Table 1. Concentration of the pesticides in river water.

	Tama river		Naka river		Edo river		Naruki river	
	Kinutasimo	Chofuseki	Siodome	Kanamachi	Ryogun			
Isoprothiolane	~0.0001 (1/8)		(0/8)	~0.0010 (7/8)	~0.0002 (2/8)		(0/8)	
Iprobenfos	~0.0002 (1/8)		~0.0002 (1/8)	~0.0125 (7/8)	~0.0005 (2/8)		~0.0040 (1/8)	
Eprocarb	(0/8)		(0/8)	~0.0004 (3/8)	(0/8)		(0/8)	
NAC	(0/8)		(0/8)	(0/8)	~0.0001 (1/8)		(0/8)	
Dichlorvos	~0.0001 (3/8)		~0.0001 (3/8)	~0.0001 (1/8)	(0/8)		~0.0003 (1/8)	
Simazine	~0.0002 (2/8)		~0.0001 (1/8)	~0.0004 (2/8)	~0.0001 (3/8)		(0/8)	
Simetryne	(0/8)		(0/8)	~0.0013 (7/8)	(0/8)		(0/8)	
Diazinon	~0.0002 (1/8)		~0.0002 (1/8)	~0.0006 (5/8)	~0.0003 (2/8)		~0.0003 (1/8)	
Benthiocarb	~0.0001 (1/8)		~0.0001 (1/8)	~0.0017 (6/8)	~0.0001 (2/8)		(0/8)	
Pyridaphenthion	(0/8)		(0/8)	~0.0201 (2/8)	(0/8)		(0/8)	
Fthalide	(0/8)		(0/8)	~0.0001 (1/8)	(0/8)		(0/8)	
Buprofezin	(0/8)		(0/8)	~0.0001 (2/8)	(0/8)		(0/8)	
Pretilachlor	(0/8)		(0/8)	~0.0005 (5/8)	~0.0001 (1/8)		(0/8)	
Bromobutide	(0/8)		(0/8)	~0.0012 (6/8)	~0.0003 (2/8)		(0/8)	
Flutolanil	(0/8)		(0/8)	~0.0005 (3/8)	~0.0001 (2/8)		~0.0008 (3/8)	
Fenitrothion	~0.0002 (3/8)		~0.0004 (4/8)	~0.0005 (2/8)	(0/8)		(0/8)	
Fenobucarb	(0/8)		(0/8)	~0.0090 (6/8)	~0.0004 (5/8)		(0/8)	
Mefenacet	~0.0002 (1/8)		~0.0002 (1/8)	~0.0220 (7/8)	~0.0033 (4/8)		(0/8)	
Molinate	~0.0001 (1/8)		(0/8)	~0.0022 (6/8)	(0/8)		(0/8)	

* Blank: not detected, not detected~maximum concentration (detected sample/total sample).

** Detected pesticides CAS No.: Isoprothiolane (50512-35-1), Iprobenfos (26087-47-8), Eprocarb (85785-20-2), NAC (63-25-2), Dichlorvos (62-73-7), Simazine (122-34-9), Simetryne (1014-70-6), Diazinon (333-41-5), Benthiocarb (28249-77-6), Pyridaphenthion (119-12-0), Fthalide (27355-22-2), Buprofezin (69327-76-0), Pretilachlor (51218-49-6), Bromobutide (74712-19-9), Flutolanil (66332-96-5), Fenitrothion (122-14-5), Fenobucarb (3766-81-2), Mefenacet (73250-68-7), Molinate (2212-67-1).

*** Isoxathion (18854-01-8), EPN (2104-64-5), Iprodione (36734-19-7), EDDP (17109-49-8), Butamifos (36335-67-8), Chloropyrifos (2921-88-2), TPN (1897-45-6), CNP (1836-77-7), Tolclofos-methyl (57018-04-9), ECP (97-17-6), Tricyclazole (41814-78-2), Propyzamid (23950-58-5), Probenazole (27605-76-1), Pendimethalin (40487-42-1), Malathion (121-75-5) and Mepronil (55814-41-0) were not detected.

**** No pesticide was detected in Hamura, Hajiima in Tama river and Higasiakikawa in Akikawa river.

Table 2. Mutagenicity of the pesticides in *S. typhimurium*. (net revertants/mg)

	TA98		YG1021		YG1024		TA100		YG1026		YG1029	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Isoxathion	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Isoprothiolane	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EPN	—	—	—	—	—	—	—	—	700	—	1380	—
Iprobenfos	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Oxine-copper	—	—	—	—	—	—	4300	—	13900	—	13000	—
Captan	12000	200	11000	1400	18000	1300	72000	1400	49500	2700	63000	3400
Chlorothalonil	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CNP	—	—	—	—	—	—	1400	—	870	2300	2100	14000
Dichlorvos	—	—	—	—	—	—	82	78	—	—	—	—
Simazine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Diazinon	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Benthiocarb	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Thiuram	—	—	—	—	—	—	510	800	1100	—	1500	—
Bromobutide	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fenitrothion	—	—	—	—	—	140	460	170	340	450	610	—
Propyzamid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fenobucarb	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Table 3. Mutagenicity of the metabolites of the pesticides in *S. typhimurium*. (net revertants/mg)

	TA98		YG1021		YG1024		TA100		YG1026		YG1029	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
Benthiocarb sulfone	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bromobutide desbromide	—	—	—	—	—	—	—	—	440	430	530	490
Fenitrothion-oxon	—	—	—	—	—	—	—	—	45	43	50	46
3-Methyl 4-nitrophenol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
p-Chlorotoluene	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
p-Chlorobenzoyl chloride	—	—	—	—	—	—	—	—	3300	—	3900	790

する例（伏脇ら、1994）もあることから、いくつかの代謝分解物の変異原性試験も実施した（Table 3）。検討した 17 種の農薬と 6 種の農薬代謝分解物のうち農薬 7 種、代謝分解物 2 種に変異原性が認められた。

このうち captan (CAS No. 133-06-2) のみは、代謝活性化の有無にかかわらず塩基置換型、フレームシフト型の 6 菌株すべてで変異原性が検出されたが、Table 2 に見られるように比較的塩基置換型の直接変異原性が高かった。また、TA100, TA98 の両菌株に対しその派生株での変異原活性の上昇は見られなかった。

その他の農薬はいずれも塩基置換型の 3 菌株でのみ変異原性が検出され、変異原活性は最高でも mg 当たり 14,000 コロニー (YG1029+S9) であった。また、代謝分解物も農薬本体と大きく異なる変異原性を示さなかった。

3.3 ヘテロサイクリックアミンの検出と変異原性

Fig. 3 に調布取水堰のブルーレーション抽出物の Sep pak Plus Silica による分画後の酢酸エチル/メタノール画分の HPLC の結果を示した。なお、同画分は、標準品を用いた検討で Trp-P-1, Trp-P-2 の 70% 以上の回収を確認している。HPLC のピークの保持時間から、河川中に代表的なヘテロサイクリックアミンである Trp-P-1, Trp-P-2 の存在が示唆された。そこで、HPLC の条件 1, 2

に示したように溶離液の組成を 12% CH₃CN/25 mM H₃PO₄/Na₂HPO₄ (pH 2) から 20% CH₃CN/20 mM H₃PO₄

(pH 2) に代え、カラムも代えた結果、標準品の保持時間は Trp-P-1 が 45 min から 13.7 min に、Trp-P-2 は 27 min から 10.5 min に大きく変わった。しかし、いずれもブルーレーション抽出物の酢酸エチル/メタノール画分は標準品とピー

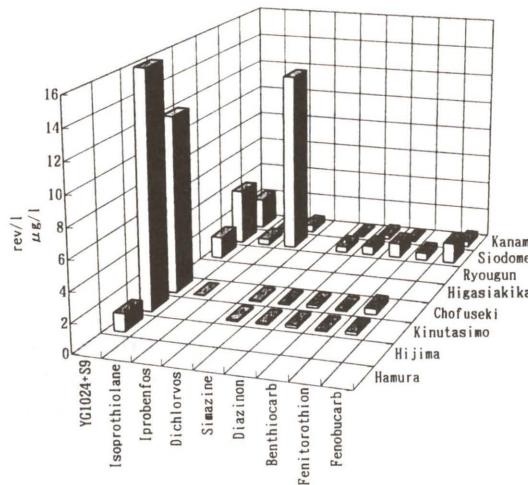


Fig. 4. Mutagenicity of river water in *S. typhimurium* YG1024 with S9mix and concentration of pesticides in river water on June 22, 1995.

4.2 変異原性と農薬との関連

水環境を汚染する可能性から監視、規制されている農薬の半数以上からは変異原性が検出されなかった。変異原性を示す農薬やその代謝分解物の殆どは河川水と異なる塩基置換型の変異原物質であり、その変異原活性も低かった。TA98 株やその派生株でも変異原性が検出された captan の場合も、mg 当たりのコロニー数は YG1024 + S9 で 1300 のため河川の変異原性に影響するとは考えられない。更に、6 月 22 日の例にも示す通り (Fig. 4) 検出農薬濃度と変異原性 (YG1024 + S9) には関連性は認められなかった。図に示していない他の測定日も同様に変異原性と農薬による汚染の傾向は異なっていた。

農薬と河川水の変異原性との関係については、DDT などの有機塩素系農薬を現在でも使用している地域では農薬が河川の変異原性に影響すると報告されている (Rehana *et al.*, 1995)。しかし、今回の検討により現在日本で使用され、水系を汚染する可能性のある農薬は、河川の変異原性には関与していないことが明らかとなった。

4.3 河川中の変異原物質の検索

河川の汚染源のうち工場排水の占める割合は、中川が 28%、江戸川が 33% などに比べ多摩川は 6% 弱 (東京都, 1996) であり、化学物質による汚染も過去のモニタリングの結果 (佐々木, 1995) から多摩川は低い傾向にあった。一方、多摩川は家庭や事務所などの生活排水の割合が高いため、生活排水に含まれる物質の変異原性への寄与を推測した。

河川水の変異原性は、①フレームシフト型で、芳香族アミンなどに高い感受性を持つ O-acetyltransferase 高產生株 (Watanabe *et al.*, 1990) の YG1024 株で S9mix 添加下時に変異原性が高い。②nitroreductase 高產生株の YG 1021 株では、TA98 と変異原活性と変わらない、などの特徴を持つため、河川水中には芳香族アミンの存在を推

測した。そこで、生活排水中の主要構成成分であるし尿に含まれる (Hayatsu *et al.*, 1985; Wakabayashi *et al.*, 1993) ヘテロサイクリックアミンの分析を行い、河川水から強変異原物質である Trp-P-1, Trp-P-2 を検出した。1回の検討結果ではあるが、ブルーレーション抽出物の YG1024 + S9 の変異原性に対し、標準品との比較で 4.4% 程度 Trp-P-1, Trp-P-2 が寄与していることを推定させる結果を得た。河川の変異原性は今回の検討でもかなり変動があるが、Trp-P-1, Trp-P-2 が数%程度関与している可能性があると考える。

勢川ら (1993) は、下水処理場に流入する都市下水中に Trp-P-2 の存在を報告しており、小野ら (1995) はし尿処理場等の排水から Trp-P-2 を検出している。これらの知見から、今回検出された Trp-P-1, Trp-P-2 は人間のし尿由来で、排水処理で完全には分解せず河川に流入したものと考える。

なお、今回のブルーレーション懸垂法は接触した河川水量を把握できないため、河川水中の Trp-P-1, Trp-P-2 の存在濃度は明らかではない。Trp-P-1, Trp-P-2 等のヘテロサイクリックアミンに起因する変異原性と河川水の変異原性の関連について、他の変異原物質の検索と合わせ、さらに明らかにしていきたい。

謝 辞

S. typhimurium YG 株を御恵与下さいました国立衛生試験所能美健彦博士に深く感謝申し上げます。本研究に際し、採水や農薬分析でご協力下さいました東京都環境保全局水質監視課と (株) 帝人エコサイエンスに深く感謝いたします。

参考文献

安部明美、浦野紘平 (1995) 底質の Ames 変異原性モニタリングのための試料調製方法とその応用、水環境学会誌, **18**, 701–710.

Filipic, M. (1995) Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area, **342**, 1–8.

伏脇裕一、浦野紘平 (1994) 除草剤 CNP による環境汚染、水道協会誌, **63**, 14–27.

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.

Hayatsu, H., T. Oka, A. Wakata, Y. Ohara, T. Hayatsu, H. Kobayashi and S. Arimoto (1983) Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine, Mutation Res., **119**, 233–238.

Hayatsu, H., T. Hayatsu and Y. Ohara (1985) Mutagenicity of human urine caused by ingestion of fried ground beef, Jpn. J. Cancer Res. (Gann), **76**, 445–448.

環境化学研究会 (1993) 環境水質分析法マニュアル (監修: 環境庁水質保全局水質規制課)。

Kusamran, W. R., K. Wakabayashi, A. Oguri, A. Tepsuwan, M. Nagao and T. Sugimura (1994) Mutagenicities of Bangkok and Tokyo river waters, Mutation Res., **325**, 99–104.

Muraoka, S. and S. Yamanaka (1982) Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* tester strains of XAD-2-ether extracts, recovered from Katsura river water in Kyoto city, and its fractions, Mutation Res., **102**, 13–26.

日本水道協会 (1993) 上水試験法 (監修: 厚生省生活局水道環境部)。

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.

小野芳朗、毛利紫乃、宗宮 功、小田美光 (1995) ヒトし尿の生物処理水中に存在する Trp-P-2 の同定と評価、環境変異原研究, **17**, 179–186.

Rehana, Z., A. Malik and M. Ahmad (1995) Mutagenic activity of the ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P.), India, Mutation Res., **343**, 137–144.

Sakamoto, H. and H. Hayatsu (1990) A simple method for monitoring mutagenicity of river water. mutagens in Yodo river system, Kyoto-Osaka, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **44**, 521–528.

佐々木裕子、森田一夫、和田照美 (1995) 東京における水環境の化学物質モニタリング、水環境学会誌, **18**, 655–662.

Sayato, Y., K. Nakamuro, H. Ueno and R. Goto (1990) Mutagenicity of adsorbates to a copper-phthalocyanine derivatives recovered from municipal river water, Mutation Res., **242**, 313–317.

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

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, Mutation Res., **234**, 337–348.

松井三郎、仙波範明、紺野貴史、松田知成、山田春美、笠文彦、中村正久 (1993) Rec-assay による水質評価—琵琶湖淀川水系における DNA 損傷性物質の調査—、用水と排水, **35**, 22–27.

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.

Sugimura, T. (1986) Studies on Environmental Chemical Carcinogenesis in Japan, Science, **233**, 312–318.

東京都 (1996) 平成 7 年度東京都環境白書資料集。

内海英雄、濱田 昭、早津彦哉、橋本徳蔵、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從来の水質汚濁指標との比較—、水質汚濁研究, **13**, 227–234.

Wakabayashi, K., H. Ushiyama, M. Takahashi, H. Nukaya, S-B. Kim, M. Hirose, M. Ochiai, T. Sugimura and M. Nagao (1993) Exposure to heterocyclic amines, Environ. Health Perspect., **99**, 129–133.

K-ras Codon 12 Mutation Induction by UV But Not by 4NQO, Analyzed by PCR Following Differential Dot-blot Hybridization, in Hypermutable Human RSa Cells

Nobuo Suzuki^{1,†}, Hideko Suzuki², Toshiharu Ishizuka¹ and Hideo Yamamori³

¹ Department of Biochemistry¹ and Surgery³, School of Medicine, Chiba University, Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260, Japan

² Department of Toxicology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

(Received: March 2, 1996; Accepted: March 2, 1996)

Summary

The human cell line RSa is hypermutable after irradiation with far-ultraviolet light (UV) or treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), as assessed by a phenotypic mutation test estimating cloning efficiency of ouabain- or 6-thioguanine-resistant mutants. In the present study, K-ras codon 12 mutation in genomic DNA from UV-irradiated or 4NQO-treated RSa cells was analyzed by polymerase chain reaction following differential dot blot hybridization. More than 3 days after UV irradiation, mutations were identified at all doses tested up to 10 J/m^2 . However, no mutations were identified at all periods up to 6 days after treatment with 4NQO at concentrations up to $1 \times 10^{-6}\text{ M}$. Thus, although 4NQO is known to be a UV-mimetic agent, inducibility of K-ras codon 12 mutation was found to be dissociated from UV-induced mutagenicity in RSa cells.

Keywords: K-ras, mutation, UV, 4NQO, human RSa cells

Introduction

Various methods for identification of mutagenic agents have been developed; for example, bacterial mutation test systems such as the *Salmonella* reverse mutation assay (Ames test) (Zeiger, 1995). However, much remains to be improved in systems for recognition and quantification of mutation in human cells. *In vitro* assay systems which are easily handled and highly sensitive for identification of mutagenic potential are required for estimation of human genetic risk factors (Clive, 1995).

The human RSa cell line may be a powerful tool for identification of agents with mutagenic potential in human cells because of its hypermutability (Suzuki and Suzuki, 1995b). Phenotypic mutation frequencies in RSa cells, when estimated as generation of clones resistant to ouabain- or 6 thioguanine-induced cell killing, are more than one resistant mutant per 10^3 survivors after irradiation with far-ultraviolet light (UV, principally 254 nm wavelength) (Suzuki and Suzuki, 1988a) and after treatment with chemicals such as orthophenylphenol (OPP) (Suzuki *et al.*, 1985), sodium saccharin (Suzuki and Suzuki, 1988b), 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) (Suzuki *et al.*, 1994), and

piperonyl butoxide (Suzuki and Suzuki, 1995a).

In addition to the phenotypic mutation tests, we recently developed a method to detect base substitution mutations of K-ras codon 12 in genomic DNA by PCR following differential dot-blot hybridization (Suzuki and Suzuki, 1993). Using this method, induction of K-ras codon 12 mutations was observed in RSa cells treated with sodium saccharin (Suzuki and Suzuki, 1993; Suzuki and Suzuki, 1995b), perillaldehyde (Suzuki and Suzuki, 1994), and Piperonyl butoxide (Suzuki and Suzuki, 1995a). Mutated ras genes have been found in over 20% of all human malignancies (Cohen and Ellwein, 1991; Bos, 1989), and the incidence of K-ras codon 12 point mutations is particularly high in pancreatic carcinomas, accounting for more than 90% of reported cases (Almoguera *et al.*, 1988). Therefore, it is important to determine whether treatment of human cells with mutagenic agents results in mutation in this locus.

In the present study, we comparatively evaluated K-ras codon 12 mutation induction in RSa cells irradiated with UV and treated with 4NQO.

Materials and Methods

Agents

The UV lamp used was described previously (Suzuki and

[†] To whom correspondence should be addressed.

Kuwata, 1979), as was 4NQO (CAS: 56-57-5) purchased from Nakalai Co., Japan. Other agents were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

Cells and culture conditions

Establishment of the human cell line RSa and details of its characteristics reported until 1990 were summarized previously (Suzuki, 1993). Hypermutability of RSa cells after UV irradiation or treatment with chemical mutagens was described elsewhere (Suzuki *et al.*, 1994; Suzuki and Suzuki, 1995a; Suzuki and Suzuki, 1995b). The normal sequence of *K-ras* codon 12 in genomic DNA from RSa cells reported previously (Suzuki and Suzuki, 1994). The human cell line SW480 with a *K-ras* codon 12 mutation (GTT) was described elsewhere (Suzuki and Suzuki, 1993). Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and antibiotics (100 µg streptomycin/ml and 100 units penicillin G/ml) was used for cell culture. Cells were cultured by incubation with medium at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Conditions of UV irradiation and 4NQO treatment

Conditions for UV irradiation were as described (Suzuki and Fuse, 1981). For 4NQO treatment cells were exposed to EMEM containing 4NQO for 1 h as described elsewhere (Suzuki and Kuwata, 1979).

Cell proliferation assay

The cell proliferation assay was carried out as described previously (Suzuki and Kuwata, 1979). Briefly, one day after inoculation into culture dishes, cells were irradiated with and without UV, or treated with or without 4NQO. Immediately after UV irradiation or 4NQO treatment, cells were cultured and surviving cell numbers were counted. Viable cells were determined by the trypan-blue dye exclusion test and counted with a hemocytometer. Survival percentage ratios were estimated as (counts of viable cells in test dishes divided by counts of viable cells in control dishes) × 100. Results are shown as means of 2 independent experiments, in each of which 4 dishes were tested at each UV or 4NQO dose tested.

Detection of *K-ras* codon 12 mutation

Mutations in codon 12 of *K-ras* were detected according to the method described previously (Suzuki and Suzuki, 1993). Briefly, extraction of genomic DNA from cells on the indicated days after UV irradiation or 4NQO treatment was performed by a standard proteinase K/SDS/phenol chloroform procedure. Genomic DNA from SW480 cells and human placenta was also obtained by the same standard procedure. Target sequences of sample DNA were amplified *in vitro* by PCR using the primers 5'-GACTG-AATATAAACTTGTGG-3' and 3'-GCTTATACTAGG-TTGTATC-5', and the amplified DNA was dot-blotted onto nylon membranes. After prehybridization and hybridization with digoxigenin-11-dUTP-3' end-labeled *K-ras* codon 12 normal or mutant probes, the membranes were washed, blocked with blocking reagent, reacted with polyclonal sheep anti-Dig Fab conjugated to alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)

and colored with nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate solutions (Boehringer Mannheim). As a normal probe, the oligonucleotides 5'-GTTGGAGCTGGTGGCGTAGG-3' was used, while mutant probes contained the following oligonucleotides mixed at the same concentration ratios; 5'-GTTGGAGCTGGCGTAGG-3', 5'-GTTGGAGCTGTGGCGTAGG-3', 5'-GTTGGAGCTGGCGTAGG-3', 5'-GTTGGAGCTGGCGTAGG-3' and 5'-GTTGGAGCTGGCGTAGG-3'.

Photographs were taken as permanent records. Dideoxynucleotide chain-termination sequencing of the PCR products was also performed according to the method described previously (Suzuki and Suzuki, 1994), using an *AmpliTaq* Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Norwalk, USA), and [γ -³²P] ATP (4000 Ci/m mole, Amersham, Buckinghamshire, UK).

Other conditions

All of the experiments were performed under dim light or a yellow lamp (National FL 20S-Y-F; Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., Osaka, Japan).

Results

Sensitivity of *K-ras* codon 12 mutation analysis

To determine the sensitivity of the *K-ras* codon 12 mutation assays performed here, genomic DNA from SW480 cells carrying *K-ras* codon 12 mutations was serially diluted into human placental DNA, followed by amplification of the target sequences. On differential dot-blot analysis, PCR-amplified oligonucleotides from genomic DNA from only SW480 cells hybridized with digoxigenin-labeled synthetic oligonucleotides containing codon 12 substitutions as probes (a mutant probe) (Fig. 1). However, the amplified oligonucleotides did not show such clear hybridization signals with the labeled synthetic oligonucleotides containing a normal codon 12 sequence (a normal probe) (Fig. 1). In contrast, oligonucleotides amplified from human placental DNA alone hybridized with normal but not with mutant

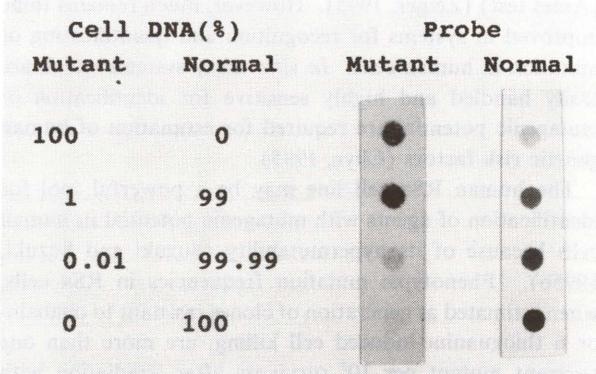


Fig. 1. Discrimination of *K-ras* DNA with and without codon 12 mutations by PCR and differential dot blot hybridization. DNA preparations were mixed at the concentration ratios (weight per weight) indicated at the left side of the panel. Each DNA mixture was analyzed by PCR following differential dot blot hybridization, as described in Materials and methods.

probes (Fig. 1). Under these assay conditions, preparation of the two genomic DNA mixtures containing more than 1% (weight per weight) DNA from SW480 cells showed positive hybridization signals with mutant as well as with normal probes (Fig. 1).

Direct sequencing analysis of non-coding strands was also performed. However, base substitutions in codon 12 were not observed when SW480 cell DNA was mixed at 1% with placental DNA, although at 50% an ACC→AAC substitution was clearly seen (Fig. 2).

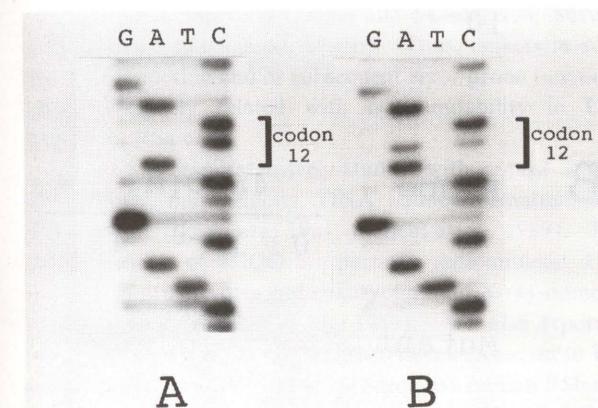


Fig. 2. Partial sequence of the antisense strand of exon-1 of the *K-ras* gene in DNA amplified from mixtures of SW480 cell and human placental genomic DNA. DNA mixtures were amplified by PCR, and the PCR products were analyzed by a dideoxynucleotide chain-termination sequencing method, as described in Materials and methods. (A) DNA mixtures consisted of 50% SW480 cells DNA and 50% human placental DNA. (B) DNA mixtures consisted of 1% SW480 cells DNA and 99% human placental DNA.

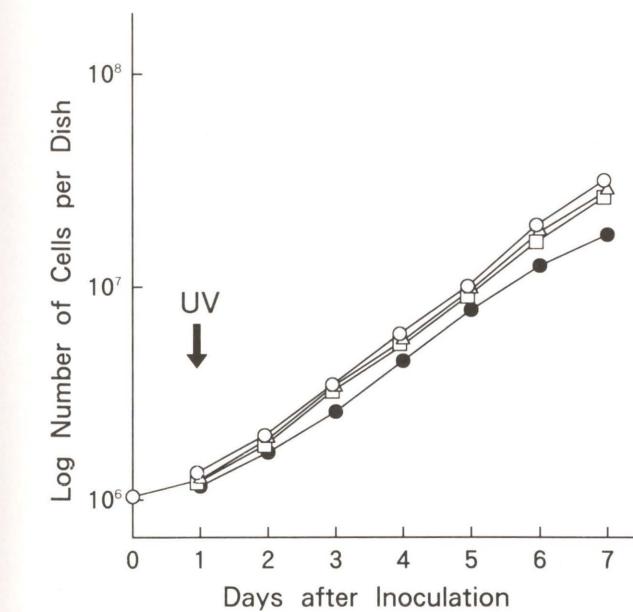


Fig. 3. Effects of UV irradiation on cell proliferation in RSa cells. Cell numbers were measured after inoculation into dishes followed by UV or mock irradiation, as described in materials and methods. ○, mock irradiation; □, 2.5 J/m² UV; △, 5 J/m² UV; ●, 10 J/m² UV.

UV-induced *K-ras* codon 12 mutations

RSa cells are highly sensitive to UV lethality when inoculated into dishes at low density. Thus, cell selection by the lethal effect was avoided by confluent inoculation of RSa cells, whereby proliferation rates of cells irradiated with 2.5 J/m² UV were almost equivalent to those of mock-irradiated cells (Fig. 3). However, irradiation of RSa cells at 5 J/m² and 10 J/m² resulted in reduction of cell proliferation, showing 85% and 50% survival 6 days after irradiation, respectively.

Genomic DNA was prepared from these cells at confluence and UV (5 J/m²)-induced *K-ras* codon 12 mutations were analyzed on various days (up to 6 days) after irradiation. Hybridization signals with mutant probes were not detected in mock-irradiated cells or in cells immediately after 5 J/m² UV irradiation (on 0 days), while positive signals were detected 3 and 6 days after UV irradiation (Fig. 4A). UV exposure at 2.5 J/m² and 10 J/m² also gave positive hybridization signals with mutant probes 6 days after irradiation (Fig. 4B).

Lack of induction of *K-ras* codon 12 mutation in 4NQO-treated RSa cells

Cell selection by the lethal effects of 4NQO was also

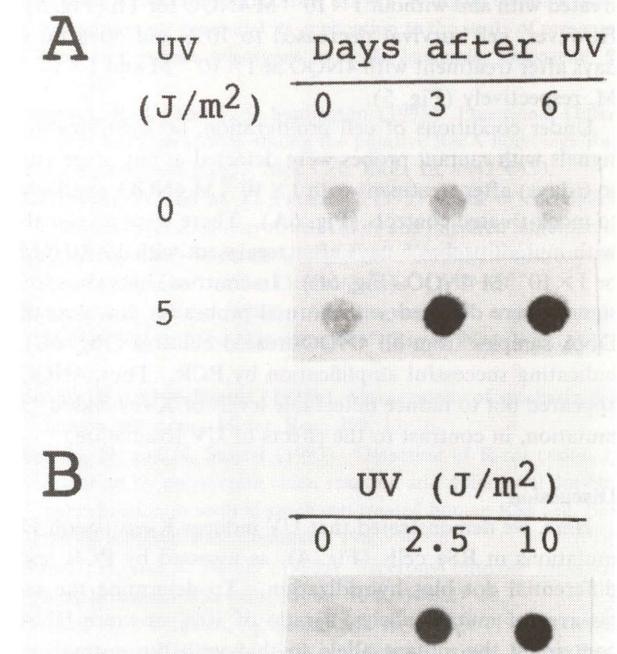


Fig. 4. Detection of *K-ras* codon 12 mutations in RSa cells at various times after irradiation with 5 J/m² UV (A) and 6 days after irradiation with various doses of UV. Mutations at codon 12 of *K-ras* were analyzed by PCR following differential dot blot hybridization with mutant probes, as described in Materials and methods.

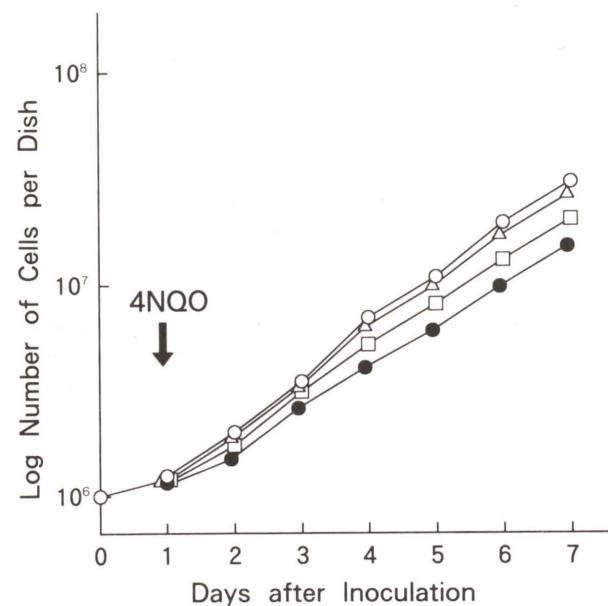


Fig. 5. Effects of 4NQO on cell proliferation in RSa cells. Cell numbers were measured after inoculation into dishes followed by treatment with 4NQO or mock treatment, as described in Materials and methods. ○, mock treatment; □, 10^{-8} M 4NQO; △, 10^{-7} M 4NQO; ●, 10^{-6} M 4NQO.

avoided by inoculating RSa cells at confluence, whereby proliferation rates were almost equivalent among cells treated with and without 1×10^{-8} M 4NQO for 1 h (Fig. 5). However, cell survival decreased to 70% and 50% on 6 days after treatment with 4NQO at 1×10^{-7} M and 1×10^{-6} M, respectively (Fig. 5).

Under conditions of cell proliferation, no hybridization signals with mutant probes were detected at any stage (up to 6 days) after treatment with 1×10^{-7} M 4NQO, similarly to mock-treated controls (Fig. 6A). There were no signals with mutant probes 6 days after treatment with 1×10^{-8} M or 1×10^{-6} M 4NQO (Fig. 6B). In contrast, hybridization signals were detected with normal probes on dot blots of DNA samples from all 4NQO-treated cultures (Fig. 6B), indicating successful amplification by PCR. Thus, 4NQO appeared not to induce detectable levels of K-ras codon 12 mutation, in contrast to the effects of UV irradiation.

Discussion

Here, we demonstrated that UV induces K-ras codon 12 mutations in RSa cells (Fig. 4), as assessed by PCR and differential dot blot hybridization. To determine the sequences of mutant alleles, a ratio of 10% or more DNA containing the mutant allele to that with the normal sequence is usually required (Jacobson and Mills, 1994). In accordance with this requirement, direct sequencing analysis did not reveal base substitution in DNA preparations with 1% DNA containing the mutant allele, although mutant sequences were detected in preparations with 50% mutant DNA (Fig. 2). However, PCR followed by allele-specific oligonucleotide hybridization has recently been applied for detection of mutations with the mutant allele present at only a few percent (Jacobson and Mills, 1994). Our method also appeared applicable for identification of

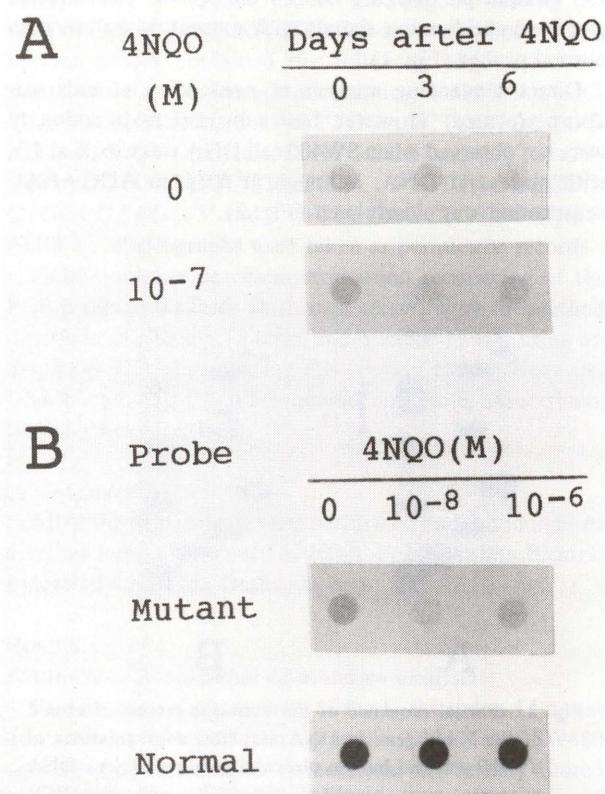


Fig. 6. Detection of K-ras codon 12 mutation in RSa cells at various times after treatment with 10^{-7} M 4NQO (A) and 6 days after treatment with various concentrations of 4NQO. Mutations at codon 12 of K-ras were analyzed by PCR following differential dot blot hybridization with mutant and normal probes, as described in Materials and methods.

K-ras codon 12 mutations present at only one percent DNA in genomic DNA preparations (Fig. 1).

In addition to the highly sensitive method applied here, the hypermutability of RSa cells after UV irradiation (Suzuki *et al.*, 1994) allowed us to detect a small fraction of cells containing K-ras codon 12 mutation. Besides their hypermutable phenotypes, we showed that UV-irradiated RSa cells are partially defective in DNA-repair capacity; less than one half of total levels of cellular repair replication and unscheduled DNA synthesis in HeLa cells (Suzuki and Fuse, 1981). At present, it remains unclear whether this defect in RSa cells contributes to their hypermutability, because a variant cell line resistant to UV cell killing, with the same DNA-repair capacity as the parent RSa cells, was shown to be hypomutable (Suzuki *et al.*, 1994).

The mechanisms underlying UV-induced mutagenicity in human cells have been studied extensively but have not been unequivocally clarified (Cooper and Krawczak, 1993; Isogai and Suzuki, 1994; Walker, 1995). However, with respect to the molecular mechanisms of UV-induced mutagenicity, an SOS mutagenesis response characterized in *Escherichia coli* has been suggested in mammalian cells

(Friedberg, 1984; Walker, 1995). In this response, RecA protein is activated early after UV irradiation, leading to proteolytic cleavage of the transcriptional repressor protein. As a consequence, the genes under control of the repressor are expressed and their products participate in UV-induced events such as genetic mutation (Walker, 1995). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the putative RecA homologs which are involved in DNA repair and recombination have been identified (Johnson and Symington, 1995). On the other hand, we found induction of protease activity in correlation with hypomutable changes in human cells (Isogai and Suzuki, 1994; Suzuki, 1995; Suzuki and Suzuki, 1995b). Thus, defects in such protease induction and/or subsequent error-prone functions may be closely related with hypermutability in UV-irradiated RSa cells.

4NQO has been extensively studied with respect to carcinogenicity, mutagenicity, DNA adduct formation, and DNA repair (Sugimura, 1981; Bailleul *et al.*, 1989). The cellular effects of 4NQO are partially radiomimetic; UV-mimetic in prokaryotes and eukaryotes, and X-ray-mimetic in eukaryotes (Bailleul *et al.*, 1989). We also reported previously that a variant, established as cells resistant to UV cell killing from a UV- and 4NQO-sensitive human RSa cell line, showed increased resistance to 4NQO cell killing (Suzuki *et al.*, 1982), while a 4NQO-resistant variant from RSa cells has increased resistance to UV (Suzuki, 1987). A UV-resistant variant of RSa cells has also been shown to exhibit increased resistance to 4NQO (Suzuki, 1984). In RSa cells, 4NQO inhibits cell proliferation and total cellular DNA synthesis and induces DNA-repair synthesis, similarly to UV (Suzuki *et al.*, 1994; Suzuki, 1984). Frequencies of ouabain-resistant (Oua^R) phenotypic mutations induced by treatment with 4NQO (1×10^{-8} M– 1×10^{-6} M) are more than one Oua^R mutant per 10^3 survivors (Suzuki *et al.*, 1994). Nevertheless, in the present study 4NQO did not induce K-ras codon 12 mutations to levels detectable by PCR analysis following differential dot blot hybridization (Fig. 6).

The mutant sequences of the antisense strand at K-ras codon 12, expected to be detected by the mutant probe used, were ACT, ACG, ACA, ATC, AGC and AAC. 4NQO, after metabolic activation, binds to DNA producing three main adducts on guanine and adenine (Sugimura, 1981; Bailleul *et al.*, 1989), while UV is known to modify pyrimidine (Walker, 1995). The absence of mutation induction in the codon 12 sequence by 4NQO might be due to the difference in base-specificity for adducts formation between the two agents.

Interestingly, hypersensitivity to cell killing and impaired inhibition of DNA synthesis after 4NQO treatment were reported to show no correlation in cells derived from ataxia telangiectasia patients (Mirzayans and Paterson, 1991). RSa cells exhibit high susceptibility to X-ray cell killing, similarly to ataxia telangiectasia cells (Suzuki and Suzuki, 1990). Thus, to determine the reason for the discrepancy regarding susceptibility of RSa cells to 4NQO-induced phenotypic and genetic mutations, further characterization of RSa cells will be necessary in addition to detailed studies on 4NQO metabolism in the cells. It is intriguing whether 4NQO-induced error-prone functions, which lead to K-ras

codon 12 mutations, differ from those induced by UV and are defective in RSa cells.

Acknowledgements

We thank Dr. M. Tatibana for valuable support. This work was funded, in part, by a grant-in aid (No. 03680179) from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan.

References

- Almoguera, C., D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Armheim and M. Perucho (1988) Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes, *Cell*, **53**, 549–554.
- Bailleul, B., P. Daubersies, S. Galiegue-Zouitina and M. H. Loucheux-Lefebvre (1989) Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 691–697.
- Clive, D. (1995) Mammalian cell mutation assays, In: D. H. Phillips and S. Venitt (Eds.), *Environmental Mutagenesis*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 201–218.
- Cohen, S. M. and L. B. Ellwein (1991) Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis, *Cancer Res.*, **51**, 6493–6505.
- Cooper, D. N. and M. Krawczak (1993) A historical view of research into the nature of mutation, In: *Human Gene Mutation*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 1–18.
- Friedberg, E. C. (1984) The role of proteases in the cellular responses to DNA damage, In: *DNA repair*, Freeman, New York, pp. 489–491.
- Isogai, E. and N. Suzuki (1994) Involvement of antipain-sensitive protease activity in suppression of UV-mutagenicity by human interferon- α , *Mutation. Res.*, **325**, 81–85.
- Jacobson, D. R. and N. E. Mills (1994) A highly sensitive assay for mutant ras genes and its application to the study of presentation and relapse genotypes in acute leukemia, *Oncogene*, **9**, 553–563.
- Johnson, R. D. and L. S. Symington (1995) Functional Differences and interactions among the putative RecA homologs Rad 51, Rad55, and Rad57, *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4843–4850.
- Mirzayans, R. and M. C. Paterson (1991) Lack of correlation between hypersensitivity to cell killing and impaired inhibition of DNA synthesis in ataxia telangiectasia fibroblasts treated with 4-nitroquinoline 1-oxide, *Carcinogenesis*, **12**, 19–24.
- Sugimura, T. (Ed.) (1981) *Carcinogenesis, A comprehensive Survey*, Vol. 6, "The Nitroquinoline", Raven, New York, pp. 1–153.
- Suzuki, H. and N. Suzuki (1988b) Mutagenicity of saccharin in a human cell strain, *Mutat. Res.*, **209**, 13–16.
- Suzuki, H. and N. Suzuki (1993) Detection of K-ras codon 12 mutation by polymerase chain reaction and differential dot-blot hybridization in sodium saccharin-treated human RSa cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 956–961.
- Suzuki, H. and N. Suzuki (1995a) Piperonyl butoxide mutagenicity in human RSa cells, *Mutat. Res.*, **344**, 27–30.
- Suzuki, H., N. Suzuki, M. Sasaki and K. Hiraga (1985) Ortho-phenylphenol mutagenicity in a human cell strain, *Mutat. Res.*, **156**, 123–127.
- Suzuki, N. (1984) A UV-resistant mutant without an increased repair synthesis activity, established from a UV-sensitive human clonal cell line, *Mutat. Res.*, **125**, 55–63.
- Suzuki, N. (1987) 4NQO- or MNNG-resistant variants established from a human cell line, RSa, with high sensitivity to both agents, *Mutat. Res.*, **178**, 135–141.
- Suzuki, N. (1993) RSa, In: T. Seno, H. Koyama and T. Kuroki (Eds.), *Manual of selected cultured cell lines for Bioscience and Biotechnology*, Kyoritsu Shuppan, Tokyo, pp. 204–205.
- Suzuki, N. (1995) Relationships between protease signal and

K-ras codon 12 mutation in UV-irradiated human cells, *J. Rad. Res.*, **35**, 282 (Abstract).

Suzuki, N. and A. Fuse (1981) A UV-sensitive human clonal cell line, RSa, which has low repair activity, *Mutat. Res.*, **84**, 133-145.

Suzuki, N. and H. Suzuki (1988a) Suppression of UV mutagenicity by human interferon, *Mutat. Res.*, **202**, 179-183.

Suzuki, N. and H. Suzuki (1990) Supervision of cellular response to radiation by human interferon, *Acta Biol. Hung.*, **41**, 243-248.

Suzuki, N. and H. Suzuki (1994) Induction of K-ras codon 12 mutation by saccharin sodium in cultured human RSa cells-comparison with Perillaaldehyde-induced mutagenicity, *Hennigensei Shiken*, **3**, 155-160.

Suzuki, N. and H. Suzuki (1995b) Suppression of saccharin-induced mutagenicity by interferon- α in human RSa cells, *Cancer Res.*, **55**, 4253-4256.

Suzuki, N. and T. Kuwata (1979) Establishment of ultraviolet-resistant cells from the highly sensitive human clonal cell line, RSb, *Mutat. Res.*, **60**, 215-219.

Suzuki, N., H. Kimoto, H. Koseki, N. Miura, T. Watanabe, N. Inaba, H. Takamizawa and S. Hashizume (1994) Human cell clones, RSa and UV-1, differing in their capability for UV-induced virus reactivation and phenotypic mutation, *Mutat. Res.*, **306**, 211-222.

Suzuki, N., J. Nishimaki and T. Kuwata (1982) Characterization of a UV-resistant strain, UV-10, established from a human clonal cell line, RSb, with high sensitivity to UV, 4NQO, MNNG and interferon, *Mutat. Res.*, **106**, 357-376.

Walker, G. C. (1995) SOS-regulated proteins in translesion DNA synthesis and mutagenesis, *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 416-420.

Zeiger, E. (1995) Mutagenicity tests in bacteria as indicators of carcinogenic potential in mammals, In: D. H. Phillips and S. Venitt (Eds.), *Environmental Mutagenesis*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp. 107-119.

Environ. Mutagen Res., **18**: 35-40 (1996)

サルモネラ試験菌株 TA102 及び TA104 に対する活性酸素産生系の変異原性

The mutagenicity of activated oxygen species-generating systems towards *Salmonella* TA102 and TA104 tester strains

羽倉昌志, 筒井美枝, 館田久利, 杉原芳樹
見上孝, 佐神文郎

Atsushi Hakura, Yoshie Tsutsui, Hisatoshi Mochida, Yoshiki Sugihara,
Takashi Mikami and Fumio Sagami

エーザイ株式会社安全性研究部 300-26 茨城県つくば市東光台 5-1-3

Department of Drug Safety Research, Eisai Co., Ltd.,
1-3 Tokodai, 5-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-26, Japan

(受付: 1996年3月15日; 受理: 1996年3月15日)

Summary

The mutagenicity of 27 different kinds of activated oxygen species (AOS)-generating systems was examined using *Salmonella* TA102 and TA104 tester strains. The AOS-generating systems used in this study include superoxide-, hydrogen peroxide-, hydroxy radical-, and singlet oxygen-generating systems, hydroperoxides, and AOS-related compounds. The data indicate that the TA102 strain is sensitive to the mutagenicity of the AOS-generating agents possessing the ability to bind intercalatively to DNA, and of peroxides, while for most of the AOS-generating systems the TA104 is more sensitive than the TA102 strain. The present study also suggests that for the AOS-generating systems mutagenic towards the TA102 and TA104 strains, the degree of mutagenic activity of the system is well-correlated with its cytotoxicity, while all non-mutagenic AOS-generating systems, show non-insignificant cytotoxicity.

Keywords: activated oxygen species (AOS), *Salmonella typhimurium* TA102, *Salmonella typhimurium* TA104, mutagenicity

諸 言

8-oxoguanine を含む DNA の酸化的損傷は、突然変異、癌、老化、その他多くの疾病の原因になるものと推察されている (Ames and Gold, 1991)。DNA に酸化的損傷を引き起こすいくつかの活性酸素産生剤の変異原性は細菌を用いた試験系によって検出できることが知られているが、サルモネラ試験菌株 TA102 は、酸化的損傷によって引き起こされる変異原性も検出可能な菌株として世界中で広く使用されている。しかしながら、TA102 株に対する変異原性が調べられている化合物数はかなり多いものの、活性酸素産生剤については、DNA にインターカレーショントン能を有する抗腫瘍性抗生物質、過酸化物、その他比較的限られた数の化合物について検討されている程度である (Levin *et al.*, 1982, 1984; Wilcox *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1992)。TA102 株は TA100 株や TA98

株とは異なって、DNA 染色体上の G:C 塩基対に変異は存在せず、プラスミド pAQ1 上の hisG428 遺伝子中に A:T 塩基対の変異 (*ochre mutation*) が存在し、さらに、除去修復能を保持している。一方、TA102 株と同じ *ochre mutation* を DNA 染色体上に持ち、除去修復能を欠損している TA104 株は、アルデヒド類の変異原性を高感度に検出可能であることが報告されているものの、活性酸素産生剤についてはあまり検討されていない (Marnett *et al.*, 1985; Han, 1992)。

活性酸素による変異原性のメカニズムはいまだよく理解されておらず、系統だった基礎的研究が必要と考えられる。本研究は、27 種類の様々な活性酸素産生系を用いて、その変異原性を TA102 株および TA104 株を用いて比較検討したものである。

Table 1. Test materials used in this study.

Test material	Abbreviation or formula	CAS No.	Manufacturer
Adriamycin	ADR	25316-40-9	Sigma
Bleomycin	BLM	9041-93-4	Sigma
Streptonigrin	STR	3930-19-6	Sigma
Danthron	DT	117-10-2	Tokyo Kasei
Potassium superoxide	KO ₂	12030-88-5	Aldrich
1,4-Naphthoquinone	NQ	130-15-4	Aldrich
Xanthine	XA	69-89-6	Sigma
Xanthine oxidase	XAO	9002-17-9	Sigma
Phenazine methosulfate	PMS	299-11-6	Wako
Hydroquinone	HQ	123-31-9	Tokyo Kasei
Phenylhydrazine	PH	100-63-0	Wako
Fe(III)-EDTA	Fe(III)-EDTA	15708-41-5	Dojindo
DL-Epinephrine	EP	329-65-7	Tokyo Kasei
Paraquat	PQ	1910-42-5	Wako
Cu(II)-EDTA	Cu(II)-EDTA	39208-15-6	Dojindo
Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂	7722-84-1	Wako
Glucose	GC	50-99-7	Wako
Glucose oxidase	GCO	9001-37-0	Tokyo Kasei
Acridine orange	AO	10127-02-3	Wako
Methylene blue	MB	61-73-4	Schmid
t-Butyl hydroperoxide	BHP	75-91-2	Aldrich
Cumene hydroperoxide	CHP	80-15-9	Nacalai
Potassium bromate	KBrO ₃	7758-01-2	Kanto Chemical
Sodium hypochlorite	NaOCl	7681-52-9	Wako
Sodium ascorbate	V.C	134-03-2	Tokyo Kasei
Carbon tetrachloride	CCl ₄	56-23-5	Wako
Ethyl methanesulfonate	EMS	62-50-0	Kanto Chemical

実験材料および方法

1. 化合物

本研究で活性酸素産生系として使用した化合物の名称、略号、CAS番号、購入先をTable 1に記した。

2. 試験菌株

Salmonella typhimurium TA102 (*hisD(G)8476,rfa/pKM101/pAQ1*) および TA104 (*hisG428,ΔuvrB,rfa/pKM101*) 株を使用した。

3. 変異原性試験

変異原性試験は、20分のpre-incubationを併用したAmes法に従って行った(Maron and Ames, 1983; Hakura et al., 1994)。ただし、AOとMBについては、細胞培養液と化合物を加えたリン酸緩衝液をディッシュ中で光照射した後、histidine-biotin入りsoft agarを混和し、hard agar上に重層した。光照射は、ML-30集光レンズとウシオ製JCM15-150F.FP光源を装着したLGPS型の光照射装置(オリエンパス光学工業(東京))を最大ボリューム(約40000lx)にして2分間室温で行った。検体を溶解した溶媒として、精製水、dimethyl sulfoxide(DMSO)あるいは1%の18-crown-6(Aldrich)を含むDMSOを用いた。被検菌液は、約2×10⁹ cells/mlで凍結保存されていた細胞懸濁液20μlを25μg/mlのampicillinと2μg/mlのtetracycline(TA102株)、あるいは25μg/mlのampicillin(TA104株)を含むOxoid nutrient broth No. 2(20ml)に接種し、10時間培養して得たものを使用した。

活性酸素産生系としてスーパーオキサイドアニオンラジカル(·O₂⁻)産生系、過酸化水素(H₂O₂)産生系、ハイドロキシラジカル(·OH)産生系、一重項酸素('O₂)産生系、有機過酸化物およびその他の活性酸素関連化合物を用いた。·O₂⁻産生系として、adriamycin、bleomycin、streptonigrin、danthron、KO₂、1,4-naphthoquinone、xanthine oxidase+xanthine、phenazine methosulfate、1,4-hydroquinone、phenylhydrazine、Fe(III)-EDTA、epinephrine、

Table 2. Mutagenicity^{a)} of activated oxygen species (AOS)-generating systems towards *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104 tester strains.

AOS-generating system	Solvent ^{e)}	S9-mix	Inter-calating activity ^{b)}	Mutagenicity			
				TA102	TA104	TA102	TA104
·O₂⁻-generating system							
ADR	W	-	+	4800	7.3 (1.7)	36000	3.5 (0.17)
BLM	W	-	+	190*	1.8 (2.9)*	34*	1.6 (5.8)*
STN	D	-	+	12000	≥7.8 [0.79]	23000	5.1 (0.20)
DT	D	+	+	20	5.6 (1300)	—	— ND [≥1300] ^{j)}
KO ₂	C	-	-	—	— [5600]	0.74	4.2 (1400)
NQ	D	-	-	—	— [15]	46	2.3 (12)
XAO (0.1 U)+XA	D	-	-	—	— [2600]	3.1	3.5 (660)
PMS	W	+	-	—	— [98]	6.5	2.2 (98)
HQ	D	-	-	—	— [1600]	1.5	4.2 (680)
PH	D	+	-	0.26	1.6 (930)	0.64	6.7 (9300)
Fe(III)-EDTA	W	+	-	—	— ND [≥14000]	0.04	1.7 (14000)
EP	W	+	-	—	— [11000]	—	— ND [≥11000]
PQ	W	-	-	—	— [3.9]	—	— [12]
Cu(II)-EDTA	W	+	-	—	— [6400]	—	— ND [≥6400]
H₂O₂-generating system							
H ₂ O ₂	W	-	-	0.24	3.1 (5900)	2.3	5.5 (740)
GC (3 μmol)+GCO	W	-	-	0.64*	≥2.2 [720]*	7.2*	3.3 (180)*
Cu(II)-EDTA (638 nmol)+V.C	W	-	-	—	— ND [≥1500]	1.0	≥2.4 ND (≥1500)
·OH-generating system							
H ₂ O ₂ (185 nmol)+Fe(III)-EDTA	W	-	-	—	— ND [≥240]	—	— ND [≥240]
·O₂-generating system							
AO+v.l. ^{g)}	W	-	+	9200	2.8 (0.19)	4800	4.5 (0.57)
MB+v.l. ^{g)}	W	-	+	570	2.7 (1.9)	2500	4.1 (0.95)
NaOCl+H ₂ O ₂ ^{h)}	W	-	-	—	— [100]	12	4.4 (100)
Hydroperoxide							
BHP	W	-	-	0.50	>6.4 (11000)	4.6	3.8 (350)
CHP	D	-	-	1.0	≥3.2 [2000]	2.8	2.1 (123)
Others							
KBrO ₃	W	+	-	—	— ND [≥30000] ^{j)}	0.018	≥2.3 ND (≥30000)
NaOCl	W	-	-	—	— [200]	—	— ND [≥200]
V.C	W	+	-	—	— [15000]	—	— ND [≥15000]
CCl ₄	D	+	-	—	— [13000]	—	— [3200]
EMS	D	-	-	0.015	≥3.2 ND (≥61000)	0.061	≥8.5 ND (≥61000)

a) The Ames test, modified by preincubation at 37°C for 20 min, was conducted at least twice, and two plates were used for each dose. The means and standard deviations of the spontaneous revertants observed with the tester strains used were indicated in parentheses as follows: TA102, -S9, water (413±32); TA102, -S9, DMSO (371±31); TA102, +S9, water (381±44); TA102, +S9, DMSO (352±34); TA104, -S9, water (399±84); TA104, -S9, DMSO (331±41); TA104, +S9, water (454±40); TA104, +S9, DMSO (463±41).

b) ADR (Bhuyan et al., 1983), BLM (Kuwahara and Sugiura, 1988), STN (Sugiura et al., 1984), DT (Swanbeck, 1966), AO (Wolfe et al., 1972), MB (OhUigin et al., 1987).

c) In this paper, a positive response in the test is defined to be a response where the maximum number of revertants per plate relative to the number produced spontaneously represented an increase of at least 1.6-fold, and a reproducible dose-response curve was observed. Mutagenic activity is expressed as induced revertants/nmol/plate, calculated from the dose-response curves; the maximum number of induced revertants per nmol observed on the plates examined. The symbols, “-” and “±” indicate a negative and an equivocal response, respectively.

d) The figures show the maximum fold increase of the revertants observed per plate relative to the number produced spontaneously. The figures in the parentheses () are C_{max}, which are doses giving the maximum number of revertants per plate. The figures in the parentheses [] are LD₅₀ (nmol/plate), which are designated as the lowest doses giving significant decrease in the background lawns of the bacteria, or the lowest doses causing significant growth inhibition, the degree of which was the T₂ level (Kikuchi and Miyake, Eds., 1992; Hakura et al., 1994).

e) W: water, D: dimethyl sulfoxide (DMSO), C: DMSO containing 1% 18-crown-6.

f) ND: not determined. The figures indicate the C_{max} or LD₅₀ to be expected, since no significant toxicity was observed below the doses described.

g) Test chemical was excited by visible light at ca. 40000lx (see Materials and method) for 2 min at room temperature.

h) Equivalent molar ratio was employed in the reaction mixture.

* unit of dose; mU.

paraquat, Cu(II)-EDTA の 14 種類を, H_2O_2 產生系として H_2O_2 , glucose+glucose oxidase, Cu(II)-EDTA+sodium ascorbate の 3 種類を, $\cdot OH$ 產生系として $H_2O_2 + Fe(III)$ -EDTA の 1 種類を, 1O_2 產生系として, acridine orange+visible light (v.l.), methylene blue+visible light, NaOCl+ H_2O_2 の 3 種類を, 有機過酸化物として t -butyl hydroperoxide, cumene hydroperoxide の 2 種類を選んだ。その他関連化合物として酸化剤である $KBrO_3$, NaOCl, 還元剤である sodium ascorbate (V.C), 酸化的代謝を受け活性酸素を產生する CCl_4 の 4 種類を選んだ。これらの活性酸素產生系については成書に詳細に記述されている (活性酸素—化学・生物学・医学一, 1987; フリーラジカルと生体, 1988; 蛋白質核酸酵素—活性酸素一, 1988)。陽性対照化合物としてエチル化剤である ethyl methanesulfonate (Guttenplan and Hu, 1984; Hakura et al., 1984) を使用した。

活性酸素產生系の変異原性

本研究では変異原性の強さの指標として, dose-response curve の直線部分から得られた最大の変異比活性 (revertants/dose/plate) を使用した。調べた活性酸素產生系とエチル化剤である EMS の変異原性の結果を Table 2 にまとめた。

活性酸素產生系 27 種類のうち, 11 種類の活性酸素產生系が TA102 株で変異原性陽性であったのに対して, 19 種類が TA104 株で陽性であった。ADM, BLM, STN, PH, H_2O_2 , GC+GCO, AO+v.l., MB+v.l., BHP, CHP は TA102 株および TA104 株で変異原性陽性であった。一方, DT は TA102 株で変異原性陽性であり, TA104 株では陰性であった。逆に, KO₂, NQ, XAO+XA, PMS, HQ, Fe (III)-EDTA, Cu (II)-EDTA + V. C, NaOCl + H_2O_2 , $KBrO_3$ は TA104 株で変異原性陽性であったが, TA102

株で陰性であった。変異比活性で比較した場合, 18 種類の活性酸素產生系については, TA104 株の方が TA102 株より大きな値を示し感受性が高かったのに対して, BLM, DT, AO+v.l. の 3 種類の系については TA102 株の方が TA104 株より大きな値を示し感受性が高かった。他の 6 種類の系は両菌株で陰性であった。以上の結果より, 一般的にインターカレーショント能を有する化合物および過酸化物群の変異原性は TA102 株で感受性が高く, 一方, 多くの活性酸素產生系の変異原性に対して TA104 株は TA102 株より高感受性であることが明らかとなった。この結果は用いた 27 種類の活性酸素產生系について, 縦軸に変異原性の指標として変異比活性を, 横軸に致死性の指標として C_{max} あるいは LD_{T_2} をとり, その変異原性と致死性との相関性を各々の菌株について示した Fig. 1 からも明らかであった。ここで用いた C_{max} は最大復帰変異数が観察された用量であり, LD_{T_2} は軽度の生育阻害が観察された用量 (変異原性が観察されなかった場合) である (Hakura et al., 1984, 1994; 変異原性試験 Q & A, 1992)。

また, Fig. 1 と Table 2 に見られるように, 活性酸素產生系の各群 ($\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2 各產生系, 有機過酸化物群およびその他の活性酸素関連化合物群) に対して TA102 株と TA104 株は各々特徴ある感受性の差が示された。TA102 株と TA104 株において活性酸素產生系の変異原性に対する感受性の差が特に顕著であったのは, インターカレーショント能を持たない $\cdot O_2^-$ 產生系であった。このような活性酸素產生系の各群によってこれら 2 菌株の間で感受性の差が認められた理由は不明であり, 今後の研究が必要であるが, 活性酸素產生系各群によって生じる DNA 損傷の種類の差, およびこれら DNA 損傷のサルモネラ DNA 修復機構に対する応答性の差など

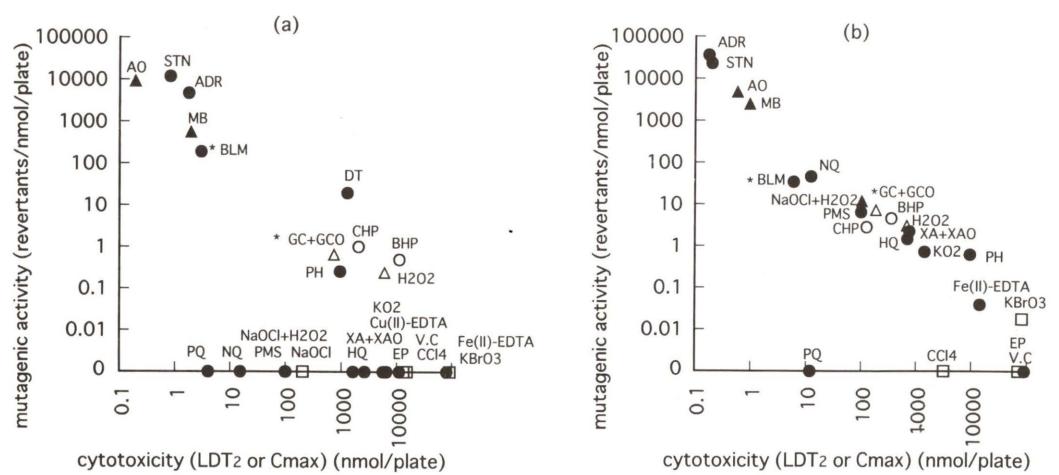


Fig. 1. Correlation between mutagenicity and cytotoxicity of the activated oxygen species (AOS)-generating systems towards *S. typhimurium* TA102 (a) and TA104 (b) strains. Mutagenic activity (revertants/nmol/plate), and C_{max} or LD_{T_2} (nmol/plate) are used as indicators of the mutagenicity and cytotoxicity, respectively. These data are taken from Table 2. Abbreviations and chemical formulae in the figures are listed in Table 1, and the symbols ●, △, ▲, ○, and □ indicate superoxide-, hydrogen peroxide-, and singlet oxygen-generating systems, hydroperoxides, and AOS-related compounds, respectively. *; with respect to BM and GC+GCO, the mutagenic activity and cytotoxicity are expressed in the unit of mU.

が考えられる。

活性酸素產生系の変異原性に対して, TA104 株の方が TA102 株より感受性が高かった理由の一つとして, TA104 株が除去修復能を欠損していることが考えられる。実際, 私たちは TA104 株 (*hisG428/ΔuvrB, rfa/pKM101*) と TA2638 株 (*hisG428/rfa/pKM101*) の比較から, 活性酸素產生系に対する変異原性には除去修復能の関与が大きいことを確認している (筒井ら, 1995)。

AO と MB については可視光照射を併用することにより Table 1 で示される変異原性が観察され, 併用しなかった場合には変異原性は認められなかった。また, 用いた可視光単独照射による致死性は無視できるものであった。

活性酸素產生系の変異原性と致死性の相関

Fig. 1 に見られるように, TA102 及び TA104 の両株において, 変異原性が見いだされた活性酸素產生系ではその変異原性と致死性の強さにより正の相関関係が認められた。一方, 変異原性が認められなかった活性酸素產生系についてはその致死性は必ずしも弱いものではなかった。この結果は変異原性が観察された系においては変異原性と致死性は相関するものの, 全ての活性酸素產生系で変異原性と致死性に相関性があるとは必ずしも言えないことを意味すると考えられる。別の見方をすれば, 致死性の強い化合物でも変異原性が検出できるものが存在したことから, 活性酸素の変異原性が一般的に検出されにくい理由の 1 因として, 化合物の致死作用の強さではなく, 致死効果に対する変異誘発効果の弱さにあるとも言えよう。

インターカレーショント能を有する活性酸素產生剤 ADR (Bhuyan et al., 1983), BLM (Kuwahara and Sugiura, 1988), STR (Sugiura et al., 1984), AO+v.l. (Wolfe et al., 1972), MB+v.l. (OhUigin et al., 1987) は TA104 および TA102 の両菌株で変異原性および致死性が強かった。この理由の一つとして, 活性酸素が化合物のインターカレートした DNA 近傍で生じたためとも考えられる。

酸化的 DNA 損傷の中で変異原性が認められているものは, 8-oxoguanine, 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine を含めいくつかのものが報告されている。しかしながら, これら既知の変異誘発性酸化的 DNA 損傷はいづれも G:C 塩基対の突然変異を主として引き起こすことが報告されており (Shibutani et al., 1991; Cheng et al., 1992; Shirnamé-Moré et al., 1987; 紙谷・葛西, 1995), A:T 塩基対に変異 (ochre mutation) を有する TA102 株および TA104 株が活性酸素產生系の変異原性に高感受性であり, G:C 塩基対に変異を有する TA100 株が低い感受性であった (筒井ら, 1995) こととは一致しない。TA102 株および TA104 株が活性酸素產生系の変異原性に高感受性であった理由は今のところ不明であるが, 以下の可能性が考えられる。すなわち, 活性酸素產生系によって (1) A:T 塩基対に生成したある酸化的 DNA 損傷, (2)

生体物質の過酸化を通じて生成したある 2 次的 (間接的) DNA 損傷 (3) G:C 塩基対に生成したある DNA 損傷のサプレッサー変異あるいは, (4) 生じたある酸化的ヌクレオチドの取り込み誤りによる可能性が挙げられる。活性酸素產生系の突然変異に関与する主要損傷およびその変異スペクトルについて詳細に検討する必要がある。

本研究は典型的な活性酸素產生系と考えられている 27 種類の変異原性を検討した。しかしながら, 誘発された変異原性はこれら活性酸素生成系の必ずしも 1 種類の純粋な活性酸素種のみによるものではなく, その高い反応性ゆえの数多くのあるいは複雑な活性酸素分子種に基づいている可能性もある。さらに, その変異誘発が產生された活性酸素分子種だけでなく, 化合物本体あるいはそのラジカルの高い反応性に基づく可能性も残されている。たとえば, NQ の変異原性は NQ の活性酸素產生能に加え, それ自身の強い求電子活性に基づくキノン-DNA 付加体形成能の関与によることが示唆されている (Hakura et al., 1994)。活性酸素產生剤による変異原性の真の究極活性体が何であるのかを調べることはこれらの変異誘発メカニズムを解明する上で重要なことと考えられる。

謝 辞

S. typhimurium TA102 株および TA104 株は東京大学医学研究所の松島泰次郎教授から供与していただきました。ここに感謝します。

参考文献

- Ames, B. N. and L. S. Gold (1991) Endogenous mutations and the causes of aging and cancer, *Mutat. Res.*, **250**, 3-16.
- Bhuyan, B. K., D. M. Zimmer, J. H. Mazurek, R. J. Trzos, P. R. Harbach, V. S. Shu and M. A. Johnson (1983) Comparative genotoxicity of adriamycin and menogarol, two anthracycline antitumor agents, *Cancer Res.*, **43**, 5293-5297.
- Cheng, K. C., D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura and L. A. Loeb (1992) 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions, *J. Biol. Chem.*, **267**, 166-172.
- Guttenplan, J. B. and Y-C. Hu (1984) Mutagenesis by N-nitroso compounds in *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104: evidence for premutagenic adenine or thymine DNA adducts, *Mutat. Res.*, **141**, 153-159.
- Hakura, A., H. Mochida, Y. Tsutsui and K. Yamatsu (1994) Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames *Salmonella* tester strains, *Chem. Res. Toxicol.*, **7**, 559-567.
- Hakura, A., S. Ninomiya, K. Kohda and Y. Kawazoe (1984) Studies on chemical carcinogens and mutagens. XXVI. Chemical properties and mutagenicity of alkyl alkanesulfonates on *Salmonella typhimurium* TA100, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3626-3635.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (著), 松尾光芳, 嵐井勝, 吉川敏一(訳) (1988) フリーラジカルと生体, 学会出版センター.
- Han, J-S (1992) Effects of various chemical compounds on spontaneous and hydrogen peroxide-induced reversion in strain TA104 of *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, **266**, 77-84.

Jung, R., G. Engelhart, B. Herbold, R. Jäckh and W. Müller (1992) Collaborative study of mutagenicity with *Salmonella typhimurium* TA102, *Mutat. Res.*, **278**, 265–270.

活性酸素 (1988) 蛋白質核酸酵素. 紙谷浩之, 葛西 宏 (1995) 活性酸素によって生ずる DNA 損傷と誘発される変異, 蛋白質核酸酵素, **40**, 1571–1577.

菊地康基, 三宅幸雄 (編) (1992) 変異原性試験 Q & A, サイエンティスト社.

Kuwahara, J. and Y. Sugiura (1988) Sequence-specific recognition and cleavage of DNA by metallobleomycin: minor groove binding and possible interaction mode, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2459–2463.

Levin, D. E., M. Hollstein, M. F. Christman, E. A. Schwiers and B. N. Ames (1982) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445–7449.

Levin, D. E., L. J. Marnett and B. N. Ames (1984) Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457–4461.

Marnett, L. J., H. K. Hurd, M. C. Hollstein, D. E. Levin, H. Esterbauer and B. N. Ames (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104, *Mutat. Res.*, **148**, 25–34.

Maron, D. M. and B. N. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173–215.

OhUigin, C., D. J. McConnell, J. M. Kelly and W. J. M. van der Putten (1987) Methylene blue photosensitised strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 7411–7427.

Shibutani, S., M. Takeshita and A. P. Grollman (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431–434.

Shirnamé-Moré, L., T. G. Rossman, W. Troll, G. W. Teebor and K. Frenkel (1987) Genetic effects of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, a product of ionizing radiation, *Mutat. Res.*, **178**, 177–186.

Sugiura, Y., J. Kuwahara and T. Suzuki (1984) DNA intercalation and nucleotide sequence cleavage of copper-streptonigrin, *Biochim. Biophys. Acta*, **782**, 254–261.

Swanbeck, G (1966) Interaction between deoxyribonucleic acid and some anthracene and anthraquinone derivatives, *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 630–633.

筒井美枝, 羽倉昌志, 館田久利, 杉原芳樹, 見上 孝, 佐神文郎 (1995) サルモネラ試験菌株 TA104 は酸化型変異原の変異原性を検出するためには TA102 より有用である, 日本環境変異原学会講演要旨集, p. 125.

Wilcox, P., A. Naidoo, D. J. Wedd and D. G. Gatehouse (1990) Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP2 tester strains, *Mutagenesis*, **5**, 285–291.

Wolfe, A. D., R. G. Allison and F. E. Hahn (1972) Labilizing action of intercalating drugs and dyes on bacterial ribosomes, *Biochem.*, **11**, 1569–1572.

八木國夫, 中野 稔 (監) (1987) 活性酸素—化学・生物学・医学—, 医歯薬出版.

Environ. Mutagen Res., **18**: 41–46 (1996)

第24回大会ミニシンポジウム
「抗変異・抗発がんとラジカル」

大腸菌 mutT 株のラジカル性自然突然変異の抑制

Suppression of spontaneous mutation due to oxygen radical in *Escherichia coli* mutT strain

三好 香苗, 香嶋伸一, 松澤昌夫, 宮坂良一
山本 孝, 西岡 一

Kanae Miyoshi, Shinichi Kashima, Masao Matuzawa, Ryoichi Miyasaka,
Takashi Yamamoto and Hajime Nishioka

同志社大学・工学部・バイオシステム研究室 610-03 京都府綴喜郡田辺町

Bio-system Research Laboratory, Faculty of Engineering, Doshisha University,
Tanabe-cho, Tuzduki-gun, Kyoto 610-03, Japan

(受理: 1996年4月1日)

Summary

MutT protein existing in cells prevents the incorporation of 8-OH-dGTP into DNA strands by causing the decomposition of 8-OH-dGTP, produced in the nucleotide pool, to 8-OH-dGMP. Therefore, a high frequency of spontaneous mutation (SM) in the mutT-deficient strain was expected. *E. coli* DSH71 (*mutT*), which is deficient in the *mutT* gene, was created in our laboratory by genetic engineering. As expected, the frequency of SM in the mutant strain was 13.5 times that in the parent strain, DSH7. SM observed here could be due to oxygen radicals generated in the cell spontaneously.

Using the strain, *E. coli* DSH71 (*mutT*), the suppressive effect on SM of such anti-oxidants as pyrogallol (PG), pyrocatechine (PC), tannic acid (TA), ascorbic acid (AsA) and β -carotene (β -C) was investigated. The results indicate a strong suppressive effect on SM by these anti-oxidants.

Green tea extract (GTE) and the infusions of three teas also suppressed SM in the same strain to some extent.

These results suggest the possibility that regular intake of food and drink containing these anti-oxidants is a major factor in the suppression of spontaneous cancer, by scavenging oxygen radicals generated spontaneously in an organism.

Keywords: spontaneous mutation, anti-oxidants, *mutT*

はじめに

細胞の突然変異の抑制は、がんの抑制という見地からも注目され、抗変異原性としてこれまで精力的に研究されてきた。しかしこれまでの抗変異原性研究の殆どは、紫外線や特定の変異原物質によって生じた特殊なDNA損傷から誘発される特殊な突然変異の抑制を対称としており、いわば特異的なものである。従って発がんの抑制の見地からは、同一のDNA損傷に由来する発がんに限定されると思われ、比較的頻度が高いと思われるヒトの自然発がんとは必ずしも関連しない可能性がある。

一方、細胞集団には一定の比率で自然突然変異 (spontaneous mutation, 以後、SM とする) 細胞が存在する。

SM 発生の機構は未だ解明されてはいないが、DNA複製の error や細胞内で constitutive に生成する活性酸素によるDNA損傷が原因と考えられている。

SM は普遍的なので、その抑制の研究は自然発がんの抑制の見地から大きな意味を持つと考えられる。しかし、通常、SM の頻度は、 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ と極めて低いので、実験的に充分な有意差を得るのはかなり困難である。

酸素 radical による酸化的DNA損傷には、Thymine Glycol (Leaden *et al.*, 1983), 5-Hydroxymethyluracil, 8-Hydroxyguanine (8-OH-Gua) (Kasai *et al.*, 1984; 葛西,

Table 1. The characteristics of bacterial strains used in this experiment.

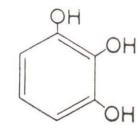
Strain	Description	Reference
CSH7	F^- , <i>lacY</i> , <i>rpsL</i> , <i>thiI</i>	16)
DSH71	as CSH7, but Δ <i>mutT::Tn5</i>	
UM196	as CSH7, but <i>his</i> , <i>katE1</i> , <i>katG17::Tn10</i>	17)
DSH191	as UM196, but Δ <i>mutT::Tn5</i>	

1988) などが知られている。最近, 8-OH-Gua に特異的に作用し, その突然変異を抑制する遺伝子, *mutM*, *mutY* などが発見され, これらの遺伝子を欠損させると, 高い SM 頻度を示すことが知られている。

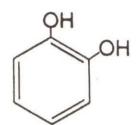
我々は, それらの遺伝子の一つである *mutT* を欠損させた変異株 DSH71 (*mutT*) および DSH191 (*katEG-mutT*) を作製した。これらの変異株は予想どおり高い SM 頻度を示した。ここで生じる SM は細胞内で constitutive に発生する酸素 radical によって生じるものと考えられ, radical 性 SM ということができる。

本研究では, これらの変異株の内 DSH71 を用いて各種抗酸化物質による radical 性 SM の抑制を検討した (Kasprzak *et al.*, 1990)。抗酸化物質としては, 植物 poly-

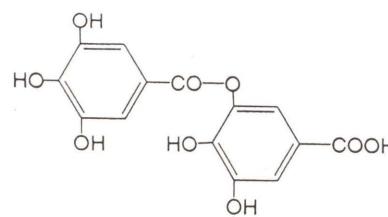
(1) pyrogallol(PG)



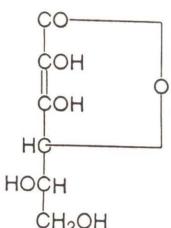
(2) pyrocatechine(PC)



(3) tannic acid(TA)



(4) ascorbic acid (AsA)



(5) β -carotene (β -C)

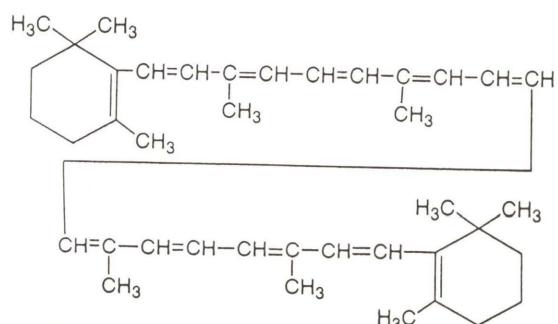


Fig. 1. Chemical structures of the samples.

phenol 類の pyrogallol (PG), pyrocatechine (PC) および tannic acid (TA) の 3 種 (Shimoi *et al.*, 1990), それに vitamin 類の, vitamin-C (AsA) および β -carotene (β -C) の 2 種を用いた。これら計 5 種の化学構造式を, Fig. 1 に示した。

最近, 緑茶の抗変異原性や抗発がん作用が注目され, green tea extract (GTE) (Yamane *et al.*, 1991; Kuwata, 1993) が実際にがん患者に投与されている。この GTE の成分を Table 2 に示したが, catechine を多く含有することがわかっている。さらに日常的に飲用されている煎茶 (sencha), 玉露 (gyokuro) および紅茶 (koucha) の三種の茶の浸出液についても検討した。

1. 実験材料および方法

1-1 培地および試薬

(1) M9 buffer: 蒸留水 1000 ml に NH_4Cl 1 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g を溶解して滅菌した後, 別に滅菌しておいた 0.5 M- MgSO_4 溶液を 3.3 ml 加えた。

(2) LB medium: 蒸留水 1000 ml に polypepton 10 g,

Table 2. Components of green tea extract (GTE)⁹⁾.

(+)-catechin	3.5%
(-)-epicatechin	7.0%
(+)-gallocatechin	14.8%
(-)-epigallocatechin	15.0%
(-)-epicatechin gallate	4.6%
(-)-gallocatechin gallate	11.6%
(-)-epigallocatechin gallate	18.0%
Caffeine	10.0%
Sugars	4.0%
Amino acids	1.5%
Minerals* and moisture	10.0%

* Minerals: Na, 7.5 mg/100 g; K, 34.1 mg/100 g; Mg, 0.5 mg/100 g; Ca, 0.7 mg/100 g; Fe, 0.2 mg/100 g; Cu, 49.0 ng/100 g; Zn, 8.0 ng/100 g.

bacto yeast extract 5 g, NaCl 5 g を加え, 滅菌後, 1N-NaOH 溶液で pH 7.2 に調整した。

(3) LB plate: 蒸留水 1000 ml に polypepton 10 g, bacto yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar powder 15 g を加え滅菌した後, 別に滅菌しておいた 0.5 M- MgSO_4 溶液を 3.3 ml 加えた。

(4) Rifampicin plate (Rif plate): 蒸留水 1000 ml に polypepton 10 g, bacto yeast extract 5 g, NaCl 5 g, agar powder 15 g を加えて滅菌後, 1N-NaOH 液で pH 7.2 に調整し, Rifampicin 80 mg を加え, plate に 20 ml ずつ分注した。

(5) VB plate: 蒸留水 600 ml に $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, Glucose 15 g, agar powder 15 g を加えたものと, 蒸留水 400 ml に citric acid 2 g, K_2HPO_4 10 g, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.5 g を加えたものを滅菌後, 混合し, plate に 20 ml ずつ分注した。

(6) green tea extract (GTE) は京都府立医科大学の山根哲郎教授から供与されたもので, その組成は Table 2 に示した。

(7) 緑茶の浸出液: 3 種の茶の葉, すなわち煎茶, 玉露および紅茶 (各 10 g) を 80°C の蒸留水 100 ml に 2-3 分間浸出させた。

(8) 各抗酸化物質の濃度: 本実験で用いられた各抗酸化物質は H_2O , DMSO のいずれかに溶解し, 各濃度に調整した。

(9) 滅菌はすべて autoclave による加圧蒸気滅菌である。また使用された化学物質および試薬はすべて nacalai tesque 株式会社より購入した。

1-2 使用菌株

本実験に使用した大腸菌とその遺伝特性を Table 1 に示した。これらの菌株はいずれも本研究室で作製したが, その方法は 1-3-3 実験方法で述べる。DSH は同志社を意味する。

1-3 実験方法

(1) *mutT* 欠損株の作製 (Fig. 2)

mutT 遺伝子は, 大腸菌の genome 上約 2.5 min の位置に *secA* 遺伝子と *guaC* 遺伝子の間に位置している事が

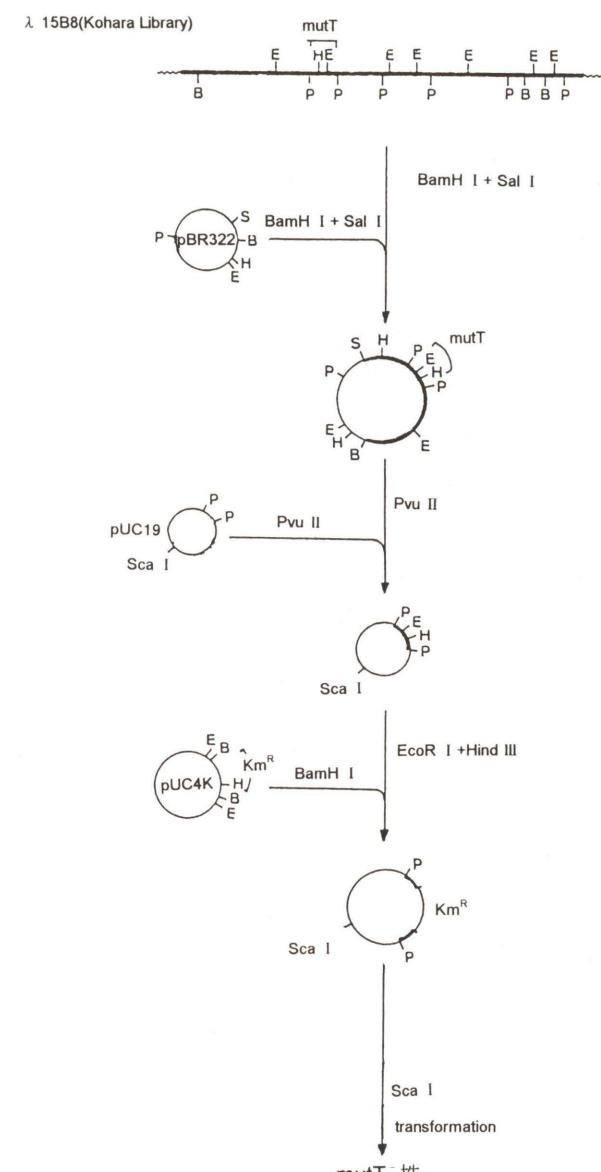


Fig. 2. Scheme of molecular cloning and constructing of deletion-mutant and overproduction-plasmid of *mutT* gene.

知られている。大腸菌の 2.5 min 付近を増幅するために Kohara の大腸菌 DNA library を用いた。*mutT* を含む 23k の大腸菌 genome をもつ No. 15B8 の phage clone から *mutT* 部分を回収した。*mutT* 遺伝子は start codon から stop codon まで全長 876 bp の比較的分子量の小さい遺伝子であり蛋白である。

λ phage 15B8 を大腸菌に感染させ大量に回収した後, polyethyleneglycol による殻取り操作を施し, 更に gel 濾過により RNA や蛋白質等の不純物を除去し 15B8 の DNA を回収した。この DNA より BamHI-SalI の制限酵素で切り出される *mutT* を含む 12.5 K の断片を切り出し, pBR322 に, sub-cloning した。この sub-cloning した BamHI-SalI 断片を plasmid 上で増幅し, plasmid を回収した後 gel 濾過により精製し, *mutT* を含むさらに小さな断片 PvuII-PvuII (0.9k) を切り出した。

同じく *PvuII* で切断を行った high copy plasmid pUC19を調整し、これに *mutT* 断片を ligation 操作により組み込んだ。更に、*mutT* 遺伝子中の EcoRI HindIII 部位(384-587)を plasmid から取り除き、plasmid pUC4K から切り出した kanamycin (Km) 耐性 cassette を組み込んだ。この操作で *mutT* 遺伝子の上流の一部と下流の一部を持ち、Km 耐性 cassette を組み入れた断片を持つ plasmid を得たことになる。

この plasmid を、liner な断片にするために、*ScalI* で切断し、*recD* 欠損株 JC7623 に transform することにより大腸菌 genome 上の正常な *mutT* と plasmid 上の不完全な *mutT* の組換えを起こさせ、*mutT* 欠損株であることを確認した。

(2) 形質導入

(A) 供与 phage 溶液の調整

Over night (ON) culture を LB medium で 10 倍に希釈し、log phase ($OD_{600}=0.4\sim0.5$) に達するまで緩やかに振盪培養した。この培養液 0.8 ml をとり、20 mM-CaCl₂ を 0.1 ml 加えた後、さらに phage 液を 0.1 ml 加え、37°C で約 15 分間静置培養した。これに soft agar 3.5 ml を加え、LB plate に重層し、plaque が現れるまで(4~8 hr) 培養した。LB 液 2.5 ml を加え、37°C で 15 分間放置後、spreader で soft agar をかきとり、よく混ぜた後、soft agar を含む 5 ml を回収した。これに chloroform を 2 滴加え、3000 rpm で遠心分離した上清を phage 液とした。

(B) 形質導入法

受容菌の ON culture を LB 液で 10 倍に希釈し、log phase ($OD_{600}=0.4\sim0.5$) に達するまで緩やかに振盪培養した。この培養液 9 ml をとり、20 mM-CaCl₂ を 1 ml 加えてよく攪拌し、さらに (A) で調整した phage を 0.05 ml 加えて、15 分間氷冷した後、37°C で 20 分間静置培養した。これを遠心分離により集菌し、抗生物質を加えた LB plate に spread して、37°C で一晩培養した。得られた抗生物質耐性 clone から活性酸素感受性株を分離し実験に用いた。

実際には上記の P1 phage を用いた形質導入法により DSH71 株を作製した。その手順は供与菌より kanamycin 耐性 (Km^R) cassette を組み込んだ *mutT* 遺伝子をそれぞれ受容菌 CSH7 (wild) へ導入操作した後、Km^R 遺伝子を marker とする selection を行い、O₂⁻ 増産剤に対する感受性によってそれぞれ分離した。

(3) 菌培養

各菌株を培養液 (LB medium) に接種し、対数期 (1~3 $\times 10^8$ cells/ml) に達するまで 37°C で振盪培養し ON culture とした。

(4) SM 率の測定

DSH71 の ON culture 1 ml, LB medium 8 ml, 各 sample 溶液 1 ml を定常期に達するまで 37°C で一晩振盪培養し、3800 rpm で 15 分遠心分離した後、M9 で 1/10 量に

懸濁した。

(A) 生存菌数の測定

再懸濁液を M9 で、さらに適当な濃度に希釈し、LB plate に 0.1 ml を spread して、37°C で一晩培養後、colony 数を計数し、生存菌数を求めた。

(B) SM 菌数の測定

再懸濁液 0.1 ml を rifampicin plate に spread して、37°C で 2 日間培養後、生えてきた rifampicin 耐性 colony を計数し、SM 数を求めた。

2. 結果および考察

DSH71 および DSH191 の Rifampicin 感受性から抵抗性への前進変異の SM 頻度をそれぞれの親株と比較して、Table 3 に示した。各菌株の約 10⁸ cell が plate にまかれたが、DSH71 の SM 頻度は 216/plate で、親株 CSH7 の 13.5 倍である。また DSH191 の SM 頻度は 1081 で、親株 UM196 の 49.1 倍である。各抗酸化物質および extract による自然突然変異への影響の実験には DSH71 を用いた。また各物質の濃度は、いずれも致死作用をもたらさない濃度とした。

各物質の抑制効果を、Figs. 3~6 に示した。横軸は各物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{plate}$)、縦軸は RMA [%] (relative mutation activity = (mutation frequency of treated cells)/(mutation frequency of control) $\times 100$) である。Fig. 3 に示されるように、PG, PC および TA は、1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の低濃度で強い抑制効果を示した。さらに高い濃度で処理しても効果はほぼ横這いであった。抑制効果は TA が最も強く、約 25% まで、ついで PG が約 30%, PC が約 50% までであった。

vitamin 類では、Fig. 4 に示されるように、 β -C が polyphenol の場合と類似の傾向を示し、低濃度で強い抑制効果を示し、高濃度ではその効果は徐々に強められる程度であった。AsA は、低濃度から高濃度にかけて徐々に効果を示して通常の量効果関係が認められた。

GTE の効果は Fig. 5 に示されるように、AsA に類似の抑制を示したが、濃度は AsA の約 1/10 で AsA なみの効果が認められた。3 種の茶浸出液では 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ で、いずれも 25% 前後の抑制を示した。これらの結果は、これら物質の抗酸化作用が、細胞に constitutive に発生する酸素 radical を捕捉し、radical 性 SM を抑制するためと思われる。

緑茶抽出物 (GTE) が発がんの抗 promotion 作用を持ち (Inagaki *et al.*, 1993), 活性酸素 radical の scavenging

Table 3. Number of spontaneous mutants.

Strain	Mutants/plate
CSH7	16 \pm 3
DSH71	216 \pm 26
UM196	22 \pm 5
DSH191	1081 \pm 55

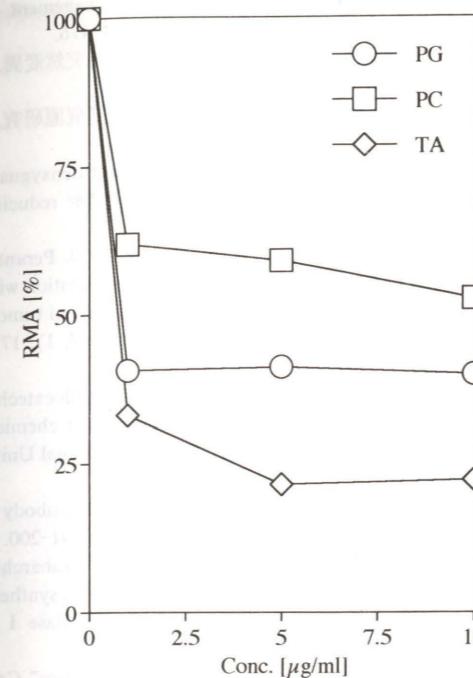


Fig. 3. Effect of pyrogallol (PG), pyrocatechene (PC) and tannic acid (TA) on spontaneous mutation in *E. coli* DSH71.

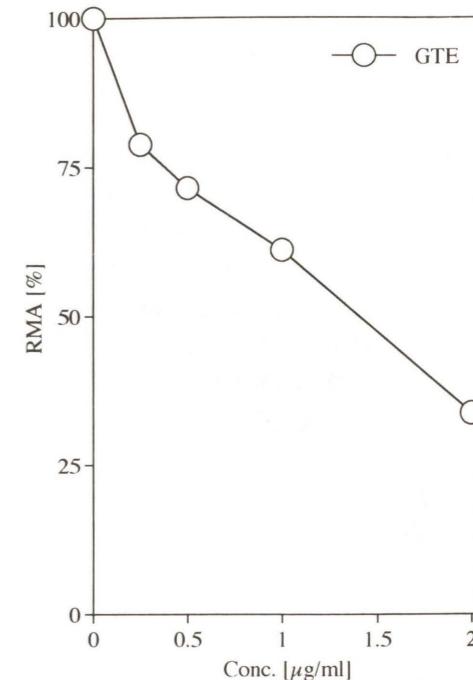


Fig. 5. Effect of green tea extract (GTE) on spontaneous mutation in *E. coli* DSH71.

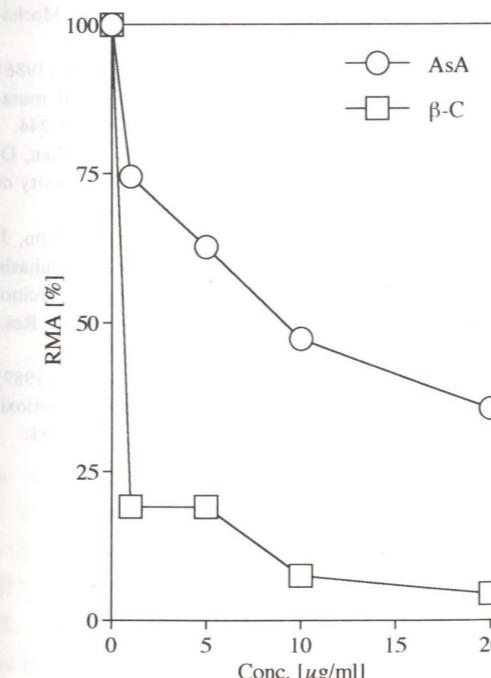


Fig. 4. Effect of ascorbic acid (AsA) and β -carotene (β -C) on spontaneous mutation in *E. coli* DSH71.

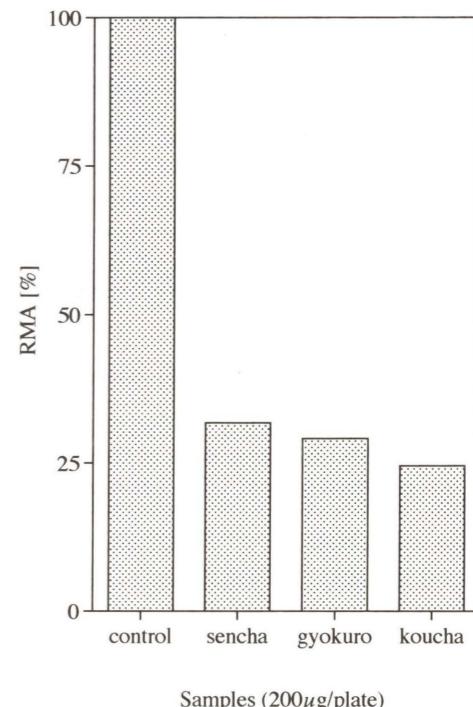


Fig. 6. Effect of 3 tea-exudations on spontaneous mutation in *E. coli* DSH71.

効果があり (Wang *et al.*, 1989; Zhao *et al.*, 1989)、また anti-oxidant 作用があることが報告されている (Osawa *et al.*, 1990)。GTE の抑制作用は、成分中の catechin 類の抗酸化作用によるものと思われる。煎茶、玉露、紅茶の浸出液の抑制効果は、茶に含まれる植物 polyphenol 類、抗酸化性 vitamin 類を大量に含んでいるためと考えられる。

大腸菌 *mutT* 遺伝子欠損株では、主として 8-OH-Gua による radical 性自然突然変異が生じていると考えられる。8-OH-Gua は、X 線、H₂O₂ と asbestos との共存、タバコの煙濃縮物、かみタバコ、nickel 化合物などのヒト発がんに関連すると思われる因子を *in vitro* で DNA に作用させることにより生じることが知られている。Fenton 反応や Haber-Weiss 反応により生じる hydroxy radical

(·OH) が 8-OH-Gua の生成に関与していると考えられる。

8-OH-Gua は、Cytosine (C) だけではなく、Adenine (A) とも相補性を示し、塩基対形成により AT→CG transversion が起こる。8-OH-Gua は MutT 蛋白により防御されているが、DNA 複製の際、nucleotide pool 中の DNA 複製材料の dGTP が酸化的損傷を受け、8-OH-dGTP となる。これが新しく合成された DNA 鎖に取り込まれると突然変異をおこすので、MutT 蛋白が 8-OH-dGTP を 8-OH-dGMP に分解することによって DNA 鎖への取り込みを防ぎ突然変異を抑制する（葛西、1992）。このため *mutT* 遺伝子欠損株は SM をおこしやすいと考えられる。

本研究で見られたように、植物 polyphenol 類、vitamin 類、GTE や茶浸出液の radical 性 SM の抑制効果の主な機構は、細胞内に生成した hydroxy radical (·OH) の無毒化 (·OH→H₂O) による 8-OH-dGTP の生成の抑制であると思われる。

酸化されやすい、もしくは還元力が強いという性質を有する物質は、抗酸化物質として働き、活性酸素の scavenging 効果があると思われる。このような作用を有する物質は、発がん initiation を抑制するのみならず、promotion をも抑制する可能性も有る。本研究の結果より、植物 polyphenol 類や vitamin 類の積極的な摂取、さらに日常的な緑茶の飲用が自然発がんの抑制や予防に有用である可能性が示唆された。

謝 辞

GTE の供与を賜った京都府立医大の山根哲郎教授に厚く感謝する。

参考文献

In: Takahashi, T. editor. Recent advances in management of digestive cancers. Tokyo: Springer-Verlag, pp. 474-476.

葛西 宏 (1988) 酸素ラジカルによる DNA 損傷と突然変異、環境変異原研究, **10**, 73-83.

葛西 宏 (1992) 活性酸素研究の立場から、環境変異原研究, **14**, 93-98.

Kasai, H. and M. Sekiguchi (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents, Nucl. Acids Res., **12**, 2137-2141.

Kasprzak, K. S., K. Higinbotham, B. A. Diwan, A. O. Perantoni and J. M. Rice (1990) Correlation of DNA base oxidation with the activation of *K-ras* oncogene in nickel-induced renal tumors (Meeting Abstract), Free Rad. Biol. Med., **9** (Suppl. 1), 172-177.

Kuwata, K. (1993) Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate, a component of green tea, on the process of chemical carcinogenesis in gastrointestinal tract, Kyoto Prefectural Univ., **102**(10), 1183-1193.

Leaden, S. A. and P. C. Hanawalt (1983) Monoclonal antibody to DNA containing thymine glycol, Mutat. Res., **112**, 191-200.

Loewen, P. C., B. L. Triggs, C. S. George and B. E. Hrabarchuk (1985) Genetic mapping of *katG*, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., **162**, 661-667.

Miller, J. N. (1972) "Experiments in Molecular Genetics" Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.

Osawa, T., M. Namiki and S. Kawakishi (1990) Role of dietary antioxidants in protection against oxidative damage. In: Kuroda, Y., D. M. Shankel and M. D. Waters, editors. Basic Life Science, Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II, Vol. 52, New York: Plenum Press, pp. 39-153.

Shimo, K., Y. Nakamura, I. Tomita, Y. Hara and T. Kada (1986) The pyrogallol related compounds reduce UV-induced mutations in *Escherichia coli* B/r WP2, Mutat. Res., **173**, 239-244.

Wang, Z. Y., S. J. Cheng, Z. C. Zhou, M. Athar, W. A. Khan, D. R. Bickers and H. Mukhtar (1989) Antimutagenic activity of green tea polyphenols, Mutat. Res., **223**, 273-289.

Yamane, T., N. Hagiwara, M. Tateishi, S. Akachi, M. Kim, J. Okuzumi, Y. Kitao, M. Inagaki, K. Kuwata and T. Takahashi (1991) Inhibition of Azoxymethane-induced Colon Carcinogenesis in Rat by Green Tea Polyphenol Fraction, Jpn. J. Res., **82**, 1336-1339.

Zhao, B., X. J. Li, R. G. He, S. J. Cheng and W. J. Xin (1989) Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals, Cell Biophys., **14**, 175-181.

Environ. Mutagen Res., **18**: 47-51 (1996)

第24回大会ミニシンポジウム
「抗変異・抗発がんとラジカル」

食品におけるフリーラジカル性変異原の生成とその阻止

Formation of free radical mutagens in foods and its prevention

菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太

Kiyomi Kikugawa, Kazuyuki Hiramoto and Tetsuta Kato

東京薬科大学薬学部 192-03 東京都八王子市堀之内 1432-1

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

(受理: 1996年2月5日)

Summary

Free radicals generated in food caused DNA damage and the formation of mutagens in the food. Scavenging of the free radicals by phenolic anti-oxidants effectively prevented DNA damage and formation of mutagens. Carcinogenic 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt (HMBD) in fresh mushroom damaged DNA via the carbon-centered 4-(hydroxymethyl)phenyl radical, and this damage was inhibited by phenolic anti-oxidants. Fragrant components 4-hydroxy-3(2H)-furanones (HHMF, DMHF and HMF), found in the Maillard reaction mixture of glucose/glycine and soy sauce, generated hydroxyl radical which broke the DNA strands. Strand breaks caused by the hydroxyl radical were prevented or accelerated by phenolic anti-oxidants. Heterocyclic amine mutagens in the model system and in bonito were found to be formed through free radical Maillard intermediates. Formation of the mutagens was prevented by scavenging of the radicals by phenolic anti-oxidants.

Keywords: carbon-centered radical, hydroxyl radical, Maillard reaction, phenolic anti-oxidant

1. はじめに

フリーラジカルは変異原の生成および発現に係わっていると考えられているにも拘らず、その実態の多くは不明であった。フリーラジカルと変異原発現との係わりは、環境中で変異原が生成する過程、環境中の成分が遺伝子障害を引き起こす過程、環境因子が体内で代謝をうけたのち遺伝子障害を引き起こす過程の3つに分けて考えることができる。ここでは、筆者らの研究を中心に食品中の変異原生成過程における係わりとその阻止、および食品中の成分が遺伝子障害を起こす場合の係わりとその阻止について述べる。

2. キノコの発癌物質の炭素中心フリーラジカルを経由するDNA障害とその阻止

新鮮な西洋キノコ *Agaricus bisporus* には発癌物質 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium 塩 (HMBD) が含ま

れている (Toth *et al.*, 1981, 1982)。筆者らは既に類似の芳香族 diazonium 塩が窒素分子の脱離により炭素中心ラジカルを生成し DNA 塩基部および鎖を攻撃して DNA 障害を引き起こすことを見いだしていた (Hiramoto *et al.*, 1993a; Hiramoto *et al.*, 1994a; Hiramoto *et al.*, 1994b; Kato *et al.*, 1992; Kikugawa *et al.*, 1992) ので、HMBD も同様な DNA 障害を引き起こすと考え検討した (Hiramoto *et al.*, 1995a; Hiramoto *et al.*, 1995b)。HMBD をスピントラップ剤の DMPO, PBN および DBNBS と混ぜ ESR スペクトルを測定すると Fig. 1 に示すシグナルが認められ、このシグナルから炭素中心ラジカルが発生していることが確認された。HMBD を水素供与体 ethanol と混ぜると benzyl alcohol の生成が認められ、生成した炭素中心ラジカルは 4-(hydroxymethyl)phenyl radical であることをついた。HMBD は DNA 鎖切断を引き起こし、切断は ethanol などの水素供与体、butyl hy-

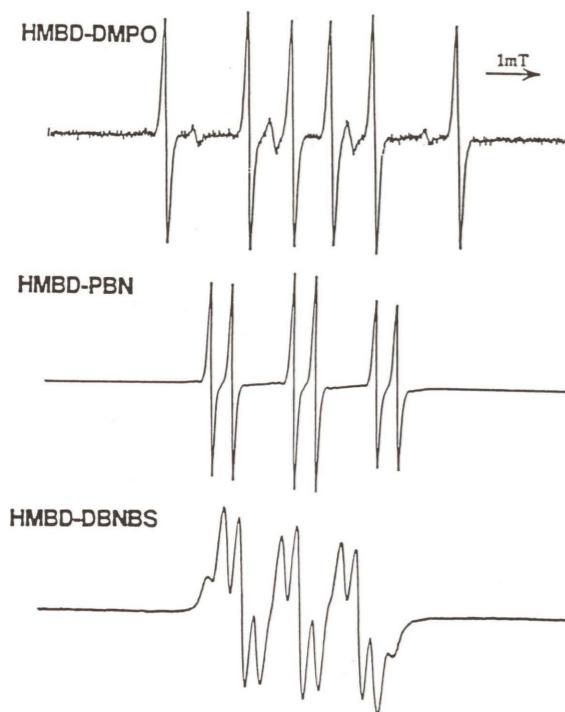


Fig. 1. ESR spectra of HMBD and spin-trapping agents.

droxyanisole (BHA) などのフェノール性抗酸化剤、スピントラップ剤で阻害されたが、superoxide dismutase と catalase の共存下では阻害されず、炭素中心ラジカルが直接 DNA 鎮を攻撃していることがわかった。HMBD によって DNA の塩基部はすべて修飾されるが、プリン塩基においては 8 位がラジカルで攻撃されることがわかった。以上のことから、HMBD による DNA 障害は炭素中心ラジカルを介して起こり、酸素中心ラジカルを経ることなく起こることが明かになった (Fig. 2)。筆者らとは完全に独立に HMBD の発見者のグループ (Lawson *et al.*, 1995) によっても同様な報告がなされている。HMBD は小核誘発作用を示すが、vitamin E 欠乏ラットではその作用が増強され、vitamin E などのフェノール性抗酸化剤が炭素中心ラジカルの作用を軽減することもわかった (加藤ら, 1995)。

3. メイラード反応を起こした食品に存在するフラノン化合物による酸素中心ラジカルを経由する DNA 障害

アミノ酸と糖のメイラード反応は多くの生成物を生じるが、その反応液の変異原性や抗変異原性については多くの知見があるにも拘らず、本体に関してはほとんどわからていなかった。筆者らはアミノ酸と glucose を加熱すると DNA 鎮切断物質が生じることをつきとめ (Hiramoto *et al.*, 1993b; Hiramoto *et al.*, 1994c), それは化学発光や一重項酸素を発する物質とは異なることを明かにした。アミノ酸と六炭糖を水溶液中加熱し、DNA の切断活性でモニターしながら、酢酸エチル抽出および HPLC により切断活性物質を精製した (Hiramoto *et al.*, 1995c)。その結果、切断物質の一つは既にわかっている芳香性物質 4-hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-3(2H)-furanone (HHMF) (Fig. 3) であることがわかった。HHMF は反応液中の弱酸性では安定であるが、pH 7 では分解しやすく、分解と同時に酸素に依存した DNA 鎮切断を起こす。切断活性は superoxide dismutase, catalase, 鉄キレート剤により抑えられ、DMPO をスピントラップ剤として用いた ESR の検討により、DMPO-OH adduct が検出された。HHMF は Fig. 4 に示すように pH 7 で還元性の endiol-ketol 構造の化合物に分解し、酸素を還元して superoxide になり、過酸化水素に不均化し、更に Fenton 反応により hydroxyl radical になって DNA 鎮切断を起こすものと考えられる。HHMF は弱いながら代謝活性化なしに *Salmonella typhimurium* TA100 株に対して変異原性を示した。メイラード反応液中には DNA 鎮切断作用をもつ類似の 4-hydroxy-3(2H)-furanone 類が複数存在する可能性が高く、メイラード反応液中のこれら 4-hydroxy-3(2H)-furanone 類の酸素中心ラジカル発生による DNA 鎮切断や変異原性は無視できないものと考えられる。

多くの食品に存在することが報告されている芳香物質 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF) (Fig. 3) は試薬として市販されており、検討した結果、本物質も

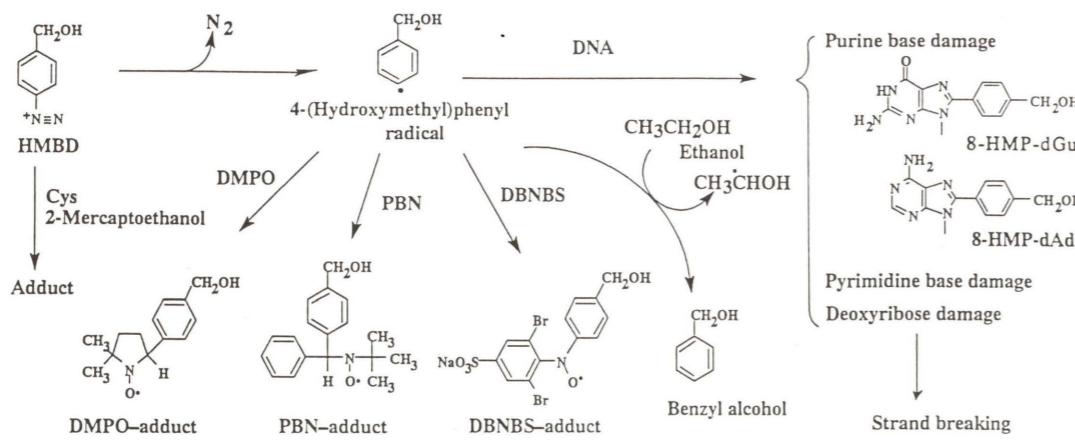


Fig. 2. Reaction of HMBD through carbon-centered radical.

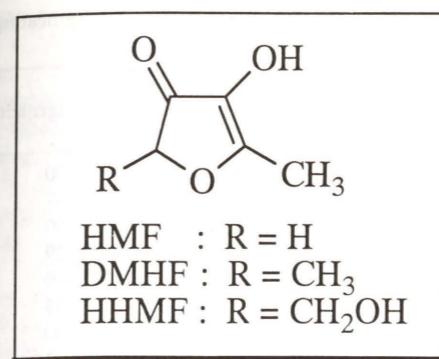


Fig. 3. Structures of 4-hydroxy-3(2H)-furanones.

HHMF と全く同様に hydroxyl radical を発生して DNA 鎮切断を引き起こし、変異原性をもつことがわかった (Hiramoto *et al.*, 1996a)。

メイラード反応を起こしている醤油について類似の生成物を探索した。上記と同様な検討の結果、醤油自身、直接 DNA 鎮切断活性を示し、活性成分の一つとして、芳香物質 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (HMF) (Fig. 3) を同定した (Hiramoto *et al.*, 1996b)。本物質はアミノ酸と五炭糖のメイラード反応により生成すると考えられ、HHMF, DMHF と同様な機構 (Fig. 4) で hydroxyl radical を発生して DNA 鎮切断を引き起こすことがわかった。HMF も変異原性を示した。これまで複雑な成分からなる醤油に変異・発癌性が認められた報告はないが、このようにその成分に変異原性があるとなれば、醤油の変異原性もあらためて見直す必要があろう。

コーヒーもメイラード反応を起こしている食品である。上記と同様の検討により DNA 鎮切断活性をもつ新しい変異原を見いだした (Kato *et al.*, 1994)。この切断活性の一部は 4-hydroxy-3(2H)-furanone の一種と考えられ、hydroxyl radical を発生して DNA 鎮切断を引き起こすと考えらる。

4. ヒドロキシルラジカルスカベンジャーとしてのフェノール性抗酸化剤

Hydroxyl radical が発生している系では一般にフェノール性抗酸化剤が scavenger としてはたらくとされているが、逆の prooxidant としてはたらくという知見もみうけられる。筆者らは Fenton 反応により生成した hydroxyl radical の DNA 鎮切断に対するフェノール性抗酸化剤の効果を検討したところ、OH 基の少ない sesamol, esculetin などは阻害効果を示したが、OH 基の多い epigallocatechin (EGC) や epigallocatechin gallate (EGCG) などは prooxidant としてはたらき DNA 鎮切断を増強した (Hiramoto *et al.*, 1996c)。このことはフェノール性抗酸化剤は一概に hydroxyl radical を消去するとはいいがたく、条件によっては増強作用を示すことを物語っている。

5. 加熱食品中のヘテロサイクリックアミン生成におけるフリーラジカルの関与とその阻止

加熱食品中にはおよそ 20 種の imidazoquinoline, imidazoquinoxaline, imidazopyridine 系のヘテロサイクリックアミン変異発癌物質の生成が認められている。これらの生成はアミノ酸、糖および creatinine が反応して生成することがわかっているが、その生成機構は必ずしも明かではない。近年、これらの生成にフリーラジカルが関与しているとの仮説がある (Pearson *et al.*, 1992) が、その関与を裏付けているのは BHA を添加したハンバーグに変異原の生成が少ないという知見だけである (Wang *et al.*, 1982)。

筆者らは焼肉、かつお節、およびモデル系の glucose/glycine/creatinine を diethylene glycol-water 中加熱した系での MeIQx などの imidazoquinoxaline 型ヘテロサイクリックアミン変異原の生成におけるフリーラジカルの関与と、その水分およびフェノール性抗酸化剤による阻止を検討した (Kikugawa and Kato, 1987; Kato *et al.*, 1996)。その結果、かつおおよびモデル系ともに水分が高いと変異原の生成は抑制され、また、いずれにおいても、

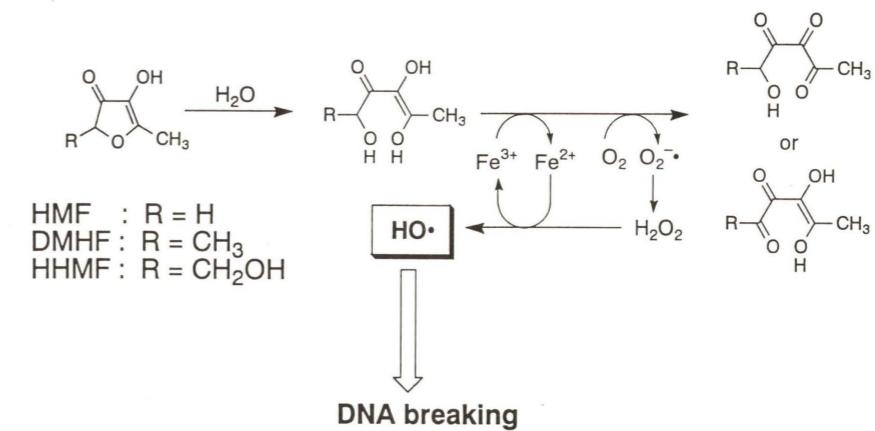


Fig. 4. Possible mechanisms for DNA strand breaking by 4-hydroxy-3(2H)-furanones.

Table 1. Effect of pretreatment of bonito meat with EGCG and green tea extract on the mutagen formation during heating-and-drying.

Pretreatment	Heating-and-drying		His ⁺ revertants/g weight	% Mutagenicity
	Temperature	Time (h)		
Water	a	24	118	100
0.5% EGCG	a	24	55	47
Water	a	48	416	100
0.5% EGCG	a	48	122	29
Water	b	24	1582	100
5% Green tea extract	b	24	450	28
Water	b	48	1201	100
5% Green tea extract	b	48	367	31

Two pieces of 20 g bonito meat were pretreated by boiling in 500 ml of water, 0.5% EGCG solution or 5% green tea extract for 40 min, and they were heated-and-dried at temperature a (100–110°C) or b (110–120°C) for 24 or 48 h. After purification of the mutagens using blue rayon, the mutagenicity was tested on *S. typhimurium* TA98 with metabolic activation.

BHA, propyl gallate, sesamol, esculetin, EGCG および EGCG を多量に含む緑茶抽出液を添加することにより変異原の生成が抑制された。かつての加熱加工における EGCG と緑茶抽出液による前処理の効果を Table 1 に示す。

モデル反応系の直接の ESR 測定では signal は認められなかったが、これから creatinine を除いた単純なメイラード反応系では pyrazine cation radical と、いわゆる melanoidin radical が認められた。この系の水分を高めると signal は認められなかった。また、この系に BHA, sesamol, EGCG を添加すると signal は認められなくなつた。

また、モデル反応系に DMPO および PBN のスピントラップ剤を加えて ESR を測定すると DMPO および PBN と炭素中心ラジカルの adduct の signal が認められた。これらの signal は水分を高めたり、BHA, sesamol, EGCG を加えたりすると signal 強度が著しく減少した。これらの事実は水分を高めたり、フェノール性抗酸化剤を添加することによる変異原の生成低減効果とよく呼応しており、変異原の生成に pyrazine cation radical や炭素中心ラジカルが寄与していることを示唆している。高含量の水分やフェノール性抗酸化剤はフリーラジカル性のメイラード反応中間体の生成を抑制することにより、変異原の生成を抑えていると考えられる。フェノール性抗酸化剤の使用は加熱食品の変異原の低減に実用化できる可能性もある。

6. おわりに

食品中には様々な形でフリーラジカルが発生し、それが直接 DNA に障害を与えること、またフリーラジカルが原因となって変異原を生成したりすることがわかった。これらフリーラジカルをフェノール性抗酸化剤でトラップすることにより、DNA 障害を抑制したり、食物中の変異原の生成を抑制できることも明かになった。しかし、フェノール性抗酸化剤も条件によっては prooxidant になることを忘れてはなるまい。

Mutat. Res., 359, 119–132.

Kato, T., T. Harashima, N. Moriya, K. Kikugawa and K. Hiramoto (1996) Formation of the mutagenic/carcinogenic imidazoquinoline-type heterocyclic amines through the free radical Maillard intermediates and its inhibition by phenolic antioxidants, *Carcinogenesis*, submitted for publication.

Kato, T., K. Hiramoto and K. Kikugawa (1994) Possible occurrence of new mutagens with the DNA breaking activity in coffee, *Mutat. Res.*, **306**, 9–17.

Kato, T., K. Kojima, K. Hiramoto and K. Kikugawa (1992) DNA strand breakage by hydroxyphenyl radicals generated from mutagenic diazoquinone compounds, *Mutat. Res.*, **268**, 105–114.

加藤哲太, 日景しおり, 菊川清見 (1995) 5-Diazouracil および 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium 塩のマウス末梢血における小核誘発作用の vitamin E 欠乏による増強, 環境変異原研究, **17**, 187–190.

Kikugawa, K. and T. Kato (1987) Effect of water content on the generation of mutagenicity in heated fish meats, *Eisei Kagaku*, **33**, 62–65.

Kikugawa, K., T. Kato and K. Kojima (1992) Substitution of p- and o-hydroxyphenyl radicals at the 8-position of purine nucleosides by reaction with mutagenic p- and o-diazoquinones, *Mutat. Res.*, **268**, 65–75.

Lawson, T., P. M. Gannett, W.-M. Yau, N. S. Dalal and B. Toth (1995) Different patterns of mutagenicity of arenediazonium ions in V79 cells and *Salmonella typhimurium* TA102: Evidence for different mechanisms of action, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2627–2635.

Pearson, A. M., C. Chen, J. I. Gray and S. D. Aust (1992) Mechanism(s) involved in meat mutagen formation and inhibition (Hypothesis paper), *Free Rad. Biol. Med.*, **13**, 161–167.

Toth, B., D. Nagel and A. Ross (1982) Gastric tumorigenesis by a single dose of 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium ion of *Agaricus bisporus*, *Br. J. Cancer*, **46**, 417–422.

Toth, B., K. Patil and H. Jae (1981) Carcinogenesis of 4-(hydroxymethyl)benzene diazonium ion (tetrafuluoroborate) of *Agaricus bisporus*, *Cancer Res.*, **41**, 2444–2449.

Wang, Y., L. L. Vuolo, N. E. Spingarn and J. H. Weisburger (1982) Formation of mutagens in cooked foods V. The mutagen reducing effect of soy protein concentrates and antioxidants during frying of beef, *Cancer Lett.*, **16**, 179–189.

参考文献

Hiramoto, K., R. Aso-o, H. Ni-iyama, S. Hikage, T. Kato and K. Kikugawa (1996a) DNA strand break by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone, a fragrant compound in various foodstuffs, *Mutat. Res.*, **359**, 17–24.

Hiramoto, K., M. Inoue, K. Maeda, T. Kato and K. Kikugawa (1994a) Generation of a carbon-centered radical with DNA-breaking activity from mutagenic fluorene-2-diazonium salt, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 414–421.

Hiramoto, K., H. Johkoh, K. Sako and K. Kikugawa (1993a) DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH), *Free Rad. Res. Commun.*, **19**, 323–332.

Hiramoto, K., M. Kaku, T. Kato and K. Kikugawa (1995a) DNA strand breaking by the carbon-centered radical generated from 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt, a carcinogen in mushroom *Agaricus bisporus*, *Chem. -Biol. Interact.*, **94**, 21–36.

Hiramoto, K., M. Kaku, A. Sueyoshi, M. Fujise and K. Kikugawa (1995b) DNA base and deoxyribose modification by the carbon-centered radical generated from 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium salt, a carcinogen in mushroom, *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 356–362.

Hiramoto, K., T. Kato and K. Kikugawa (1993b) Generation of DNA-breaking activity in the Maillard reaction of glucose-amino acid mixtures in a solid system, *Mutat. Res.*, **285**, 191–198.

Hiramoto, K., T. Kato and K. Kikugawa (1994b) Mechanisms of the DNA breaking activity of mutagenic 5-diazouracil, *Mutat. Res.*, **306**, 153–163.

Hiramoto, K., K. Kido and K. Kikugawa (1994c) DNA breaking by Maillard products of glucose-amino acid mixtures formed in an aqueous system, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 689–694.

Hiramoto, K., N. Ojima, K. Sako and K. Kikugawa (1996c) Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 558–563.

Hiramoto, K., K. Sekiguchi, R. Aso-o, K. Ayuha, H. Ni-iyama, T. Kato and K. Kikugawa (1995c) DNA strand breaks induced through active oxygen radicals by fragrant component 4-hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-3(2H)-furanone in Maillard reaction of hexose/amino acid, *Fd Chem. Toxicol.*, **33**, 803–814.

Hiramoto, K., K. Sekiguchi, K. Ayuha, R. Aso-o, N. Moriya, T. Kato and K. Kikugawa (1996b) DNA breaking activity and mutagenicity of soy sauce: Characterization of the active components and identification of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone,

野菜抽出物および食用油の抗脂質ラジカル活性と抗DNA
切断作用: がん予防と抗ラジカル活性Anti-lipid-peroxide radical activity of vegetable extracts and plant oils,
and their suppressive effect against DNA cleavage induced by
alkylperoxide radicals: Implication in cancer prevention

前田 浩

Hiroshi Maeda

熊本大学医学部微生物学教室 860 熊本市本荘2丁目2-1

Department of Microbiology, Kumamoto University School of Medicine,
2-2-1 Honjo, Kumamoto, 860 Japan

(受理: 1996年3月12日)

Summary

It is known that diet high in fat and red meat has a high correlation in cancer incidence. Fat, especially unsaturated fat, is readily oxidized to become lipid hydroperoxide. Reaction between lipid hydroperoxides (alkylhydroperoxide; ROOH) and heme iron (derived from red meat) form a lipid radical (alkylperoxide radical; ROO[·]). A reaction between heme/iron and *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH or ROOH) yields *t*-BuOO[·] (or ROO[·]) which has an apparently very long half life, and it exhibits much more potent biological activity such as bactericidal action or DNA strand breakage than *t*-BuOOH per se. Using the ROO[·](*t*-BuOO[·]) generating system we have quantified the ROO[·] scavenging potency of vegetable and plant (beans, tea) extracts. Furthermore, we examined the anti-tumor-promoter effect of the vegetable/plant extracts. There was a significant correlation between anti-tumor-promotor activity and anti-ROO[·] activity, in which greener the vegetable, the higher in both values. Lastly, edible vegetable oils were examined for their susceptibility against peroxide formation, ROO[·] formation and ROO[·]-scavenging activity, and the results showed that purified/refined vegetable oils have virtually no ROO[·]-scavenging capacity, while virgin/extravirgin olive oil, and crude oils from sesame, corn germ, rape seeds, had much higher lipid radical scavenging activity in this order, as well as resistant against air oxidation, than the commercial purified oils. Animal experiments, using rats which administered with *N*-methyl-*N*-nitrosourea, 2 mg × 6/2 wk, intrarectally, and being fed with the diet high in both lipid (safflower oil) and iron (hemoglobin), showed a significantly high incidence of colon cancer. All these data support possible carcinogenic potential of lipid radical generated by reaction with heme iron which derived from myoglobin in red meat. Importance of lipid radical scavenging components in vegetable, other plant derived foods and edible oils is discussed.

Keywords: lipid radical, green vegetables, high fat diet, DNA cleavage, carcinogenesis, edible vegetable oils

1. はじめに

近年, 油の摂取と癌死, とくに乳癌や前立腺癌の相関が疫学上データから論じられている (Cohen, L. A., 1987; Giovannucci, E. et al., 1992; Trock, B. et al., 1990). 脂質

に加えて赤身の肉の摂取もこれに正の相関があるようである (Stevens et al., 1988). 最近, マウスに移植したヒト前立腺癌の成長が総カロリー摂取が同じにも関わらず, 与えるエサ中に占める脂質の量に比例して, その腫瘍の

成長が大幅に加速することが報告され、注目されている (Wang, Y. et al., 1995)。

以上の赤身の肉と脂質の過剰摂取がいかなる機構で「がん化」に関連づけられであろうか。我々は、脂質過酸化物が重要であると考えている。それは過酸化脂質が日常的に空気酸化によって生じており、とくに後述する精製食用油は容易に過酸化物となるからである。

我々は、脂質過酸化物としての ROOH , $\text{R}-\text{R}'-\text{O}-\text{O}'$ などと、赤身の肉の成分のヘム、プロトヘム、ヘミン、ヘマチニなどとの反応によって過酸化脂質ラジカルとくにアルキルパーオキサイドラジカル (以下 ROO') が生ずることを見出した (Akaike, T. et al., 1992)。このものは他の酸素ラジカル (O_2^- , $\cdot\text{OH}$) などよりも見かけ上長い寿命 (生体内半減期 > 30 分) を有しているため、脂質が豊富な細胞膜や臓器 (乳腺、前立腺?) に蓄積することが考えられるし、腸管内で脂質ラジカルが生ずることを考えると、腸管上皮細胞に容易に接触して傷害を与える、またカイロミクロンとなってリンパ系に取り込まれて血中へ到達することが考えられる。

我々は既に ROOH とヘムの反応から生ずると考えられるラジカルとして、 ROO' , RO' (アルコキシラジカル), R' (アルキルラジカル/C-センターラジカル) があるが、 ROO' が主たる反応生成物であることを報告した (Akaike, T. et al., 1992)。

本総説では ROO' 生成とそのスカベンジャー物質、 ROO' による DNA 鎮の切断とそのスカベンジャーによる DNA 鎮の切断抑制、 ROO' スカベンジャー活性と EB-ウイルスによるトランスフォーメーションを抑制することの相互関係をあわせて概説する。また、日常的に摂取する野菜の ROO' 消去活性、精製食用油の ROO' の生成能と ROO' の消去活性もあわせて考察する。

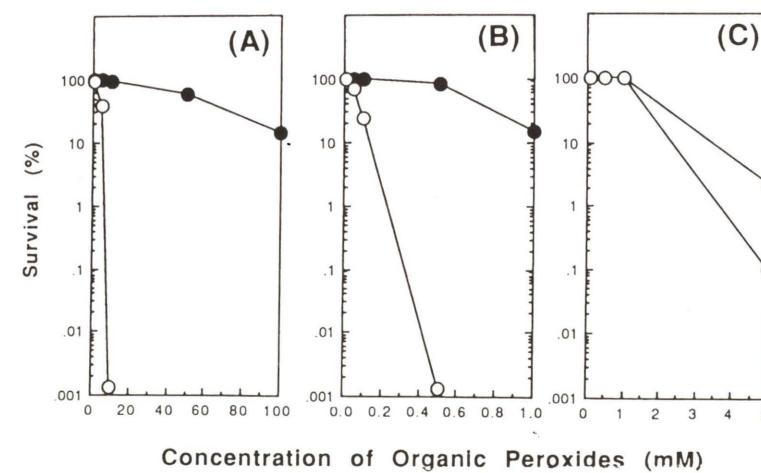


Fig. 2. Cytocidal effect observed in the reaction of various peroxides and iron complexes. *Staphylococcus aureus* ($1-2 \times 10^6$ CFU/ml) was incubated at 37°C for 30 min in various concentrations of $t\text{-BuOOH}$ (A), methyl ethyl ketone-OOH (B), or CumeneOOH, (C) in PBS with iron complexes. The number of viable bacteria was measured by the colony formation assay. (●) Control, peroxides alone; (○) incubation with peroxides and $500 \mu\text{g/ml}$ of metHb (from Akaike et al., 1992).

2. ヘムと過酸化脂質 (ROOH) の反応によるアルキルパーオキサイドラジカル (ROO') の生成と抗菌作用

実験に用いられる ROOH として、*t*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH), methyl ethyl ketone peroxide, cumene hydroperoxide, methyl linoleate hydroperoxide を用いて実験を行った。そのうちでも、*t*-BuOOH は水に易溶性のヒドロパーオキシドとして有用である。

Fig. 1 にこれら ROOH + ヘムの反応、即ち、

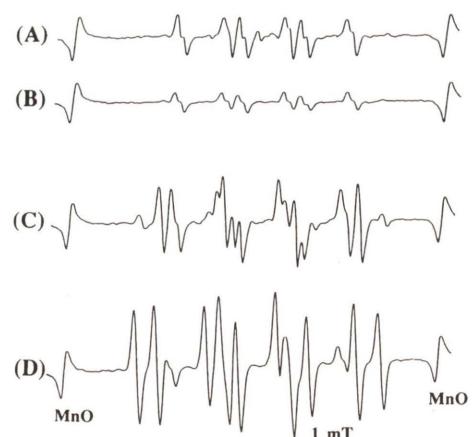
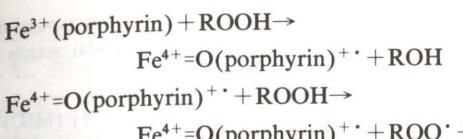


Fig. 1. ESR spectra of DMPO spin adducts in the reaction systems of *t*-BuOOH plus metHb or DTPA- Fe^{2+} . (A) Spectrum obtained in the reaction mixture of 20 mM *t*-BuOOH, 500 $\mu\text{g/ml}$ (31 μM heme iron) of metHb, 500 μM DTPA, and 9 mM DMPO in sodium phosphate buffer, pH 7.3. (B) Spectrum obtained in the reaction mixture of 20 mM *t*-BuOOH, 31 μM DTPA- Fe^{2+} , and 9 mM DMPO in the same buffer as (A). (C) Spectrum observed in the same reaction system as (A) except that the concentration of DMPO was increased to 90 mM. (D) Spectrum observed in the same reaction system as (B) except that the concentration of DMPO was increased to 90 mM. All spectra were recorded at 1 min after incubation at room temperature (from Akaike et al., 1992).



により生ずる ROO' をラジカルスピンタップ剤 DMPO により捕捉した ESR スペクトルを Fig. 1 に示す。

このラジカル分子種の生物活性の一つとして、抗菌活性を *Staphylococcus aureus* を用いてしらべたのが Fig. 2 である。これで解ったことは ROOH のままで抗菌力は弱いが、ラジカル ROO' となると抗菌力が強く発現することである。

この用いたヘム関連の各種含鉄化合物についてラジカル生成を抗菌活性でみると、Fig. 3B のように、キレート

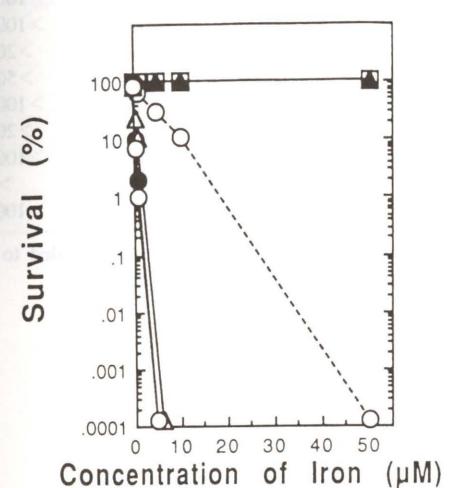


Fig. 3A. Cytocidal effect against *S. aureus* in the reaction of various iron complexes and *t*-BuOOH. *S. aureus* was incubated in a mixture of 10 mM of *t*-BuOOH and various concentrations of iron complexes at 37°C for 30 min. Incubation with metHb (●), myoglobin (○), hemin (△), cytochrome c (○), DTPA- Fe^{2+} (□), and catalase (▲). See reference (Akaike et al., 1992) for details.

剤 DTPA やカタラーゼでは生じない。また、その強さはヘモグロビン鉄の量を増加させると強くなる (Fig. 3A) (ESR のデータも同じ)。一般にヘモグロビン、メトヘモグロビン、ミオグロビン、ヘミン、ヘマチニなどでは強力な殺菌作用を発現する。これと関連して見かけ上の反応溶液中での ROO' の寿命をみるとメトヘモグロビン / ヘモグロビンが最も長く、チロクローム > カタラーゼ > DTPA-鉄錯体の順に短くなり、ヘム鉄構造をもつもののみが特に有意に長く、生体内では 30 分以上の半減期をもつと考えられる (Fig. 4)。

以上の事実をもとに、我々はバイオアッセイ法を確立したが、その方法による ROO' の定量方法は簡便であ

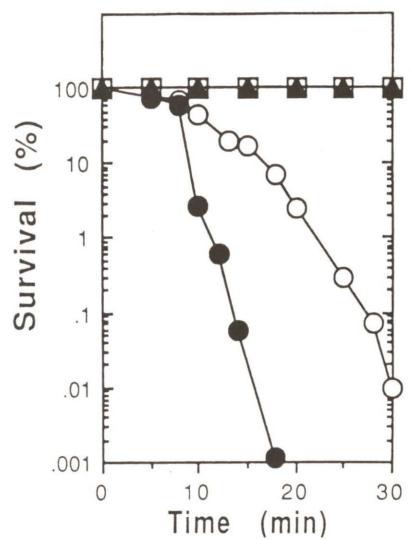


Fig. 3B. Time course of bactericidal action induced by the reaction of *t*-BuOOH and various iron complexes. *S. aureus* was incubated with 10 mM *t*-BuOOH and 500 $\mu\text{g/ml}$ metHb (31 μM heme iron) (●), 384 $\mu\text{g/ml}$ cytochrome c (31 μM heme iron) (○), 1.84 mg/ml catalase (31 μM heme iron) (□), or 31 μM DTPA- Fe^{2+} (▲) at 37°C for various incubation periods (Akaike et al., 1992).

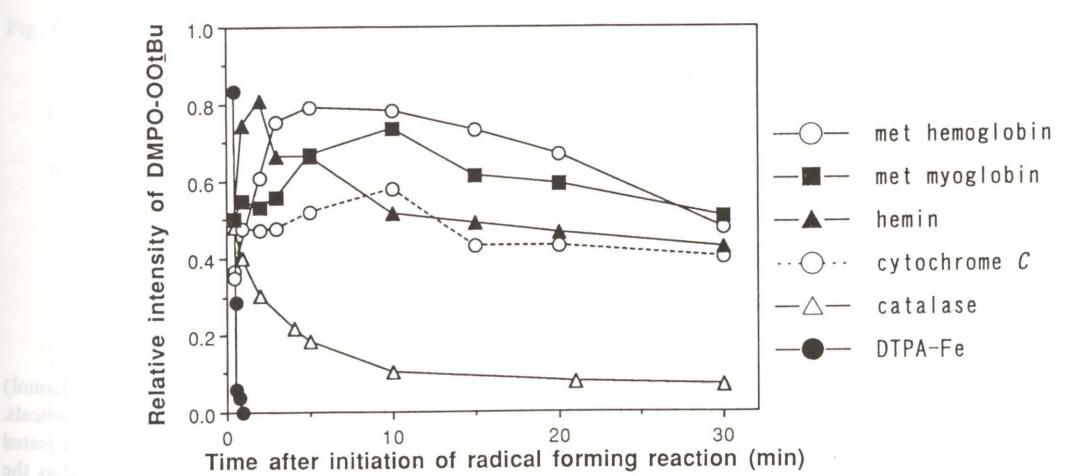


Fig. 4. Time course of generation of DMPO spin adduct for t -BuOO' in t -BuOOH + various heme or non heme iron (Akaike et al., 1992).

り、この分子種（アルキルパーオキサイド・ラジカル）のみに特異性があることから、汎用性のある方法として報告した (Akaike, T. et al., 1995)。

このような ROO^{\cdot} ラジカルの発生を予防あるいは消去する物質をこの方法を用いてスクリーニングしたところ、プロブコール、 α -トコフェロール、グルタチオン、L-システインなどが強い活性を示したが (Table 1)、興味あることにシングレットオキシゲンのスカベンジャーとして知られている β -カロテンや、メチオニン、スーパー・オキサイドスカベンジャーの尿酸やスーパー・オキサイドディスムターゼ (SOD)、エプセレン、アスコルビン酸、ヒドロキシラジカルスカベンジャーのヒアロウロン酸によるこの ROO^{\cdot} ラジカル消去作用はほとんどないか、あっても極めて弱かった (Akaike, T. et al., 1995)。

3. 野菜等のアルキルパーオキサイドラジカル (ROO^{\cdot}) 消去作用と抗プロモーター作用：加熱野菜スープの有用性

一方、この ROO^{\cdot} はルミノールを用いた光学発光法でも簡単に定出することができる、その方法を用いて次の実験を行った。即ち、我々は上記の $t\text{-BuOOH} + \text{ヘム}$ の反応が ROO^{\cdot} を特異的に生成することを利用して、 ROO^{\cdot} の中和活性を、生の野菜の冷水抽出液と 5 分間水

Table 1. Antioxidant activities of various substances determined by a bioassay based on bactericidal action of ROO^{\cdot} .

Antioxidant	Antioxidant activities (μM) (MIC)*		
	$t\text{-BuOO}^{\cdot}$	CumOO^{\cdot}	MeLOO^{\cdot}
α -Tocopherol	15.6	31.3	72.0
Probucol	31.3	7.8	3.9
L-Cysteine	125	250	15.6
Glutathione	250	125	7.8
DMPO	250	125	>10000
DPPD	125	125	>2000
L-Ascorbate	500	250	>3000
BHA	2000	>2000	31.3
<i>n</i> -Propyl gallate	500	60	500
Luminol	500	125	125
Trolox	500	125	>2000
Uric acid	1000	500	1000
BHT	>2000	>2000	31.3
PBN	>10000	>10000	>10000
Diphenylamine	>2000	>10000	>10000
Hydroquinone	>10000	>2000	>2000
Ebselen	>5000	>5000	>5000
L-Methionine	>10000	>10000	>10000
β -Carotene	>2000	>2000	>2000
Hyaluronic acid	>10000	>10000	>10000
DMSO	20%	>20%	>20%
Cu, Zn-SOD	>10000 U	>10000 U	>10000 U

* MIC indicates the minimal concentration needed to inhibit the ROO^{\cdot} -induced cytotoxicity against *S. aureus*.

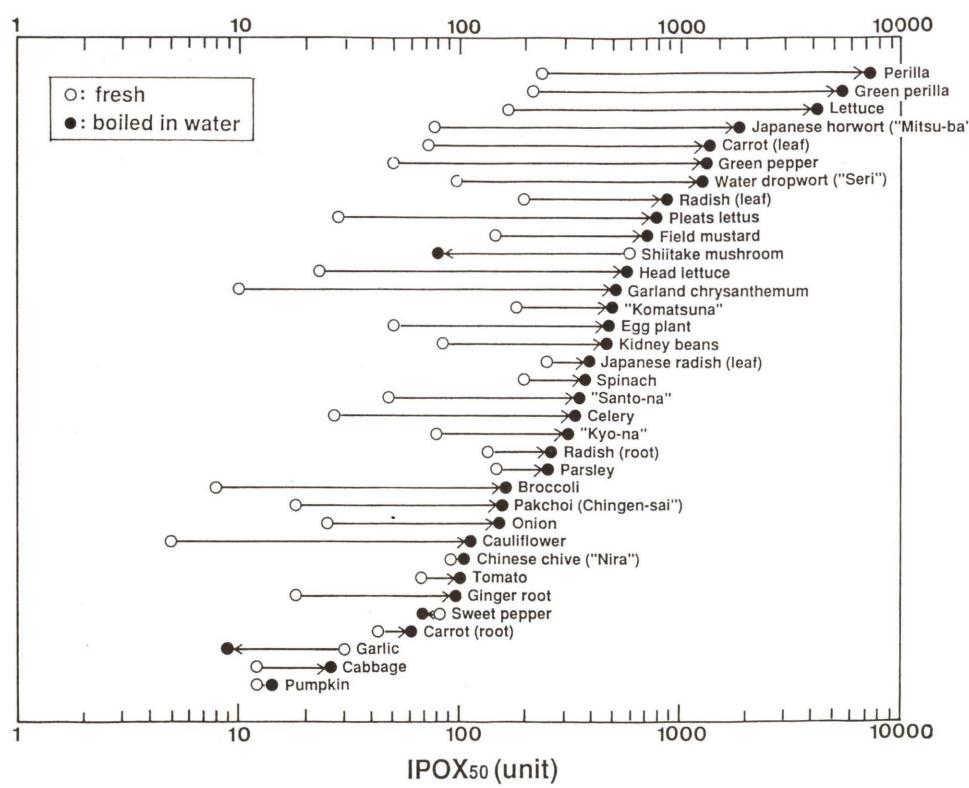


Fig. 5. Alkyl peroxide radical-scavenging activity of various vegetable extracts. A given amount of $t\text{-BuOOH}$ ($5.0 \mu\text{mol}$) was reacted with the methemoglobin/hemoglobin system, which generates predominantly alkyl peroxide radicals. Various cold-water vegetable extracts after homogenization or hot-water vegetable extracts after 5 min boiling were tested for anti-alkyl peroxide radical activity (IPOX) by the chemiluminescence method using luminol. IPOX₅₀ is defined as the 50% inhibitory dilution (fold) number of vegetable extracts toward alkylperoxide radical formation, as described in the reference (Maeda et al., 1992). Higher values indicate greater lipid-radical-scavenging potency.

で煮沸した野菜の上清（スープ）を数十検体を用いて検討した。結果は、緑色の強い野菜ほど ROO^{\cdot} を強く中和消去した。また、生野菜の冷水抽出物より、熱水抽出物の方が数倍～数百倍も強くなることである (Fig. 5)。その理由は一つには、植物細胞壁（セルロース、ヘミセルロース、ペクチンなど）に抱含された有効成分が、普通のホモゲナイゼーションの処理で容易に遊離しないのに反し、加熱によって細胞壁破壊を生じさせるとともに、加熱によりセルロースなどに吸着している成分が遊離することが考えられる (Maeda, H. et al., 1992)。

一方、EB ウィルスによる Raji 細胞のトランスフォーメーション実験系において野菜などの水抽出成分を添加して興味あることが判った。即ち、 ROO^{\cdot} の消去／中和活性が強いほど、EA でみるトランスフォーメーションの発生頻度を抑えることである (抗 EA 発現活性; Fig. 6 の縦軸の IEA_{50})。さらに 60 種以上の植物食品について検討してみると、一般に煮沸 5 分の上清の方が、生の冷水抽出液よりはるかに優れていたことである。一方、 β -カロテンやリコペンを多量に含有するニンジンやトマトはその EA 抑制作用や ROO^{\cdot} の中和活性作用は極めて低かった。また、比較的色白のハクサイやキャベツの内側の葉や大根（根）はこの様な観点からは極めて貧弱な

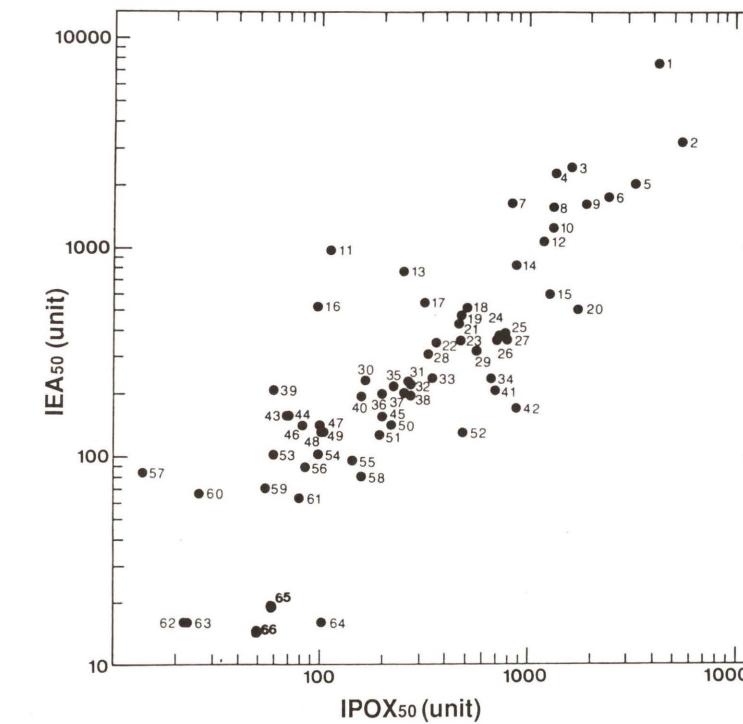


Fig. 6. Correlation between anti-tumor-promoter effect (IEA_{50}) and alkylperoxide radical-scavenging effect (IPOX_{50}) of various hot-water extracts of vegetables, beans, mushrooms, and root vegetables. The correlation factor was 0.82. (1) Japanese lettuce ("chisha"), (2) green perilla, (3) black bean, (4) carrot leaf, (5) red bean (Japanese "azuki"), (6) mung bean (green bean), (7) radish (Japanese "daikon") leaf, (8) Japanese hot pepper ("shishito") leaf, (9) horwot (Japanese "mitsuba") leaf, (10) fern sprout with stalk ("warabi"), (11) cauliflower, (12) edible burdock ("kaori-gobo") root, (13) parsley, (14) Japanese radish leaf ("hatsuka daikon"), (15) water dropwort, (16) ginger root, (17) mustard leaf (Japanese "kyona"), (18) garland chrysanthemum, (19) soybean, (20) stalk of butlerbur, (21) kidney bean, type 1, sheath/fresh green (Japanese "saya-ingene"), (22) eggplant, (23) cabbage, outside green leaf, (25) lotus root, (26) mustard leaf, (27) lettuce, (28) celery, (29) leaf lettuce (*Lactuca sativa*), (30) broccoli, (31) Japanese radish ("hatsuka daikon") root, (32) rape/brassica leaf (Japanese "mibuna"), (33) non-heading Peking cabbage (Japanese "santona"), (34) plum (Japanese "ume"), (35) taro root (Japanese "satoimo"), (36) kidney bean, type 2, fresh green/sheath (Japanese "ingen"), (37) potato, (38) Japanese hot pepper (kyoto var. 1), (39) carrot root, (40) Japanese hot peper (kyoto var. 2), (41) brassica family vegetable leaf ("hiroshima"), (42) sweet potato, (43) green pepper, (44) red pepper, (45) asparagus, (46) green pea, (47) green pea sheath, (48) kidney bean, type 3, fresh green sheath (var. "master-ingene"), (49) Chinese chive leaf, (50) red onion, (51) kidney bean, type 3, var. Japanese "toramame", (52) Japanese "komatsuna", thick stalk brassica family, (53) Japanese champignon ('shimeji' mushroom), (54) "enoki" mushroom, (55) onion root, (56) bamboo shoots, (57) pumpkin, (58) pak choi, Chinese vegetable leaf, (59) onion, miniature type, (60) cabbage, inside leaf, (61) "shiihake" mushroom, (62) Japanese radish root ("daikon"), (64) tomato var. 1, (65) tomato var. 2, (66) tomato var. 3. See also Fig. 5 and text for details.

抑制作用しかなかった (Fig. 5, 6). これに対し、白菜やキャベツの外側の有色部の抗ラジカル活性は充分、強いものであった。図には示していないが、豆類(とくに黒豆、小豆、緑豆、大豆の順)やお茶はこの両方の活性が、極めて強かった。

4. アルキルパーオキサイドラジカルによるDNA切断と抗ラジカル剤によるDNA切断の抑制

上に記したように *t*-BuOOH から生ずる ROO^{\cdot} について、*E. coli* プラスミドDNA(pBR322あるいはpUC19)に対する影響を検討した。この場合、 ROOH 単独、ヘム単独の何れの場合もDNA切断はみられなかったが、この両者を混ぜて ROO^{\cdot} が生じる系で、DNA切断がみられた (Fig. 7A)。さらに ROO^{\cdot} の消去剤のトロロックス、 α -トコフェロール、さらにプロトカテキン酸などの添加により強いDNA切断の抑制がみられた (Fig. 7B、未発表を含む)。これらのデータから ROO^{\cdot} こそが細胞傷害やDNA傷害における最も強力な因子であると考えられる。

5. 食用油における過酸化脂質の生成、さらにヘム鉄成分添加によって生ずる ROO^{\cdot} の検討：精製食用油の問題点とラジカル消去能

精製油の問題点として過酸化脂質(ROOH)となり易いことである。Fig. 8に精製度の異なる植物油の脂質過酸化物の生成速度を示した。すでに記したように、 ROOH は金属存在下にはさらに ROO^{\cdot} となる。

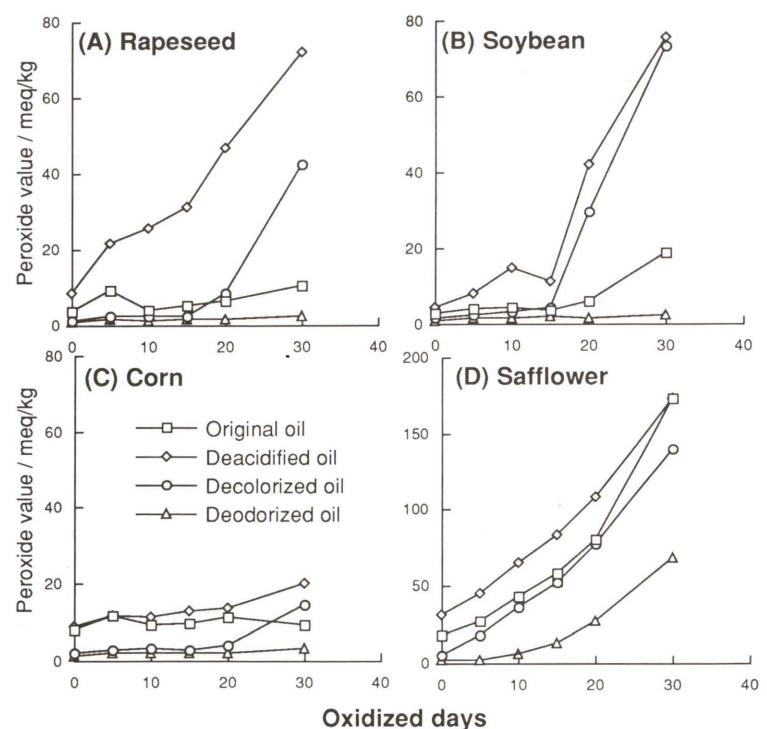


Fig. 8. Lipid peroxide values (POV) of various oils from different processing steps exposed to air at 37°C. Samples from each processing step with different symbols are shown in C.

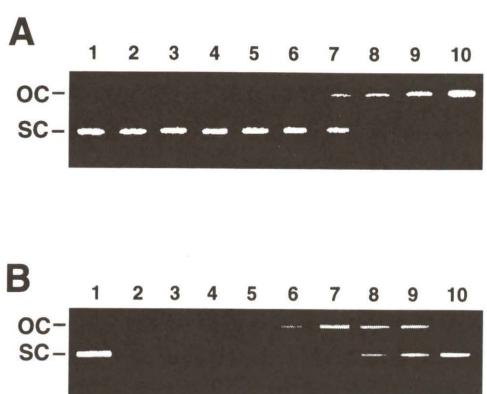


Fig. 7. DNA cleavage revealed by agarose gel electrophoresis of plasmid DNA (pBR322) after treatment with either *t*-BuOOH, hemoglobin (Hb), or combination of both. SC, super coiled DNA, OC, open circle DNA, or degraded product (as invisible). Gels were stained with ethidium bromide and it was viewed under ultraviolet light after washing. (A) The each reaction mixture contained 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pBR322 DNA (final conc.), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hb, 0.5 mM DTPA and various concentration of *t*-BuOOH in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) at room temperature for 120 min. Lane 1 pBR322 DNA alone; lane 2, DNA + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hb; from lane 3 to lane 6 contain DNA + 1, 3, 10 and 100 mM *t*-BuOOH without 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hb, respectively. Lane 7 to lane 10 contained 1, 3, 10, and 100 mM *t*-BuOOH, respectively, with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hb. (B) The reaction mixture contained similar to (A). Lane 1, pBR322 DNA alone; lane 2, DNA + 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 20 mM BuOOH; from Lane 3-10, each contained 1, 4, 12, 36, 110, 330, 1000, and 3000 μM of protocatechuic acid, in addition to lane 2. Both ROOH and heme are required for DNA cleavage (unpublished).

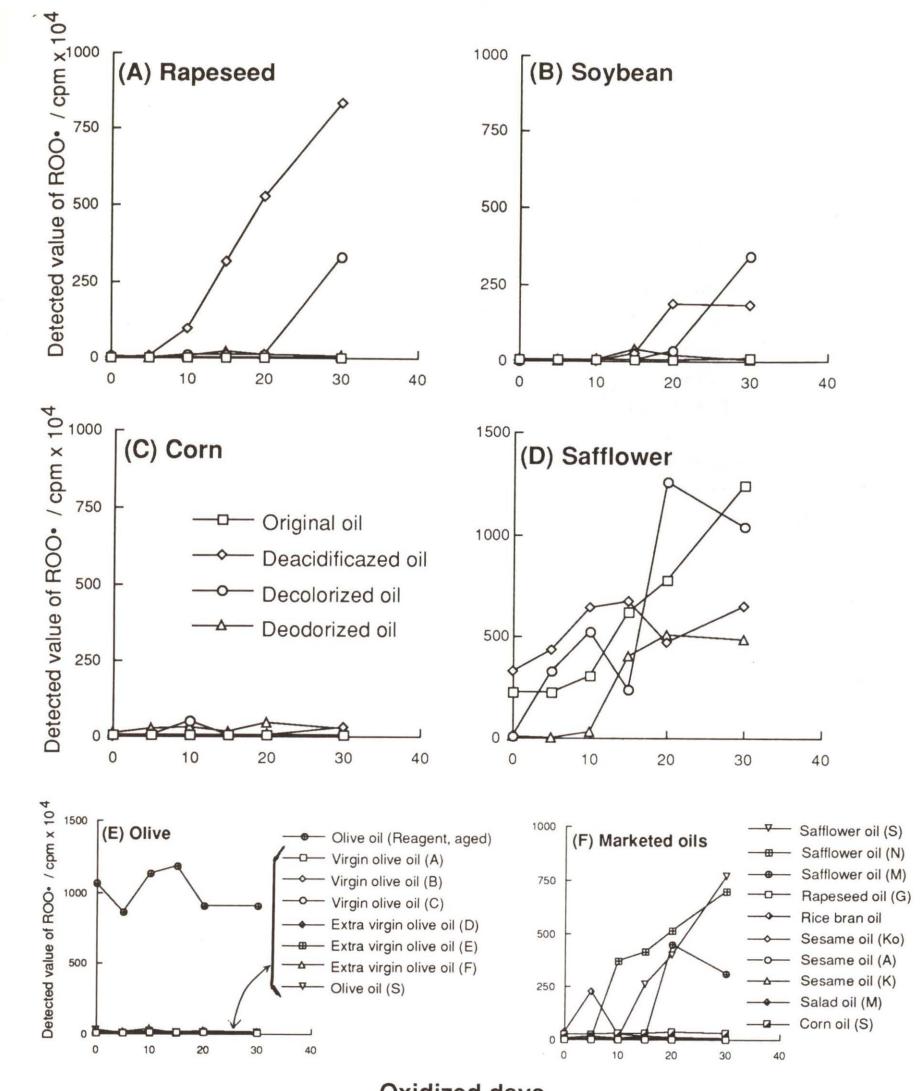


Fig. 9. ROO^{\cdot} generation determined by luminol enhanced chemiluminescence method using various oxidized oils from different refining processes and commercial oils exposed to air at 37°C.

この $\text{ROOH} \rightarrow \text{ROO}^{\cdot}$ への変換が、野菜その他の植物抽出成分によって抑えられることも既に記した。そこで各種食用油、とくに精製度の異なる食用油にヘミン等を添加したときの ROO^{\cdot} の生成がどうなっているかに焦点をあてルミノール依存性の化学発光法を用いて検討した。Fig. 9 が各種精製食用油とその精製過程のものについて調べたデータである。Fig. 10 に *t*-BuOOH にヘミンを添加したときに生ずる ROO^{\cdot} を中和する活性をトロロックス(α -トコフェロールの水可溶化誘導体)およびケルセチンとの比較値として示した。

この一連の食用油に関する研究から、次の点が明らかになった。

(1) 精製することによって、脂質過酸化反応の抑制成分(抗酸化成分)が減少し、多くの食用油は過酸化物の生成が生じやすくなっている。

(2) 精製前の原油のままでは何れも強い抗酸化成分が含まれている。概ね、ギリシャ産のヴァージンオリーブオイル>ゴマ油>コーン油=菜種油(古典的精製法によるもの)の順であった(Table 2)。これに対し、精製した市販の紅花油、大豆油等、何れも ROO^{\cdot} の消去能はほとんどなかった。

6. 高脂質・高鉄分食における発癌

「はじめに」の項に記した疫学的事実を、我々は「Heme + Lipid(ROOH) $\rightarrow \text{ROO}^{\cdot} \rightarrow \text{DNA 傷害} \rightarrow \text{Mutation} / \text{発癌}」で説明できるとの仮説を裏付けるため、ラット直腸内に発癌剤(*N*-Nitroso-*N*-methylurea)を1日1回2 mg/ratで隔日計6回投与し、それを1群約25匹として次の4群にわけて36週間飼育した。即ち、(I群)紅花油5% (w/w)、(II群)同5% (w/w)+ヘモグロビン3% (w/w)、(III群)これはII群に対して ROO^{\cdot} ラジカルスカベンジャー活性をもつルイボス茶1%水を飲料水として与えた群、(IV群)紅花油12%の高脂質食にした群。これらについて37週目に屠殺、癌と腫瘍の発生状況を$

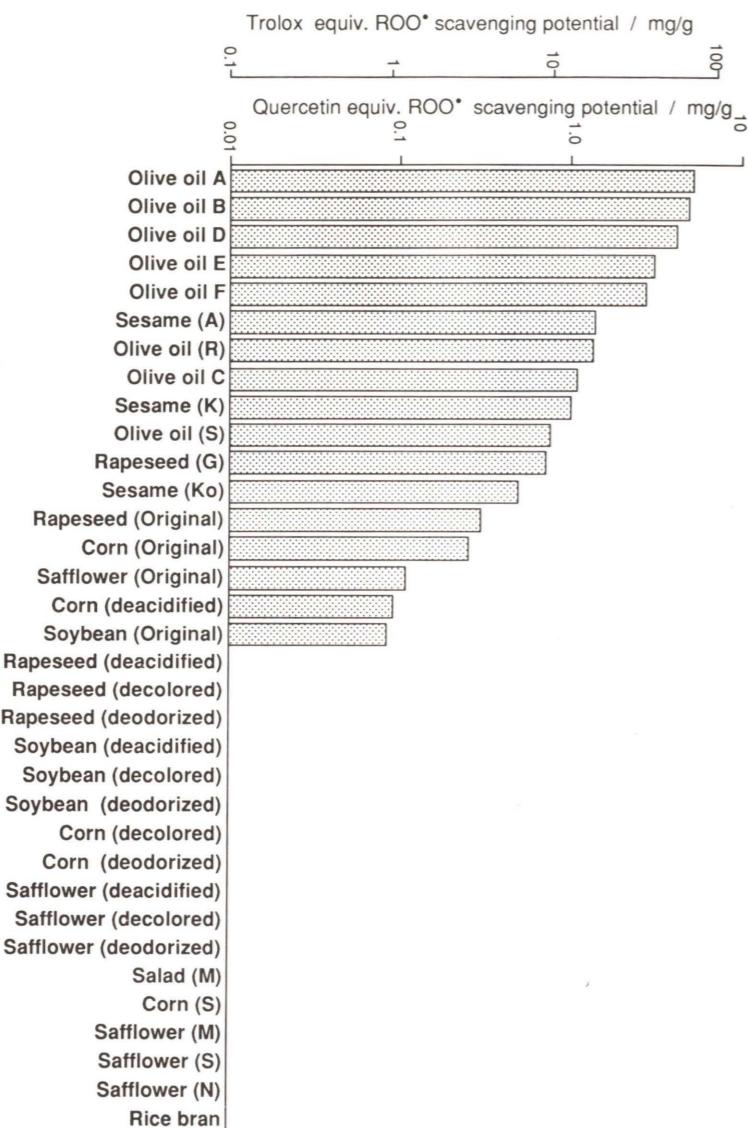


Fig. 10. Lipid peroxide radical (ROO[·]) scavenging potential of edible oils expressed as trolox or quercetin equivalent. ROO[·] was generated by the reaction between *t*-BuOOH and hematin and quantitated by luminol enhanced chemiluminescence assay. All samples are commercial material except those obtained from different refining process.

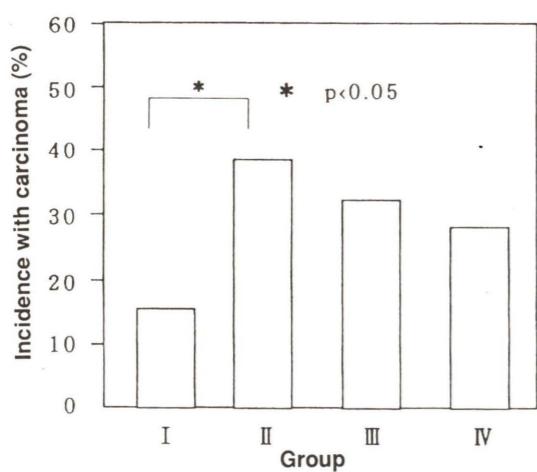


Fig. 11. Effect of high fat/high iron diet in the carcinogenesis in rats pretreated with *N*-methyl-*N*-nitrourea (see text for details. From Fukushima *et al.*, 1995). *n*=25 for each group.

検討した。Fig. 11 にその結果を示した。

その結果は、鉄（ヘモグロビン）過剰添加食によって、癌発生頻度は確実に上昇した。脂質を5%から12%に増すことにより、やはりその頻度が増加傾向を示した。また、ルイボス茶飲用群でやや発癌減少傾向がみられた（Fig. 11）。これらの結果は本稿のテーマである高脂質+高ヘム（鉄）食が発癌促進を示すことを裏付けるものである（福島ら, 1995）。今回の知見は Stevens らの鉄摂取量と癌発生頻度の関係ありとする仮説（1988）を支持している。

7. おわりに

現在、一般人のほとんどは精製油を食用油として消費している。しかしながら、もともとの植物種子中にあっては、多種の酸化機構から生ずる脂質ラジカル（分子の攻撃）から種子（DNA）を保護するために多量のラジカル

Table 2. LOO[·]-scavenging potential of various commercial oils and oils from different processing steps.

(1) Commercial oils	LOO [·] -scavenging potential	
	Quercetin equivalent (mg/g)	Trolox equivalent (mg/g)
Extra virgin olive oil (A) ^a	417	58.1
Extra virgin olive oil (B)	308	41.4
Extra virgin olive oil (C)	273	36.8
Virgin olive oil (D)	522	70.3
Virgin olive oil (E)	488	65.7
Virgin olive oil (F)	108	14.5
Olive oil (G)	134	18.0
Olive oil (H)	75.4	10.2
Rapessed (I)	72.4	9.74
Sesame (J)	137	18.5
Sesame (K)	99.0	13.3
Sesame (L)	48.9	6.58
Flax seed (M)	3.74	0.505
Salad (N) ^b	<1.72	<0.232
Safflower (O)	<1.72	<0.232
Safflower (P)	<1.72	<0.232
Safflower (Q)	<1.72	<0.232
Corn (R)	<1.72	<0.232
Rice bran (S)	<1.72	<0.232

(2) Oil sample from different processing steps	LOO [·] -scavenging potential	
	Quercetin equivalent (mg/g)	Trolox equivalent (mg/g)
Rapessed (original)	30.0	4.04
(deacidified)	<1.72	<0.232
(decolored)	<1.72	<0.232
(deodorized)	<1.72	<0.232
Soybean (original)	8.36	1.13
(deacidified)	<1.72	<0.232
(decolored)	<1.72	<0.232
(deodorized)	<1.72	<0.232
Corn (original)	25.4	3.42
(deacidified)	9.28	1.25
(decolored)	<1.72	<0.232
(deodorized)	<1.72	<0.232
Safflower (original)	10.9	1.46
(deacidified)	<1.72	<0.232
(decolored)	<1.72	<0.232
(deodorized)	<1.72	<0.232

^a A-S, different source. ^b N, mixture of purified oils.

また、抗 ROO[·] 活性と EB-ウイルスによる B リンパ球トランスマーメーション抑制作用が関連することは逆にいえば ROO[·] が腫瘍プロモーターになりうることを示唆している。何れにしろ緑色野菜、お茶、豆類等が持つ強い ROO[·] 消去活性とこれらを多く摂取する人々の間に癌の発生頻度が低いという疫学のデータ（Trock, B. *et al.*, 1988; Giovannucci, E. *et al.*, 1992）とはよく一致するといえる。また、β-カロテンなどはシングレット・オキシゲンのスカベンジャーであるが、β-カロテンや人参などが ROO[·] を消去しないことは興味あるところである。最近話題となった疫学的研究として、β-カロテンの投与はヘビースモーカーにおいて、むしろ肺癌などの頻度を増加させているという事実（Heinonen, O. P. *et al.*, 1994）を説明できるともいえる。

引用文献

Akaike, T., K. Sato, S. Ijiri, Y. Miyamoto, M. Kohno, M. Ando and H. Maeda (1992) Bactericidal activity of alkyl peroxyradicals generated by heme-iron catalyzed decomposition of organic peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 55–63.

Akaike, T., S. Ijiri, K. Sato, T. Katsuki and H. Maeda (1995) Determination of peroxyradical-scavenging activity in food by using bactericidal action of alkylperoxy radical. *J. Agr. Food Chem.*, **43**, 1864–1870.

Cohen, L. A. (1987) Diet and cancer. *Scientific Am.*, **257**, 42–48.

Fukushima, Y., K. Takagi, M. Takano and H. Maeda (1995) 高脂肪・高鉄分食による大腸発癌の促進とラジカルスカベンジャー食による発癌抑制。消化器癌の発生と進展, **7**, 199–201.

Giovannucci, E., M. J. Stampfer, G. Colditz, E. B. Rimm and W. C. Willett (1992) Relationship of diet to risk of colorectal adenoma in man. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**, 91–98.

Heinonen, O. P., D. Albane *et al.* (1994) The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New Engl. J. Med.*, **330**, 1029–1035.

Maeda, H., T. Katsuki, T. Akaike and R. Yasutake (1992) High correlation between lipid peroxide radical and tumor-promoter effect: Suppression of tumor promotion in the Epstein–Barr virus/B-lymphocyte system and scavenging of alkylperoxide radicals by various vegetable extracts. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 923–928.

Stevens, R. G., D. Y. Jones, M. S. Micozzi and P. R. Taylor (1988) Body iron store and risk of cancer. *New Engl. J. Med.*, **319**, 1047–1052.

Trock, B., E. Lanza and P. Greenwald (1990) Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: Critical review and meta-analyses of the Epidemiologic evidence. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 650–661.

Wang, Y., J. G. Corr, H. T. Thaler, Y. Tao, W. R. Feir and W. D. W. Heston (1995) Decreased growth of established human prostate LNCap tumors in nude mice fed a low-fat diet. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**, 1456–1462.

第24回大会ミニシンポジウム
「抗変異・抗発がんとラジカル」

フラボノイド化合物の抗発がんプロモーター作用と 酸素ラジカル捕捉作用

Anti-tumor-promoter activity and oxygen radical scavenging
activity of flavonoid compounds

西野 輔翼¹, 井上 純子², 川西正祐²

Hoyoku Nishino¹, Junnko Inoue² and Shousuke Kawanishi²

¹国立がんセンター研究所がん予防研究部 104 東京都中央区築地 5-1-1

²京都大学医学部公衆衛生学講座 606 京都市左京区吉田近衛町

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

² Department of Public Health, Kyoto University School of Medicine,
Yoshida-Konoecho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(受理: 1996年2月13日)

Summary

Flavonoids, such as quercetin, have been shown to have anti-tumorigenic activity. We have surveyed flavonoids more active than quercetin in carcinogenesis inhibition, and found that luteolin showed strong anti-tumor-promoter activity. In this study, on the radical scavenging activity of luteolin, quercetin, kaempferol and flavone was examined by the ESR method to clarify the mechanism of anti-tumorigenic action. Luteolin proven to have potent radical scavenging activity, as quercetin, which correlated well with their anti-carcinogenic activity. Thus, the radical scavenging activity of flavonoids seems to play an important role in their anti-tumorigenic action.

Keywords: flavonoids, oxygen radicals, ESR, tumorigenesis, luteolin

緒 言

フラボノイドは植物界に広く分布している化合物で、ヒトが日常摂取している食品中にも豊富に含まれている。我々は、代表的なフラボノイドであるケルセチンに抗発がんプロモーター作用のあることを見い出して以来、がん予防への応用を目標として基礎的な検討を行ってきた。まず初めにケルセチンが発がんプロモーターTPAによって引き起こされる培養細胞のリン脂質代謝亢進を抑制することを明らかにし、続いてマウス皮膚二段階発がん（イニシエーター: DMBA, プロモーター: TPA）のプロモーション過程を抑制することを証明した（Nishino ら, 1984a, b）。その後、ケルセチンよりもさらに抗発がんプロモーター作用の強力なフラボノイドのスクリーニングテストを行い、ルテオリン（Fig. 1）など

が有望であることを見い出した。ルテオリンについて、*in vivo* の発がん抑制実験においても、強い抗発がんプロモーション作用を持っていることが証明された（Fig. 2）。

さて、フラボノイドをヒトのがん予防に用いる場合、その作用機序を明らかにしておく必要がある。発がん過程の進展には酸素ラジカルが関与していると考えられている（たとえば、TPA タイプの発がんプロモーターは、細胞における酸素ラジカル産生を促進することが明らかにされており、それが発がんプロモーション作用に関与していると考えられている）ので、本研究においては、酸素ラジカルに対するフラボノイドの効果を解析した。

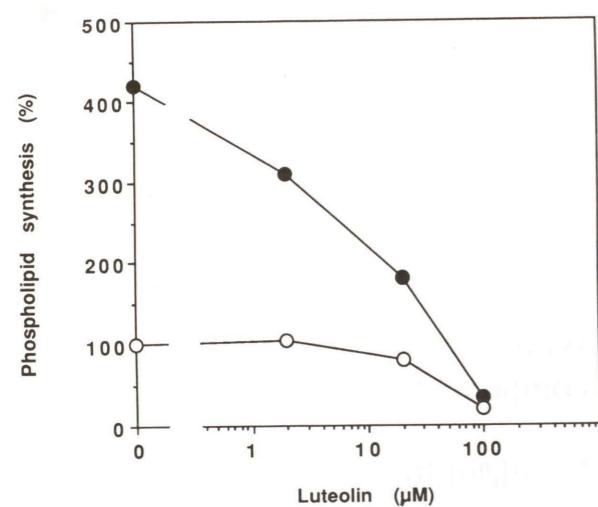


Fig. 1. Effect of luteolin on the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-stimulated phospholipid synthesis of HeLa cells.

Various concentration of luteolin was added to medium for the culture of HeLa cells. After 1 h, ^{32}P was added to the medium with TPA (50 nM), ●, or its vehicle, ○. Incubation was continued for 4 h, and then incorporated radioactivity in phospholipid fraction was assayed. Each point represents the mean of duplicate experiments.

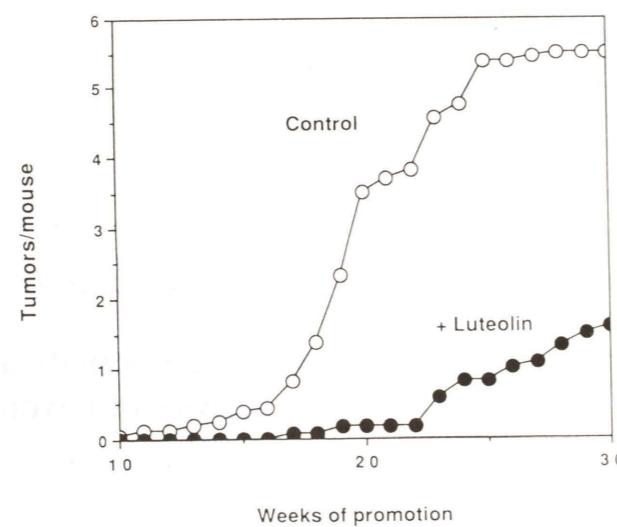


Fig. 2. Effect of luteolin on tumor formation in two-stage carcinogenesis of mouse skin.

Initiation of skin carcinogenesis was carried out by a single application of 100 μg DMBA on the back of 8-weeks-old female ICR mice. For promotion, TPA (1st-stage promoter, applied once after the initiation, 10 nmol) and mezerein (2nd-stage promoter, applied twice weekly from 3 days after TPA application, 3 nmol for 15 weeks, and 6 nmol for subsequent 15 weeks), were used. Luteolin (30 μM) or its vehicle were applied topically 40 min before and 16 h after the TPA treatment. ○, control group; ●, luteolin-treated group.

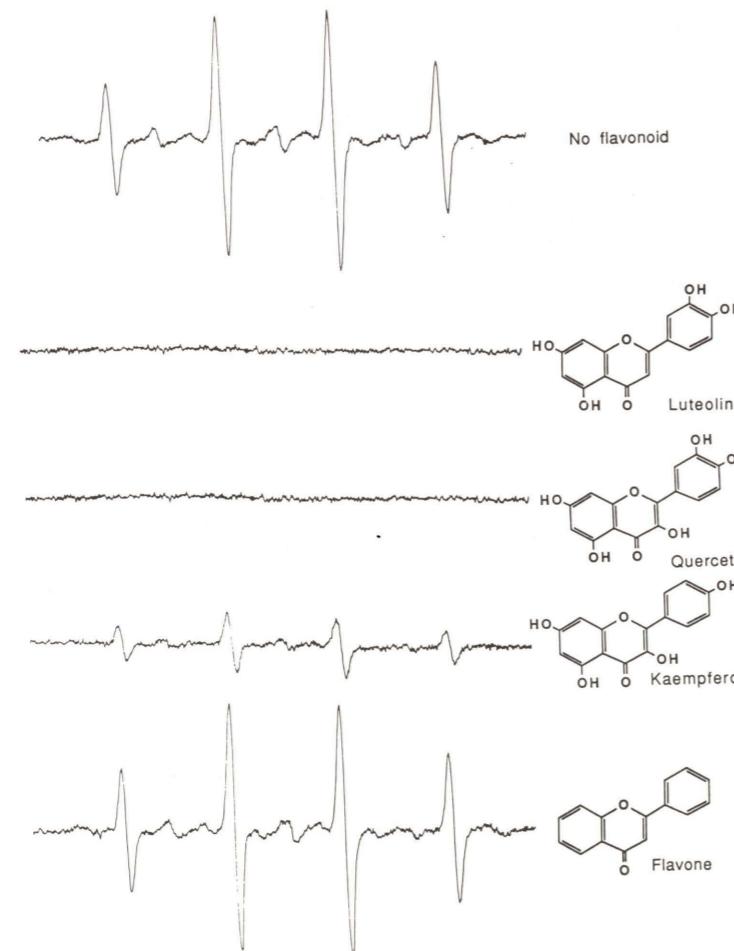


Fig. 3.

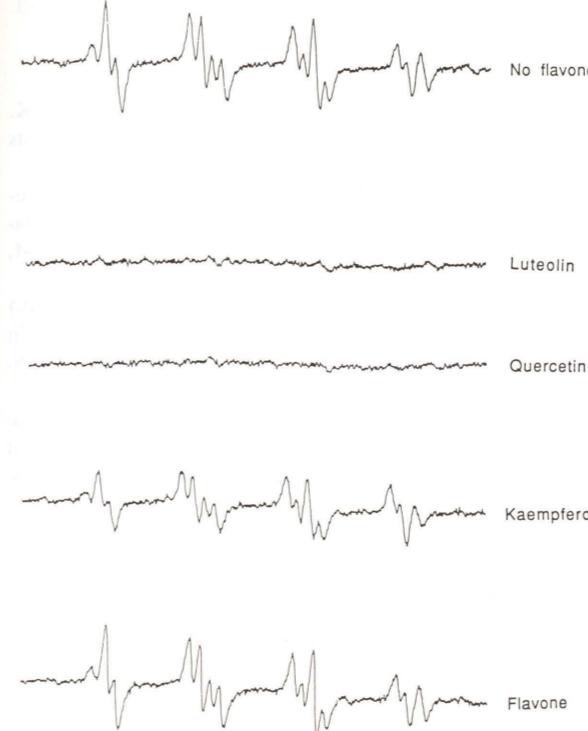


Fig. 4. ESR spectra of the superoxide adduct of DMPO produced from hypoxanthine and xanthine oxidase in the presence of flavonoids. Sample (100 μl) contained 0.005 units xanthine oxidase (XOD), 0.45 mM hypoxanthine and 146 mM DMPO in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.9). Where indicated, flavonoid (0.5 mM) was added to the sample solution. After the addition of XOD, aliquots of the solution were taken in a calibrated capillary, and ESR spectra were measured at room temperature.

実験材料および方法

フラボノイド類は HPLC で精製した純度 99% 以上のものを使用した。酸素ラジカルに対するフラボノイドの効果の解析は、スピントラップ剤 DMPO の酸素ラジカル付加体の生成に対する阻害作用を電子スピン共鳴 (ESR) — スピントラッピング法で定量する方法で行った。

結果

Fig. 3 および Fig. 4 に示したように、今回検討した 4 種類のフラボノイドの酸素ラジカル捕捉作用の強さは、ルテオリン、ケルセチン、ケンフェロールの順で、フラボンには捕捉作用は認められなかった。すなわち、強い抗発がんプロモーター作用を示すルテオリンがラジカル捕捉作用も強いことが明らかとなったわけであり、抗プロモーター作用と酸素ラジカル捕捉作用との間に一定の

Fig. 3. ESR spectra of the hydroxyl radical spin adduct of DMPO produced by the decomposition of hydrogen peroxide catalyzed by Fe^{3+} -NTA in the presence of flavonoids. Sample (100 μl) contained 20 μM FeCl_3 , 40 μM NTA, 0.2 mM H_2O_2 and 146 mM DMPO in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.9). Where indicated, flavonoid (0.25 mM) was added. After the addition of H_2O_2 , aliquots of the solution were taken in a calibrated capillary, and ESR spectra were measured at room temperature.

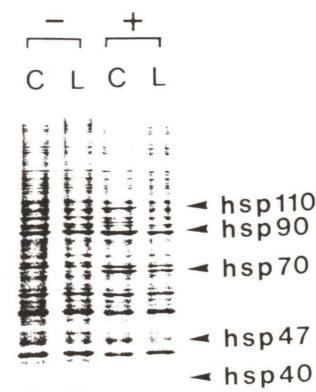


Fig. 5. Inhibition by luteolin of heat shock protein (hsp) induction.

Effect of luteolin on hsp induction in COLO 320DM cells was studied by SDS-PAGE. Arrowheads indicate the inducible hsp. + or - means with or without heat shock. L or C means with or without luteolin (25 μM). Luteolin was proven to inhibit the induction of hsp70.

関連が認められた。この結果は、酸素ラジカル捕捉作用がフラボノイドによる抗発がんプロモーター作用に関与していることを示唆するものである。

考察

今回、ルテオリンに強いラジカル捕捉作用のあることが証明されたが、このルテオリンについては、マウス生体内における抗酸化性についても検討されている。すなわち、 γ 線照射によって引き起こされるマウスの骨髄および脾臓における過酸化物量の増加を、ルテオリンの経口投与が有意に抑制することが報告されているのである。

また、われわれは、Fig. 5 に示したように、ルテオリンが heat shock protein (hsp 70) の誘導を阻害する効果もあることをみいだしている。このように、ルテオリンは多彩な生物学的活性を持っているフラボノイドであることが明らかにされているわけで、応用性に富むものとして注目すべきものと考えられる。

ところで、フラボノイドの中には、変異原性を示すものがあることが知られている（たとえばケルセチンなど）が、ルテオリンには変異原性はない。したがって、ルテオリンは効力が強いのみならず、安全性の面からも優れているということができる。

また、酸素ラジカルは、発がんのプロモーション過程のみならず、イニシエーション段階でも重要な働きをすると考えられているので、ルテオリンが抗イニシエーション作用を示す可能性もある。今後検討すべき課題で

あろう。

今回、4種のフラボノイドについて取り上げたが、自然界にはその他にも興味あるフラボノイドが多く存在しており、今後さらに検討を加えていきたいと考えている。たとえば、ゲニステインやアピゲニンについてラジカル捕捉作用などについて詳細に検討する予定である。これらのフラボノイドは、他とは異なり、細胞周期のG2/M期で進行阻害作用を示す (Matsukawaら, 1993; Satoら, 1994) ことから、興味深い。今後の展開が期待される。

謝 辞

本稿は、京都府立医科大学生化学教室および公衆衛生学教室との共同研究の結果をまとめたものである。また、本研究は植物科学研究協会助成金によって行なわれ

たものである。

文 献

Matsukawa, Y., N. Marui, T. Sakai, Y. Satomi, M. Yoshida, K. Matsumoto, H. Nishino and A. Aoike (1993) Genistein arrests cell cycle progression at G₂-M, *Cancer Res.*, **53**, 1328-1331.
Nishino, H., A. Nishino, A. Iwashima, K. Tanaka and T. Matsura (1984a) Quercetin inhibits the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, a tumor promoter, *Oncology*, **41**, 120-123.
Nishino, H., A. Iwashima, H. Fujiki and T. Sugimura (1984b) Inhibition by quercetin of the promoting effect of teleocidin on skin papilloma formation in mice initiated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Gann*, **75**, 113-116.
Sato, F., Y. Matsukawa, K. Matsumoto, H. Nishino and T. Sakai (1994) Apigenin induces morphological differentiation and G₂-M arrest in rat neuronal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 578-584.

Environ. Mutagen Res., **18**: 67-71 (1996)

特 別 企 画

第24回大会ミニシンポジウム
「抗変異・抗発がんとラジカル」

抗酸化剤によるヘテロサイクリックアミン発癌の抑制

Inhibition of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by antioxidants in rats

広瀬 雅雄, 二口 充, 白井智之

Masao Hirose, Mitsuru Futakuchi and Tomoyuki Shirai

名古屋市立大学医学部第一病理学教室 467 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

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

(受理: 1996年1月16日)

Summary

Chemo-preventive effects of antioxidants against 2-amino-6-methyldipyrido-[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1)- or 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQ_x)-induced hepatocarcinogenesis and dose dependent inhibition of 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) against MeIQ_x-induced hepatocarcinogenesis, were investigated in a rat medium-term liver bioassay featuring diethylnitrosamine initiation and partial hepatectomy. Effects of antioxidants against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis were examined in female rats. In the medium-term liver bioassay, the number and total area of pre-neoplastic glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive liver foci in rats treated with 0.03% Glu-P-1 alone increased significantly (46.8 and 12.0, respectively) compared to control values (3.8 and 0.4). Combined treatment with 1% HTHQ, 1% green tea catechins, 0.1% β -carotene or 1% 3-O-dodecylcarbomethylascorbic acid reduced both of these parameters. The effect of HTHQ was greater and the percentage inhibition of the number and area reached 90 and 98.3, respectively. In the dose-response study, up to 0.125% HTHQ significantly reduced the effect of MeIQ_x on the number and area of foci. In the mammary carcinogenesis study, combined treatment with HTHQ, α -tocopherol, green tea catechins and chlorophyllin reduced the incidence, multiplicity or mean size of mammary tumors induced by dietary treatment with 0.02% PhIP. Again the effect of HTHQ was the greatest among these antioxidants, and the incidence of carcinoma was reduced to 5% by the combined treatment as compared with 40% incidence in the group with PhIP alone. These results indicate that antioxidants, particularly HTHQ, exert a potent chemo-preventive action against heterocyclic amine-induced carcinogenesis.

Keywords: antioxidant, chemo-prevention, hepatocarcinogenesis, mammary carcinogenesis

緒 言

我々の環境中には dimethylnitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone などのニトロソ化合物, aflatoxin B₁ などのカビ毒, benzidine, 4-aminobiphenyl などの芳香族アミン, benzo(a)pyrene などの芳香族炭化水素, 1-nitropyrene などのニトロアレンをはじめとして数多くの変異原性および発癌性物質が存在している。近年ヘテロサイクリックアミン (HCA) に注目が集まっているが、これは肉、魚肉などの加熱過程で生成さ

れるためヒトが普遍的に摂取していると考えられる。現在まで 20 種類以上の物質が同定されており、これらはいずれも強い突然変異原性を示し、そのうち十種類の物質では 2 年間の発癌性試験によりラットの肝、大腸、乳腺等に発癌性が確認されている (Wakabayashi *et al.*, 1992)。さらに 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinaline (IQ) に関してはサルの肝臓に発癌性のあることも見いだされている (Adamson *et al.*, 1990)。疫学的にも焼け焦げの摂取と大腸がんの危険度との相関を認めて報告

もあり (Layton *et al.*, 1995), 環境中の最も重要な発癌物質の一つとされ、特に欧米人に大腸がん、乳がんの多い一要因とも考えられている。従って、HCAの発癌性を抑制させることはがんの一次予防の観点から極めて重要な課題である。一方、抗酸化剤の中には薬物代謝酵素の阻害、解毒酵素の誘導、活性化された発癌物質やフリーラジカルのトラップなどにより発癌物質の持つ発癌作用を抑制させるものが多く報告されている (De Flora *et al.*, 1993; Morse and Stoner, 1993)。本報告では HCA の発癌性を抑制させる抗酸化剤について述べる。実験 1 は肝癌物質あるいはプロモーターを短期間に見いだす目的で開発された中期肝癌試験法 (Ito *et al.*, 1992) を応用した実験で、diethylnitrosamine (DEN) でイニシエーション後に、肝に癌性のある HCA 単独で、あるいは HCA と同時に被検物質を投与し、HCA の投与で増加した肝前癌病変が、被検物質の投与でどの程度抑制されるかを検討することにより HCA の肝癌作用に対する抑制効果を予測する。実験 2 では PhIP 単独群、PhIP と同時に被検物質を投与した群を設け、PhIP で発生する乳腺腫瘍が被検物質との同時投与によりどの程度抑制されるかを観察した。

実験材料および方法

1. 実験動物

日本チャールスリバー社から購入した 6 週令の F344 系雄ラット (実験 1) あるいは 6 週令の雌ラットを用いた。動物はチップを敷いたプラスチックケージに 3~4 匹ずつ入れ、温度、湿度、光、換気を自動調節された動物室で飼育した。飼料 (オリエンタル MF) と飲料水は自由に摂取させた。

2. 化学物質

N-diethylnitrosamine (DEN) と ellagic acid は東京化成工業株式会社、 β -carotene は理研ビタミン株式会社より購入した。1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ), 脂溶性の 3-O-dodecylcarbomethylascorbic acid (DAsA), 水溶性の 3-O-ethylascorbic acid (EAsA) は日本ハイップクス株式会社より、 β -ジケトン類である *n*-triacontane-16-18-dione (TTAD), chlorophyllin, α -toco-

pherol はエーザイ株式会社より、茶カテキン (GTC, Polyphenon 100[®]) は三井農林株式会社より供与された。2-amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQ_x) および 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]-pyridine (PhIP) は国立がんセンター若林敬二博士より供与された。

3. 実験方法

[実験 1] 各群 15~16 匹のラットに肝癌物質である DEN を 200 mg/kg 体重の濃度でイニシエーターとして 1 回腹腔内投与し、その 2 週後より肝臓に癌性のある HCA である Glu-P-1 あるいは MeIQ_x をそれぞれ 0.03% の濃度で単独で混餌投与した群、Glu-P-1 あるいは MeIQ_x と同時に種々の被検物質 (1~0.0625% HTHQ, 1% DAsA, 1% EAsA, 1% GTC, 1% chlorophyllin, 0.2% TTAD, 1.5% α -tocopherol あるいはゲラチンでコートした 0.1% β -carotene) をそれぞれ混餌投与した群、基礎食のみの対照群を設け合計 8 週で動物を屠殺した。なお実験開始後 3 週目に肝細胞の増殖を促進し、前癌病変の発生を促進させるために部分肝切除を行った (Fig. 1)。屠殺後肝重量を測定、アセトン固定しパラフィンブロックを作製、薄切し抗 glutathione S-transferase placental form (GST-P) 抗体で免疫染色を行い、陽性に染色された肝前癌病変 (GST-P 陽性細胞巣) の単位面積当たりの数および面積を定量的に測定した。

[実験 2] 各群 10~21 匹の F344 系雌ラットを用いた。動物はチップを敷いたプラスチックケージに 3~4 匹ずつ入れ、温度、湿度、光、換気を自動調節された動物室で飼育した。飼料 (オリエンタル MF) と飲料水は自由に摂取させた。

実験結果

[実験 1] 体重は Glu-P-1 を投与した群間で有意な減少を示すものはみられなかった。肝に癌性のある HCA である Glu-P-1 を 0.03% の濃度で投与すると

GST-P 陽性細胞巣の 1 cm² 当たりの数および面積は、対照のそれぞれ 3.8:0.4 に比較して 46.8:12.0 と著しく増加した。しかし HTHQ, GTC, β -carotene あるいは DAsA を同時に投与することによりこれらは有意に減少し、とくに HTHQ での減少が著しかった (Table 1)。

次に同じく肝に癌性のある HCA で焼き焦げの中に多く含まれている MeIQ_x を 0.03% の濃度で単独に投与すると、Glu-P-1 と同様に GST-P 陽性細胞巣の数および面積は、対照の 4.0:0.28 に対し 32.8:3.94 と著明に増加した。しかし HTHQ の同時投与により用量相関性に

GST-P 陽性細胞巣は減少し、0.125% の低容量まで抑制効果が認められた (Table 2)。

[実験 2] 実験期間中 PhIP を投与した群間で有意な体重減少はみられず、HTHQ を同時に投与した群では PhIP 単独よりかえって体重が増加していた。乳腺腫瘍は実験開始後 30 週目に PhIP 単独投与群で 20% に発生したが、GTC 同時投与群では 5% であり、ellagic acid, chlorophyllin, α -tocopherol, HTHQ 同時投与群ではそれぞれ 34, 36, 42, 52 週目にはじめて腫瘍が発生した。最終的な腺癌の発生頻度は、PhIP 単独群で 40% であった

Table 1. Final body weight and effects of antioxidants on Glu-P-1-associated increase in liver GST-P positive foci.

Treatment	No. of rats	Body weight (g)	GST-P positive foci			
			Number (No./cm ²)	% inhibition	Area (mm ² /cm ²)	% inhibition
Glu-P-1	10	262±9 ^a	46.8±11.0 ^a	—	12.0±5.6 ^a	—
Glu-P-1+HTHQ	13	264±12	8.1±2.1 ^d	90	0.6±0.2 ^d	98.3
DAsA	12	255±11	38.2±7.6 ^b	20	7.9±3.5 ^b	35.3
EAsA	14	255±15	39.1±14.5	17.9	11.2±5.4	6.9
GTC	15	276±12 ^c	25.5±6.0 ^d	49.5	4.4±1.8 ^c	65.5
Chlorophyllin	15	253±18	56.0±9.7 ^b	—	18.8±8.3 ^b	—
TTAD	15	261±11	38.0±10.2	20.5	9.0±4.6	25.9
α -Tocopherol	11	271±11	35.3±9.2 ^b	26.7	11.9±6.6	0.01
β -Carotene	16	258±16	34.4±10.5 ^c	28.8	6.2±2.8 ^b	50
Basal diet	15	288±18	3.8±1.6	—	0.4±0.2	—

Mean±SD.

Significantly different at ^a*P*<0.01 vs basal diet group value, and at ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.001 vs Glu-P-1 alone group value.

Table 2. Final body weight and dose-dependent effect of HTHQ on MeIQ_x-associated increase in liver GST-P positive foci.

Treatment	No. of rats	Body weight (g)	GST-P positive foci			
			Number (No./cm ²)	% inhibition	Area (mm ² /cm ²)	% inhibition
MeIQ _x	15	241±12 ^a	32.8±8.2 ^a	—	3.94±1.35 ^a	—
MeIQ _x +HTHQ (1.0%)	15	213±8 ^d	9.6±4.8 ^d	80.6	0.91±1.08 ^d	82.8
MeIQ _x +HTHQ (0.5%)	14	238±7	11.4±3.2 ^d	74.3	0.95±0.36 ^d	81.7
MeIQ _x +HTHQ (0.25%)	13	238±15	14.6±5.6 ^d	63.2	1.27±0.52 ^d	73.0
MeIQ _x +HTHQ (0.125%)	15	249±8	23.9±6.1 ^b	30.9	2.51±0.97 ^b	39.1
MeIQ _x +HTHQ (0.0625%)	14	246±12	31.8±9.8	3.5	3.49±1.41	12.3
Basal diet	15	265±10	4.0±2.1	—	0.28±0.16	—

Mean±SD.

Significantly different at ^a*P*<0.001 vs basal diet group value, and at ^b*P*<0.05, ^d*P*<0.001 vs MeIQ_x alone group value.

Table 3. Effects of antioxidants on PhIP-induced rat mammary carcinogenesis.

Treatment	No. of rats	Adenocarcinoma				Fibroadenoma	
		Incidence (%)	Multiplicity (No./rat)	Mean size (diameter, mm)	Incidence (%)	Multiplicity (No./rat)	
PhIP	20	8 (40)	0.40±0.50	49±15	2 (10)	0.10±0.31	
PhIP+HTHQ	21	1 (5)**	0.05±0.22**	16	0	0	
PhIP+GTC	21	6 (29)	0.29±0.46	31±20*	0	0	
PhIP+ α -Tocopherol	20	4 (20)	0.20±0.41**	30±18	1 (5)	0.05±0.22	
PhIP+Chlorophyllin	20	3 (15)	0.15±0.37*	35±31	0	0	
PhIP+Ellagic acid	19	5 (26)	0.32±0.58	44±25	0	0	
Basal diet	10	0	0	0	0	0	

Mean±SD.

Significantly different at **P*<0.05, ***P*<0.01 vs PhIP alone group value.

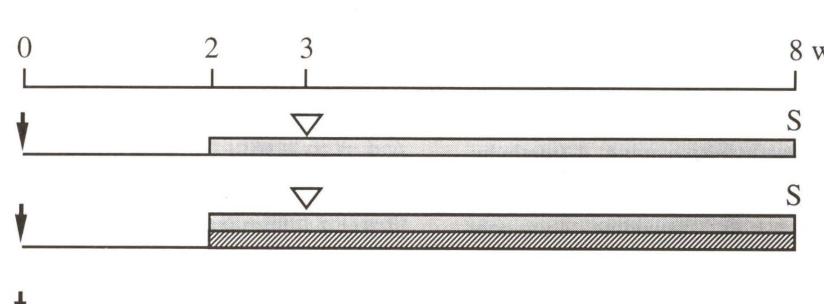


Fig. 1. Experimental protocol of experiment 1. Six-week-old male F344 rats were used.

↓: DEN 200 mg/kg body wt, ip; ■: Glu-P-1 or MeIQ_x at a dose of 0.03% in diet; ▨: Test chemicals in diet;
▽: Two-thirds partial hepatectomy; S: Sacrifice for GST-P immunohistochemical staining.

が、抗酸化剤の同時投与群ではいずれも発生頻度が減少し、特に HTHQ 群では 5% にすぎなかった。 α -tocopherol および chlorophyllin 投与群では 1 匹当たりの平均腫瘍個数のみが、GTC 群では腫瘍の平均サイズのみが有意に減少していた (Table 3)。

考 察

実験 1 ではいくつかの抗酸化剤が Glu-P-1 投与による GST-P 陽性細胞巣の増加を抑制したが、脂溶性のフェノール系合成抗酸化剤である HTHQ の抑制効果が最も強く、HTHQ が Glu-P-1 の肝発癌を強く抑制することが示唆された。次の実験では、別の HCA である MeIQ_x の肝発癌に対する HTHQ の抑制効果の用量相関性を検討し、HTHQ が MeIQ_x に対しても Glu-P-1 と同様な効果を示し、かつ 0.125% まで抑制効果が期待されることを明らかにした。本実験モデルは短期間であり、実際どの程度癌の発生を抑制するかが不明であるため、0.03% Glu-P-1 と 0.5% HTHQ を被検物質として、同様の実験系を 26 週まで延長して肝腫瘍の抑制の程度を検討した。その結果肝癌および腺腫の発生頻度は HTHQ の投与により Glu-P-1 を与えない対照レベルまで減少し、HTHQ の強い発癌抑制効果が確認された (Hirose *et al.*, 1995d)。実験 2 でもやはり HTHQ が PhIP による乳腺腫瘍の発生を強く抑制した (Hirose *et al.*, 1995a)。最近我々は HTHQ が PhIP によるラット大腸発癌をも明瞭に抑制することを明らかにしている (未発表データ)。

HTHQ は *Salmonella* TA100 を用いた Ames Assay では Glu-P-1, PhIP のみならず Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2, IQ, MeIQ, MeIQ_x による突然変異原性を 60~100% の抑制率で抑制する一方、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, AF-2 や benzo(*a*)pyrene で誘発される突然変異原性に対しては効果が弱く (Hirose *et al.*, 1995c), dimethylnitrosamine による肝発癌は抑制しない (Hirose *et al.*, 1995b)。従って HTHQ は HCA 発癌に対するかなり特異的な発癌抑制物質であるといえよう。

Ames Assay を用いて HTHQ の Glu-P-1 に対する抗変異原効果を他のフェノール系抗酸化剤である BHA, BHT, propyl gallate, *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) と比較してみると HTHQ の抑制効果が最も強い結果から (Hirose *et al.*, 1995c), 発癌抑制効果も HTHQ が最も強いことが推察された。さらにこれらフェノール系抗酸化剤の抗変異原効果と肝ミクロソームを用いた抗酸化効果の程度がよく一致していることは興味ある点である (Nihro *et al.*, 1994)。

本実験で用いた HCA の投与量は 0.02~0.03% であり、長期実験では HTHQ は HCA の 17~25 倍の投与量で肝臓や乳腺の発癌を強く抑制している。ヒト一日当たりの HCA の摂取量は最大でも 10 μ g 程度であり (Layton *et al.*, 1995; Wakabayashi *et al.*, 1993), 単純計算上では 170~250 μ g の HTHQ の摂取で発癌の抑制が充

分に期待できる。BHA あるいは BHT のヒト ADI はそれぞれ 0~0.5 mg/kg 体重 (JACFA, 1989), 0~0.125 mg/kg 体重 (JECFA, 1986), また BHA/BHT の平均摂取量はヒト一日当たり約 8 mg である (Kirkpatrick and Lauer, 1986)。従って 170~250 μ g の HTHQ はヒトが充分摂取可能な量であると考えられる。また現在摂取されている BHT などの抗酸化剤も HCA 発癌の抑制に寄与していることも考えられる。

HTHQ の発癌抑制機序については種々の実験結果から、HCA の代謝活性化の阻害および活性代謝物の捕捉が大きく関与し (Hirose *et al.*, 1995c) さらに活性酸素の捕捉も関与している可能性が示唆されている (Kato *et al.*, 1996)。

以上、抗酸化剤である HTHQ と茶カテキンおよび β -carotene は HCA である Glu-P-1, MeIQ_x あるいは PhIP による発癌を抑制した。特にフェノール系である HTHQ の効果は強く、ヒトが摂取可能な用量で HCA による肝、乳腺や大腸発癌を抑制することが期待され、HCA 発癌に対する予防剤として有望である。また将来これらの抗酸化剤を食品に応用することにより HCA 発癌の危険性はかなり軽減されるものと考えられる。

参考文献

Adamson, R. H., U. P. Thorgeirsson, E. G. Snyderwine, S. S. Thorgeirsson, J. Reeves, D. W. Dalgard, S. Takayama and T. Sugimura (1990) Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in nonhuman primates: induction of tumors in three macaques, *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 10~14.

De Flora, S., A. Izzotti and C. Bennicelli (1993) Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: role in primary prevention, In: G. Bronzetti, H. Hayatsu *et al.* (Eds.), *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III*, Prenum Press New York and London, pp. 1~16.

Hirose, M., K. Akagi, R. Hasegawa, M. Yaono, T. Satoh, Y. Hara, K. Wakabayashi and N. Ito (1995a) Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis by antioxidants in F344 female rats, *Carcinogenesis*, **16**, 217~221.

Hirose, M., R. Hasegawa, J. Kimura, K. Akagi, Y. Yoshida, H. Tanaka, T. Miki, T. Satoh, K. Wakabayashi, N. Ito and T. Shirai (1995b) Inhibitory effects of 1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ), green tea catechins and other antioxidants on 2-amino-6-methylimidopyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1)-induced rat hepatocarcinogenesis and dose-dependent inhibition by HTHQ of lesion induction by Glu-P-1 or 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQ_x), *Carcinogenesis*, **16**, 3049~3055.

Hirose, M., S. Iwata, E. Ito, Y. Nihro, S. Takahashi, Y. Mizoguchi, T. Miki, T. Satoh, N. Ito and T. Shirai (1995c) Strong antimutagenic activity of the novel lipophilic antioxidant 1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone against heterocyclic amine-induced mutagenesis in the Ames assay and its effect on metabolic activation of 2-amino-6-methylimidopyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1), *Carcinogenesis*, **16**, 2227~2232.

Hirose, M., H. Tanaka, J. Kimura, N. Ito, T. Satoh, T. Miki and T. Shirai (1995d) Chemoprevention of Glu-P-1-induced rat hepatocarcinogenesis by an antioxidant 1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ): comparison of short and long term experiments, *Proc. Jpn. Cancer Assoc.*, **54**, 123.

Ito, N., T. Shirai and R. Hasegawa (1992) Medium-term bioassays for carcinogens, In: H. Vainio, P. N. Magee *et al.* (Eds.), *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*, IARC, Lyon, pp. 353~388.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1986) Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. Butylated hydroxytoluene (BHT). WHO Food Additives Series, **21**, 25~46.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1989) Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series, **776**, 14~15.

Kato, T., R. Hasegawa, D. Nakae, M. Hirose, M. Yaono, L. Cui, Y. Kobayashi, Y. Konishi, N. Ito and T. Shirai (1996) Dose dependent induction of 8-hydroxy guanine and preneoplastic foci in the rat liver by a food-derived carcinogen, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline, at low dose levels, *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, in press.

Kirkpatrick, D. C. and B. H. Lauer (1986) Intake of phenolic antioxidants from foods in Canada, *Fd. Chem. Toxic.*, **24**, 1035~1037.

Layton, D. W., K. T. Bogen, M. G. Knize, F. T. Hatch, V. M. Johnson and J. S. Felton (1995) Cancer Risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research, *Carcinogenesis*, **16**, 39~52.

Nihro, Y., H. Furukawa, S. Sogawa, T. C. Wang, H. Miyataka, H. Matsumoto, T. Miki and T. Satoh (1994) Synthesis and anti-lipid-peroxidation activity of hydroquinone monoalkyl ethers, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 576~579.

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

Wakabayashi, K., H. Ushijima, M. Takahashi, H. Nukaya, S.-B. Kim, M. Hirose, M. Ochiai, T. Sugimura and M. Nagao (1993) Exposure to heterocyclic amines, *Environ. Health Perspect.*, **99**, 129~133.

第24回大会ミニシンポジウム
「抗変異・抗発がんとラジカル」

Suppressive Effects of Natural Antioxidants on Carcinogenesis in Digestive Organs

Hideki Mori, Shigeyuki Sugie, Takuji Tanaka,
Hiroki Makita and Naoki Yoshimi

Department of Pathology, Gifu University School of Medicine,
40 Tsukasa-machi, Gifu 500, Japan

(Accepted: February 13, 1996)

Summary

A number of naturally-occurring compounds possess chemopreventive properties against carcinogenesis in the digestive organs. In general, they are considered to relate to activation or detoxification of carcinogens and have potential to control carcinogen-induced hyper-cell proliferation in the target organs. Meanwhile, many of them have anti-oxidative activities and the properties appear to be very important, especially those of agents such as phenolic compounds or carotenoids. As shown here, chemopreventive organosulfur compounds also exert protective effects on lipid peroxidation especially after *in vivo* exposure. This point may also be important for the display of the protective effects of sulfur compounds together with the detoxification of carcinogens. Thus, combined intake of these naturally-occurring agents will be useful in the prevention of human cancers, particularly those of the digestive organs.

Keywords: chemoprevention, anti-oxidation, phenols, organosulfur compounds, carotenoids

Introduction

Digestive tract epithelium is continuously exposed to the substances taken orally and liver is the representative organ to metabolize these absorbed agents. Accordingly, digestive organs could be those where carcinogenesis is most strongly influenced by environmental agents. In our environment, exist a variety of natural antioxidants, some of which have been known to possess antimutagenic and anti-neoplastic effects. Currently, these naturally occurring chemicals with antioxidative properties are regarded as promising chemical group for cancer prevention. Our group has demonstrated the intervening effects with a number of naturally occurring compounds including antioxidants using animal models for carcinogenesis in digestive organs (Mori *et al.*, 1995a, b).

Antioxidative Chemopreventive Agents

1) Phenolic compounds

Chlorogenic acid is a phenolic compound widely distributed as a plant constituent. We have examined the modifying effect of chlorogenic acid in a hamster model with methylazoxymethanol (MAM) acetate and found that the phenolic compound has a chemopreventive effect for the large bowel cancer (Mori *et al.*, 1986). With the reasons that chlorogenic acid is well contained in coffee

beans and the beans contain other chemopreventive phenolic compounds like caffeic acid, modifying effects of coffee beans extracts containing a high concentration of chlorogenic acid on large bowel carcinogenesis was done in the expression of aberrant crypt foci (ACF) which are regarded as one of precursor lesions for the bowel cancers and a reliable intermediate biomarkers for detection of chemopreventive agents (Kawamori *et al.*, 1995a). Two types of coffee beans extracts [K-401: 36.9% chlorogenic acid, 0.6% caffeine and others, K-409: 21.9% chlorogenic acid, 6.5% caffeine and others] inhibited the occurrence of ACF (Fig. 1), suggesting that phenolic compounds contained in coffee beans have a protective action on the large bowel carcinogenesis and coffee drinking may be useful for the protection. The preventive effect of chlorogenic acid is suggested to relate to the antioxidative properties. Previously, Kasai *et al.* (1993) reported that chlorogenic acid is a potent inhibitor of formation of 8-hydroxydeoxyguanosine being generated by oxidative DNA damages. Ellagic acid is also a popular phenolic compound contained in a variety of edible plants. We have shown the inhibitory effect of this compound on hepatocarcinogenesis in rodents (Tanaka *et al.*, 1988). Related phenolic compounds such as caffeic acid or ferulic acid are also known to act as electrophilic trapping agents and are inhibitors of TPA. These

Incidence of aberrant crypt foci (ACF)

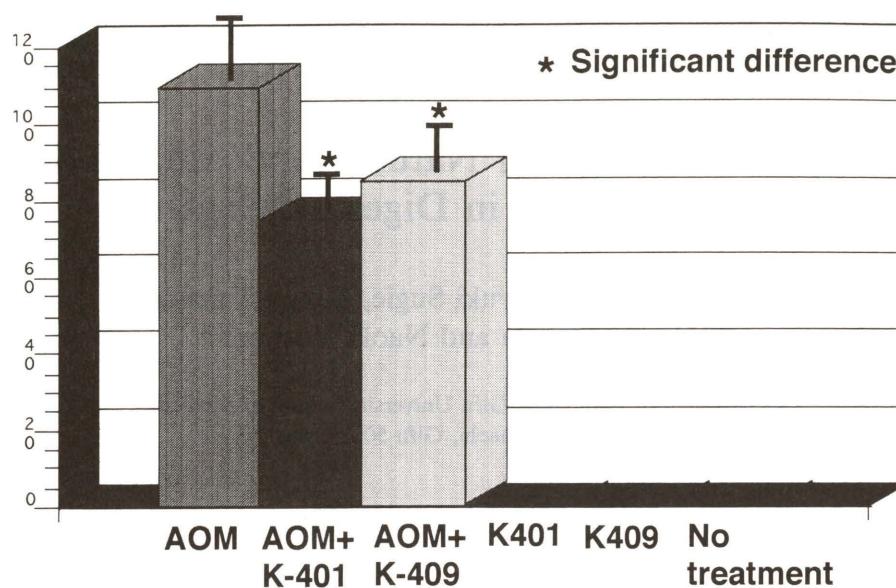


Fig. 1. The data are the total numbers of lesion/colon.

phenolic compounds were found to have chemopreventive properties for oral cancer in a rat model using 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) (Tanaka *et al.*, 1993a) indicating that these naturally occurring phenolic compounds are applicable for prevention of human oral neoplasia. A simple phenolic acid, protocatechuic acid is one of the constituents in edible plants, fruits, and vegetables. This phenolic compound is also known as a natural antioxidant. Modifying effects of protocatechuic acid in carcinogenesis of oral cavity, liver, stomach or large intestine were respectively tried using rat models with 4-NQO, diethylnitrosamine (DEN), *N*-methyl-*N*-nitrosourea or azoxymethane (AOM), and the phenolic compound was found to have clear chemopreventive effects in all of these digestive organs (Tanaka *et al.*, 1993b, c; Tanaka *et al.*, 1994a; Tanaka *et al.*, 1995a). Curcumin is the major pigment in turmeric which is widely used as a spice and coloring agent. Hesperidin, a major citrus flavonoid, is the 7B-rutinoside of the flavon hesperitin. Both compounds are known to possess antioxidative, antimutagenic or antitumorigenic effects. Modifying effects of curcumin or hesperidin on oral carcinogenesis were examined in the rat model with 4-NQO and the results were compared with that of β -carotene, another natural antioxidant. All of these antioxidants exerted protective action in the animal model and the order of chemopreventive efficacy was curcumin > β -carotene > hesperidin (Tanaka *et al.*, 1994c). Gingerol is an active compound contained in ginger which is widely used as a spice in food and an oriental medicine. Chemopreventive effect of this phenolic compound on intestinal carcinogenesis was also confirmed by us (Yoshimi *et al.*, 1992).

2) Organosulfur compounds

Organosulfur compounds belong to a member of chemopreventive agents. For the mode of action, activation of detoxifying enzymes has been considered to be important. But, they intend to have antioxidative activities, and this is possibly related to the preventing action. Glucosinolates and indoles which are present abundantly in cruciferous

vegetables, are representative chemopreventive organosulfur compounds. We have proved that sinigrin has inhibitory effects on DEN-induced hepatocarcinogenesis (Tanaka *et al.*, 1990) and 4-NQO-induced oral carcinogenesis (Tanaka *et al.*, 1992) in rats. Benzyl isothiocyanate (BITC) and benzyl thiocyanate (BTC) are also constituents of cruciferous vegetables, being present as their glucosinolates precursors. Both thiocyanate compounds exerted chemopreventive effects on carcinogenesis in liver and large bowel of rats (Sugie *et al.*, 1993, 1994). Recently, we have confirmed that methyl methane thiosulfonate (MMTS), also one of constituents of cruciferous vegetables, has a clear suppressive effect on colon carcinogenesis (Kawamori *et al.*, 1995b). Inhibitory effect of this compound on hepatocarcinogenesis was also confirmed (Unpublished). Taurine is an organosulfur compound and is contained in a variety of animals and plants. Taurine has been reported to have antioxidative as well as antiatherosclerotic or antihypertensive effects. A chemopreventive effect of this organosulfur compound on large bowel carcinogenesis in rats was recently reported (Reddy *et al.*, 1993) and we have proved a clear inhibitory effect of this agent on hepatocarcinogenesis in rats (Okamoto *et al.*, 1996).

3) Oxygenated carotenoids

A number of carotenoids are present in nature mostly as constituents of vegetables, fish and sea algae. β -carotene and carotenoids have been found to have some biological functions such as photoprotection and antioxidative properties including singlet oxygen quenching. Some oxygenated carotenoids (xanthophylls) have been reported to possess antitumor effects. We have shown a protective effect of astaxanthin rather than canthaxanthin on mouse urinary bladder carcinogenesis induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in mice (Tanaka *et al.*, 1994b). In subsequent studies, both xanthophylls (Fig. 2) were found to have potent chemopreventive effects on 4-NQO-induced oral carcinogenesis and AOM-induced large bowel carcinogenesis in rats (Tanaka *et al.*, 1995a, c). Such

Natural xanthophylls (oxygenated carotenoids)

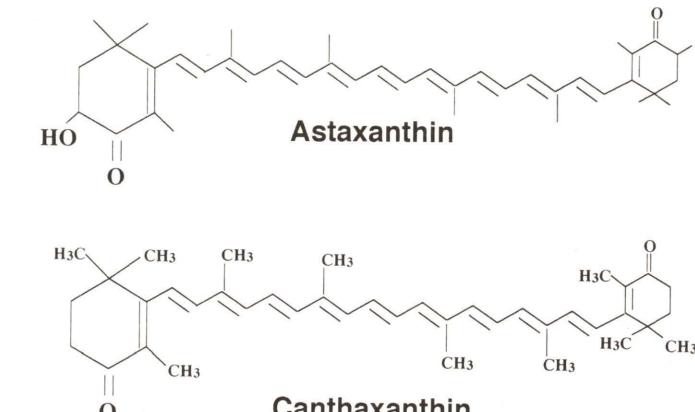


Fig. 2. Molecular structures of astaxanthin and canthaxanthin.

Modifying effect of each compound on lipid peroxidation in erythrocyte membrane

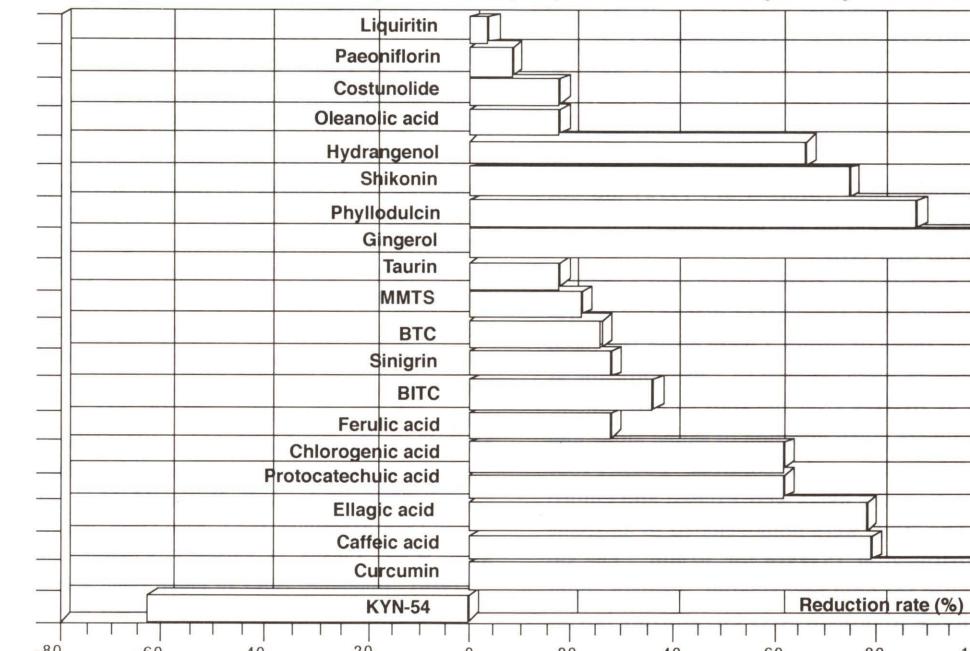


Fig. 3. Modifying effects of a number of agents on *t*-BuOOH-induced malon dialdehyde in the erythrocyte membrane. The data show reduction rate (%) of lipid peroxidation.

chemopreventive effect of the oxygenated carotenoids may not be dependent to their provitamin A activity but to be related to their effectiveness as an antioxidant and free radical scavenger. These naturally occurring antioxidants are regarded as promising preventive agents for human cancers.

Antioxidative Activities of Chemopreventive Agents against Lipid Peroxidation

A number of compounds which have been demonstrated to have preventive effects in animal models for digestive organs carcinogenesis in our laboratory were further examined for the activity against lipid peroxidation.

1) Assay using erythrocyte membrane ghost system

Rabbit blood was diluted with isotonic buffer, centrifuged and lysed. The erythrocyte membrane ghosts were pelleted by centrifuging and the precipitate was diluted to

give a suspension. Peroxidation of the erythrocyte membrane ghosts was generated by tertiary butylhydroperoxide (*t*-BuOOH), and the ghosts were incubated for 20 min at 37°C together with test compound dissolved in DMSO. The modifying effects of chemopreventive compounds on the lipid peroxidation was evaluated with the values of *t*-BuOOH-induced malon dialdehyde (Osawa *et al.*, 1987). Results of this assay are indicated in Fig. 3. Phenolic compounds such as curcumin, caffeic acid, ellagic acid and gingerol exerted strong inhibitory effects on the peroxidation. Isocoumarins phyllodulcin and hydrangenol, naphthoquinone shikonin, which are contained in plants and used as oriental medicine also showed strong suppressive activities. Organosulfur compounds such as BITC, BTC and MMTS also exerted antioxidative properties although the effects were rather weak. In this assay, a synthetic butenolide compound, KYN-54 having protective effect

Modifying effect of each compound on lipid peroxidation in erythrocyte membrane in liver homogenate

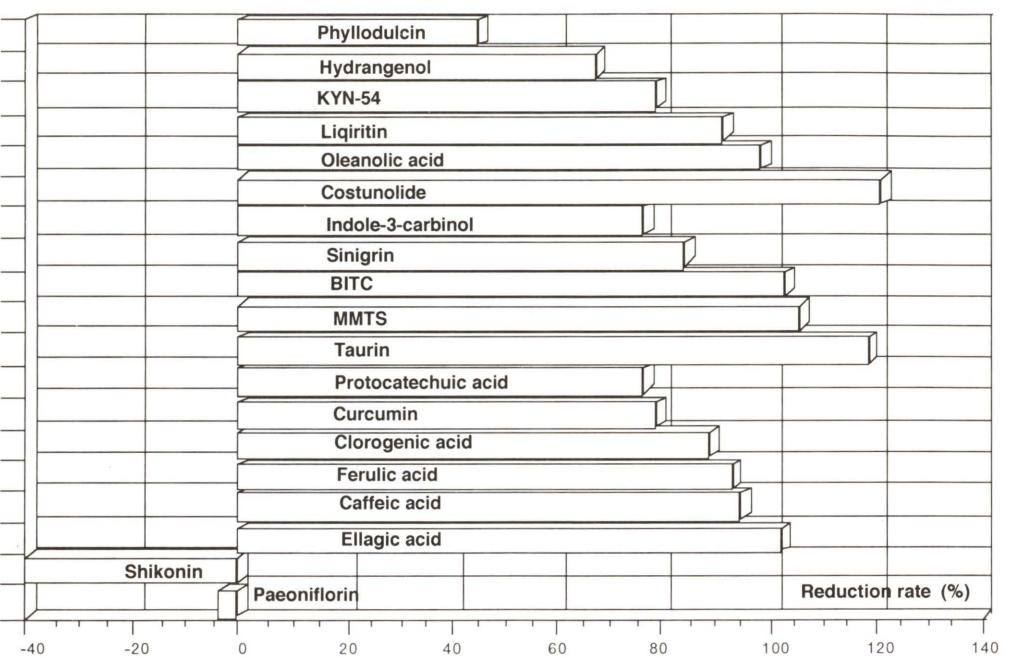


Fig. 4. Effects of each agent on 2-nitropropane-induced lipid peroxidation in the liver tissues.

in large bowel carcinogenesis (Mori *et al.*, 1992) did not indicate any positive reaction on the peroxidation.

2) Assay using rat liver cells

Male F344 rats, 5 weeks old, were divided into 3 groups. Rats in group 1 received test chemical in diet at concentration of 100 ppm and those of group 2 were given the basal diet alone. Both groups were exposed to 2-nitropropane at dose of 100 mg/kg at 10 days after the start of experiment. Animals of group 3 were given injection of saline alone and kept on the basal diet, and treated as controls. Twenty four hours after the injection, the livers were excised and chilled in ice cold PBS. The livers were homogenized in an tissue homogenizer, centrifuged at 15,000 g for 30 min. The supernatant was assayed for lipid peroxidation. Protein count was measured by Bio-Rad protein assay kit, utilizing bovine serum albumin as a standard (Osawa *et al.*, 1987). Results of this assay are shown in Fig. 4. As like in the assay with erythrocyte membrane, phenolic compounds such as ellagic acid, caffeic acid or chlorogenic acid indicated fairly strong activity on the lipid peroxidation. Organosulfur compounds like taurin, MMTS or BITC, and sesquiterpene compound, costunolide which had been proved as preventive on large bowel carcinogenesis (Mori *et al.*, 1994), also had strong activity. Shikonin and paeoniflorin did not exert any positive responses.

References

Kasai, H., M-H. Cung, F. Yamamoto, E. Otsuka, J. Laval, A. P. Grollman and S. Nishimura (1993) Formation, inhibition of formation, and repair of oxidative 8-hydroxyguanine DNA damage, In: G. Bronzetti, H. Hayatsu *et al.* (Eds.), Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III, Plenum Press, New York, pp. 257-262.

Kawamori, T., T. Tanaka, A. Hara, J. Yamahara and H. Mori (1995) Modifying effects of naturally occurring products on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats, *Cancer Res.*, **55**, 1277-1282.

Osawa, T., A. Ide, J.-D. Su and M. Namiki (1987) Inhibition of lipid peroxidation by ellagic acid, *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 808-812.

Reddy, B. S., C. V. Rao, A. Rivenson and G. Kellof (1993) Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds, *Cancer Res.*, **53**, 3493-3498.

Sugie, S., K. Okumura, A. Okumura, T. Tanaka and H. Mori (1994) Inhibitory effects of benzyl thiocyanate and benzyl

isothiocyanate on methylazoxymethanol acetate-induced intestinal carcinogenesis in rats, *Carcinogenesis*, **15**, 1555-1560.

Sugie, S., A. Okumura, T. Tanaka and H. Mori (1993) Inhibitory effects of benzyl isothiocyanate and benzyl thiocyanate on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats, *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 865-870.

Tanaka, T., H. Iwata, K. Niwa, Y. Mori and H. Mori (1988) Inhibitory effect of ellagic acid on N-2-fluorenlyacetamide-induced liver carcinogenesis in male ACI/N rats, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **79**, 1297-1303.

Tanaka, T., T. Kawamori, M. Ohnishi, K. Okamoto, H. Mori and A. Hara (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and post-initiation phases, *Cancer Res.*, **54**, 2359-2365.

Tanaka, T., T. Kawamori, M. Ohnishi, H. Makita, H. Mori, K. Satoh and A. Hara (1995) Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase, *Carcinogenesis*, **16**, 2957-2963.

Tanaka, T., T. Kojima, T. Kawamori and H. Mori (1995) Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid, *Cancer*, **75**, 1433-1439.

Tanaka, T., T. Kojima, A. Wang, M. Suzuki, K. Okamoto and H. Mori (1993) Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids, *Carcinogenesis*, **14**, 1321-1325.

Tanaka, T., T. Kojima, T. Kawamori, N. Yoshimi and H. Mori (1993) Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats, *Cancer Res.*, **53**, 2775-2779.

Tanaka, T., T. Kojima, Y. Mori and H. Mori (1992) Inhibitory effects of the natural products indole-3-carbinol and sinigrin during initiation and promotion phases of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 835-842.

Tanaka, T., T. Kojima, M. Suzuki and H. Mori (1993) Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid; suppressing effects on tumor development and biomarkers expression of colon carcinogenesis, *Cancer Res.*, **53**, 3098-3913.

Tanaka, T., H. Makita, M. Ohnishi, Y. Hirose, A. Wang, H. Mori, K. Satoh, A. Hara and H. Ogawa (1994) Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin; comparison with the protective effect of β -carotene, *Cancer Res.*, **54**, 4653-4659.

Tanaka, T., H. Makita, M. Ohnishi, H. Mori, K. Satoh and A. Hara (1995) Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res.*, **55**, 4059-4064.

Tanaka, T., Y. Mori, Y. Morishita, A. Hara, T. Ohno, T. Kojima and H. Mori (1990) Inhibitory effect of sinigrin and indole-3-carbinol on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats, *Carcinogenesis*, **11**, 1403-1406.

Tanaka, T., Y. Morishita, M. Suzuki, T. Kojima and H. Mori (1994) Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*, **15**, 15-19.

Yoshimi, N., A. Wang, Y. Morishita, T. Tanaka, S. Sugie, K. Kawai, J. Yamahara and H. Mori (1992) Modifying effects of fungal and herb metabolites on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1273-1278.

第24回大会ミニシンポジウム
「ヒト集団の環境影響モニタリング」

DNAメチル化のモニタリング

Monitoring of DNA methylation

佐藤茂秋, 大杉理恵

Shigeaki Sato and Rie Ohsugi

神戸大学医学部衛生学講座 650 神戸市中央区楠町 7-5-1

Department of Hygiene, Kobe University School of Medicine
7-5-1, Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650, Japan

(受理: 1996年2月22日)

Summary

DNA modification and the following structural changes of DNA are considered to be the initial event of carcinogenesis or other age-related disorders. DNA methylation is one of the most common forms of DNA modification induced by environmental methylating agents such as *N*-nitroso compounds. We measured the level of *N*⁷-methyldeoxyguanosine 3'-monophosphate (7-MedGp) in human peripheral leukocytes by high-performance liquid chromatography (HPLC)/³²P-postlabeling method in various groups. The level of 7-MedGp of healthy non-smokers (3-80 residues/10⁷ dGp) tended to decrease with age, and was significantly lower than that of smokers and rather higher than that of the cancer patients. A wide variation of the level was found in non-smokers at age groups between 20 to 60 years. Thus the 7-MedGp level seemed to reflect that of the recent exposure of each individual to environmental methylating agents. To see if the 7-MedGp level in peripheral leukocytes serves as a marker of cancer risk, follow-up studies on the subjects with high and low levels of this marker should be necessary.

Keywords: HPLC/³²P-postlabeling method, *N*⁷-methyldeoxyguanosine 3'-monophosphate (7-MedGp), monitoring, cancer risk

1.はじめに

ヒトの生活環境には生体に損傷を与える種々の要因が存在し、その損傷の様式や部位も様々である。老化やそれに伴って発生する癌などの疾患もそのような要因による特定の遺伝子の構造変化により引き起こされるのではないかと考えられている。現在ではこの遺伝子の構造変化を感度良く検出する方法がいくつか考案されているが、癌の発生初期に予想される 10¹⁰~10¹¹ 個の体細胞当たり 1 個の細胞の様なわずかな変化を検出するためにはそれらは十分ではなく、さらにそれをヒト集団に応用するのは尚一層困難である。そこで、遺伝子変化を直接検出するかわりに、将来それを誘発する可能性のある DNA の化学修飾を指標とするモニタリングが試みられている。今までにタバコに含まれるベンツピレン (Alexandrov *et al.*, 1992) などの多環芳香族炭化水素や食品中に含まれるアフラトキシン (Harrison *et al.*, 1991) の

ような化学物質による DNA 付加体、また、紫外線によるピリミジンダイマーの形成 (Setrow, 1982) や放射線による single strand break などについてヒトの種々の組織において定量がなされてきた。我々は環境中に普遍的に存在するニトロソ化合物等によると考えられるヒト末梢血白血球 DNA のメチル化が癌等の疾患発生の危険度評価または生物学的加齢の指標となり得るかを検討している。ヒト DNA 中にはメチル化剤などの作用により、Fig. 1 に示したようなメチル化塩基が存在するが、このうち 1-メチルアデニン、3-メチルシトシン (Boiteux *et al.*, 1982), 3-メチルチミン、O⁶-メチルグアニン (Schenkel *et al.*, 1984), O²-メチルシトシン及び O⁴-メチルチミン (Saffhill *et al.*, 1985) の 6 種の塩基は正常の塩基対を構成しない場合があり、点突然変異の原因となることが知られている。危険度評価の観点からは、これらの塩基を対象とし、その増減をモニターすることが望ましいわ

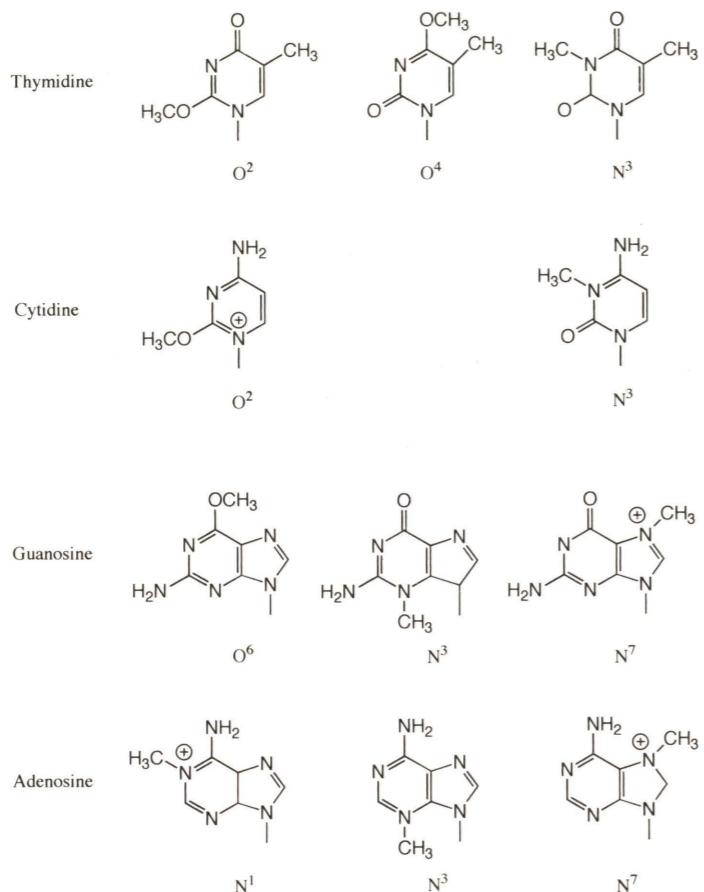


Fig. 1. Chemical structures of methylated bases found *in vivo*.

けであるが、これらの塩基はその存在割合が低く、定量することが容易ではない。そこで、これらの代わりにその存在割合が比較的高く測定しやすい7-メチルグアニンをN⁷-メチルデオキシグアノシン3'-1'リン酸(7-MedGp)として定量し、異なる年齢、生活環境、生活習慣、疾患群で比較検討を行った。

2. 材料と方法

健常人として種々の年齢の健康なボランティアや定期健康診断の受診者〔学生(10~25才), 会社員(20~60才), 特別養護老人ホーム入所者(70~90才)〕を、また、癌患者としては入院中で手術、化学療法前の、主に消化器系、泌尿器系の患者を対象とした。これらの対象者から末梢血を5~10mlヘパリン採血し、溶血後フェノール/クロロホルム法により白血球DNAを抽出した。7-MedGp定量にはShieldsらの方法(1990)に若干の変更を加えたHPLC/³²P-postlabeling法(Fig. 2)を用いた。すなわち、得られたDNAをmicrococcal nucleaseとspleen phosphodiesteraseでデオキシヌクレオシド3'-1'リン酸に分解した。これからHPLCにより目的のN⁷-メチルデオキシグアノシン3'-1'リン酸(7-MedGp)および内部標準となるデオキシグアノシン3'-1'リン酸(dGp)の画分を採取した。dGp画分の1/1000(v/v)量を7-MedGpの画分に加え、この混合ヌクレオチドの5'端を[γ -³²P]ATP

ATPおよびT4-polynucleotidokinaseにより標識した。これを二次元薄層クロマトグラフィーによって展開し、各々のヌクレオチドのスポットの放射活性の比からdGpに対する7-MedGpの存在比を求めた。各々のサンプルについて3回の分析を行い、その平均値をサンプル中の7-MedGpの値とした。

3. 結 果

i) 加齢等との相関

健康な非喫煙者での測定値を年齢に対しプロットした(Fig. 3)。7-MedGpの量は3~80個/10⁷dGpとばらつきが大きく、加齢に伴い減少する傾向を示したが、有為な相関ではなかった($p=0.09$)。また、種々の生活環境にある壮年群(60才以下)でばらつきが大きく、それに対して生活環境が同じで単純と思われる老人ホーム入所者群ではばらつきが小さかった。このことから7-MedGpの量は個々の生活環境におけるメチル化剤への最近の暴露を反映していると考えられる。

ii) 喫煙との相関

生活習慣の一つとして、喫煙との関連を見た。健康な喫煙者群及びそれと年齢を一致させた非喫煙者群での7-MedGpの量を比較した(Fig. 4)。喫煙者群での7-MedGpの量(23.8 ± 16.3 個/10⁷dGp)は非喫煙者群のそれ(15.9 ± 5.8 個/10⁷dGp)に比較して有為に高い傾

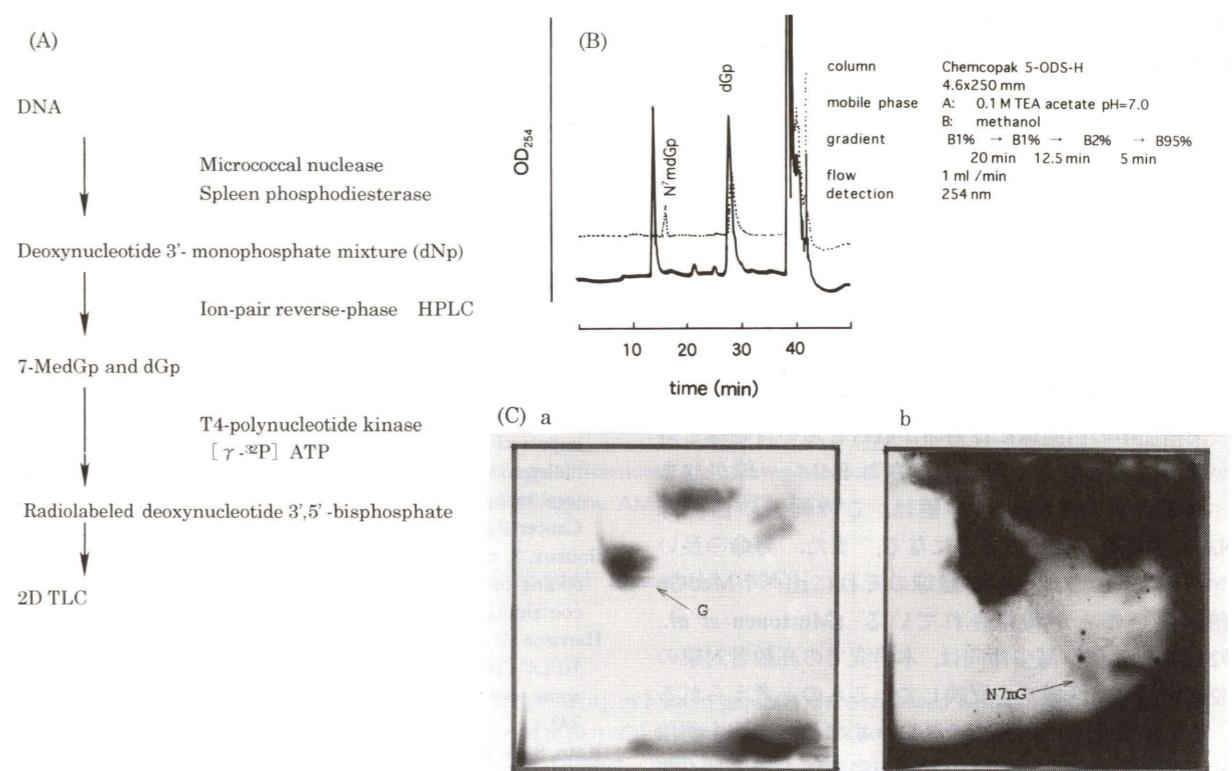


Fig. 2. Protocol of analysis of 7-MedGp (A). Representative patterns of HPLC/³²P-postlabeling analysis of 7-MedGp (B). Typical patterns of autoradiography obtained by exposure for 10 min (a) and 2 hrs (b) (C).

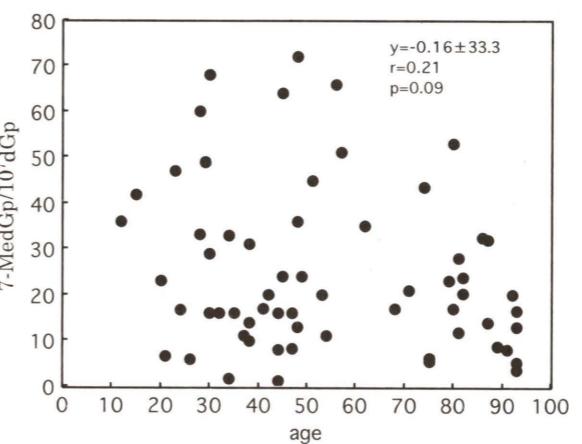


Fig. 3. The levels of 7-MedGp of peripheral leukocyte DNA of healthy non-smokers at various ages.

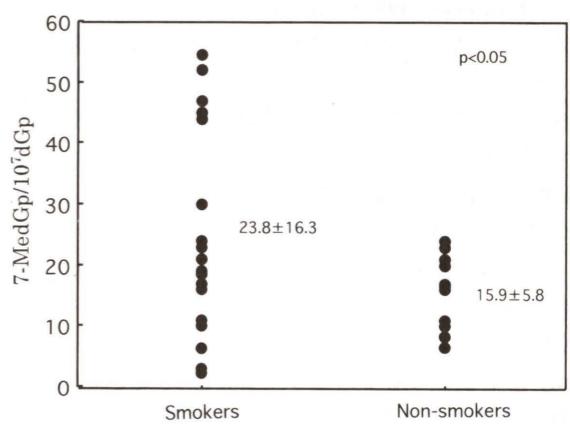


Fig. 4. The levels of 7-MedGp of healthy smokers' and non-smokers' peripheral leukocyte DNAs.

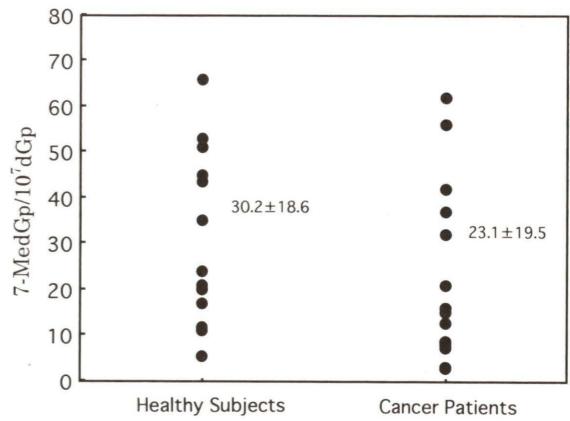


Fig. 5. The levels of 7-MedGp of healthy non-smokers' and cancer patients' peripheral leukocyte DNAs.

い生活習慣が単純化し、採血時には入院前の生活習慣の影響は既に消失しているためではないかと考えている。

4. 考 察

現在までの定量の結果、末梢血白血球DNA中の7-MedGpの量は有為ではないが加齢に伴う減少傾向を示し、喫煙により有為に増加し、また癌患者と健常人では有為の差ではなく、癌患者でむしろ低いなどの傾向が示された。このため、測定された値は環境中のメチル化剤への暴露により何年も蓄積されたメチル化レベルではなく、比較的最近の暴露を反映しているものと考えられる。末梢血中の白血球には寿命が数日と短い骨髄球と寿命が数ヶ月あるいは1年以上とされるリンパ球が含まれ、測定された7-MedGpの値は、この両者の白血球DNAの平均をみていることになる。また、寿命の長いリンパ球DNAのほうが骨髄球のそれに比べ7-MedGpの値が高いことが報告されている(Mustonen *et al.*, 1992)。加齢に伴う減少傾向は、本研究での高齢者対象の比較的単純な生活様式を反映しているものと考えられるが、その他老化に従い寿命の長い、すなわち修飾を蓄積する可能性のあるリンパ球の割合が白血球中で少なくなることによるのかもしれない。また、肺組織では喫煙と7-MedGpの量との相関はないとする報告もなされている(Kato *et al.*, 1995)。我々の結果では有為な差がみられた。癌患者と健常人との有為の差ではなく、癌患者がむしろ低い傾向を示したが、これも入院による生活の単純化を反映するものであろう。生活習慣、生活環境による差が見られたことから、末梢血白血球の寿命などから7-MedGpの量は生活環境中のメチル化剤への比較的最近の暴露量を反映しているものと考えられる。

この定量値を各個人または集団の将来の発癌リスクの評価に用いることができるか否かを調べるために、高い値を示した群と低い値を示した群について、follow-up studyが必要となるであろう。また、突然変異の誘発に直接に関係のあるO⁶-メチルグアニンについても同様の

測定を行い、検討する必要がある。

謝 辞

検体の収集にあたっては大阪大学医学部環境医学教室森本兼彌教授、竹下達也助教授、滋賀医科大学第2生化学講座上山久雄助教授、愛滋会矢倉診療所兼高明生先生のご協力をいただいた。また本研究は文部省科学研究費の援助を受けた。

参考文献

Alexandrov K., M. Rojas, O. Geneste, M. Castegnaro, A. M. Camus, S. Petruzzelli, C. Giuntini and H. Bartsch (1992) An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diolepoxide-DNA adducts in smokers' lung: Comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Res.*, **52**, 6248-6253.

Boiteux, S. and J. Laval (1982) Mutagenesis by alkylating agents: coding properties for DNA polymerase of poly(dC) template containing 3-methylcytosine. *Biochimie*, **64**, 637-641.

Harrison J. C. and Garner R. C. (1991) Immunological and HPLC detection of aflatoxin adducts in human tissues after an acute poisoning incident in S.E. Asia. *Carcinogenesis*, **12**, 741-743.

Kato, S., E. D. Bowman, A. M. Harrington, B. Blomeke and P. G. Shields (1995) Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**, 902-907.

Mustonen, R. and K. Hemminki (1992) 7-Methylguanine levels in DNA of smokers' and non-smokers' total white blood cells, granulocytes and lymphocytes. *Carcinogenesis*, **13**, 1951-1955.

Saffhill, R. and J. A. Hall (1985) The incorporation of O⁶-methyldeoxyguanosine monophosphate and O⁴-methyldeoxythymidine monophosphate into polynucleotide templates leads to errors during subsequent *in vitro* DNA synthesis. *Chem. Biol. Interact.*, **56**, 363-370.

Schendel, P. F. and I. Michaeli (1984) A model for the mechanism of alkylation mutagenesis. *Mutat. Res.*, **125**, 1-14.

Scield, P. G., A. C. Povey, V. L. Wilson, A. Weston and C. C. Harris (1990) Combined high-performance liquid chromatography/³²P-postlabeling assay of N⁷-methyldeoxyguanosine. *Cancer Res.*, **50**, 6580-6584.

Setlow, R. B. (1982) DNA repair, aging and cancer. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **60**, 249-255.

Environ. Mutagen Res., **18**: 83-86 (1996)

特 別 企 画

第24回大会ミニシンポジウム
「ヒト集団の環境影響モニタリング」

Chromosome Abnormality in Human Gametes by Exposure to Mutagens

Yujiro Kamiguchi, Hiroyuki Tateno, Seiji Watanabe
and Kazuya Mikamo

Department of Biological Sciences, Asahikawa Medical College,
4-5 Nishikagura, Asahikawa 078, Japan

(Accepted: January 13, 1996)

Summary

Previous studies on chromosome abnormality in human gametes were reviewed with emphasis on the effects of mutagens. A marked increase of structural chromosome aberrations has been found in human spermatozoa irradiated *in vitro* with X-, gamma-, and beta-rays and in those treated *in vitro* with anti-neoplastic agents such as bleomycin, daunomycin, methyl methanesulfonate, and triethylenemelamine. In contrast, no chromosome-damaging effect has been found with microwaves, cyclophosphamide, mitomycin C or dioxin. Some investigators have carried out sperm chromosome analysis in cancer patients who had undergone radio- and chemotherapy and found a significant increase of chromosome aberrations, while others have found no such effect. Recently, sperm chromosome analysis has become more convenient with the use of frozen-thawed human spermatozoa and frozen-thawed hamster oocytes for *in vitro* fertilization. Further prospects of sperm chromosome study are discussed in relation to recent advances in methodology.

A number of cytogenetic studies have also been carried out with human oocytes. However, the direct effects of mutagens on human oocyte chromosomes have not yet been studied because of difficulties in using them for mutagenicity testing. This kind of study is still dependent upon the use of animal models.

Keywords: human spermatozoa, human oocytes, chromosome aberrations, radiation, chemical agents

abnormality in human gametes exposed to mutagens.

I. Sperm chromosome studies

1. *In vitro* effects of mutagens

A marked increase in structural chromosome aberrations has been reported in human spermatozoa irradiated *in vitro* with X-rays (Kamiguchi *et al.*, 1990b), gamma-rays (Brandriff *et al.*, 1988; Mikamo *et al.*, 1990, 1991), and tritium beta-rays (Kamiguchi *et al.*, 1990a). The incidence of spermatozoa with radiation-induced structural chromosome aberrations (*Y*) increased exponentially with increasing dosage (*D*), being expressed by an equation, $Y(\%) = 100(1 - e^{-0.0054D})$ for gamma-rays (Fig. 1). Within the low dose area below 2 Gy, however, the dose-dependent increase was approximately linear, showing nearly the same rate in each kind of radioactive ray ($Y = 0.08 + 34.52D$ for X-rays; $Y = 4.25 + 31.65D$ for gamma-rays; $Y = 2.20 + 34.62D$ for beta-rays) (Mikamo *et al.*, 1990, 1991). The breakage-type aberrations were induced by radiation far more frequently than the exchange-type aberrations. The

Introduction

Cytogenetic study of human gametes is important in assessing genetic (transgenerational) effects of various mutagens. A number of studies have been carried out in human spermatozoa during the last decade because of the development of the interspecific *in vitro* fertilization system between human spermatozoa and zona-free hamster oocytes. Using this method, it has been shown that spontaneous incidences of sperm chromosome aberrations are considerably high. This method has also been applied to chromosomal studies of spermatozoa exposed *in vitro* to various mutagens. At present, this experimental approach is the only way to assess directly the effects of mutagens on human sperm chromosomes.

A large body of human oocyte chromosome studies have also been carried out in the last decade with the wide use of *in vitro* fertilization-embryo transfer technique. These studies have shown that chromosome aberrations also occur with high frequency in human oocytes.

We review here the previous studies on the chromosome

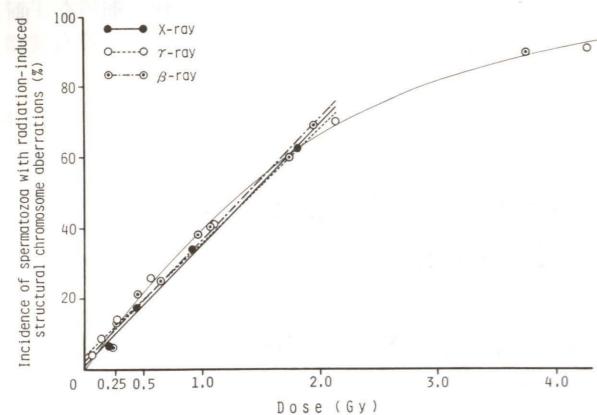


Fig. 1. Dose-response relationship for the induction of human spermatozoa with radiation-induced structural chromosome aberrations.

former showed a linear increase, whereas the latter showed a quadratic increase. In both types of aberration, the slope of dose-effect equation was also nearly the same for each kind of radiation. The dose-dependent increase of chromosomally abnormal spermatozoa was almost the same between acute (135.5 cGy/min) and chronic (1.7 cGy/min) exposures to gamma-rays (Tateno *et al.*, unpublished). This was in a marked contrast to the results in somatic cells in which chronic exposure has been shown to be far less effective in inducing structural chromosome aberrations. The possible reason for this is that spermatozoa have no cytoplasm, and therefore have no enzyme to repair radiation-induced DNA damage. Microwave irradiation has been shown to have no clastogenic effect on sperm chromosomes (Kamiguchi *et al.*, 1995b).

The *in vitro* effects of some chemicals have also been studied (Kamiguchi *et al.*, 1995a). A significant increase in structural chromosome aberrations was found in spermatozoa treated with antineoplastic agents such as bleomycin, daunomycin, methyl methanesulfonate, and triethylenemelamine (Fig. 2). In contrast, cyclophosphamide and mitomycin C had no such effect, although they are known to be clastogenic in somatic cells. However, this is not surprising, because it has been shown that their metabolites, rather than the chemicals themselves, actually act to induce aberrations. Spermatozoa have no cytoplasm, and therefore have no enzymes to metabolize these chemicals. Moreover, no chromosome-damaging effect was found with

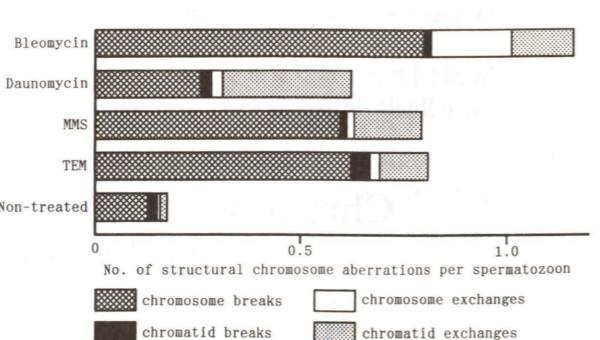


Fig. 2. Types of mutagen-induced structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa. The net incidence of mutagen-induced aberrations was calculated with the formula previously described by us (Kamiguchi *et al.*, 1990b).

MMS, methyl methanesulfonate; TEM, triethylenemelamine.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Kamiguchi, 1995). These results are summarized in Table 1.

The above-mentioned *in vitro* studies indicate that human sperm chromosomes are highly vulnerable to radiation and some chemicals. Furthermore, it has been found that human spermatozoa retain a high fertilizing ability even after a high-dose exposure to mutagens (Kamiguchi *et al.*, 1990a, b; Mikamo *et al.*, 1990, 1991; Kamiguchi *et al.*, 1995a, b). This suggests that mutagen-induced sperm chromosome aberrations may be transmitted to the next generation without being selected out at fertilization, so far as these mutagens are concerned.

2. In vivo effects of mutagens

Some data on the *in vivo* effects of mutagens on male germ cells have been accumulated. Several investigators carried out sperm chromosome analysis in cancer patients who had undergone radio- and/or chemotherapy. In these patients, spermatozoa were exposed to the therapeutic agents at their spermatogonial stage. As shown in Table 2, however, the results were not consistent. Some investigators found significant increases in both numerical and structural chromosome aberrations (Martin *et al.*, 1986, 1989; Brandriff *et al.*, 1994), another found increases only in structural aberrations (Genescà *et al.*, 1990), and others found no effect in either aberrations (Jenderny and Röhrborn, 1987; Jenderny *et al.*, 1992). In these studies,

Table 1. Cytogenetic effects of various mutagens on human sperm chromosomes.

Mutagen	Dose	Duration of exposure	Induction of structural chromosome aberrations
X-rays	0.23–1.82 Gy	3.8 min >	+
γ-rays	0.06–4.25 Gy	3.2 min >	+
β-rays	0.25–3.74 Gy	80 min	+
Microwaves	2.45 GHz, 500W	5–10 sec	–
Bleomycin	50 µg/ml	90 min	+
Daunomycin	0.1 µg/ml	90 min	+
Methyl methanesulfonate	100 µg/ml	120 min	+
Triethylenemelamine	0.1 µg/ml	120 min	+
Cyclophosphamide	1–1000 µg/ml	120 min	–
Mitomycin C	0.1–100 µg/ml	120 min	–
Dioxin	1–5 µg/ml	120 min	–

Table 2. Induction of chromosome aberrations in spermatozoa of cancer patients.

Author	Disease	Treatment	Chromosome aberrations	
			Aneuploidy	Structural anomaly
Martin <i>et al.</i> (1986)	Seminoma etc.	Radiotherapy	+	+
Jenderny and Röhrborn (1987)	?	Radiotherapy	–	–
Martin <i>et al.</i> (1989)	Seminoma etc.	Radiotherapy	–	+
Genescà <i>et al.</i> (1990)	Wilms' tumor etc.	Radio- and/or chemotherapy	–	+
Jenderny <i>et al.</i> (1992)	Seminoma etc.	Chemotherapy	–	–
Brandriff <i>et al.</i> (1994)	Hodgkin's disease	Radio- and/or chemotherapy	+	+

* The increase was not statistically significant.

therapeutic treatments were done in spermatogonia, so that the chromosomally abnormal spermatozoa detected are thought to be descendants of affected spermatogonia which had survived during subsequent mitotic and meiotic divisions to form mature spermatozoa. Thus, the majority of abnormal spermatozoa are expected to have structural chromosome aberrations of stable type such as inversion and reciprocal translocation. However, a considerable number of abnormal spermatozoa did have unstable aberrations. Therefore, existing results are still controversial and further studies are necessary to be able to draw a definite conclusion.

3. Data from normal men

Several investigators have carried out sperm chromosome analysis in normal men and found that spontaneous incidence of spermatozoa with structural chromosome aberrations varies considerably from donor to donor, ranging from 0.0 to 23.1% (Martin *et al.*, 1987), 1.9 to 14.5% (Brandriff *et al.*, 1990), or 3.6 to 24.8% (Kamiguchi *et al.*, 1994). These great individual variations suggest that the donors of high incidence may have been exposed to some mutagens, but no investigator was able to find any possible correlation between these donors and their exposure to specific agents. Both positive (Martin and Rademaker, 1987) and negative (Kamiguchi *et al.*, 1994) results have been reported as to the possible correlation of aberration frequency with donor age. While, the habit of cigarette smoking has been shown to be unrelated (Kamiguchi *et al.*, 1994). Consequently, causal factors of individual variations remain unknown.

4. Recent advances in methodology

Sperm chromosome analysis has recently become more convenient and reliable due to the following methodological improvements. Martin *et al.* (1991) have succeeded in chromosome analysis of frozen-thawed spermatozoa and found that cryopreservation does not affect the frequency of sperm chromosome aberrations, so spermatozoa can now be frozen and sent over long distances for later cytogenetic studies. Tateno *et al.* (1992, 1995) have developed a freezing method for unfertilized hamster oocytes and shown that freezing of the oocyte does not affect the frequency of sperm chromosome aberrations, so hamster oocytes can now be stored for ready supply and transportation. These oocytes are of particular value in clinics where animal care and experiments with live animals are problematical or forbidden. Cui *et al.* (1994) have developed a chromosome painting method using fluorescent in situ hybridization, allowing sperm chromosomes to be analyzed more precisely. This technique is especially useful in detect-

ing chromosomal rearrangements. Most recently, sperm chromosomes have been successfully analyzed after intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes (Rybouchkin *et al.*, 1995). This method seems to be useful in studying the possible correlation between specific morphology of a spermatozoon and its chromosomal abnormality.

II. Oocyte chromosome studies

It has been shown that chromosomal abnormalities are the major cause of spontaneous abortions and that trisomy is the most predominant chromosome aberration found in abortuses and newborns. In trisomies 13, 18, and 21, about 80% of the extra chromosomes were shown to be maternal in origin (Chandley, 1991). To obtain more direct evidence of maternal contribution, a large number of cytogenetic studies have been carried out in human unfertilized oocytes (Pellestor, 1991; Kamiguchi *et al.*, 1993, 1994; Nishino *et al.*, 1994). Incidences of chromosome aberrations were reported to be surprisingly high, ranging from 18% to more than 50%. Unfortunately, however, there has been no experimental data on the effects of specific mutagens on human oocyte chromosomes because of the difficulties in using them for mutagenicity testing. This kind of study still has to rely upon animal models. Until now, much direct evidence has been accumulated in murine species as to the induction of aneuploidy and structural chromosome aberrations by radiation (Mikamo, 1982; Griffin *et al.*, 1990) and chemicals (Mailhes and Marchetti, 1994).

III. Conclusion

In vitro studies on the effects of mutagens have shown that human spermatozoa are highly vulnerable to radiation and some chemicals. Sperm chromosome studies in normal men have revealed that there is a great individual variation in the frequencies of chromosomally abnormal spermatozoa. However, causal factors of this variation still remain unknown, although influences of some environmental mutagens are suspected. In future, therefore, epidemiologic studies have to be performed in relation to the race, profession, immediate environment, pesticides, food additives, medicaments, etc. Chromosome studies in men occupationally exposed to a specific mutagen and men living in highly polluted areas seem to be especially important. Moreover, *in vitro* mutagenicity tests with human spermatozoa have to be further expanded to include a greater range of agents suspected of causing mutagenesis.

Acknowledgments

This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (No. 02455006) and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (No. 05278114) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, and a grant from the Japanese Atomic Energy Research Institute.

References

Brandriff, B. F., L. A. Gordon, L. K. Ashworth and A. V. Carrano (1988) Chromosomal aberrations induced by *in vitro* irradiation: Comparison between human sperm and lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.*, **12**, 167-177.

Brandriff, B. F., L. A. Gordon and A. V. Carrano (1990) Cytogenetics of human sperm: Structural aberrations and DNA replication, In: M. L. Mendelsohn, R. J. Albertini (Eds.), *Mutation and the Environment, Part B*, Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 425-434.

Brandriff, B. F., M. L. Meistrich, L. A. Gordon, A. V. Carrano and J. C. Liang (1994) Chromosomal damage in sperm of patients surviving Hodgkin's disease following MOPP (nitrogen mustard, vincristine, procarbazine, and prednisone) therapy with and without radiotherapy, *Hum. Genet.*, **93**, 295-299.

Chandley, A. C. (1991) On the parental origin of *de novo* mutation in man, *J. Med. Genet.*, **28**, 217-223.

Cui, X., H. Tateno, I. Hayata, K. Sato and Y. Kamiguchi (1994) A chromosome painting method for human sperm chromosomes using fluorescent *in situ* hybridization, *Jpn. J. Hum. Genet.*, **39**, 255-258.

Genescà, A., M. R. Caballin, R. Miró, J. Benet, X. Bonfill and J. Egoscue (1990) Human sperm chromosomes: Long-term effect of cancer treatment, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **46**, 251-260.

Griffin, C. S., C. Tease and G. Fisher (1990) The effect of low-dose X-irradiation on numerical and structural chromosome anomaly induction in mouse immature oocytes, *Mutat. Res.*, **231**, 137-142.

Jenderny, J., M. L. Jacobi, A. Rüger and G. Röhrborn (1992) Chromosome aberrations in 450 sperm complements from eight controls and lack of increase after chemotherapy in two patients, *Hum. Genet.*, **90**, 151-154.

Jenderny, J. and G. Röhrborn (1987) Chromosome analysis of human sperm. I. First result with a modified method, *Hum. Genet.*, **76**, 385-388.

Kamiguchi, Y. (1995) Detection of human sperm chromosome aberrations caused by man-made environmental toxic agents, *Proc. Sci. Res. Priority Areas on "The Man-Earth System"*, pp. 318-320.

Kamiguchi, Y., B. Rosenbusch, K. Sterzik and K. Mikamo (1993) Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method, *Hum. Genet.*, **90**, 533-541.

Kamiguchi, Y., H. Tateno, Y. Iizawa and K. Mikamo (1995a) Chromosome analysis of human spermatozoa exposed to anti-neoplastic agents *in vitro*, *Mutat. Res.*, **326**, 185-192.

Kamiguchi, Y., H. Tateno and K. Mikamo (1990a) Dose-response relationship for the induction of structural chromosome aberrations in human spermatozoa after *in vitro* exposure to tritium β -rays, *Mutat. Res.*, **228**, 125-131.

Kamiguchi, Y., H. Tateno and K. Mikamo (1990b) Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X-irradiated *in vitro*, *Mutat. Res.*, **228**, 133-140.

Kamiguchi, Y., H. Tateno and K. Mikamo (1994) Chromosomally abnormal gametes as a cause of developmental and congenital anomalies in humans, *Cong. Anom.*, **34**, 1-12.

Kamiguchi, Y., H. Tateno, S. Watanabe and Y. Tonomura (1995b) Effects of microwave irradiation on human sperm chromosomes, *Sci. Rept. Tokyo Woman's Christian Univ.*, **45**, 1297-1303.

Mailhes, J. B. and F. Marchetti (1994) Chemically-induced aneuploidy in mammalian oocytes, *Mutat. Res.*, **320**, 87-111.

Martin, R. H., J. E. Chernos and A. W. Rademaker (1991) Effect of cryopreservation on the frequency of chromosomal abnormalities and sex ratio in human sperm, *Mol. Reprod. Develop.*, **30**, 159-163.

Martin, R. H., K. Hildebrand, J. Yamamoto, A. Rademaker, M. Barnes, G. Douglas, K. Arthur, T. Ringrose and J. S. Brown (1986) An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy, *Mutat. Res.*, **174**, 219-225.

Martin, R. H. and A. W. Rademaker (1987) The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men, *Am. J. Hum. Genet.*, **41**, 484-492.

Martin, R. H., A. Rademaker, K. Hildebrand, M. Barnes, K. Arthur, T. Ringrose, J. S. Brown and G. Douglas (1989) A comparison of chromosomal aberrations induced by *in vivo* radiotherapy in human sperm and lymphocytes, *Mutat. Res.*, **226**, 21-30.

Martin, R. H., A. W. Rademaker, K. Hildebrand, L. Long-Simpson, D. Peterson and J. Yamamoto (1987) Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men, *Hum. Genet.*, **77**, 108-114.

Mikamo, K. (1982) Meiotic chromosomal radiosensitivity in primary oocytes of the Chinese hamster, *Cytogenet. Cell Genet.*, **33**, 88-94.

Mikamo, K., Y. Kamiguchi and H. Tateno (1990) Spontaneous and *in vitro* radiation-induced chromosome aberrations in human spermatozoa: Application of a new method, In: M. L. Mendelsohn, R. J. Albertini (Eds.), *Mutation and the Environment, Part B*, Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 447-456.

Mikamo, K., Y. Kamiguchi and H. Tateno (1991) The interspecific *in vitro* fertilization system to measure human sperm chromosomal damage, In: B. L. Gledhill, F. Mauro (Eds.), *New Horizons in Biological Dosimetry*, Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 531-542.

Nishino, T., Y. Kamiguchi, H. Tateno, K. Sengoku and M. Ishikawa (1994) A cytogenetic study of human oocytes unfertilized in *in-vitro* fertilization (IVF), *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, **46**, 95-101.

Pellestor, F. (1991) Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes, *Hum. Genet.*, **86**, 283-288.

Rybouchkin, A., D. Doxortsev, P. D. Sutter, C. Qian and M. Dhont (1995) Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa, *Hum. Reprod.*, **10**, 1130-1135.

Tateno, H. and Y. Kamiguchi (1995) Application of cryopreserved golden hamster oocytes to *in vitro* genotoxicity assays for human sperm chromosomes, *Environ. Mol. Mutagen.*, **25**, 263-265.

Tateno, H., Y. Kamiguchi and K. Mikamo (1992) A freezing and thawing method of hamster oocytes designed for both the penetration test and chromosome assay of human spermatozoa, *Mol. Reprod. Develop.*, **33**, 202-209.

Environ. Mutagen Res., **18**: 87-90 (1996)

第24回大会ミニシンポジウム
「ヒト集団の環境影響モニタリング」

アルコール感受性を規定する遺伝素因と染色体変異

Genetic factors regulating alcohol sensitivity and chromosome alterations in a Japanese population

竹下達也, 森本兼義

Tatsuya Takeshita and Kanehisa Morimoto

大阪大学医学部環境医学教室 565 大阪府吹田市山田丘 2-2

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

(受理: 1996年3月5日)

Summary

Excessive drinking of alcohol is now widely known to be one of the major life-style components that can cause deleterious effects on health. Among these effects, of major concern from the view point of prevention of alcohol-related diseases, are cytogenetic and other genotoxic effects. Alcohol is first metabolized to acetaldehyde, a direct cause of various types of chromosomal DNA lesions and alcohol-related diseases, and is then further detoxified to the much less toxic metabolite, acetate. Some 50% of Oriental people are deficient in the aldehyde-dehydrogenase 2 isozyme (ALDH2) that can most efficiently detoxify acetaldehyde. In the present study we investigated, in 524 Japanese workers, the relationships of the ALDH2 genotype with alcohol-associated symptoms, drinking behavior and the levels of genetic damage in peripheral blood lymphocytes. The latter was assessed by sister chromatid exchange (SCE), utilizing a new, rapid and non-isotopic PCR method. We found ALDH2 genotypes had a great effect on alcohol sensitivity and alcohol-drinking behavior. We showed that lymphocytes from habitual drinkers lacking the ALDH2 enzyme had significantly higher frequencies of SCE than those from ALDH2 proficient individuals. Hemoglobin-associated acetaldehyde levels were also high among habitual drinkers with ALDH2 deficiency.

Keywords: alcohol-drinking, acetaldehyde, aldehyde dehydrogenase, genetic polymorphism, sister chromatid exchange

1. はじめに

がんの原因の大きな部分を食事、タバコをはじめとするライフスタイル関連要因が占めていることが疫学的に示されており、ライフスタイル環境の健康影響を定量的に解析することは重要な課題である (Doll and Peto, 1981)。我々はこれまで喫煙および総体としてのライフスタイルが、ヒト末梢血リンパ球の染色体変異（姉妹染色分体交換 (SCE)、小核）量に大きな影響を与えることを示してきた (Morimoto, 1990; Morimoto, 1993; Morimoto *et al.*, 1984; Morimoto and Takeshita, 1996)。しかしヒトにおいては、環境化学物質の代謝酵素活性に著しい個体差のあることが報告されてきており (Ayesh *et al.*,

1984; Blum *et al.*, 1991; Nakachi *et al.*, 1993; Seidegard *et al.*, 1986), ライフスタイル環境の健康影響も、各個体の遺伝素因、特に代謝酵素活性の個体差の影響をも加味して評価を行うことが重要な課題となっている。

日本人をはじめとする東洋人においては、アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) およびアルコール脱水素酵素 (ADH) などアルコールの代謝酵素に高頻度に多型がみられ (Agarwal and Goedde, 1990; Goedde *et al.*, 1979), アルコール感受性に大きな影響を及ぼしている (Wolff, 1972)。とくにアセトアルデヒド (AcH) 高親和性である ALDH2 の変異型は東洋人の約半数にみられ、飲酒時に血中 AcH 濃度が上昇し飲酒行動を抑制するとされてい

る (Harada *et al.*, 1981; Harada *et al.*, 1982). AcH は染色体変異や遺伝子変異を誘発するなど遺伝毒性が明らかにされている (Lambert *et al.*, 1994; Obe *et al.*, 1986; Obe and Ristow, 1977; Singh and Khan, 1995). そこで我々は、日本の職域集団男性を対象として、ALDH 等の遺伝子型を PCR 法を用いてスクリーニングし、質問紙法にてアルコール感受性および飲酒行動を把握し、さらに末梢血リンパ球の染色体変異 (SCE) 量を測定し、これらの健康指標の関連性の検討を行った (Morimoto and Takeshita, 1996; Takeshita and Morimoto, 1996; Takeshita *et al.*, 1993; Takeshita *et al.*, 1994).

1. 日本人集団における ALDH2 遺伝子型とアルコール感受性、飲酒行動との関連

ALDH2 の遺伝子型の検討には PCR-RFLP 法を用いた。末梢白血球より DNA を抽出し、これを鑄型として PCR 法によりエクソン 12 の増幅を行った。一方のプライマーの 1箇所に人工的にミスマッチを起こすことによって通常型アリルのみ制限酵素 Ksp6321 の認識部位が生じる (Takeshita *et al.*, 1993; Takeshita *et al.*, 1994)。増幅後にこの酵素で消化することにより、通常型ホモ (ALDH2*1/2*1), ヘテロ型 (ALDH2*1/2*2) と変異型ホモ (ALDH2*2/2*2) の 3 つの遺伝子型が明瞭に判定された。

Fig. 1 のように、通常量の飲酒でのフラッシングは、通常型ホモとそれ以外の遺伝子型との間に明瞭な差が認められたが、ヘテロ型と変異型ホモの間には差はみられなかった。ビールをコップに 1/4 杯という少量飲酒でのフラッシングは、ヘテロ型では 19% にすぎないが、変異型ホモでは 79% が常に出現すると答えた。動悸や頭痛、眠気についても 3 つの遺伝子型の間で、変異型アリルの

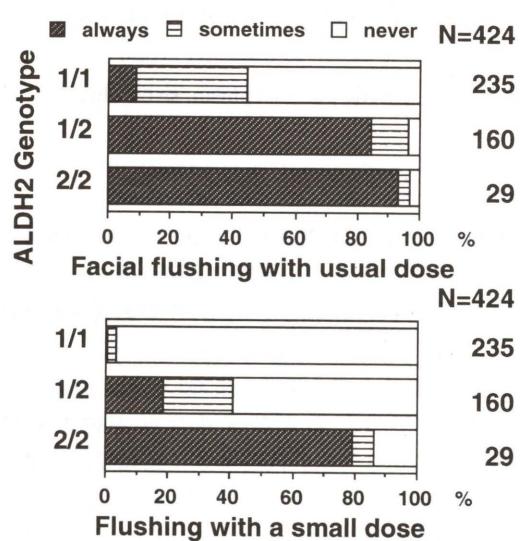


Fig. 1. Frequency of facial flushing after alcohol drinking in three ALDH2 genotypes among males. 1/1, 1/2, 2/2 denotes ALDH2*1/2*1, ALDH2*1/2*2, ALDH2*2/2*2, respectively.

数が多いほど頻度が高くなっていた。これらは男子における結果であるが、女子でもほとんど同様の結果であった。これらの飲酒時症状は、血中 AcH 濃度が高値となつたためにヒスタミンやカテコラミンが分泌されて生じるものと考えられている (Takeshita and Morimoto, 1996).

飲酒行動についても、Fig. 2 のようにほぼ毎日習慣的に飲酒している者の頻度は、通常型ホモが 52% と最も多く、ヘテロ型が 28%, 変異型ホモでは 0% となった。女子は全体に男子より飲酒頻度が低いが、やはり通常型ホモ、ヘテロ型、変異型ホモの順に飲酒頻度が低くなつた。男子では 1 日平均飲酒量も飲酒頻度と同様に、変異型アリルの数が多くなるに従つて少なくなつた (Fig. 3).

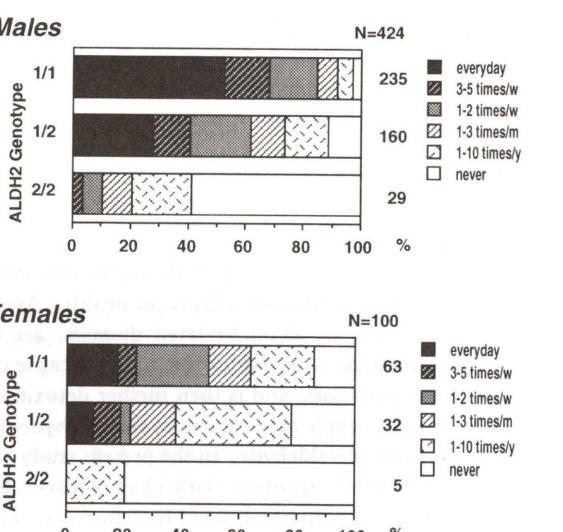


Fig. 2. Drinking frequency in three ALDH2 genotypes.

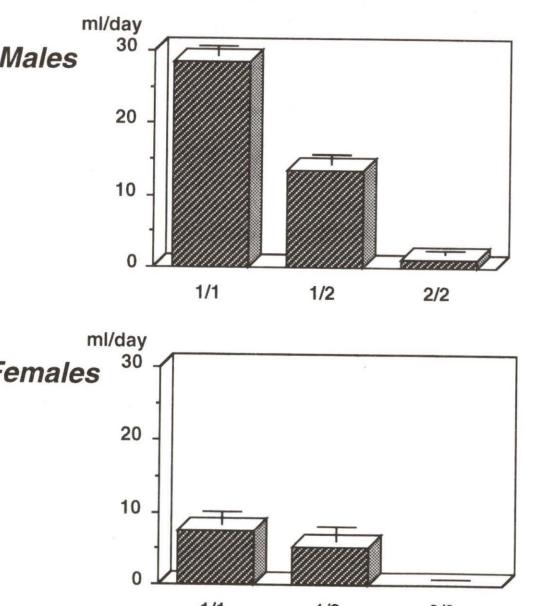


Fig. 3. Mean amounts of net ethanol consumption (per day) in three genotypes.

これまで毛根細胞の ALDH2 酶活性の有無によって、通常型ホモとそれ以外の群の間に明らかな表現型の差があることが知られていたが、今回はじめてヘテロ型と変異型ホモとの間にも明らかな差のあることが示された (Takeshita *et al.*, 1993; Takeshita *et al.*, 1994)。我々日本人の中には、ビールをコップに 1 杯も耐えられないというような極めてアルコール感受性の高いグループが決して稀ならず存在しているが、このような人の多くは ALDH2 の変異型ホモと考えられる。

アルコール脱水素酵素 (ADH2) の多型もモンゴロイドに多い変異型は活性が高いとされているが、飲酒時の AcH 濃度には差がみられないと報告されている (Yamamoto *et al.*, 1993)。本調査では、ADH2 多型は顔面紅潮やパッチテストの結果に軽度の影響を与えていたものの、飲酒行動への影響はみられなかった (Takeshita *et al.*, 1996)。

3. ALDH2 遺伝子型と末梢血リンパ球 SCE 頻度、赤血球ヘモグロビン AcH 付加体量との関連

末梢血リンパ球の baseline SCE 頻度を、ALDH2 活性および習慣的飲酒の有無によって 4 群に分けて比較検討

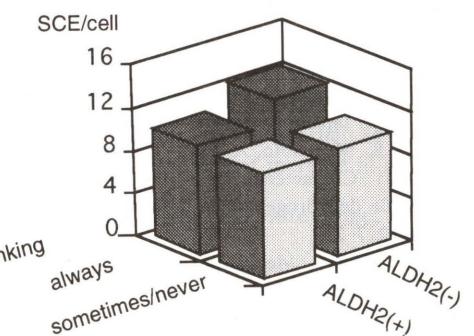


Fig. 4. Baseline sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes from ALDH2-deficient and nondeficient individuals. ALDH2(+) denotes ALDH2*1/2*1, and ALDH2(−) denotes ALDH2*1/2*2 plus ALDH2*2/2*2.

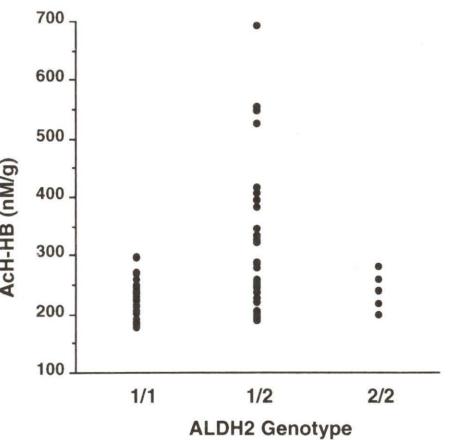


Fig. 5. Levels of hemoglobin-associated acetaldehyde adducts in three ALDH2 genotypes.

した所、ALDH2 活性が乏しいが習慣的に飲酒している群は、他の 3 群にくらべて有意に高い値であった (Fig. 4) (Morimoto and Takeshita, 1996)。喫煙の SCE 頻度への影響を補正しても結果は同様であった (Morimoto and Takeshita, 1996)。この群では、ALDH2 活性が乏しいため、習慣的に飲酒すると AcH による DNA 損傷レベルが持続的に高く SCE 頻度の上昇に結びついたことが考えられる。

AcH の持続的健康影響のもうひとつの指標として、赤血球ヘモグロビンの可逆的な AcH 付加体 (AcH-HB) 量を HPLC 法および蛍光検出器のシステム (Peterson and Polizzi, 1987) にて測定した。経口的エタノール負荷によりヘテロ型では著明な AcH-HB 量の増加をみたが、通常型ホモでは上昇がみられなかった。また職域集団の中で ALDH2 遺伝子型ごとに AcH-HB 量をみると、ヘテロ型に高値を示す者がみられたが、その全例が習慣的飲酒者であった (Fig. 5) (unpublished data)。従つて AcH-HB 量は、AcH の健康影響の予測的指標として有用と考えられた。

4. おわりに

以上のことから AcH の健康影響が ALDH2 等の遺伝素因および飲酒などの環境要因の両方により決定されることが示唆された。

アルコール依存症 (Harada *et al.*, 1982)、アルコール性肝障害 (Shibuya and Yoshida, 1988) においては、飲酒量の平均値の高い通常型ホモの危険が高いが、アルコール性肝障害の中で比較的重いタイプはヘテロ型に多いことを示唆する報告もある (Enomoto *et al.*, 1991)。またアルコール依存症も最近の久里浜病院の報告ではヘテロ型の割合が増加しているという (Higuchi *et al.*, 1994)。飲酒誘発喘息は東洋人に多いとされている (Watanabe, 1991) が、とくに飲酒後短時間のうちに出現する喘息はヘテロ型および変異型ホモに多いことが示唆されている (Takada *et al.*, 1994)。このように様々なアルコールに関連した健康影響が東洋人においては遺伝素因の交絡影響を受けていることが明らかになってきた。今後さらに集団の縦断的観察等の方法により精密に健康影響を検討する必要があろう。一般的にヒト集団におけるライフスタイル環境の健康影響を定量的に評価する上では、頻度の高い代謝酵素の多型などの遺伝素因の評価が不可欠と考えられる。

参考文献

- Agarwal, D. P. and H. W. Goedde (1990) Alcohol metabolism, alcohol intolerance, and alcoholism, Springer-Verlag, Berlin.
- Ayesh, R., J. R. Idle, J. C. Ritchie, M. J. Crothers and M. R. Hetzel (1984) Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer, *Nature*, **312**, 169–170.
- Blum, M., A. Demierre, D. M. Grant, M. Heim and U. A. Meyer (1991) Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**,

Doll, R. and R. Peto (1981) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 1191-1308.

Enomoto, N., S. Takase, N. Takada and A. Takada (1991) Alcoholic liver disease in heterozygotes of mutant and normal aldehyde dehydrogenase-2 genes, *Hepatology*, **13**, 1071-1075.

Goedde, H. W., S. Harada and D. P. Agarwal (1979) Racial differences in alcohol sensitivity: a new hypothesis, *Hum. Genet.*, **51**, 331-334.

Harada, S., D. P. Agarwal and H. W. Goedde (1981) Aldehyde dehydrogenase deficiency as cause of facial flushing reaction to alcohol in Japanese, *Lancet*, **ii**, 982.

Harada, S., D. P. Agarwal, H. W. Goedde, S. Tagaki and B. Ishikawa (1982) Possible protective role against alcoholism for aldehyde dehydrogenase deficiency in Japan, *Lancet*, **ii**, 827.

Higuchi, S., S. Matsushita, H. Imazeki, T. Kinoshita, S. Takagi and H. Kono (1994) Aldehyde dehydrogenase genotypes in Japanese alcoholics, *Lancet*, **343**, 741-742.

Lambert, B., B. Andersson, T. Bastlova, S. M. Hou, D. Hellgren and A. Kolman (1994) Mutations induced in the hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene by three urban air pollutants: acetaldehyde, benzo[a]pyrene diolepoxyde, and ethylene oxide, *Environ. Health Perspect.*, **102** (Suppl 4), 135-138.

Morimoto, K. (1990) Life-style and genetic factors that determine the susceptibility to production of chromosome damage, In: G. Obe and A. T. Natarajan (Eds.), *Chromosomal aberrations. Basic and applied aspects*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 287-301.

Morimoto, K. (1993) Chromosome alterations in peripheral lymphocytes as indices of lifestyle and genotoxicity, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **65**, S37-S41.

Morimoto, K., K. Miura, T. Kaneko, K. Iijima and A. Koizumi (1984) Human health situation and chromosomal alterations: Sister chromatid exchange frequency in lymphocyte from passive smokers and patients with hereditary disease, In: R. Tice, A. Hollaender, B. Lambert and K. Morimoto (Eds.), *Sister chromatid exchanges: Genetic toxicology and human studies*, Plenum, New York, pp. 801-812.

Morimoto, K. and T. Takeshita (1996) Low Km aldehyde dehydrogenase (ALDH2) polymorphism, alcohol-drinking behavior, and chromosome alterations in peripheral lymphocytes, *Env. Health Perspect.*, **104** (Suppl. 3), 563-567.

Nakachi, K., K. Imai, S. 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.

Obe, G., R. Jonas and S. Schmidt (1986) Metabolism of ethanol *in vitro* produces a compound which induces sister-chromatid ex-

changes in human peripheral lymphocytes *in vitro*: Acetaldehyde not ethanol is mutagenic, *Mutat. Res.*, **174**, 47-51.

Obe, G. and H. Ristow (1977) Acetaldehyde, but not ethanol, induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells *in vitro*, *Mutat. Res.*, **56**, 211-213.

Peterson, C. M. and C. M. Polizzi (1987) Improved method for acetaldehyde in plasma and hemoglobin-associated acetaldehyde: results in teetotalers and alcoholics reporting for treatment, *Alcohol*, **4**, 477-480.

Seidegard, J., R. W. Pero, D. G. Miller and E. J. Beattie (1986) A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer, *Carcinogenesis*, **7**, 751-753.

Shibuya, A. and A. Yoshida (1988) Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese with alcohol liver diseases: A strong association of the usual Caucasian-type aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2¹) with the disease, *Am. J. Hum. Genet.*, **43**, 744-748.

Singh, N. P. and A. Khan (1995) Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes, *Mutat. Res.*, **337**, 9-17.

Takada, A., M. Tsutsumi and Y. Kobayashi (1994) Genotypes of ALDH2 related to liver and pulmonary diseases and other genetic factors related to alcoholic liver disease, *Alcohol Alcohol.*, **29**, 719-727.

Takeshita, T. and K. Morimoto (1996) Effects of genetic polymorphisms in alcohol-metabolizing enzymes on alcohol hypersensitivity and alcohol-related health problems in Orientals, *Env. Health Prev. Med.*, **1**, 1-8.

Takeshita, T., X. Q. Mao and K. Morimoto (1996) The contribution of polymorphism in the alcohol dehydrogenase β -subunit to alcohol sensitivity in a Japanese population, *Hum. Genet.*, **97**, 409-413.

Takeshita, T., K. Morimoto, X. Mao, T. Hashimoto and J. Furuya (1993) Phenotypic differences in low Km aldehyde dehydrogenase in Japanese workers, *Lancet*, **341**, 837-838.

Takeshita, T., K. Morimoto, X. Mao, T. Hashimoto and J. Furuya (1994) Characterization of the three genotypes of low Km aldehyde dehydrogenase in a Japanese population, *Hum. Genet.*, **94**, 217-223.

Watanabe, T. (1991) Mechanism of ethanol-induced bronchoconstriction in Japanese asthmatic patients, *Jpn. J. Allergol.*, **40**, 1210-1217.

Wolff, P. H. (1972) Ethnic differences in alcohol sensitivity, *Science*, **175**, 449-450.

Yamamoto, K., Y. Ueno, Y. Mizoi and Y. Tatsuno (1993) Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism, *Jpn. J. Alcohol Drug Depend.*, **28**, 13-25.

第24回大会ミニシンポジウム
「ヒト集団の環境影響モニタリング」

環境因子とアトピー性皮膚炎

Role of environmental factors in atopic dermatitis

堀川達弥, 市橋正光

Tatsuya Horikawa and Masamitsu Ichihashi

神戸大学医学部皮膚科学教室 650 神戸市中央区楠町 7-5-1

Department of Dermatology, Kobe University School of Medicine,
7-5-1 Kusunokicho, Chuo-ku, Kobe 650, Japan

(受理: 1996年2月26日)

Summary

A recent increase in the incidence of atopic dermatitis has become a major concern for both the public and the medical profession. This increase may be at least partly attributable to changes in environmental factors. The role of environmental factors in triggering and/or exacerbating atopic dermatitis is reviewed. One of the most important factors suggested is the increase of house dust mite in the warm and humid accommodation which has been built increasingly during the last two decades. Other environmental factors such as fungi, infection, air pollution and metals in drinking water, may also contribute to the recent increase in atopic dermatitis.

Keywords: house dust mite, fungi, metals

はじめに

アトピー性皮膚炎は瘙痒をともなう慢性的皮膚炎を主徴とする疾患であり、年齢とともに変化する特徴的な皮疹を有する (The Japanese Dermatological Association, 1995)。アトピー性皮膚炎では家族に同症あるいは喘息やアレルギー性鼻炎をもつ症例が多く、遺伝形式は不明ではあるものの、遺伝性疾患であると考えられている。アトピー遺伝子についての研究がなされているが (Cookson *et al.*, 1992; Shirakawa *et al.*, 1994), 現在のところ確立されたものはない。その発症機序については未だ確立されたものではなく、提唱されている病因としては、(i) アレルギー説、(ii) 遺伝的な皮膚易被刺激性による皮膚炎の発症説、(iii) 心身症説などがあるが、我々はダニ、真菌、食物、金属などに対するアレルギー反応を皮膚易被刺激性や精神的因素が助長するのであろうと考えている。ここではアレルギー説を念頭において話を進める。アトピー性皮膚炎が近年増加していること、またアトピー性皮膚炎が転地により軽快することがあること、あるいは季節的な増悪軽快が見られること、などより、アトピー性皮膚炎には環境因子が深く関与していると考え

られる。本稿においてはアトピー性皮膚炎に関与すると考えられる環境因子について述べる。

近年におけるアトピー性皮膚炎患者数の増加

我が国におけるアトピー性皮膚炎患者数は近年増加しつつあるという報告が多く見られる (上田, 1996; 西岡, 1991; 松本ら, 1986; 吉田ら, 1991)。Fig. 1 に神戸大学医学部付属病院皮膚科外来における新患患者数あたりのアトピー性皮膚炎患者数の年度別推移を示す。1973年には3.1%であったアトピー性皮膚炎患者数は1983年には5.1%, 1994年には8.1%と増加している。また1973年、1983年と比べて1992年および1994年では20歳代の患者数の増加が著しかった (Fig. 2)。特に成人女性患者数は男性に比較して増加していた (Fig. 3)。また兵庫県の盆地にある西脇市の市立西脇病院においても近年のアトピー性皮膚炎患者数の増加がみられた (Fig. 4)。同様の報告が北里大学よりなされている (西岡, 1991)。藤田学園保健衛生大学の報告によれば (上田, 1996), 3歳から15歳までの幼小児のアトピー性皮膚炎の有病率は1988年と比べて、1992年では有意に増加していた。ま

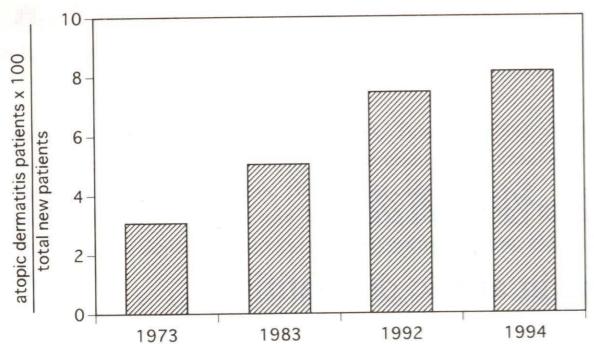


Fig. 1. Increasing trend of the relative population of atopic dermatitis patients among out-patients in the Dermatology Clinic of Kobe University Hospital. Each number of atopic dermatitis patients in each year is presented as % population of all the out-patients in a year.

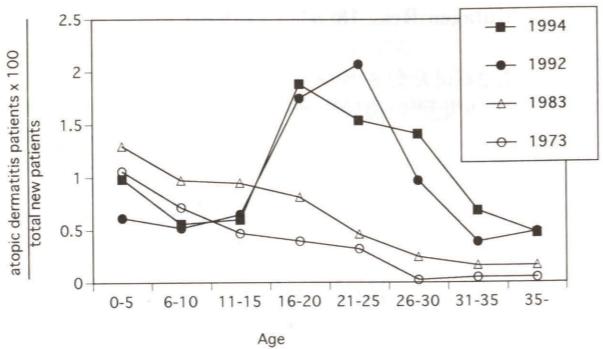


Fig. 2. Prominent increase of adult atopic dermatitis patients observed among out-patients of Dermatology Clinic of Kobe University Hospital. Data are shown as % incidence from each generation: Closed square indicates the % population in 1994, closed circle in 1992, open triangle 1983, and open circle 1973.

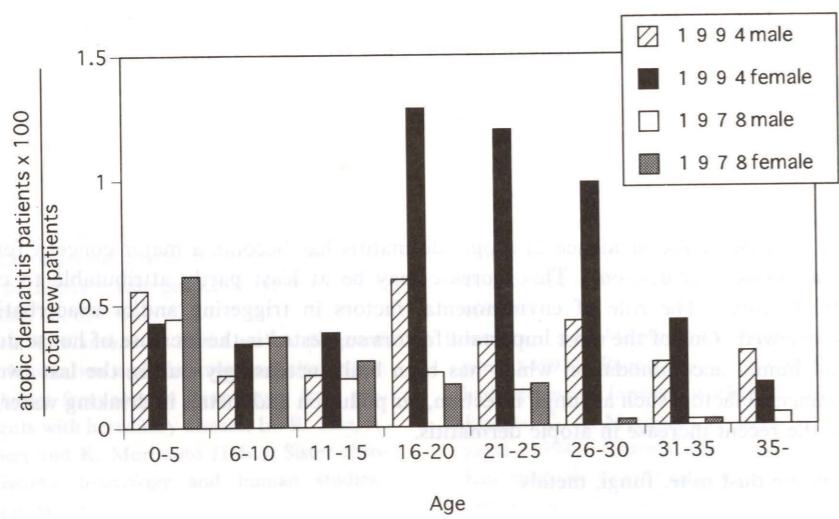


Fig. 3. The upward trend of female atopic dermatitis patients is more prominent than male after adolescence. The incidence rate of male and female atopic dermatitis among the out-patients are presented as % total out-patients in a year. Hatched bar indicates % population of 1994 male atopic dermatitis patients from each generation, black bar 1994 female, white bar 1978 male and grey bar 1978 female.

た、1972年にはみられなかった20歳代のピークが1989年にはみられるようになったという。同様に20歳代のピークが近年見られるようになったとする平野ら(1993)の報告がある。また松本ら(1986)によれば、学童のアトピー性皮膚炎患者の発症頻度は都市>近郊都市>山村の順に多くそれぞれ有意差があったとしている(Fig. 5)。ヨーロッパにおいても同様に近年アトピー性皮膚炎患者数が増加していると報告されている(Schultz-Larsen and Hanifin, 1992)。アトピー性皮膚炎が近年において増加している原因は不明であるが、何らかの環境因子が関与していると推察される。

室内環境因子

アトピー性皮膚炎に関与する環境因子は室内環境因子と室外環境因子およびその他の環境因子に大別することができる(Table 1)。室内環境因子にはチリダニ、真菌、タバコの煙、ペットの毛や皮垢などがあげられるが、最

も重要視されているのは、チリダニである。

アトピー性皮膚炎の発症機序とダニアレルギー

我が国の住居様式が木造住宅からコンクリート住宅やプレハブ住宅へと移行するにつれて、室内チリダニ量が増加してきたとの報告がなされた(高岡, 1989)。この室内チリダニの増加とアトピー性皮膚炎患者の増加は平行していると思われる。一方、大多数のアトピー性皮膚炎患者では血清 IgE 抗体値が高値を示すが、ダニに対する特異 IgE 抗体、とくにチリダニ科に属するヤケヒヨウヒダニ(Dermatophagoides pteronyssinus: Der p)、およびコナヒヨウヒダニ(Dermatophagoides farinae: Der f)に対する IgE 抗体多くの症例で証明される(Chapman et al., 1983)。特に、1歳以降のアトピー性皮膚炎患者において顕著に見られ(馬場, 1985)、当科におけるアトピー性皮膚炎患者の約 80% が Der p あるいは Der f に対する特異 IgE を有していた(小村ら, 1993)。またアトピー

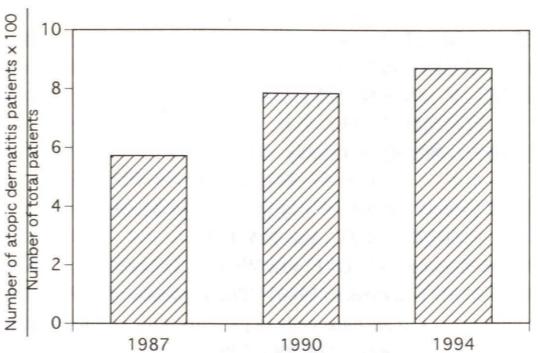


Fig. 4. Increase of the relative population of atopic dermatitis patients among the out-patients in the Dermatology Clinic of Nishiwaki Municipal Hospital. Each number of atopic dermatitis patients in each year is presented as % population of all the out-patients in a year.

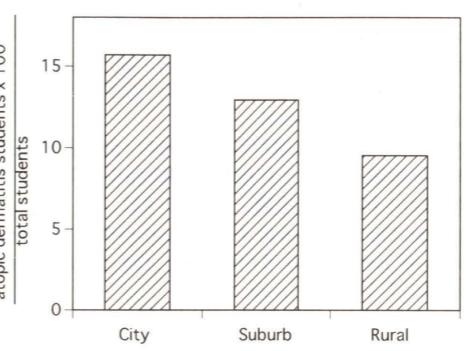


Fig. 5. The difference of disease rate in atopic dermatitis patients among city, suburb and countryside. Data are presented as relative rate of atopic dermatitis in all students tested. The data are from the study by Matsumoto et al., 1986.

Table 1. Possible environmental factors which may provoke or exacerbate atopic dermatitis.

Inside	house dust mite fungi smoking animals
Outside	fungi pollen insects light air pollution
Others	social environment stress metals in drinking water

性皮膚炎患者ではダニ抗原をもちいたパッチテストを施行すると湿疹病巣が再現できることが示されている(Mitchell et al., 1982)。近年の研究により、IgE は mast cell よりの chemical mediator の放出を誘導するのみならず T cell 介在型応答をもまた惹起することができることが示された(Ray et al., 1983)。Bruynzeel-Koomen ら

(1986) は表皮の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞上に IgE 分子が存在することを示し、またアトピー性皮膚炎患者の IgE を有するランゲルハンス細胞はダニ抗原を末梢リンパ球に提示し刺激することができるということを示した(Mudde et al., 1990)。Tanaka ら(1990)はダニ抗原パッチテスト陽性部を経時に検索したところ、ダニ抗原が IgE 陽性ランゲルハンス細胞とともに真皮内へと移動することを見いだした。このようにアトピー性皮膚炎では、表皮バリヤーの破壊された皮膚より侵入しやすくなったダニ抗原が IgE を介して T 細胞に抗原提示され、遅延型アレルギー反応が起こるという機序が発症の重要な役割の一つを担っていると考えられる。IgE は皮膚において肥満細胞よりの化学伝達物質の放出を刺激することが知られており、ダニ抗原がアトピー性皮膚炎の病巣部において IgE を介して T 細胞と肥満細胞の両者を刺激しているものと考えられる。近年ダニ抗原の分子生物学的な解析が進み、ダニ抗原の主な 3 群の抗原蛋白が同程された(The second international workshop group, 1992)。分子量約 25000 でシステインプロテアーゼ活性をもつもの(Der p-I, Der f-I), 分子量約 14000 でプロテアーゼ活性を持たないもの(Der p-II, Der f-II), 分子量約 29000-30000 でトリプシンあるいはセリンプロテアーゼ活性をもつもの(Der p-III, Der f-III)等である。室内ダニ抗原量と抗ダニ IgE の産生量との間には有意な相関があることが知られており(Lau et al., 1989)、この事実より室内ダニ抗原量は室内塵 1gあたり 2 μg 以下にするのが望ましいとされている(The second international workshop group, 1992)。実際、アトピー性皮膚炎患者に mite free room などのダニ抗原の少ない住居で生活することによりアトピー性皮膚炎が軽快したという報告がある(Roberts, 1984; 三田ら, 1987)。

その他の室内環境因子

チリダニの他にアトピー性皮膚炎に関する室内環境因子には真菌(可部, 1989)、ペットの毛や皮垢(阿久津と牧野, 1989)、タバコの煙(秋本と飯倉, 1994)などがある。当科アレルギー外来患者 159 名中 57% が真菌特異 IgE を有していた(小村ら, 1993)。またホルムアルデヒドなど建築資材に含まれる物質も関連があるのではないかとされるが(Schopf and Baumgartner, 1989)、実際の報告は少ない。

室外環境因子とアトピー性皮膚炎

室外環境因子としては、空中飛散微小物質(真菌、花粉、虫)などと光線や大気汚染などがあげられる(Table 1)。室外真菌の空中飛散量は花粉や虫と同様、季節変動が見られ、真菌は夏から秋に飛散量は増加する(可部, 1989)。季節的な増悪軽快が見られるアトピー性皮膚炎患者ではこのような因子もその病像形成に関与している

と思われる。赤外線(川本ら, 1992), 紫外線(Keong et al., 1992; 石田ら, 1994), 等の太陽光線によるアトピー性皮膚炎の増悪が報告されているが, 一方でUVA, UVBあるいはPUVA等の紫外線療法がアトピー性皮膚炎の治療の目的で用いられ(吉池, 1994), 一定の効果を上げている。また海水浴療法も効果的であるとされ(三浦ら, 1994), 太陽光線が必ずしもアトピー性皮膚炎の増悪に働くとはいえない。

大気汚染とアトピー性皮膚炎の関連についての直接的な証拠はないが, ディーゼル排気微粒子がマウスのIgE産生を増強するアジュバントとして働くことが示されている(小泉, 1989)。近年, トラックをふくむ自動車台数の増加は著しく, IgE産生機構に間接的に関与している可能性は否定できない。

その他の環境因子

その他の環境因子としては社会的な環境因子が重要であると考えられる。対人関係などにおけるストレスがアトピー性皮膚炎の増悪因子になっており, 心理療法やカウンセリング等により軽快する症例が報告されている。1995年1月の阪神大震災の後アトピー性皮膚炎の増悪が見られる患者がいたが, 我々のアンケート調査によればストレスを感じた者に増悪したものが多かった(児玉ら, 1996)。またこのほかに, 我々は飲水中に含まれるニッケルなどの微量金属がアトピー性皮膚炎の増悪因子となる可能性があることを報告したが(足立ら, 1993), 飲料水や食物中の微量物質にも注目し, さらに検討する必要があろう。

おわりに

アトピー性皮膚炎ではすでに述べたようにIgEがその病像形成に重要であると考えられる。IL-4が重要な役割をなしているIgEの産生機構およびIgE介在性のT細胞応答や肥満細胞よりの化学伝達物質放出, 好酸球による組織障害などの機構が複雑にからみあっており, 例えはダニ抗原に対する特異IgEが存在するだけではアトピー性皮膚炎の症状は必ずしも見られない。環境因子もIgEの産生機構とIgE介在性のT細胞応答および肥満細胞よりの化学伝達物質放出のそれぞれに関与している可能性があるので, 今後の課題は環境因子がどこに働くのかについて考慮しながら研究する必要があろう。

謝 辞

本研究にご協力をいただいた神戸大学皮膚科学教室の足立厚子, 児玉昌子, 高島努, 西野圭輔, 小村明彦氏に深謝致します。

参考文献

足立厚子, 堀川達弥, 市橋正光(1993)水道水により皮疹の増悪を認めた全身型金属アレルギー—アトピー性皮膚炎を中心

に—日皮会誌, **103**, 418.

秋本憲一, 飯倉洋治(1994)出生前状態とアトピー性皮膚炎の関係. 第6回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム記録集. アトピー性皮膚炎のコンセンサスステートメント. 企画, 協和発酵工業株式会社, 医科学出版社, pp. 13-18.

阿久津郁夫, 牧野莊平(1989)動物性抗原一ハチ・ベット・ウマアレルギー. アレルギーの臨床, **9**, 799-803.

馬場 実(1985)アトピーと喘息. 皮膚科 Mook No. 1, 今村貞夫編, 金原出版, 東京, pp. 115-125.

Bruynzeel-Koomen, C., D. F. van Wichen, J. Toonstra, L. Berrens and P. L. B. Bruynzeel(1986) The presence of IgE molecules on epidermal Langerhans cells in patients with atopic dermatitis. Arch. Dermatol. Res., **278**, 199-205.

Chapman, M. D., S. Rowntree, E. B. Mitchell(1983) Quantitative assessment of IgG and IgE antibodies to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol., **72**, 27-33.

Cookson, W. O. C. M., R. P. Young, A. J. Sandford, M. F. Moffatt, T. Shirakawa, P. A. Sharp, J. A. Faux, C. Julier, P. N. LeSouef, Y. Nakamura, G. M. Lathrop and J. M. Hopkin(1992) Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. Lancet, **340**, 381-384.

平野真也, 上田英一郎, 末広晃宏, 永田 誠, 森島陽一, 安野洋一(1993)当科における顔部アトピー性皮膚炎について. 日皮アレルギー, **1**, 223-228.

石田義次, 松尾津朗, 大城戸宗男(1994)最小紅斑量域値以下のUVB反復照射により紅斑性浸潤局面を誘発したアトピー性皮膚炎の1例. 臨床皮膚, **48**, 823-825.

The Japanese Dermatological Association(1996) Japanese Dermatological Association Criteria for the diagnosis of atopic dermatitis. J. Dermatol., **23**, 66-67.

川本知江, 吉池高志, 相川洋介, 小川秀興(1992)アトピー性皮膚炎患者における皮膚の光線過敏性について. 日皮会誌, **102**, 1559-1561.

Keong, C. H., Y. Kurumaji, C. Miyamoto, S. Fukuro, S. Kondo and K. Nishioka(1992) Photosensitivity in atopic dermatitis: demonstration of abnormal response to UVB. J. Dermatol., **19**, 342-347.

児玉昌子, 高島 努, 原田 晉, 堀川達弥, 市橋正光(1996)阪神大震災とアトピー性皮膚炎. 第95回日本皮膚科学会総会抄録集.

小泉一弘(1989)大気汚染とアレルギー疾患. アレルギーの臨床, **9**, 16-19.

小村明彦, 花垣博史, 足立厚子, 高島 努, 堀川達弥(1993)アトピー性皮膚炎に於けるカンジダの関与について. 日皮アレルギー, **1**, 217-222.

Lau, S., G. Falkenhorst, A. Weber, I. Werthmann, P. Lind, P. Buettner-Goetz and U. Wahn(1989) High mite-allergen exposure increase the risk of sensitization in atopic children and young adults. J. Allergy Clin. Immunol., **84**, 718-725.

松本修一, 栄花芳典, 諸井智香子, 稲坂 博, 安部 誠, 上田 宏(1986)学童期アトピー性皮膚炎の疫学的研究. 藤田学園医学会誌, **10**, 197-302.

三田哲郎, 安江厚子, 三田一幸(1987)アトピー性皮膚炎に対するクリーンルーム治療の試み. 西日本皮膚, **49**, 730-733.

Mitchell, E. B., M. D. Chapman, F. M. Pope, J. Crow, S. S. Jouhal and T. A. E. Platts-Mills(1982) Basophils in allergen-induced patch test sites in atopic dermatitis. Lancet, **1**, 127-130.

三浦克志, 椿 俊和, 秋本憲一, 飯倉洋治(1994)アトピー性皮膚炎と海水浴. アレルギーの臨床, **14**, 24-26.

Mudde, G. C., F. C. van Reijzen, G. J. Boland, G. C. de Gast, P. L. B. Bruynzeel and Bruynzeel-Koomen(1990) Allergen presentation by epidermal Langerhans' cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. Immunology, **69**, 335-341.

西岡 清(1991)成人型アトピー性皮膚炎. 皮膚臨床, **33**, 413-418.

A. Faux, C. Ra, W. O. Cookson and J. M. Hopkin(1994) Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. Nat. Genet., **7**, 125-129.

高岡正敏(1989)住環境の変化とダニ数の関係. アレルギーの臨床, **103**, 20-24.

Tanaka, Y., S. Anan and H. Yoshida(1990) Immunohistochemical studies in mite antigen-induced patch test sites in atopic dermatitis. J. Dermatol. Sci., **1**, 361-368.

上田 宏(1996)アトピー性皮膚炎の現状. からだの科学, **186**, 27-31.

吉田彦太郎, 田中洋一, 阿南貞雄(1991)アトピー性皮膚炎における食物アレルギーとダニアレルギー. 新アレルギー性皮膚疾患—基礎と臨床—, 吉田彦太郎監修, 協和企画通信, 東京, pp. 129-142.

吉池高志(1994)紫外線療法. アレルギーの臨床, **14**, 20-23.

第24回ミニシンポジウム
「*In vitro* 遺伝子突然変異試験法の新たな展開」

Principles of the Mouse Lymphoma Assay and Advantages of the Microwell Method

Julie Clements

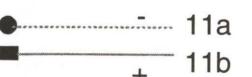
Corning Hazleton (Europe), Otley Road, Harrogate, North Yorkshire, HG3 1PY, United Kingdom

(Accepted: February 19, 1996)

The mouse lymphoma assay (MLA) was first described by Clive *et al.* (1972) as an *in vitro* assay for the detection of gene mutations in cultured mammalian cells. The assay system utilizes the thymidine kinase (*tk*) locus in L5178Y mouse lymphoma cells and involves selection of *tk*^{-/-} mutants in a *tk*⁺⁻ clonal line. Non-mutants (*tk*⁺⁻) produce thymidine kinase and die in the presence of the selective agent and mutants (*tk*^{-/-}) do not produce thymidine kinase and survive. Originally, bromodeoxyuridine was used as the selective agent but this was improved with the use of trifluorothymidine (Clive *et al.*, 1979).

The mouse lymphoma assay has a number of advantages over other mammalian cell mutation assays. There is a short expression time of 2-3 days for *tk* mutants, compared to 1 week for *hprt* mutants and the mutant frequency is relatively high so a large number of events can be recorded. The mouse lymphoma cells grow in suspension culture facilitating the treatment, subculturing and plating of large numbers of cells ensuring the use of statistically sound experimental protocols. Furthermore, the assay is sensitive from a genetical point of view as a wide range of genetic changes are detected. The *tk* gene is on chromosome 11 in the mouse and the homologous chromosomes are distinguishable because of a centromeric heteromorphism and are designated 11a and 11b (see Fig. 1). Extensive cytogenetic and molecular analysis of *tk*^{-/-} mutants has revealed the variety of genetic changes that may be detected in the assay. These include point mutations and small deletions

● Genetic changes detected in the MLA



point mutations within *tk* gene
deletion of entire gene
chromosomal events involving chr 11 *tk*⁺ allele
(visible chromosome rearrangements)
large deletions/loss entire chromosome 11
mitotic recombination

Fig. 1. Diagrammatic representation of the *tk* locus and the wide range of genetic changes detected in the MLA.

within the *tk* gene, deletion of the entire gene, chromosomal events involving the chromosome 11 *tk*⁺ allele (visible chromosome rearrangements), large deletions and loss of the entire chromosome 11 and mitotic recombination (Applegate *et al.*, 1990; Clive *et al.*, 1990; Hozier *et al.*, 1989). Essentially, the mouse lymphoma assay may be regarded as an assay for loss of heterozygosity.

Two types of mutant colony are found on the selective plates and these are defined as LARGE and SMALL colony mutants. Clive and Moore and co-workers have shown that, as a general rule, mutation within the *tk* gene results in LARGE normally growing colonies whereas many SMALL slow-growing colonies have visible chromosome aberrations. It has therefore been suggested that by recording colony size, MLA may indicate gene mutation and chromosome breakage potential of chemicals. The frequencies of small and large colony mutants are mutagen and dose-dependent. The chromosome aberrations in the small colony mutants tend to be associated with the distal end of chromosome 11b where the *tk* gene maps and the mutants have lost *tk*⁺ sequences. Large colony mutants tend to be karyotypically indistinct and show variable loss of *tk*⁺ sequences (Applegate *et al.*, 1990).

In the past, many laboratories have experienced problems with the standard MLA, particularly relating to mutant selection using agar cloning. Cole *et al.* (1983) developed a microwell cloning procedure for the MLA, a procedure originally described by Thilly (1980) for human lymphoblastoid cells, and obtained similar results with this method and agar cloning. Using the microwell method, Cole *et al.* (1990, 1991) compared *tk* mutant induction with other genetic endpoints (*hprt*, ouabain, micronucleus) in the same treated cell populations and demonstrated the utility of the methodology. Although agar cloning is simple and reproducible with practice, the microwell method of MLA is considered to be technically less complicated and it saves both time and effort. Many laboratories have now demonstrated the utility of the microwell MLA and the assay has given comparable, reproducible results. In the early days, before and during the National Toxicology Program (Tennant *et al.*, 1987), the standard agar MLA had a reputation for unreliability and "over sensitivity" but this

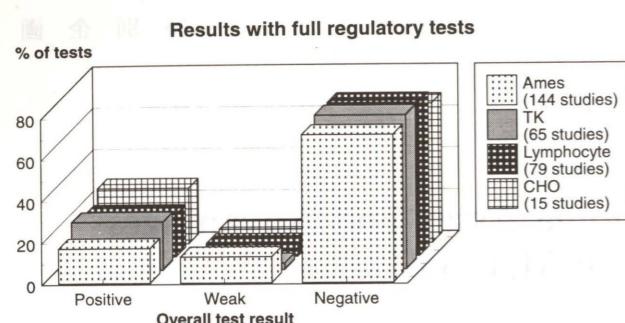


Fig. 2. Proportion of positive, weak and negative results for a variety of full regulatory tests, illustrating that the MLA is not over-sensitive.

has now largely been overcome by the use of robust protocols and controlling for pH, osmolality and extremes of toxicity. Indeed, the results of several full regulatory tests for a variety of assays performed in our laboratory are shown in Fig. 2, illustrating that the proportion of positive results in the MLA is in line with other assays.

When performed correctly, the agar and microwell methods for the MLA are equally acceptable. The treatment phase (usually 3–4 hours) and the expression period (2–3 days) are identical. Non-toxic, soluble chemicals are tested up to 5 mg/ml, 5 µl/ml or 10 mM whichever is the lowest. Relatively insoluble chemicals should be tested up to or beyond their limit of solubility but any precipitate should not interfere with the assay (Draft OECD Guideline, September, 1995). Indeed, caution should be exercised in view of the fact that the mouse lymphoma cells grow in suspension culture and hence the potential difficulty of removing a test chemical from the cultures when it is tested up to precipitating doses. Interestingly, the Step 4 ICH Guideline (1995) suggests that if no cytotoxicity is observed then it is reasonable to use the lowest precipitating concentration of test chemical as the top concentration. However, if dose-related cytotoxicity or mutagenicity is observed, irrespective of solubility, the top concentration should be based on cytotoxicity (unless precipitation interferes with the test).

The main difference between the agar and microwell MLA is in the cloning of the cells. For the agar method, the cells are cloned in soft agar selection medium and typically three petri dishes containing 200 cells per dish might be used for viability assessment and three dishes containing 1 million cells per dish might be employed for mutant selection. In contrast, for the microwell method, cells are cloned in 96-well microtitre plates and typically two plates for each culture (1.6 cells/well) might be used for viability assessment and four plates (2000 cells/well) might be used for mutant selection. One key point to note is that, for the microwell method (essentially a fluctuation test), the number of clonal cells per well is calculated from the proportion of wells containing no clones (negative wells) using the zero term of the Poisson distribution.

The means of determining cytotoxicity can vary between the agar and microwell method of the MLA. When using the agar method, cytotoxicity is traditionally measured by relative total growth (RTG) which is defined as the cumulative relative suspension growth (compared to control) multiplied by the relative plating efficiency for each culture. Ideally, the top concentration of test chemical should yield less than 20% RTG, when possible. When using the microwell method, cytotoxicity is measured by Day 0 relative survival (%Rs). The cells are counted immediately post-treatment and plated to determine relative plating efficiency. Ideally, the top dose of test chemical should yield less than 20% RS. Both methods for determining cytotoxicity (RTG and RS) are acceptable (Clive *et al.*, 1995; OECD and ICH guidelines) and it is possible to determine RS for the agar method and RTG for the microwell method. For both the agar and the microwell MLA, caution must be applied when interpreting data at less than 10% RTG or RS as biologically irrelevant events may occur at such high levels of toxicity.

Recovery of small colony mutants is critical in the MLA. This category of mutants is most susceptible to underestimation when using agar cloning and this may be attributable to suboptimal cloning medium, low colony counter sensitivity to small colonies and possibly lack of detection

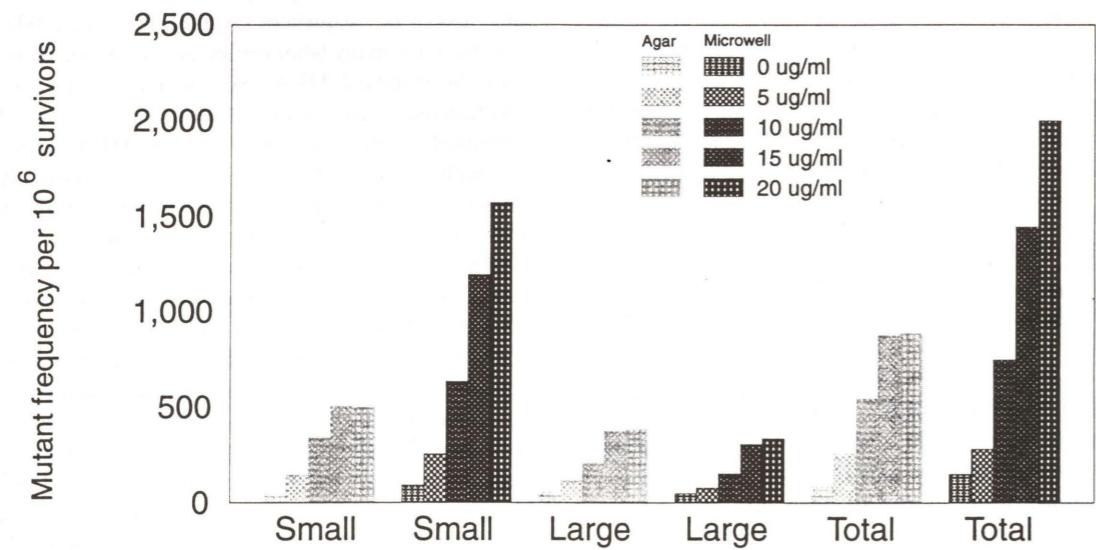


Fig. 3. Recovery of small and large colony mutants following exposure of cells to MMS, cells from the same treated populations were cloned using the agar and microwell methods.

of the very small colonies. Thus, ease of recovery of small colony mutants is perhaps the main advantage of the microwell MLA method. This is illustrated in Fig. 3, where cells were treated with MMS at different concentrations and then samples from the same treated populations were cloned using both the agar and the microwell methods. Dose-related increases in mutant frequency were seen for both methods of cloning. However, the mutant frequencies obtained following cloning in microwells were higher than in agar and this was attributable to better recovery of the small colony mutants.

It is possible to score small and large colony mutants by eye or in an automated way for both agar and microwell cloning. It is perfectly acceptable to distinguish large and small colonies by eye in microwells but in order to generate colony size distributions, we have developed an objective automated scoring system using image analysis. The size (area) of each colony is measured. Typical colony size distributions for a selection of chemical mutagens are shown in Fig. 4. For the doses shown, aminoacridine and ethidium bromide (intercalating agents) and amethopterin (methotrexate) and methapyrilene (mammalian cell but not bacterial mutagens) mainly induce small colony mu-

gants whereas the alkylating agent EMS induces large colony mutants.

At the MLA workshop in Portland (Clive *et al.*, 1995) it was agreed that colony sizing should be performed for the positive controls in all experiments. This can be regarded as a quality control measure for mutant recovery and ideally 60–75% small colonies should be obtained. Similarly, sizing in the negative controls is recommended for all experiments as a quality control for mutant colony growth. If relevant, and as an assessment of potential clastogenicity, colony sizing should be performed on at least one positive dose of test chemical, including the culture with the highest mutant frequency. A slightly different approach is recommended in the Draft OECD guideline (September, 1995) which states that if the test chemical is positive, colony sizing should be performed on at least one of the test cultures (the highest positive concentration) and on the positive control. However, if the test chemical is negative, the Draft OECD guideline suggests it is only necessary to perform colony sizing on the positive control.

The definition of "Positive", "Negative" or "Questionable" responses in the MLA will depend on experimental variability (Clive *et al.*, 1995). When using the agar

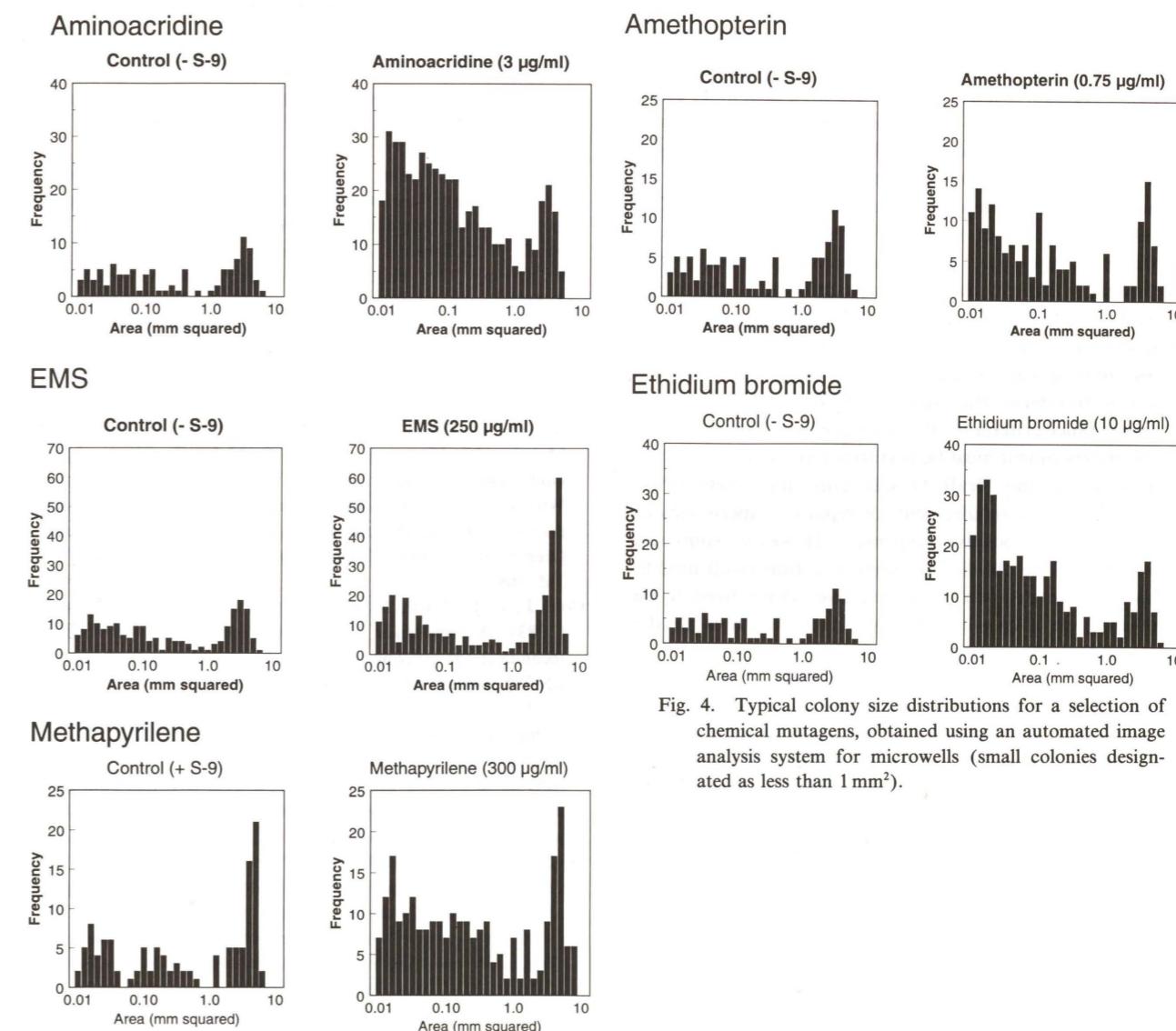


Fig. 4. Typical colony size distributions for a selection of chemical mutagens, obtained using an automated image analysis system for microwells (small colonies designated as less than 1 mm²).

method of MLA, variability can be determined in specific experiments (for example using 20 replicate cultures for a non-mutagen at 20% relative survival) or by using replicate cultures. With the microwell method, replicate cultures tend to be used and a heterogeneity factor may be applied as recommended in the United Kingdom EMS (UKEMS) statistical guidelines (Robinson *et al.*, 1990).

For the agar MLA method, a positive response is often defined as a dose-response plus a predetermined increase in mutant frequency at one dose. However, it must be emphasized that the predetermined increase in mutant frequency should be defined for each laboratory using historical data. A negative response for the agar method is where all parameters for negative and positive controls and cytotoxicity are fulfilled but there is no increase in mutant frequency above the predetermined value. For the microwell method, the UKEMS statistical package (Robinson *et al.*, 1990) determines significant increases in mutant frequency and tests for linear trend. Reproducibility of results always provides additional confidence. Similarly, for a negative response, the UKEMS package applies, taking variability into account with the heterogeneity factor.

Two areas of discussion lately have focused on the need for replicate cultures and replicate experiments when performing the MLA. The need for replicate cultures depends on how the laboratory measures and applies its variability (see above) both within and between experiments. With the agar method, if single cultures are used then more doses should be evaluated. When using microwells, replicate cultures are required for the UKEMS statistical package and as a quality control and this is strongly supported by many experienced workers in the field. The Draft OECD Guideline (September, 1995) indicates that either single or replicate cultures may be used at each concentration but recommends the number of concentrations in the range should be increased if only single cultures are used (at least 8 analysable) and replicate negative (solvent) control cultures should always be used.

When considering the issue of replicate experiments, if all the acceptance criteria for the assay are not strictly fulfilled, a repeat experiment must be performed (Clive *et al.*, 1995). According to the Draft OECD Guideline (September, 1995), there is no requirement for replicate experiments to confirm a clear positive response. However, equivocal results should be clarified by further testing (with modifications to the protocol) and negative results need to be confirmed on a case-by-case basis (modifications to the protocol should again be considered).

One of the problems in evaluating the role of the MLA in a battery of short-term tests is the quality of the data used to make the assessments and the comparability of the protocols and therefore the debate is likely to continue for some time. There are some advantages with the MLA which favour its inclusion in the test battery. The bacterial mutation assays detect very small genetic changes whereas the chromosome aberration assays detect very large genetic changes. In contrast, the MLA detects a very wide range of changes, the mutants are viable and the mutations can be analysed by molecular techniques. Thus, a lot of information can be provided by the MLA and the genetic changes detected are known to be important in tumour develop-

Ames	CA	MLA	Second <i>in vivo</i> test
+(+ S-9)	+ (+ S-9)	+ (+ S-9) large and small cols	Liver UDS
+ (- S-9)	-	+ (- S-9) large cols	DNA binding in tissue of first contact
-	+ (+ S-9)	+ (+ S-9) small cols	Liver micro- nucleus

Fig. 5. Examples of how the MLA can help to influence the choice of *in vivo* tests when a battery of *in vitro* tests are performed.

ment. One other area where the MLA can contribute is in helping to influence the choice of *in vivo* tests and this is illustrated in Fig. 5.

In summary, the background to the MLA has been described in this paper, the agar and microwell methods for the assay have been compared, data analysis and the use of replicate cultures and experiments have been discussed and the role of the MLA has been addressed.

References

Applegate, M. L., M. M. Moore, C. B. Broder, A. Burrell, G. Juhn, K. L. Kasweck, P-F. Lin, A. Wadhams and J. C. Hozier (1990) Molecular dissection of mutations at the heterozygous thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *PNAS*, **87**, 51-55.

Clive, D., W. G. Flamm, M. R. Machesko and N. R. Bernheim (1972) A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells, *Mut. Res.*, **16**, 77-87.

Clive, D., K. O. Johnson, J. S. F. Spector, A. G. Batson and M. M. M. Brown (1979) Validation and characterization of the L5178 Y/TK^{+/+} mouse lymphoma mutagen assay system, *Mut. Res.*, **59**, 61-108.

Clive, D., P. Glover, M. Applegate and J. Hozier (1990) Molecular aspects of chemical mutagenesis in L5178Y/tk^{+/+} mouse lymphoma cells, *Mutagenesis*, **5**, 191-197.

Clive, D., G. Bolcsfoldi, J. Clements, J. Cole, M. Homna, J. Majeska, M. Moore, L. Müller, B. Myhr, T. Oberly, M-C. Oudelhkim, C. Rudd, H. Shimada, T. Sofuni, V. Thybaud and P. Wilcox (1995) Consensus agreement regarding protocol issues discussed during the mouse lymphoma workshop: Portland, Oregon, May 7, 1994, *Environmental and Molec. Mutagen.*, **25**, 165-168.

Cole, J., C. F. Arlett, M. H. L. Green, J. Lowe and W. Muriel (1983) A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in L5178Y mouse lymphoma cells, *Mut. Res.*, **111**, 371-386.

Cole, J., M-C. Diot, F. N. Richmond and B. A. Bridges (1990) Comparative induction of gene mutations and chromosome damage by 1-methoxy-1,3,5-cycloheptatriene (MCHT), 2. Results using L5178Y mouse lymphoma cells to detect both gene and chromosome damage; validation with ionizing radiation, methyl methane sulphonate, ethyl methane sulphonate and benzo(a)pyrene, *Mut. Res.*, **230**, 81-91.

Cole, J., F. N. Richmond and B. A. Bridges (1991) The mutagenicity of 2-amino-N⁶-hydroxyadenine to L5178Y tk^{+/+} 3.7.2c mouse lymphoma cells: measurement of mutations to ouabain, 6-thioguanine and trifluorothymidine resistance, and the induction of micronuclei, *Mut. Res.*, **253**, 55-62.

Hozier, J. C., J. R. Sawyer and M. M. Moore (1989) High-resolution cytogenetic analysis of L5178Y TK^{+/+} 3.7.2C cells: variation in chromosome 11 breakpoints among small-colony TK^{-/-} mutants, *Mut. Res.*, **214**, 195-199.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1995) Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals, Step 4 Final draft, July 18, 1995. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for updating Guideline 476, *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test, Revised Draft Document, September 1995.

Moore, M. M., D. Clive, J. C. Hozier, B. E. Howard, A. Gail Batson, N. T. Turner and J. Sawyer (1985) Analysis of trifluorothymidine resistant (TFT^r) mutants of L5178Y/TK^{+/+} mouse lymphoma cells, *Mut. Res.*, **151**, 161-174.

Robinson, W. D., M. H. L. Green, J. Cole, R. C. Garner, M. J. R. Healy and D. Gatehouse (1990) Statistical evaluation of bacterial/mammalian fluctuation tests. In *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data* (Ed. Kirkland, D. J.) Cambridge University Press, pp. 102-140.

Tennant, R. W., B. H. Margolin, M. D. Shelby, E. Zeiger, J. K. Haseman, J. Spalding, W. Caspary, M. Resnick, S. Stasiewicz, B. Anderson and R. Minor (1987) Prediction of Chemical Carcinogenicity in Rodents from *In Vitro* Genetic Toxicity Assays, *Science*, **236**, 933-941.

Thilly, W. G., J. G. DeLuca, E. E. Furth, H. Hoppe IV, D. A. Kaden, J. J. Krolewski, H. L. Liber, T. R. Skopek, S. A. Slapikoff, R. J. Tizard and B. W. Penman (1980) *In Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection* (Hollerender, A. and F. J. de Serres eds.), Vol. 6, 331-364.

第24回ミニシンポジウム
「In vitro 遺伝子突然変異試験法の新たな展開」マウスリンフォーマ試験は染色体異常誘発物質を
検出できるのかClastogens and/or spindle poisons can be detected by mouse lymphoma *tk* assay島田 弘康
Hiroyasu Shimada

第一製薬株式会社 134 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号

Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 16-13, Kitakasai 1-Chome, Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan

(受理: 1996年3月12日)

Summary

Mouse lymphoma *tk* assay (MLA) has been one of the focused issue to introduce or not into a standard test battery for ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) guideline of genotoxicity. It is recognized that the MLA can detect not only mutagens but also clastogens. Based on the outcomes of the international collaborative studies of the MLA organized by the Ministry of Health and Welfare Japan and the Japan Pharmaceutical and Manufacturers Association, 22 chemicals out of 29 clastogens and/or spindle poisons (76%) could be detected by the standard 3 h treatment protocol of the MLA. Most of the chemicals having negative or inconclusive results become to show positive responses by the 24 h continuous treatment in the recent study. In addition the percentage of increase of small colonies in the MLA positive clastogens was 66.2%, whereas the MLA positive non-clastogens was 25.0%. These results indicate that MLA can detect chromosomal damaging agents and a dominant increase of small colonies suggests the induction of chromosomal aberrations in the MLA.

Keywords: mouse lymphoma assay, clastogen, small colony

1. 緒 言

マウスリンフォーマ試験 (MLA) は、遺伝子突然変異と染色体異常の両方を哺乳動物細胞で検出しうる試験系として、医薬品のガイドラインに関する国際ハーモナイゼーション: ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) における変異原性試験の標準組合せ (standard test battery) での議論の中心となっている試験法である。しかし、我が国ではマウスリンフォーマ試験 (MLA) についての経験が乏しいため、本試験法を評価するだけの十分なデータを持ち合わせていないのが実状であった。そこで、MLA で染色体異常誘発物質が検出できるか否かについて、厚生省 (MHW) と日本製薬工業協会 (JPMA) が共催し、1994~1995年

に2回の共同研究を行った。本シンポジウムでは、これらの共同研究より得られた結果をもとに、今回私に与えられたテーマである「マウスリンフォーマ試験は染色体異常誘発物質を検出できるのか?」について論ずる。

2. ガイドラインにおけるマウスリンフォーマ試験の位置づけ

MLA ではチミジンキナーゼ遺伝子座 (*tk*) をヘテロにもつ L5178Y (*tk*^{+/−}) 細胞を用い、*tk*^{+/−} → *tk*^{−/−} の突然変異を指標とする。本試験法では、遺伝子突然変異の他に、染色体異常に繋がるような *tk* locus を含む大きな欠失を生育の遅い小さなコロニーとして検出できるとされている (Blazak *et al.*, 1898)。また、染色体異常試験ではそのほとんどがその後死んでしまう細胞の異常を観ているの

Table 1. Standard battery of genotoxicity tests.

Test category	Japan	EU	USA
Reverse mutation in bacteria	●	●	●
Mouse lymphoma tk assay		●	●
Mammalian cell gene mutation		●	●
Chromosome damage <i>in vitro</i>	●	●	●
Chromosome damage <i>in vivo</i>	●	●	●

に対し、MLA では変異して生き残った細胞を観ているという点で、特にリスク評価という意味で説得性がある。

Table 1 に、日本、ヨーロッパおよび米国における遺伝毒性試験の標準組み合わせについて示した。日本での standard battery は細菌を用いる復帰突然変異試験、*in vitro* 染色体異常試験および *in vivo* 小核試験の 3 試験の組み合わせであるが、欧米では哺乳動物細胞を用いる遺伝子突然変異試験が必須である。そのため、ヨーロッパでは日本の 3 点セットに哺乳動物細胞での遺伝子突然変異試験を加えた 4 点セットとなっている。一方、米国では *in vitro* 系での哺乳動物細胞試験としては MLA 試験のみで良いとしている。これは MLA が遺伝子突然変異と同時に染色体異常も検出できる試験系であるとの認識に基づくものであり、もし MLA を行わずに HPRT 等の他の遺伝子突然変異試験を行った場合には、*in vitro* 染色体異常試験を追加要求している。

ICH の主要な目的の 1 つは、世界各国で共通しあえる基礎データはお互いに利用し合い、経費、資源の無駄をなくすことである。そこでなるべく共通項目を多くするためにガイドラインのハーモナイゼーションが必要になってくる訳である。遺伝毒性試験について言えば、試験の標準組み合わせのうち、MLA が日本で経験のない試験系として俎上にあがってきた。MLA を正当に評価するためにもわが国での経験は必須であり、そのため MHW と JPMA の共催により試験法のバリデーションのための共同研究を行った。

3. マウスリンフォーマ国際共同研究

共同研究の主たる目的は、MLA が standard battery の一員として実験手技上の問題点も含めて適切かどうか、および理論通りに染色体異常誘発物質が MLA で検出できるのかの 2 点である。第 1 回目の共同研究は国内 42 機関、海外 7 機関が参加し、21（うち 1 化合物は試験全体の品質を調べるために内部対照）の化合物について評価した。第 2 回目の共同研究は第 1 回目のフォローアップとして国内 40 機関、国外 6 機関が参加して、第 1 回目で確定できなかった 3 化合物を含む 23 化合物について評価した。

試験は全て 96 穴のマイクロタイタープレートを用いて行い、Cole らの方法 (1983) に基づいた統一プロトコールに従い、1 つの化合物について 2 つ以上の機関で評価した。また、共同研究のデーターの質を保証するた

めに、1994 年にポートランドで開催された MLA のワークショップでの取り決めと同じ受け入れ基準を採用した (Clive *et al.*, 1995)。すなわち、薬物処理直後の陰性対照における plating efficiency (PE0) が 60~140%、expression time 後の plating efficiency (PE2) が 70~130%、薬物処理直後の relative survival (RS) が 10~20% であること、陰性および陽性対照における突然変異頻度が妥当な値であることなどをデータの受け入れ条件とした。なお、陰性または陽性の判定には、英国の環境変異原学会で推奨している統計パッケージを用いた。

1 回目の共同研究で PE0/PE2 の受け入れ基準を満たしていたものは 83.0%、2 回目では 84.4% であり、また、陰性・陽性対照における突然変異頻度も 2~3 の研究室を除いていずれも妥当な範囲内であった。40 化合物における MLA の陽性率は 57.5%、34 の染色体異常誘発物質での MLA 陽性率は 64.7% であった。またこの中から評価の確定しなかった 5 化合物を除いた 29 の染色体異常誘発物質の MLA 陽性率は 75.9% となり、MLA が染色体異常物質を相当に検出できることが明らかとなった。今回の共同研究で明らかに陰性となった化合物の中には、染色体異常試験で長時間処理をしないと異常が見られない核酸塩基類似物質等が含まれていることから、MLA 試験でも長時間処理の必要性が議論されている。また、今回試験した 40 化合物には、倍数体／異数体を誘発する化合物が 8 つ含まれていたが、このうち半数の 4 化合物が MLA で陽性になったことから、MLA は倍数体／異数体誘発物質も検出できることが今回の共同研究から明らかになった。

4. 染色体異常試験系の比較

評価した 40 化合物について、文献より集めた各種 *in vitro* 染色体異常試験の結果および HPRT を指標とする遺伝子突然変異試験との比較を行った (Table 2)。評価の定まらない化合物を除いた 33 化合物の MLA 陽性率は約 69.7% であったが、HPRT 試験ではきわめて低く 25.0% であった。これは、MLA 試験では染色体異常は小さなコロニーとして検出できるが、HPRT ではできな

いという理論的根拠と一致していた。

一方、染色体異常試験同志での感受性を比較すると、CHL、ヒトリンパ球および V79 での感受性はほぼ 90% 前後と同程度であったが、CHO では 50% と低かった。CHO 細胞を用いる系は欧米での染色体異常試験の標準となっているが、この感受性の違いについては、薬物処理方法や観察項目等のプロトコールの違いがその主たる原因であることが Galloway *et al.* (1996) や Kirkland (1992) によって既に報告されている。CHL 細胞を用いた日本の染色体異常試験のプロトコールは、数的異常のマーカーとしての倍数体の観察と細胞毒性による細胞周期延長を考慮した長時間処理に特徴があるが、今回の共同研究で CHL 細胞のみで陽性となっている化合物の半分は倍数性誘発物質であった。また、発癌物質に対する感受性を参考までに示したが、解析数があまりに少ない試験系を除外して比較すると、MLA と CHL 細胞を用いる染色体異常試験はほぼ同程度の感受性であったが、CHO 細胞では低かった。

5. コロニーサイズ

共同研究ではコロニーの観察を 12 日目と決めた。ま

た、small と large colony の判定基準として、コロニーの大きさが well の直径の 1/4 以下でかつ形態が密なものを small colony、well の直径の 1/4 以上でかつ辺縁部が diffuse しているものを large colony と定義した。

Fig. 1(A) に典型的な small colony を示した。8 日から 14 日まで同一コロニーの経日的な生育を示したが、8 日目には既に小さなコロニーが見えはじめ、その後日を追ってサイズは少しづつ大きくなるが形態が密であることに変わりがない。しかしあまり日が経ってしまうと大きさの点で small と large の区別は難しくなる。典型的な large colony を Fig. 1(B) に示した。8 日目で既にかなりの大きさのコロニーになっており、12 日目前後のコロニーでみると、辺縁部が diffuse しているのが観察される。一方全てのコロニーが明瞭に区別できるわけではなく、中には判定が困難なものもある。Fig. 1(C) には 10 日目頃から急にコロニーが出来はじめ、急速に大きくなつた例を示した。これを small とするのか large とするのかは難しい問題である。

これらのコロニー (n=61) について、サンプルティングによる遺伝子解析を行ったところ、small colony では tk locus を 100% 欠失していた。また large

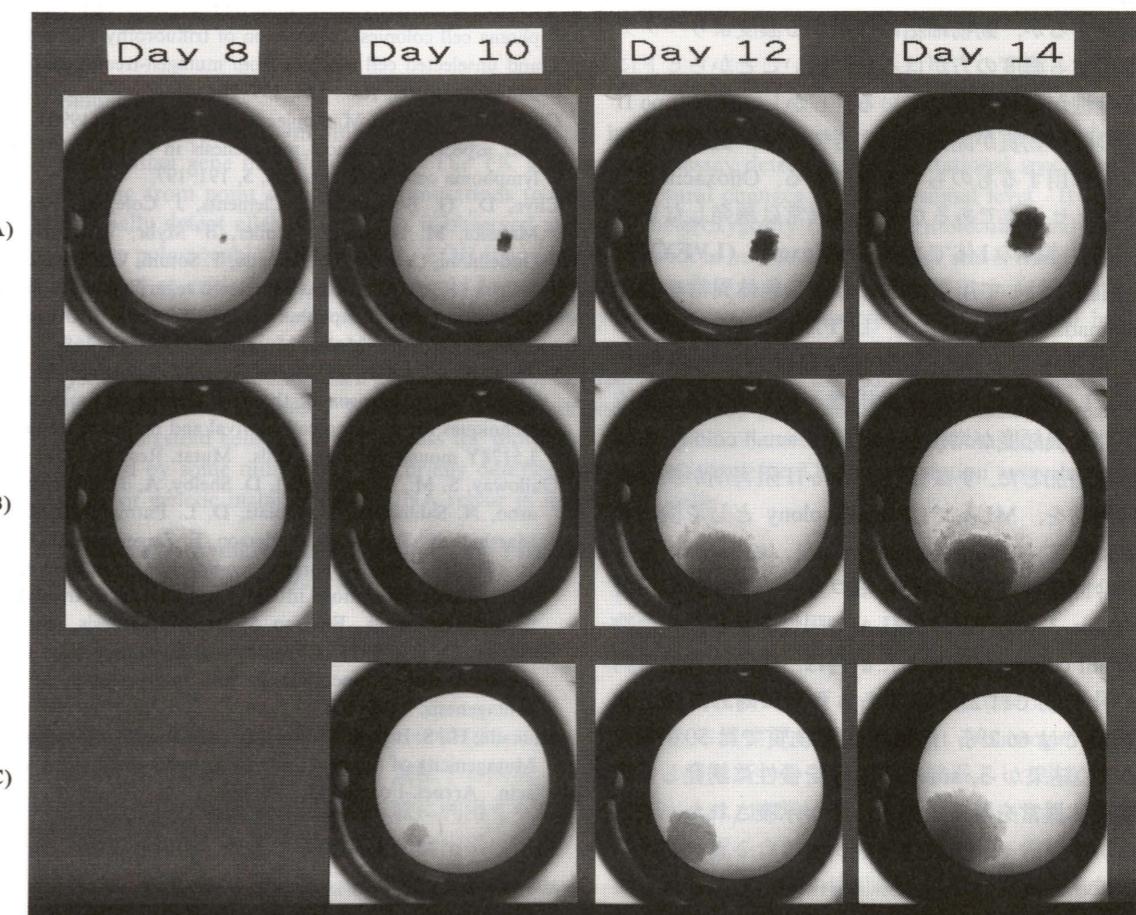


Fig. 1. Mutant colonies were classified by size and morphology on day 12. Small colony (A) is defined as less than a quarter of well's diameter with compact morphology, and large colony (B) is defined as a quarter of well's diameter or more with diffused or totally in peripheral morphology. Some colony (C) showed very rapid growth and was difficult to classify small or large.

Table 2. Summary of the 6 mammalian test systems.

Test system	No. of chemicals	No. of positives (%)	Concordance with carcinogenicity (%)
Gene mutation			
MLA	33 ¹⁾	23 (69.7)	70.0 (14/20)
HPRT	13	3 (25.0)	50.0 (3/6)
Chrom aberration			
CHL	30	26 (86.7)	72.2 (13/18)
CHO	26	13 (50.0)	42.1 (8/19)
HL	14	13 (92.9)	70.0 (7/10)
V79	10	9 (90.0)	50.0 (3/6)

¹⁾ Excluding inconclusive or equivocal chemicals.

Table 3. Analysis of colony size.

MLA	Increase of small colonies (%) ¹⁾		
	CA+		CA-
	Structural ab.	Polyploid	
+	66.2	50.0	25.0
-	33.3	26.7	21.4
I	62.5	62.5	25.0

I: Inconclusive.

¹⁾ Significant or more than 20% increase of small colonies compared with solvent control.

colony の 67% がやはり *tk* locus を欠失しており、これは Clive らの報告 (1990) とほぼ一致していた。成長の早い中間型のコロニーも *tk* locus を 100% 欠損していた。これがなにを意味するのかは今後の検討課題であるが、コロニーサイズはある程度の目安になったとしても、これだけで染色体異常誘発物質かどうかを判定するには問題があるように思われる。分離したコロニーの染色体分析も含めて、今後さらに検討が必要である。

キノロン系合成抗菌剤は染色体異常を誘発するが Ames の通常の菌株では陰性を示す。この系統の薬剤の抗菌作用メカニズムは Topo II 阻害で、染色体異常を特徴的に誘発するが、動物細胞に作用する濃度よりバクテリアに作用する濃度の方がはるかに低いことからヒトに対する安全性が高いとされている。しかし、最近 topo II 阻害作用の強い物質が開発されてきており、低濃度で動物細胞にも作用するものもできている。Ofloxacin は d 体と 1 体のラセミ体であるが染色体異常は誘発しない。しかし、活性本体の 1 体である levofloxacin (LVFX) では CHL 細胞に対して用量に依存した染色体異常を誘発する (Shimada *et al.*, 1992)。LVFX は、CHO 細胞の HPRT を指標とした遺伝子突然変異試験では陰性であったが、L5178Y 細胞の *tk* を指標とした系では用量依存的に突然変異頻度が増加し、同時に small colony の割合が優性に増加した。すなわち、Topo II 阻害剤が誘発する染色体異常を、MLA では small colony として検出しえたことになる。

また、今回の共同研究におけるコロニーサイズの解析結果を Table 3 に示した。MLA で陽性を示した化合物のうち small colony が増加した割合は、染色体異常を誘発しない化合物では 25.0% であったのに対し、構造異常誘発物質では 66.2%、倍数体誘発物質では 50.0% であった。この結果から、small colony を優性に誘発した場合には染色体異常を疑って良いことが示唆された。

6. 結論

以上の結果より、

- 1) MLA は染色体異常誘発物質をある程度検出しうる。今回の共同研究では、約 76% の染色体異常誘発物質を検出した。
- 2) 核酸塩基類似物質等ある種の染色体異常誘発物質は、既存のプロトコールでは MLA で検出できない。これに関しては、現在長時間処理による検討がすすめられており、長時間処理により MLA でも検出可能であることが示されつつある。
- 3) Small colony を誘発する化合物は、染色体異常誘発物質である可能性が推測されるが、染色体異常誘発物質全てが small colony として検出できる訳ではない。

謝辞

本共同研究に参加し、短期間のうちに貴重なデータを提供して下さった共同研究参加者および共同研究世話人の皆様に深く感謝します。

References

Blazak, W. F., F. J. Los, C. J. Rudd and W. J. Caspary (1989) Chromosome analysis of small and large L5178Y mouse lymphoma cell colonies: comparison of trifluorothymidine-resistant and unselected cell colonies from mutagen-treated and control cultures. *Mutat. Res.*, **124**, 197-208.

Clive, D., P. Glover, M. Applegate and J. Hozier (1990) Molecular aspects of chemical mutagenesis in L5178Y/*tk*^{+/−} mouse lymphoma cells. *Mutagenesis*, **5**, 191-197.

Clive, D., G. Bolcsfoldi, J. Clements, J. Cole, M. Honma, J. Majeska, M. Moore, L. Muller, B. Myhr, T. Oberly, M-C. Oudelhkim, C. Rudd, H. Shimada, T. Sofuni, V. Thybaud and P. Wilcox (1995) Consensus agreement regarding issues discussed during the mouse lymphoma workshop: Portland, Oregon, May 7, 1994. *Environ. Molec. Mutagenesis*, **25**, 165-168.

Cole, J., C. F. Arlett, M. H. L. Green, J. Lowe and W. Muriel (1983) A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequency in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.*, **111**, 371-386.

Galloway, S. M., T. Sofuni, M. D. Shelby, A. Thilagar, V. Kumar, N. Sabharwal, D. Gulati, D. L. Putman, H. Murli, R. Marshall, N. Tanaka, B. Anderson, E. Zeiger and M. Ishidate, Jr. (1996) A multi-laboratory comparison of in vitro tests for chromosome aberrations in CHO and CHL cells treated under the same protocols. *Environ. Molec. Mutagenesis*. submitted.

Kirkland, D. J. (1992) Chromosomal aberration tests in vitro: problems with protocol design and interpretation of results. *Mutagenesis*, **7**, 95-106.

Shimada, H., S. Itoh, C. Hattori, S. Tada and Y. Matsuura (1992) Mutagenicity of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Arznei-Forsch*, **43**, 378-385.

第24回ミニシンポジウム
「*In vitro* 遺伝子突然変異試験法の新たな展開」

ヒトリンパ球細胞株の *tk* 遺伝子を利用した欠失型、組換え型突然変異

Deletional and recombinational mutations at heterozygous thymidine kinase (*tk*) locus in human lymphoblastoid cells

本間正充[†], 林 真, 祖父尼俊雄

Masamitsu Honma, Makoto Hayashi and Toshio Sofuni

国立衛生試験所, 変異遺伝部 158 世田谷区上用賀 1-18-1

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

(受理: 1996年3月17日)

Summary

Heterozygous thymidine kinase (*tk*) locus in human cells represents an attractive system for mammalian gene mutation assays. The TK gene mutation assay detects a wide mutational spectrum, ranging from point or frameshift mutations to gross structural changes at chromosomal level. It can especially detect allele loss, which is observed as loss of heterozygosity (LOH) by molecular analysis, using a polymorphic DNA marker. LOH is an important event in human tumorigenesis and is frequently observed at critical loci, which should locate tumor suppressor genes in a variety of human tumors. Mutations detected in the TK gene mutation assay are recessive and correspond to the second hit proposed in the two-hit theory of tumor suppressor genes. We believe that the TK gene mutation assay system is suitable not only as a genotoxicity test, but also as a good model for examining genetic changes in human tumorigenesis. We provide a brief review of the TK gene mutation assay using human lymphoblastoid cells TK6 and discuss the molecular bases of TK mutants occurring spontaneously and induced by some mutagens. We briefly describe the application of the TK gene mutation assay in the study of genetic instability and DNA repair in mammalian cells.

Keywords: thymidine kinase (*tk*) locus, TK6 cells, gene mutations, loss of heterozygosity (LOH), multi-step carcinogenesis

1. はじめに

常染色体性遺伝子であるチミジンキナーゼ (*tk*) はヘテロの状態で存在する場合に限り、*hprt* 遺伝子と同様、薬剤耐性を指標とした遺伝子突然変異試験に利用することができる。*tk* を利用した遺伝子突然変異検出系は従来の *hprt* や Na/K ATPase などの遺伝子突然変異検出系と異なり、点突然変異等の小さな DNA の変異だけでなく、染色体レベルに及ぶ大きな DNA の欠失や、染色体間の組換えによる変異等をも検出できるのが特徴である。

[†] Corresponding author.

このため従来のエームス試験で検出される mutagen と染色体異常試験で検出される clastogen の両者をカバーしうる新しい変異原性試験系として注目されている (Clive *et al.*, 1979)。また、ここで検出される欠失型、組換え型変異を含む全ての変異は、ヒト癌組織において観察される癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異とも対応しており、細胞の癌化過程における遺伝子変化のモデル系としても有用であると考えられる (Cavenee *et al.*, 1983)。

筆者らはこの *tk* 遺伝子をヘテロに持つヒトリンパ球様細胞株 TK6 を用いて種々の環境変異原によって誘

発される突然変異誘発機構と、それらを制御する内的要因について分子遺伝学的研究を行ってきた。本稿では *tk* 遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異検出系の有用性と重要性について TK6 細胞を用いた実験結果をもとに紹介する。

2. チミジンキナーゼ (*tk*) 遺伝子を利用した突然変異検出系の特徴

ヒト *tk* 遺伝子は 17 番染色体長腕に位置し、TK6 細胞では片方の対立遺伝子に点突然変異が存在し機能を失っている。したがって活性型 *tk* 遺伝子は 1 コピーであり、これをターゲットとした遺伝子突然変異検出系が確立されている (Liber and Thilly, 1982)。

Fig. 1 に *hprt* と *tk* 遺伝子突然変異の特徴を比較した。*hprt* では遺伝子内に点突然変異や小さな欠失や挿入等の突然変異が起こると 6TG (6TG) 耐性の変異体として検出することができる。しかし、*hprt* 遺伝子とその近傍に存在する essential な遺伝子をも巻き込む大きな欠失型の突然変異等が起こると細胞は致死となり変異体として検出することができない。実際、3Mb を越える欠失型の *hprt* 変異体の検出は不可能とされている。一方、*tk* では点突然変異はもちろんのこと、大きな欠失により近傍にある essential な遺伝子をも喪失したとしても、もう一方の対立遺伝子の存在のため致死とはなら

ず、欠失型変異体としてトリフルオロチミジン (TFT) で回収することができる。また常染色体性であるため染色体間の組換えにより、ホモとなる変異体も検出可能である。このように理論的には点突然変異から染色体一本の変異までをカバーしうる広範囲の変異スペクトラムを持つことが *tk* などの常染色体遺伝マーカーを用いた遺伝子突然変異検出系の大きな特徴である。

Fig. 2 ではヒトゲノムの各単位のサイズと、ヒト癌で観察される遺伝子変化の種類、および現在利用されている各種変異原性試験と分子生物学的手法の検出範囲を DNA の長さをもとに比較した。多くの試験法の中で、常染色体性遺伝子突然変異試験が最も広範な突然変異スペクトラムを持ち、エームス試験と染色体異常試験の両者をカバーしうるだけでなく、それらの方法では検出できない数ベースから数メガベースの DNA の変異をも検出しうる。特にこのサイズの DNA の変異は癌遺伝子や癌抑制遺伝子にも多く認められ、遺伝子突然変異の対象としては極めて重要であると考えられる。また変異のタイプとしては、劣性の突然変異検出系であるため先ほど述べたように対立遺伝子全体の消失をも検出することができる。このような変異は p53 や Rb などの癌抑制遺伝子の変異として高頻度に観察される Loss of Heterozygosity (LOH) と同等の遺伝子変異である。このように常染色体マーカーでの突然変異は癌遺伝子、癌抑制遺伝子

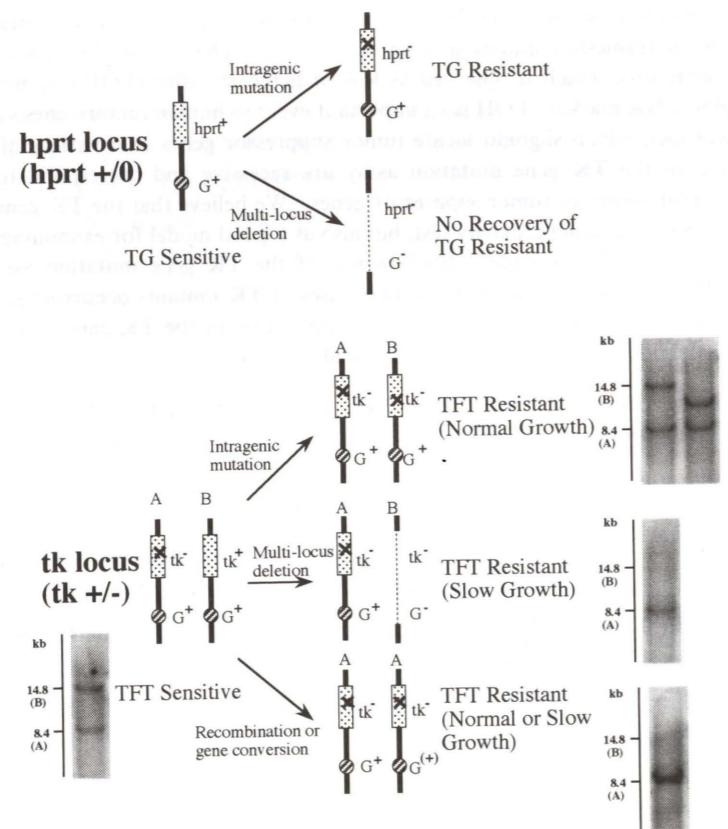


Fig. 1. Possible mutational events occurring at the *hprt* locus (TG sensitive) and *tk* locus (TFT sensitive) and hybridization patterns of genomic DNA of *tk* mutants. *G* is a hypothetical essential gene neighboring the *hprt* and *tk* genes.

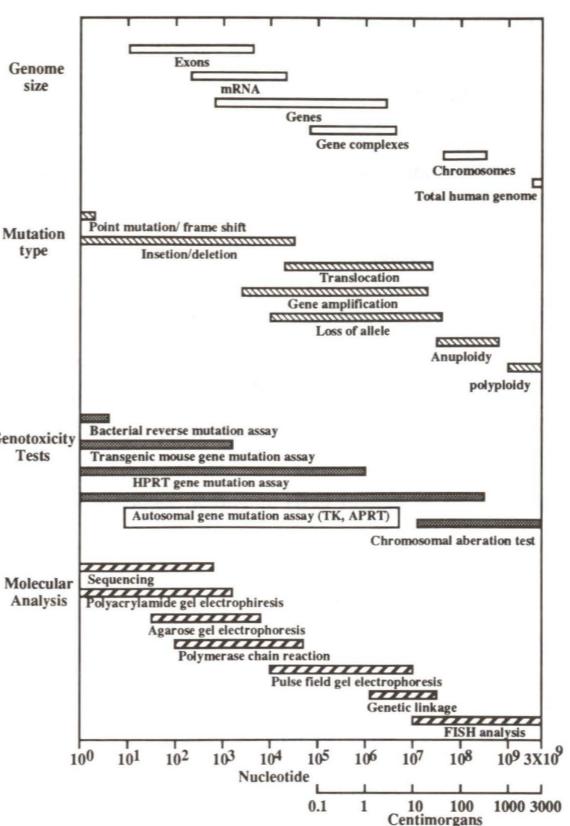


Fig. 2. Capacity of genotoxicity tests and molecular analysis based on genome sizes and types of mutational events.

における突然変異をよく反映しており、本検出系が細胞癌化における遺伝子変化のモデル系としても有用である。

さらに、*tk* 遺伝子の場合、変異体は増殖速度の異なる 2 つのタイプ normal growth (NG) 変異体と slow growth (SG) 変異体として検出される。主として NG 変異体は点突然変異、SG 変異体は染色体レベルの大きな変異によるものである。これは *tk* 遺伝子を利用した突然変異検出系特有の特徴であり、マウスリンゴーマ L5178Y 細胞を用いた場合にも認められる。ヒトおよびマウスの *tk* 遺伝子近傍に細胞の増殖に関与する遺伝子があり、欠失等によりそのコピー数が減少すると細胞の増殖速度が低下するためと考えられているが、詳しいことはまだ解明されていない (Amundson and Liber, 1992)。

Fig. 3 に TK6 細胞を用いて X 線と EMS の変異原性を *tk* と *hprt* 遺伝子突然変異で検出した例を示す。X 線では *hprt* と *tk*-NG 変異体の誘発があまり起こらないのに對して *tk*-SG 変異体の誘発は顕著であった。一方、EMS では全くその逆であった。このことは X 線は clastogen であり、点突然変異よりもむしろ染色体レベルの突然変異を誘発し、アルキル化剤である EMS は点突然変異を優先的に誘発することを示している (Liber et al., 1989)。

このように *tk* 遺伝子突然変異検出系では、単に変異原による突然変異の誘発性を検出することができるだけ

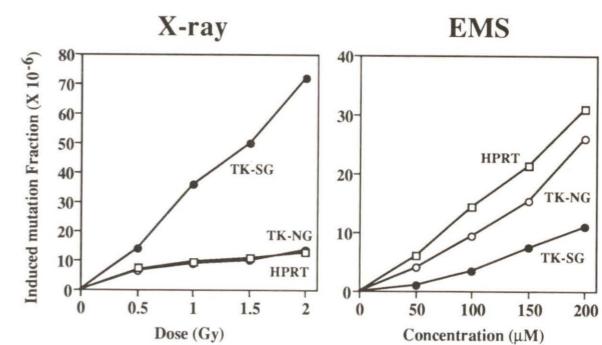


Fig. 3. Comparative mutagenicities following X-ray and EMS treatments in TK6 cells. (□) HPRT mutation frequency; (○) normal growth TK mutation frequency; (●) slow growth TK mutation frequency.

なく、増殖速度の異なる 2 つの変異体の出現率の違いからどのようなタイプの突然変異が起きているかを知ることができ、その変異原物質の性質を予測することができる。

3. *tk* 遺伝子突然変異体の遺伝子解析とその変異スペクトラム

tk 変異体は増殖速度の異なる変異体の出現率からだけでなく、*tk* 遺伝子の変異部位を解析することにより突然変異のタイプを分類でき、その発生のメカニズムを詳細に検討することができる。TK6 細胞の *tk* 遺伝子の近傍には制限酵素 *SacI* の多型性部位が存在する。これを用いた RFLP-サンサン解析により *tk* 遺伝子の 2 つのアリルを区別することができる (Fig. 1)。正常の TK6 細胞でみられる 14.8 kb のバンドがターゲットとなる活性型アリルのバンドで 8.4 kb のバンドはすでに点突然変異をもつ不活性型のアリルに相当する。変異は大きく分けて 3 つに分類される。第 1 は *tk* 遺伝子内部もしくはその限られた近傍までの変異で intragenic mutation として分類される。14.8 kb のバンドに変化がないか、バンドの位置が変化するもので、これらは点突然変異と小さな欠失、挿入型の変異である。他の 2 つはバンドが完全に消失するもので、いわゆる LOH 型の変異である。LOH 型の変異の発生には先に述べたように 2 つのメカニズムが考えられる。1 つは欠失によって *tk* 座位がヘミになる場合と、もう一つはアリル間の組み換えによってホモになる場合である。両者の区別は残った 8.4 kb のバンドの濃さから判断できる。つまり、ホモであればそのバンドの濃さは 2 倍になる。LOH の発生には他に細胞分裂時の染色体の不分離による活性型アリルをもつ 17 番染色体全体の消失や、それに伴う不活性アリルをもつ染色体の倍加などが理論的に考えられるが、TK6 ではほとんど観察されないことが報告されている (Yandell et al., 1990)。

出現する変異体の種類 (NG および SG 変異体) の比とその遺伝子解析の結果から得られた突然変異スペクト

Table 1. Mutational spectrum at TK locus in TK6 cells.

	Category of Mutants	% of Mutants		
		Spont.	X-ray (2 Gy)	EMS* (150 μ M)
Normal Growth Mutant	LOH- — Point mutation, intragenic mutation	29.6	14.3	62.3
	LOH+ — Hemi — Intermediate deletion	5.6	16.7	5.4
	LOH+ — Homo — Recombination or gene conversion	3.7	0	
Slow Growth Mutant	LOH- — Multiple mutation	0	0	2.6
	LOH+ — Hemi — Large deletion	14.6	58.0	26.2
	LOH+ — Homo — Recombination or gene conversion	46.4	11.0	3.3

* Data from Li *et al.* (1992).

ラムの結果を Table 1 に示す。自然突然変異では全体の約 30% が点突然変異などの比較的小さな遺伝子の変異であるのに対して、残りの 70% は LOH 型の変異であり、その大部分は組換えによるものであった。X 線照射でもその変異の大部分は LOH 型であった (85%) が、同じ LOH でもそれらは組換えよりはむしろ欠失によるものが多かった。X 線は主として DNA 鎮の切断を引き起こし染色体レベルの大きな遺伝子変異を起こすことが知られているが、この結果はそれを裏付けるものである。またアルキル化剤である EMS では予想されたように点突然変異がその主要な変異であった (Li *et al.*, 1992)。このように tk 遺伝子突然変異検出は変異原の特徴を反映した突然変異を捕らえることができ、これを利用することにより各種変異原の突然変異誘発のメカニズムを解析することが可能である。

また、変異原の種類に関わりなく SG 変異体のほとんどすべてが LOH 型の変異を示した。このことは増殖速度の違いは的確に遺伝子レベルでの変異を反映し、SG 変異体の出現率による変異の種類を予想できることの根拠を示すものである。

4. 癌抑制遺伝子における遺伝子変異と tk 遺伝子突然変異

tk 遺伝子の突然変異スペクトラムをみると LOH 型の突然変異がかなりの部分を占めることが容易に理解できる。これは癌抑制遺伝子の突然変異などで見られる劣性型突然変異の最大の特徴である。Table 2 に代表的な癌抑制遺伝子である Rb, p53, APC で観察された LOH の頻度を示す (Lasko and Cavenee, 1991)。LOH 型突然変異が癌抑制遺伝子の主要な遺伝子変化であり、またその頻度は tk の突然変異で得られた LOH の頻度と近似している。このように tk 遺伝子での突然変異は癌抑制遺伝子でのセカンドヒットの突然変異を非常によく反映しており、このことが本系が癌化過程における遺伝子変異のモデル系としても有用であるとの論拠となっている。

Table 2. Frequency of LOH at Tumor Suppressor Genes in Human Tumors.

Gene (Locus)	Tumor type (Cell)	% of LOH*
tk (17q)	TK6	70
Rb (13q)	Retinoblastoma	70
	Osteosarcoma	63
	Small cell lung carcinoma	94
	Breast cancer	21
	Hepatocellular carcinoma	23
	Neuroblastoma	18
p53 (17p)	Colorectal carcinoma	80
	Breast carcinoma	57
	Hepatocellular carcinoma	44
	Bladder carcinoma	31
	Stomach cancer	60
	Small cell lung carcinoma	100
	Ovarian cancer	75
	Astrocytoma	50
APC (5q)	Colorectal carcinoma	70
	Stomach cancer	60

* Data from Honma and Little (1995), Lasko and Cavenee (1991).

5. tk 遺伝子突然変異検出系の応用

tk 遺伝子を利用した突然変異検出系は広域の変異スペクトラムをもつ高感度の検出系である。実際、エームス試験や *hprt* などでは検出困難でも tk では検出できる変異原物質は多数存在する。また直接 DNA に損傷を与える、DNA の複製や代謝などに影響を及ぼし、間接的に突然変異を誘発するような化合物に対してもこの系は有効ではないかと考えている。最近、我々は TK6 細胞を用いて強力な発ガンプロモーターである TPA の突然変異誘発性を認めた (Honma and Little, 1995)。TPA は遺伝的不安定性を助長し、自然突然変異全体を押し上げるものと考えられた。この遺伝的不安定化がプロモーター作用と関係している可能性がある。

一方、このような変異原などの外的因子による突然変異だけでなく、突然変異を制御する細胞側の内的因子の研究についても本系は利用できると考えている。最近、DNA 修復、組換え、染色体分配、細胞周期の停止、apo-

ptosis などをコントロールする細胞内因子が突然変異の生成と強く関係していることが解明されつつある。このような因子の遺伝子を破壊したり、または高発現させ、突然変異の頻度やその変異スペクトラムを検討することは、その因子の機能を知るだけでなく、癌の遺伝的要因を分子レベルで解明することにつながるものと考えられる。

筆者らはこれら要因のうち p53 に注目している。p53 は損傷した DNA と直接または間接的に作用し、細胞周期の停止、apoptosis、DNA 修復の亢進などを導き、突然変異の制御において中心的役割を演じているとされている。TK6 細胞の変異株で異常な p53 タンパクのみを高発現する WTK-1 細胞を用いて突然変異を検討したところ、この細胞の tk 遺伝子での変異頻度は TK6 の 30 倍以上も高く、その変異の 90% 以上が組換えによる LOH であった。p53 の変異によっては点突然変異の誘発は起こらないことが報告されていることから (Sands *et al.*, 1995)、p53 は主として染色体レベルでのゲノムの安定化に関与しているものと考えられる (Honma *et al.*, 投稿中)。これらの結果は、多段階発癌過程における p53 の変異以降の LOH 型突然変異の蓄積を説明しうるものと考えられる。TK6 細胞の変異株としては他にミスマッチ修復に関与する GTBP タンパクを欠損した MT1 細胞もあり、この細胞も突然変異頻度が高くアルキル化剤に対しては抵抗性であることが報告されている (Kat *et al.*, 1993)。

6. おわりに

3 年前筆者が初めて米国の環境変異原学会に参加したとき、そこで発表される研究内容の多彩さとレベルの高さに驚いた。それは変異原研究にたずさわるものだけでなく、遺伝学や分子生物学の研究者に対しても十分興味のもてる内容であった。日本と違っては乳類細胞を用いた突然変異に関する分子レベルの研究が非常に多いことを認識した。これまで日本の環境変異原研究においては、は乳類細胞を用いた遺伝子突然変異検出系は普及しておらず、この種の研究は世界的に見て大きく遅れている。このような研究の遅れは、遺伝毒性試験の国際的

ハーモナイゼーションに影響を与えただけでなく、学問的にもアンバランスであると言わざるをえない。今後、MLA 試験や TK6 細胞を用いた研究を通じて、わが国においても乳類細胞を用いた変異原性試験が定着し、発展することを切望する。

参考文献

Amundson, S. A. and H. L. Liber (1992) A comparison of induced mutation at homologous alleles of the tk locus in human cells. II. Molecular analysis of mutants. *Mutat. Res.*, **267**, 89–95.

Cavenee, W. K., T. P. Dryja, R. A. Phillips, W. F. Benedict, R. Godbout, B. L. Gallie, A. L. Murphy, L. C. Strong and R. L. White (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, **305**, 779–784.

Clive, D., K. O. Johnson, J. F. S. Spactor, A. G. Baston and M. M. M. Brown (1979) Validation and characterization of the L5178 Y/TK+/- mouse lymphoma mutagen assay system. *Mutat. Res.*, **59**, 61–108.

Honma, M. and J. B. Little (1995) Recombinagenic activity of the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human lymphoblastoid cells. *Carcinogenesis*, **16**, 1717–1722.

Kat, A., W. G. Thilly, W. H. Fang, M. J. Longley, G. M. Li and P. Modrich (1993) An alkylating-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 6424–6428.

Lasko, D. and W. Cavenee (1991) Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 281–314.

Li, C. Y., D. W. Yandell and J. B. Little (1992) Molecular mechanisms of spontaneous and induced loss of heterozygosity in human cells in vitro. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **18**, 77–87.

Liber, H. L. and W. G. Thilly (1982) Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts. *Mutat. Res.*, **94**, 467–485.

Liber, H. L., D. W. Yandell and J. B. Little (1989) A comparison of mutation induction at the tk and hprt loci in human lymphoblastoid cells; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal tk locus. *Mutat. Res.*, **216**, 9–17.

Sands, A. T., M. B. Suraker, A. Sanchez, J. E. Marth, L. A. Donehower and A. Bradley (1995) p53 deficiency dose not affect the accumulation of point mutations in a transgenic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 8517–8521.

Yandell, D. W., T. P. Dryja and J. B. Little (1990) Molecular genetic analysis of recessive mutations at a heterozygous autosomal locus in human cells. *Mutat. Res.*, **229**, 89–102.

第24回ミニシンポジウム
「*In vitro* 遺伝子突然変異試験法の新たな展開」

ヒト・リンパ芽球様細胞のAPRT遺伝子を利用した 組換え型突然変異の検出と分子レベルの解析

Detection and molecular analysis of mitotic recombination by using
APRT marker in human lymphoblastoid cells

異 紘一*, 立花 章**, 藤森 亮*, 佐々木正夫**

Kouichi Tatsumi*, Akira Tachibana**, Akira Fujimori* and Masao Sasaki**

* 放射線医学総合研究所生物影響研究部 263 千葉市稲毛区穴川4-9-1

** 京都大学放射線生物研究センター 606-01 京都市左京区吉田近衛町

* Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences,
4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi, 263 Japan

** Radiation Biology Center, Kyoto University,
Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, 606 Japan

(受理: 1996年4月15日)

Summary

Constitutional loss or inactivation of one allele of a tumor suppressor gene, as illustrated by hereditary retinoblastoma, Wilms tumor or Li-Fraumeni syndrome, increases the susceptibility to malignancy by reducing the number of events necessary for the complete loss of the negative regulatory function.

A mutation assay system at the APRT locus in human lymphoblastoid cells has been developed to dissect the second step in loss-of-function mutations, that is, the forward mutation from $APRT^{+/-}$ to $APRT^{-/-}$ or $APRT^{0/-}$, and also to determine the potency of physical and chemical agents to produce such mutations. Molecular analysis of 2,8-diaminopurine-resistant mutants revealed that 85% of the spontaneous mutants and 93% of the gamma-ray-induced mutants resulted from the loss of the intact allele at the APRT locus. It also indicated that somatic recombinations and large deletions were the major causes for the allelic losses, and that non-disjunctions were unlikely. Sites of somatic recombinations or deletions were not randomly distributed along the long arm of the chromosome but clustered at the border of heterochromatic and euchromatic regions near the centromere.

Keywords: somatic recombination, deletions, non-disjunction, LOH, microsatellite

1. はじめに

大腸腺腫が次第に悪性化して癌に転換する過程に例示されるように、本来多段階である発癌には癌遺伝子の優性遺伝子異常、すなわち活性化のみならず、複数の癌抑制遺伝子の劣性遺伝子異常、すなわち失活が関与している。体細胞の対立遺伝子喪失 (allelic loss) が発癌にとり重要な機序であることは、網膜芽細胞腫、遺伝性ウイルムス腫瘍、家族性大腸ポリポーシス、リー・フラウメニ症候群など一連の高発癌遺伝病において、癌抑制遺伝子の一方の対立遺伝子があらかじめ構成的に喪失または失

活しており、生後もう一方の正常対立遺伝子が喪失または失活することで発癌に至ることからも明らかになった。異型接合性消失 (LOH) を指標として検出される対立遺伝子喪失は、欠失、体細胞 (有糸分裂) 組換え (乗り換え)、遺伝子変換、染色体不分離のみ、または染色体不分離と重複、の何れかを介して発生する (Cavenee *et al.*, 1983)。このような仕組みの中で、癌細胞の劣性形質 (対立遺伝子) 発現の原因として体細胞組換えの重要性を最初に指摘したのは大野乾博士 (Ohno, 1974) である。私達は、できるだけ多種類の突然変異検出系をヒト体細

胞に適用したい、という極めて単純な動機から、培養ヒトリンパ芽球様細胞で半接合X染色体上のヒボキサンチン・フォスフォリボシリルトランスフェラーゼ遺伝子(*HPRT*)だけでなく、常染色体16番長腕上のアデニン・フォスフォリボシリルトランスフェラーゼ遺伝子(*APRT*)についても定量的突然変異検出系と遺伝子変化解析技術を開発していく内に、常染色体上では欠失とともに体細胞組換えが比較的高頻度で普遍的に生じているらしいことを知るに至った(Fujimori, A. et al., 1992; Tatsumi, K. et al., 1992)。

本稿では常染色体遺伝子失活変異モデルとしての2,6-ジアミノプリン抵抗性(*DAP^r*)変異検定系を用いた私たちの実験結果を紹介し、対立遺伝子喪失の原因としての体細胞組換えの意義について考察する。

2. 癌化に関係のない常染色体遺伝子について対立遺伝子喪失はどのくらい頻繁に起きるか?

プリンのサルベージ代謝経路を司る酵素の一つ*APRT*を欠損する劣性遺伝病では、磷酸化されず血液中にたまつたアデニンが酸化されて難溶性の2,8ジハイドロキシ・アデニンになり、尿路結石症を惹き起す。この遺伝病の保因者の一人から樹立されたリンパ芽球様細胞(第1ヒットは第3エキソンのナンセンス変異)を培養して、新たに起こる第2ヒットの頻度を*DAP^r*を指標にして調べると、自発突然変異率は 1.7×10^{-6} 細胞/世代を示し、*HPRT*座位での6チオグアニン抵抗性(*TG^r*)の場合よりも約10倍高率であった。またFig. 1に示す様に γ 線はきわめて効率よく*DAP^r*変異を誘発し、自発突然変異頻度(1.8×10^{-5})を差し引いた正味の頻度上昇は*DAP^r*では*TG^r*のやはり約10倍であった。しかし紫外線は*DAP^r*変異をあまり強く誘発せず(倍加線量は 17.6 J/m^2)、正味の増加は*TG^r*変異の場合とほぼ同程度であった。

ヒトの*APRT*遺伝子は5つのエキソンからなるが、全

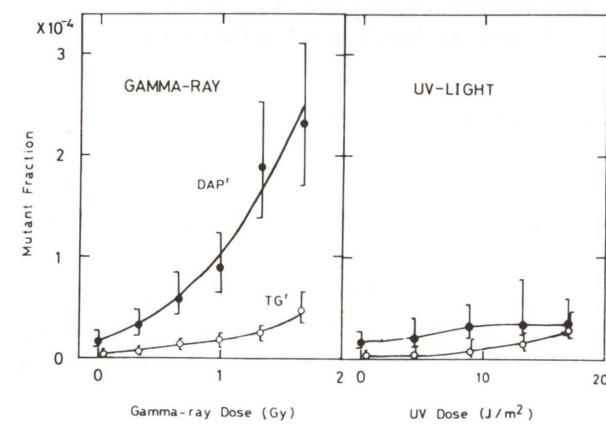


Fig. 1. Concurrent measurement of the mutation frequencies for *DAP^r* and *TG^r* in WR10 cells after gamma-irradiation (left panel) and UV-irradiation (right panel). Closed circles, *DAP^r*; open circles, *TG^r*. (Tatsumi et al., 1992)

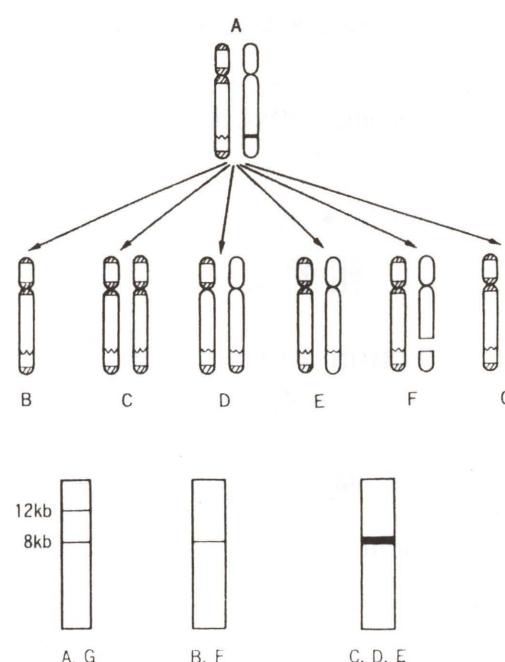


Fig. 2. Mechanisms for the loss of wild-type allele in *APRT* heterozygote WR10 cells and the corresponding Southern blot patterns for LOH at the *APRT* locus. A, heterozygous inactivation; B, chromosomal non-disjunction; C, non-disjunction followed by re-duplication; D, somatic crossing-over (mitotic recombination); E, gene conversion; F, deletion; G, point mutation.

長は2.5 kbでむしろ*HPRT*遺伝子より標的としてはるかに小さい。したがって、接合性の相違による変異発生機構の違いが自発および誘発頻度の大きな差の原因と考えられた。そこで検定細胞株WR10が*APRT*遺伝子近傍のSphI RFLPに関して12 kbと8 kbを示す異型接合であることを利用し(Fig. 2), 自発および γ 線誘発の*DAP^r*変異体クローンについてLOHを調べると、自発突然変異体クローンの85%(22/26), γ 線(2 Gy)照射細胞からの変異体クローンの93%(64/69)がLOHを伴っていた。すなわちヒトリンパ芽球では対立遺伝子喪失が*TG^r*変異の約10倍以上の頻度で自然に起こっており、 γ 線照射により25%の生存率を与える線量でも 2×10^{-4} 以上に誘発される。

3. その中で体細胞組換えによるものの比率はどの位か?

染色体17番に存在する*TK*遺伝子の量を内部標準としてイメージアナライザ(BAS2000)による*APRT*遺伝子量プロット解析(Fig. 3)を行うと、LOHを伴う*DAP^r*変異体の内、自発変異では約半数が、放射線誘発変異でも60%が2コピーを示した。すなわち第1ヒットである経世代失活対立遺伝子の同型接合を意味し、体細胞分裂組換えおよび遺伝子変換(Fig. 2のD, E)かまたは染色体不分離と重複(Fig. 2のC)の関与を示唆した。そして、約半数が1コピーの半接合であって野生型対立遺伝子の欠失(Fig. 2のF)による変異体であることが判明

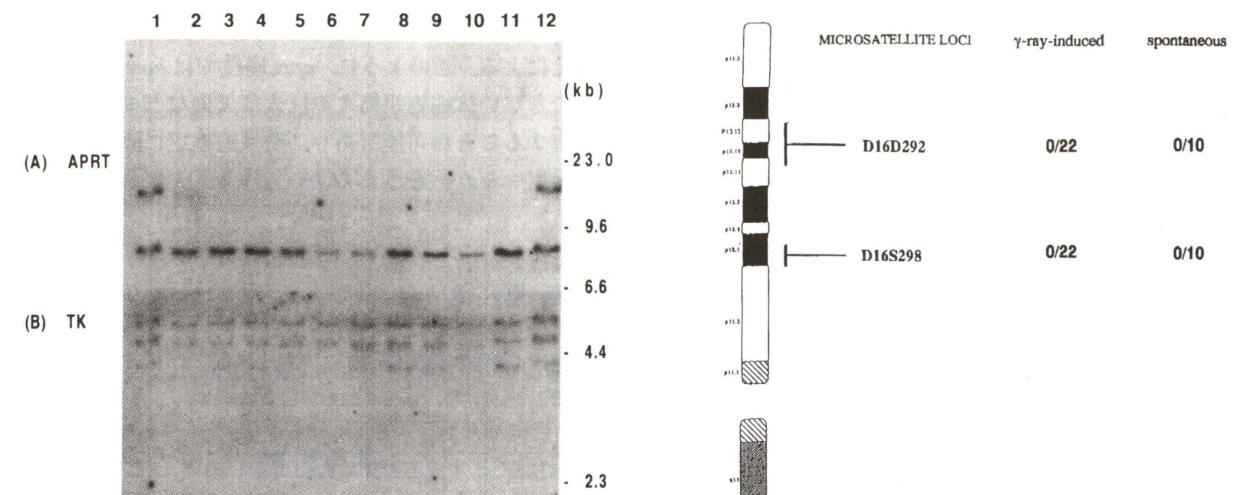


Fig. 3. Dosage blot analysis of DNAs from parental WR10 cells (lane 1 and 12) and gamma-ray-induced *DAP^r* mutant clones (lane 2-10). DNA from TK6 with 2 copies of 8 kb allele was included as an internal reference (lane 11). Genomic DNAs were digested with SphI, fractionated on an agarose gel, and blotted onto a nylon membrane. The upper part was hybridized with the *APRT* probe (A) and the lower part, with the *TK* probe (B). (Fujimori et al., 1992)

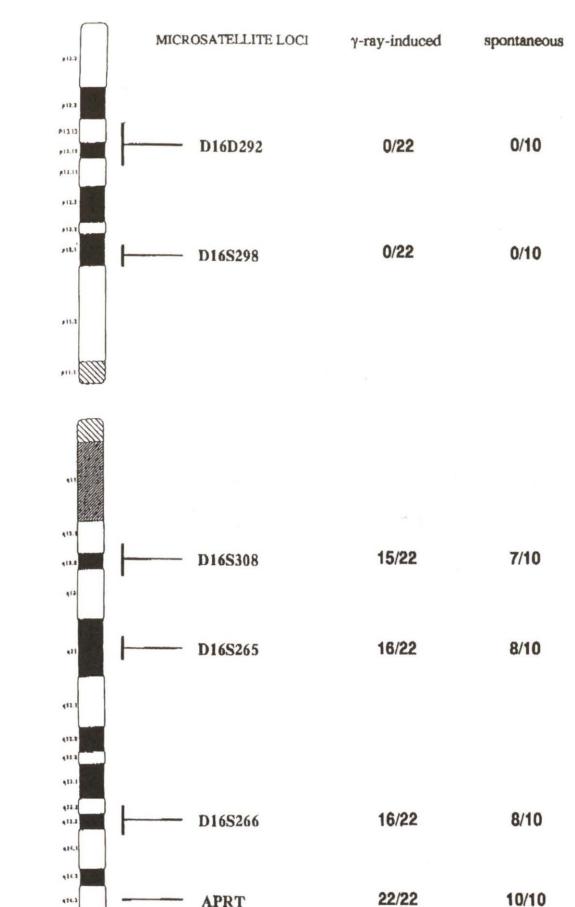


Fig. 4. Proportion of mutant clones with loss of heterozygosity at polymorphic microsatellite loci along Chromosome 16 in spontaneous and gamma-ray-induced *DAP^r* mutations. (Tachibana et al., unpublished)

した。さらに16番染色体短腕上のミクロサテライトDNAのVNTRマークター(D16S298およびD16D292)を用いて(CA)_nリピート多型の解析をPCRにより行ったところ、これらの短腕マークターに関しては自発、 γ 線誘発何れの場合でもLOHが見つからなかった(共に0/10, 0/22)。よって染色体不分離の可能性が除外できた。以上から正常対立遺伝子の消失は、半接合染色体では起こり得ない体細胞組換え(遺伝子変換を含む)が半分、残り半分が欠失、おそらく相同染色体の存在によって細胞致死や増殖遅延を免れ得るかなり大きな欠失であることが明らかとなった。これらが*DAP^r*変異頻度と*TG^r*変異頻度の10倍以上の差異の原因であろうと推察できる。なお、*APRT*遺伝子が16番長腕テロメアに極めて近いため、より遠位のSTSマークターが利用できず、組換えと遺伝子変換の区別はできていない。

4. 体細胞組換えや大きな欠失の切断点はランダムに分布しているのか?

LOHを伴う変異体クローンにおける体細胞組換えや欠失の範囲をマイクロサテライト・マークターを用いて調べると、自発、 γ 線誘発に関わらず*APRT*座位(16q24.3)から約50 cM離れたD16S266(16q23.3), 70 cMのD16S265(16q21), 80 cMのD16S308(16q12.2)でもいすれも約70%がLOHを伴っていた(Fig. 4)。すなわち脆弱部位が近い16q23.3までの間で変異体クローンの20~30%に切断が起こるが、その後は動原体近くまで切断は起こらないように見える。したがって、組換えや欠失の切断点はランダムに分布せず、異染色質と正

染色質の境界周辺に集中するらしいことが判明した。ショウジョウウバエにおける自発およびX線誘発の体細胞組換えについて、その頻度分布が調べられている(Becker et al., 1976)。何れの染色体についても、動原体近傍のヘテロクロマチン領域で最高で、我々がヒト16番染色体で観察した結果とよく符合している。もしこのような頻度分布がすべての常染色体に一般化できるならば、癌抑制遺伝子の体細胞組換えによる対立遺伝子喪失の頻度に対する染色体上の局在の影響はあまり大きくなることになる。本来、放射線によってランダムに誘起されるDNA切断などの損傷そのものが直接的に欠失や組換えの引き金と考えると、この非ランダムの切り替え点分布は理解しにくい。恐らく引き金としてのDNA損傷の位置に関わらず、交差はDNA塩基配列やクロマチンとの関係で規定される特定の場所で起こりやすいのであろう。

5. 癌化における体細胞組換え関与の可能性

癌抑制遺伝子に関して(1)構成的に片方の対立遺伝子が失活している高発癌性遺伝病の患者、(2)極めて稀だが発生初期に失活変異を生じた体細胞モザイクの人、

(3) 一方の対立遺伝子に失活変異を招來した細胞クローニングが体内に発生した人、の順番に、失活につながる第2ヒットを起こし得る標的細胞が多く、したがってチャンスが大きい。

実際に癌細胞で観察されている第2ヒットはリンパ芽球様細胞 *APRT* 遺伝子の場合と同じ機構で生じているのだろうか？網膜芽細胞腫では配偶子に生じている第1ヒットは塩基置換やごく短い欠失など遺伝子内の小さな変異として検出されることが多いが、体細胞に起こる第2ヒットでは50~60%にLOHが見られた。機構について比率は報告によって異なるが、体細胞組換えが10~50%，染色体不分離が40~60%，欠失10%，点突然変異および微小欠失が30%である (Benedict *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1992)。肝細胞癌70例中、染色体16番上でLOHを認めた36例の癌組織について、共通の対立遺伝子喪失を示す染色体領域を解析した報告でも、染色体不分離と重複によると思われるものが19例で、その比率はむしろ高い (Tsuda *et al.*, 1990)。電離放射線が染色体不分離を誘発しないことはよく知られているにしても、ヒト・リンパ芽球様細胞で自発 *DAP^r* 変異体クローニングにも不分離がみられない理由は不明である。

常染色体上のがん抑制遺伝子に隣接する細胞増殖に関する必須遺伝子を想定すると、これを巻き込むような大きな欠失が第2ヒットである場合には、必須遺伝子の遺伝子量効果が現れる可能性がある。体細胞組換えや染色体不分離と重複の場合にはその可能性が小さく、がん細胞の増殖優位は妨げられない。

6. おわりに

TG^r 変異を誘発しない農薬パラコート、新キノロン系抗菌剤、polyADPR ポリメラーゼ阻害剤のベンザミドなどが有意に *DAP^r* 変異を誘発し、またアルキル化剤 MNNG、DNA クロスリング剤ジエポキシブタンなどでは *TG^r* 変異よりはるかに高率に *DAP^r* 変異が誘発され

ることがわかっている。これらの内、半分以上が体細胞組換えによる。このように、*aprt* 座位では *hprt* 座位では検出できない体細胞組換えや巨大な欠失などの突然変異を検出することが可能であり、変異原検定に際し、両座位の検出マーカーをうまく使い分ける工夫が必要であろう。

謝 辞

我々の実験結果につき有益なるご助言を賜った近畿大学原子力研究所藤川和男、近藤宗平両先生に深謝します。

参考文献

Becker, H. J. (1976) Mitotic recombination, In: M. Ashburner and E. Novitski (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*, Academic Press, London, Vol. 1c, pp. 1020-1087.
Benedict, W. F., E. S. Srivatsan, C. Mark *et al.* (1987) Complete or partial homozygosity of chromosome 13 in primary retinoblastoma, *Cancer Res.*, **47**, 4189-4191.
Cavenee, W. K., T. P. Dryja, R. A. Phillips *et al.* (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma, *Nature*, **305**, 779-784.
Fujimori, A., A. Tachibana and K. Tatsumi (1992) Allelic losses in mutations at the *APRT* locus of human lymphoblastoid cells, *Mutat. Res.*, **269**, 55-62.
Ohno, S. (1974) Significance of aneuploidy in malignant cells, In: J. German (Ed.), *Chromosomes and Cancer*, John Wiley & Sons, New York, pp. 77-94.
Tatsumi, K., A. Fujimori, A. Tachibana and Y. Houki (1992) Concurrent analyses of mutagenesis by ionizing radiation at the *APRT* and *HPRT* loci in human lymphoblastoid cells, In: T. Sugahara, L. A. Sagan and T. Aoyama (Eds.), *Low Dose Irradiation and Biological Defense Mechanisms*, Elsevier, Amsterdam, pp. 331-334.
Tsuda, H., W. Zhang, Y. Shimosato *et al.* (1990) Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 6791-6794.
Zhu, X., J. M. Dunn, A. D. Goddard *et al.* (1992) Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma, *Cytogenet. Cell Genet.*, **59**, 248-252.

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 稽務幹事 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、国際交流幹事、編集幹事および会計監査は会長が委嘱する。この他会長は必要な場合には会員の中より若干名を指名し総会の承諾を得て、評議員に加えることができる。
役員および評議員の任期は2年とする。
役員が同じ任務に引続いて就任する場合には2期をもって限度とする。
評議員会は会員を代表し、事業計画、経費の収支、予算決算およびその他の重要事項について審議する。
第9条 本会は年1回総会を開く。
総会において会則の改廃制定、予算・決算の承認、その他評議員会において審議した重要事項の承認を行う。
第10条 本会の事務執行機関は会長および4名の幹事をもって構成する。
会長は執行機関の長となり、また本会を代表する。
第11条 本会の事務は暦年による。
第12条 本会に名誉会員をおく。

附記

1. 本会則は平成6年1月1日より施行する。
2. 本会の事務所を
東京都世田谷区上用賀1-18-1
國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。

会長		祖父尼 俊雄	氏名		所屬
庶務幹事	林 真				
会計幹事	田中憲穂	荒木 明宏	日本バイオアッセイ研究センター		
国際交流幹事	大西克成	石館 基	オリンパス光学工業(株)・染色体研究センター		
編集幹事	若林敬二	太田 敏博	東京薬科大学・生命科学部		
会計監査	佐藤茂秋	大西克成	徳島大学・医学部		
	白須泰彦	葛西 宏	産業医科大学・産業生態科学研究所		
賞等選考委員	松島泰次郎 (委員長)	菊川清見	東京薬科大学・薬学部		
	木苗直秀	木苗直秀	静岡県立大学・食品栄養科学部		
	島田弘康	黒田行昭	麻布大学・環境保健学部		
	葛西宏	坂本京子	(財)食品薬品安全センター・秦野研究所		
	菊川清見	瀧谷徹	(財)食品薬品安全センター・秦野研究所		
	長尾美奈子	島田弘康	第一製薬(株)・開発研究所		
	後藤純雄	清水英佑	東京慈恵会医科大学・医学部		
編集委員	石館基 (委員長)	須藤鎮世	伊藤ハム(株)・中央研究所		
	鈴木潤三	祖父尼俊雄	国立衛生試験所・変異遺伝部		
	瀧谷徹	田中憲穂	(財)食品薬品安全センター・秦野研究所		
	太田敏博	長尾美奈子	国立がんセンター研究所・発がん研究部		
	下位香代子	西富保	(株)三菱化学安全科学研究所・鹿島研究所		
	西富保	能美健彦	国立衛生試験所・変異遺伝部		
	降旗千恵	林 真	国立衛生試験所・変異遺伝部		
企画委員	秋山實利	早津彦哉	岡山大学・薬学部		
	能美健彦	松島泰次郎	日本バイオアッセイ研究センター		
	森秀樹	山添 康	東北大学・薬学部		
	早津彦哉	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・生化学部		
		渡部烈	東京薬科大学・薬学部		

(五十音順)

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

6. 校正

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

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部単位で申し込みすること。

住 所・所 属 等 変 更 届

平成 年 月 日

環境変異原研究 執筆規定

- 用語は日本語または英語とする。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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で書く。
- 数字は算用数字を用い、単位は英文の慣用による省略記号を用いる。
- 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。
- 句読点はカンマ（，）およびピリオド（。）とする。
- 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。
- 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。
- 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。
- 本文中の文献引用は著者名および年号をもってする。
- 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
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	(和)
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

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

学歴	学部	学部学校名	卒業年次 年		
	大学院	課程学校名	修了年次 年		
学位					
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

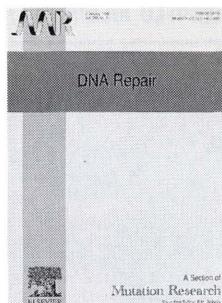
賛助会員名簿（五十音順）

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

家田貿易株式会社
エスピー食品株式会社 中央研究所
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
三共株式会社 安全性研究所
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
明治製薬株式会社 製品総合研究所

Mutation Research

DNA Repair

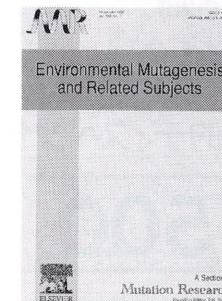


Audience: Molecular Geneticists, Molecular Biologists, Biochemists, Researchers in Mutagenesis and Cancer

Abstracting/Indexing

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

1996: Volumes 362-364 in 9 issues/Subscription Price: Dfl. 1407.00/ISSN 0921-8777



Mutation Research

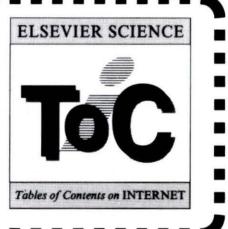
Environmental Mutagenesis and Related Subjects

Audience: Environmental Scientists, Mutageneticists, Toxicologists

Abstracting/Indexing

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

1996: Volumes 359-361 in 9 issues/Subscription Price: Dfl. 1407.00/ISSN 0165-1161



☞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

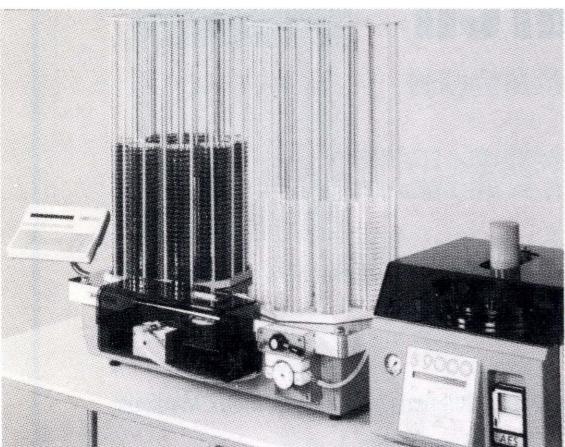
URL: <http://www.elsevier.nl/locate/estoc>



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
〒106 東京都港区東麻布1-9-15 東麻布1丁目ビル4F
フリーダイアル : 0120-383-608 ファックス : 03-5561-5047
E-mail : KYF04035@niftyserve.or.jp

全自动培地作成システム

FULLY AUTOMATED MEDIA PREPARATION SYSTEM



全自动培地作成システムは、自動培地分注装置APS450と新型培地滅菌保温器S9000で構成され、いかなる要求にも充分に適用できるシステムを初めて市場に出ました。

種火のいらない電子着火式ブンゼンバーナー

ガスプロфиー



- コンパクト・低価格。
- IRセンサーによる電子着火。
- ガス配管不要(オプション装着)。
- タイマー/連続点火/フットスイッチ切替え付

MC707P

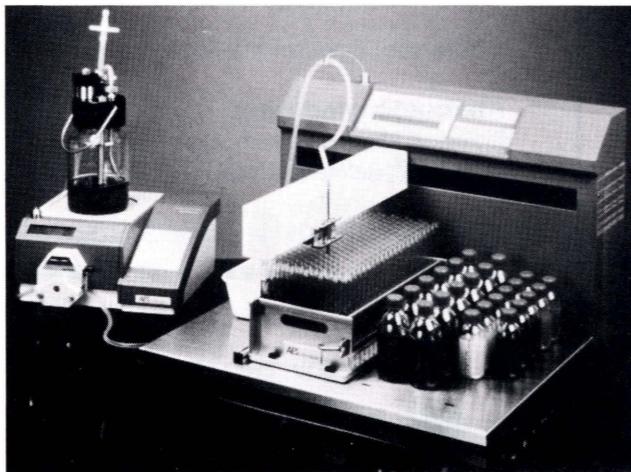
コロニーカウンター



- お手持ちのサインペンで使えます。
- ×2のレンズにより、コロニーを容易に判別できます。
- カウント数は、見易いLED表示。
- プリンター接続可能(オプション)。

精巧な、多目的ディスペンサー

XY500



XY500は、2方向軸運動を行なうマイクロプロセッサー駆動のアームがあります。どんな種類の容量分注器(シリング、ポンプ、ペリスチルティックポンプ等)でも楽に使用することができる。どんな液体サンプルもスピードと正確さで手をわざわざ分注することができる。



フランス・AES Laboratoire総代理店

株式会社 東京エム・アイ商会

〒104 東京都中央区新川2-7-1

TEL (03) 3551-7873

FAX (03) 3551-7318

MC707P

コロニーカウンター



- お手持ちのサインペンで使えます。
- ×2のレンズにより、コロニーを容易に判別できます。
- カウント数は、見易いLED表示。
- プリンター接続可能(オプション)。

新製品

オリエンタルの変異原性試験用試薬 S-9/コファクター セット

無菌凍結品の変異原性試験用コファクターが、S-9とセットで販売になります。

より便利に! より手頃な価格に!

特徴

- エームステスト用と染色体異常試験用の2種類の試薬セットです。
- コファクターが無菌凍結品になり、解凍後S-9と混合するだけで使用できます。
- S-9とコファクターは実用的な分注量比ですから、混合が容易です。
- S-9とコファクターは未混合ですから、混合条件を変更しての試験が可能です。また、保存中にS-9とコファクターの未知の反応が起こりません。
- セット販売ですから、購入と在庫管理が便利です。
- 包装単位を少量化し、より手頃な価格に致しました。

製品名	包装単位	備考
エームステスト用 S-9/コファクターAセット	S-9 1ml × 10本 コファクターA 9ml × 10本	エームステストでのデータを添付します
染色体異常試験用 S-9/コファクターCセット	S-9 2ml × 3本 コファクターC 4.7ml × 3本	染色体異常試験でのデータを添付します

(保存は-80°Cでお願い致します)

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

- 従来品は引き続き取扱いしております。

変異原性試験用 S-9 (無菌凍結品)	2ml × 10本
エームステスト用 コファクターI (凍結乾燥品)	9ml用粉末 × 10本

誘導法の変更や、サル、イヌなどラット以外のS-9またはミクロソームの調製、その他、技術的なお問合せは、弊社バイオ部までお願い致します。

製造元

 オリエンタル酵母工業株式会社

〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目8番3号
(日本橋東硝ビル)
Tel.(03)3663-8210

販売元

 和光純薬工業株式会社

本社 〒541 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
電話 (06)203-3741(代表)
東京支店 〒103 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号
電話 (03)3270-8571(代表)

Wako

環境汚染物質PAHsの分析に最適

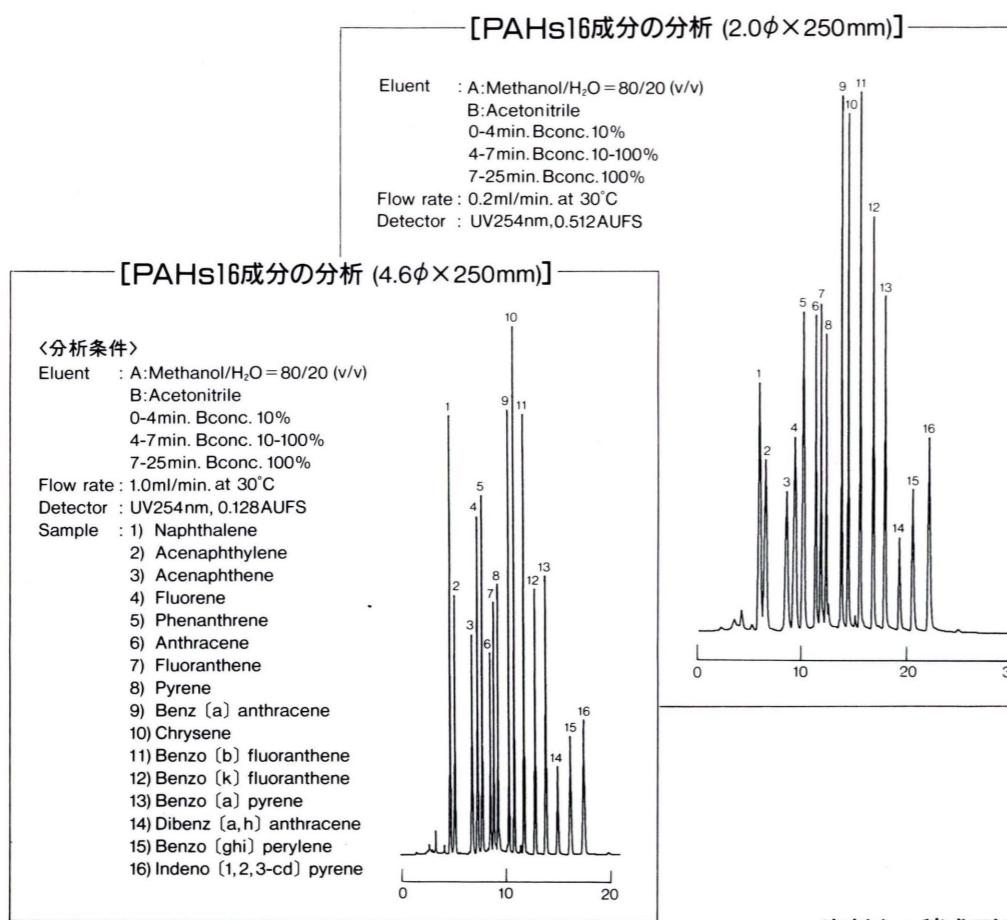
HPLC用パックドカラム Wakopak Wakosil-PAHs

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



* 資料をご請求下さい。

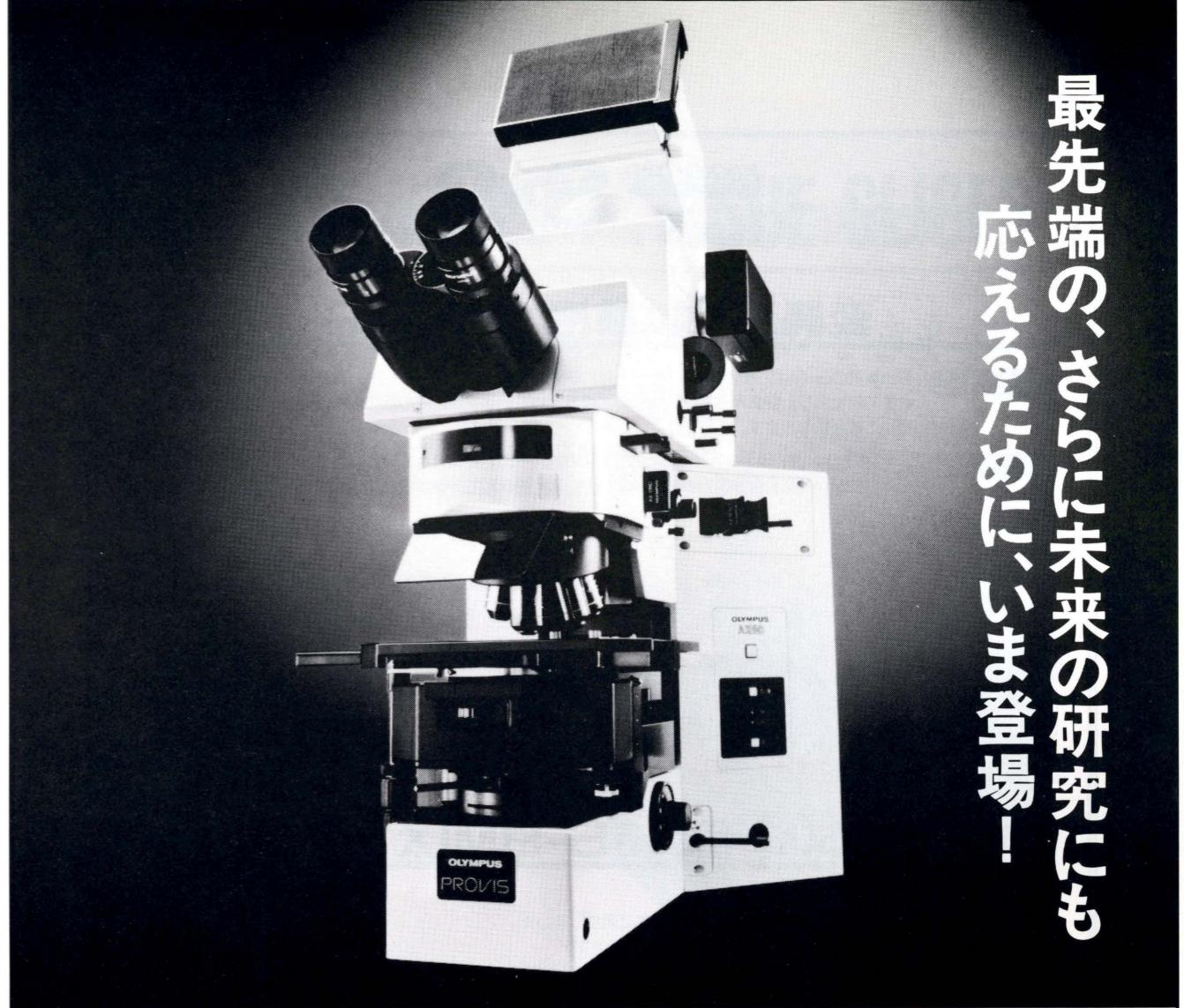
和光純薬工業株式会社

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

最先端の、さらに未来の研究にも
応えるために、いま登場！



PROVISは、最先端の、さらに未来の研究に応えるUIS光学系とともに、研究の進展に伴って性能や機能を柔軟に拡げていける、豊かなシステム性を内包。次世紀にも、研究顕微鏡の標準・規範になり得る"原器"として、オリンパスの先端技術のすべてを結集させました。

観察から撮影まで、
一貫した自動化を実現した
最高級写真顕微鏡 AX80

対物レンズ変換、フォーカシング、コンデンサ変換、調光、励起光の切換等を、すべて電動化。多様な観察法へのスピーディな切換えを可能にしました。さらに、撮影、各種光路への切換え、測光、ズーム変倍なども自動化。すべての操作をマルチコントロールボックスで集中制御できます。

最先端研究ニーズに、世界最高の光学性能と
豊かなシステムで対応
最高級システム研究顕微鏡 AX70

独自のUIS光学系による、高解像度、高コントラストの最高の観察像。研究の広がりに対応して、システムを拡張していく鏡基の剛性、照明の多様性。周辺機器の配備や大型標本の観察もラクな操作環境。さらに、U-PHOTOの搭載により撮影の全自動化も可能に。研究の進展を限りなくサポートします。

未来性能を先取りした
トップリサーチャの研究顕微鏡

PROVIS

AX
AX80/AX70

人から発想します。オリンパス
OLYMPUS[®]

オリンパス光学工業株式会社 販売元/オリンパス販売株式会社 カタログのご請求は、オリンパス販売株式会社 〒101 東京都千代田区神田駿河台3-4(龍名館ビル)TEL 03-3251-8971

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S口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。活性には異常がありませんので、よく攪拌して御使用下さい。

●包装単位

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

●活性データ

ロット毎に下記の生化学的活性データを添付致します。

分 画	測 定 テ ー タ
S-9 (9,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量 DMN脱メチル酵素活性 アニリン水酸化酵素活性 ベンゾ(a)ピレン水酸化酵素活性
ミクロソーム (105,000×g分画)	タンパク質含量 チトクロームP-450含量

ロット毎に下記の変異原活性データ(突然変異株数)を添付致します。

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

* Salmonella typhimurium

エームス試験用凍結S-9MIX

特長

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

●包装単位

10ml × 8本、5ml × 4本

染色体異常試験用凍結S-9MIX

特長

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

●包装単位

3.5ml × 3本

カタログNo.	品 名	包 装	価 格
S-9	変異原性試験用凍結S-9	1.5ml × 12本	¥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

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



 家田貿易株式会社

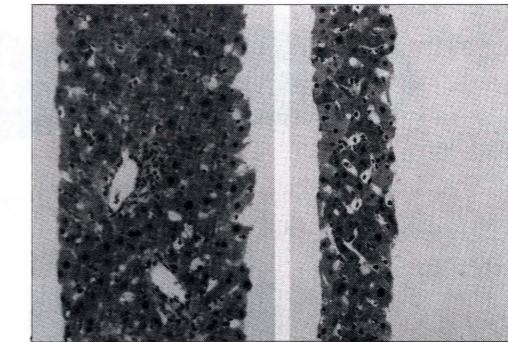
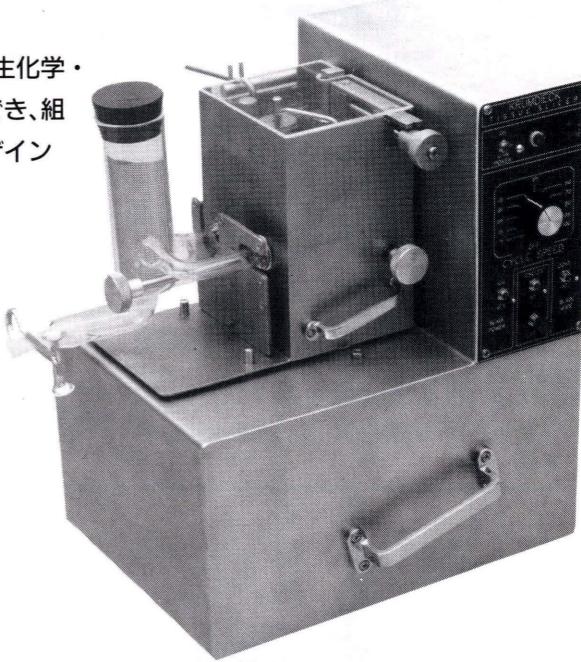
東京：〒113 東京都文京区本郷3-14-16 EKビル
TEL.03(3816)2861 FAX.03(3814)5347
大阪：〒564 大阪府吹田市南金田1-14-5
TEL.06(338)1518 FAX.06(338)5626

THE KRUMDIECK TISSUE SLICER

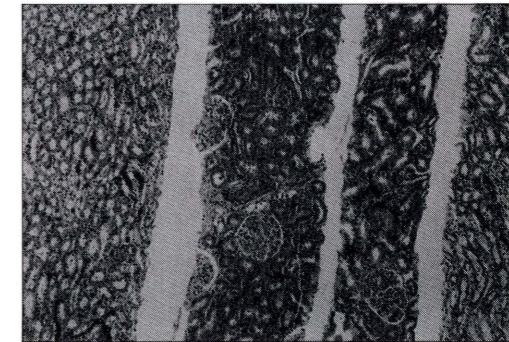
生きた組織の無菌スライスができます。

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。



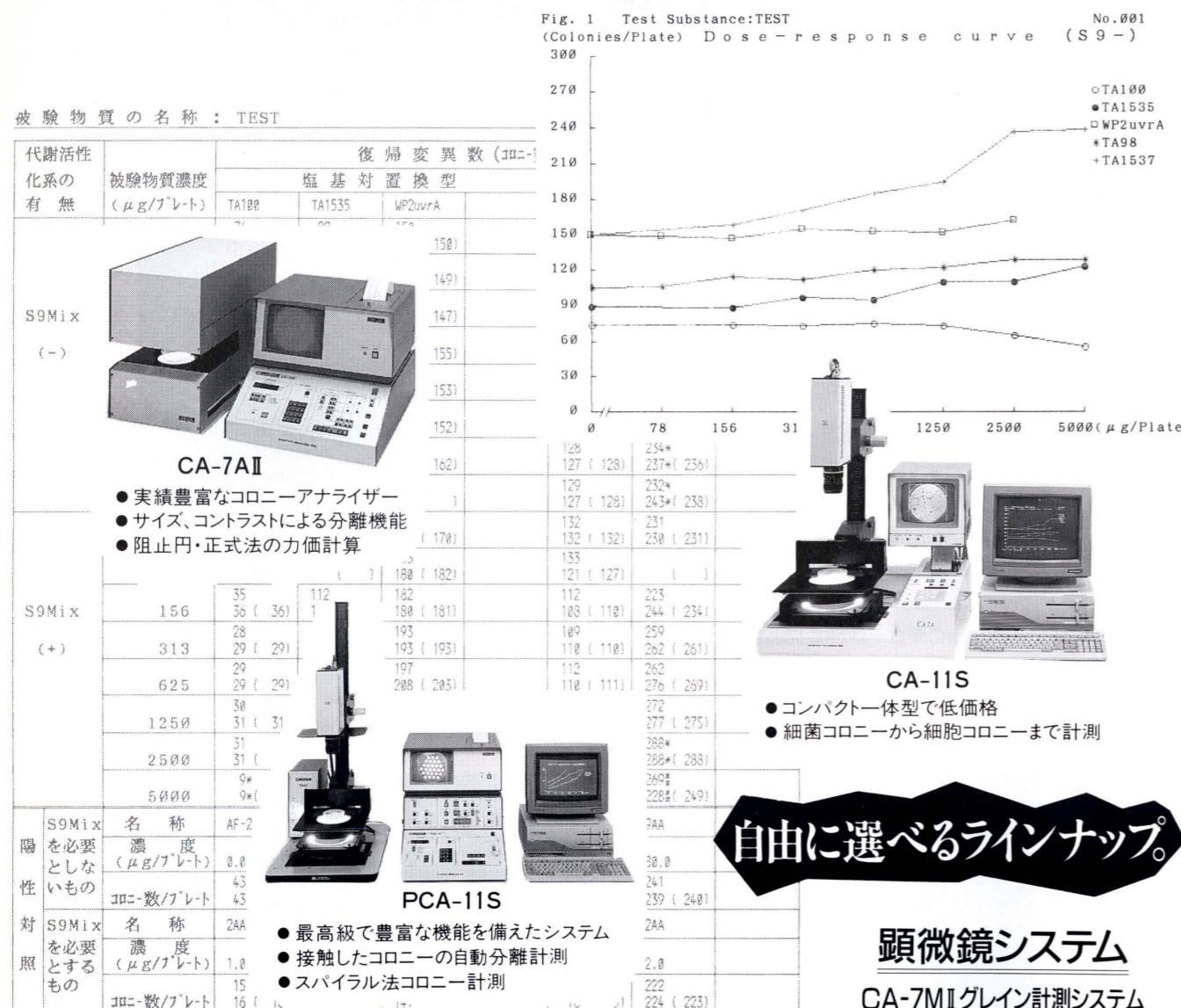
販売元
ショーシンEM株式会社

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

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。



- 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あります。お気軽にご相談下さい。

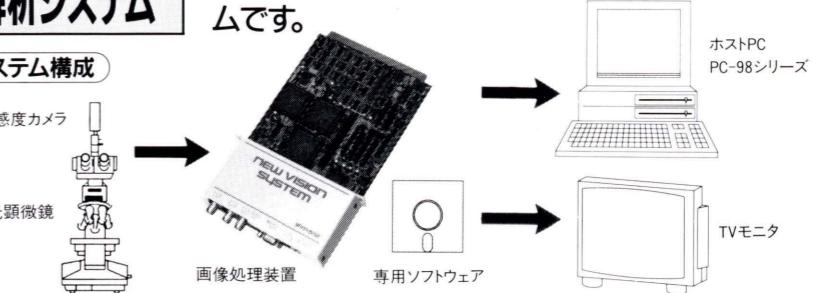
製造発売元

SSC 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)

BIOSCOOP® DNA損傷画像解析システム

《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

開発製造元

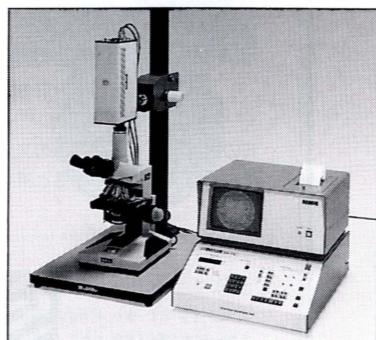
(社)日本システムハウス協会会員)

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

顕微鏡システム

CA-7MIIグレイン計測システム



CA-7MII

編集後記

今年度 (Vol. 18, No. 1) から、本誌は新しい装いのもとに再出発致しました。表紙のデザインを募集して参りましたが、結局、降旗委員の作品が採用されました。いかにも「環境変異原は怖い」という印象が伝わってきます。

本号は、大阪大会の特集号（後藤委員担当）ですが、次号 No. 2 は本学会 25 周年特別号（清水大会長企画、下位委員担当）として出版予定です。Vol. 18, No. 3（来年 1 月発行予定、瀧谷委員担当）は本学会シンポジウムを掲載する予定ですが、一般論文も受け付けますので、奮って御投稿下さい（締切 11 月末）。

編集委員長 石館 基

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 18 卷 第 1 号 1996 年

平成 8 年 7 月 10 日 印刷
平成 8 年 7 月 15 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

目 次

第 24 回大会特別講演

化学物質のリスク評価—よりよき手法を求めて—

和田 攻…… 1

総 説

研究奨励賞授賞講演

気相暴露による微生物変異原性試験法の開発とその利用

荒木明宏…… 5

研究奨励賞授賞講演

突然変異修飾因子の検索とその作用機構に関する研究

下位香代子…… 15

一般論文

河川の変異原性とその原因物質の検索について

佐々木裕子, 木瀬晴美, 菊池幹夫 21

K-ras codon 12 mutation induction by UV but not by 4NQO, analyzed by PCR following differential dot-blot hybridization, in hypermutable human RSa cells

N. Suzuki, H. Suzuki, T. Ishizuka and H. Yamamori…… 29

サルモネラ試験菌株 TA102 及び TA104 に対する活性酸素産生系の変異原性

羽倉昌志, 筒井美枝, 餅田久利, 杉原芳樹, 見上 孝, 佐神文郎…… 35

特別企画 第 24 回大会ミニシンポジウム

「抗変異・抗発がんとラジカル」

大腸菌 mutT 株のラジカル性自然突然変異の抑制

三好香苗, 香嶋伸一, 松澤昌夫, 宮坂良一, 山本 孝, 西岡 一…… 41

食品におけるフリーラジカル性変異原の生成とその阻止 菊川清見, 平本一幸, 加藤哲太…… 47

野菜抽出物および食用油の抗脂質ラジカル活性と抗 DNA 切断作用: がん予防と抗ラジカル活性 前田 浩…… 53

フラボノイド化合物の抗発がんプロモーター作用と酸素ラジカル捕捉作用 西野輔翼, 井上純子, 川西正祐…… 63

抗酸化剤によるヘテロサイクリックアミン発癌の抑制 広瀬雅雄, 二口 充, 白井智之…… 67

Suppressive Effects of Natural Antioxidants on Carcinogenesis in Digestive Organs H. Mori, S. Sugie, T. Tanaka, H. Makita and N. Yoshimi…… 73

「ヒト集団の環境影響モニタリング」

DNA メチル化のモニタリング 佐藤茂秋, 大杉理恵…… 79

Chromosome Abnormality in Human Gametes by Exposure to Mutagens

Y. Kamiguchi, H. Tateno, S. Watanabe and K. Mikamo…… 83

アルコール感受性を規定する遺伝素因と染色体変異 竹下達也, 森本兼彙…… 87

環境因子とアトピー性皮膚炎 堀川達弥, 市橋正光…… 91

「*In vitro* 遺伝子突然変異試験法の新たな展開」

Principles of the Mouse Lymphoma Assay and Advantages of the Microwell Method J. Clements and C. Hazleton…… 97

マウス・リンゴーマ試験は染色体異常誘発物質を検出できるのか 島田弘康…… 103

ヒト・リンパ球細胞株の tk 遺伝子を利用した欠失型, 組換え型突然変異 本間正充, 林 真, 祖父尼俊雄…… 107

ヒト・リンパ芽球様細胞の APRT 遺伝子を利用した組換え型突然変異の検出と分子レベルの解析 異 純一, 立花 章, 藤森 亮, 佐々木正夫…… 113

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

住所・所属等変更届

日本環境変異原学会 入会申込書

賛助会員リスト